

**Федеральное государственное бюджетное учреждение
«Национальный медицинский исследовательский центр онкологии
имени Н. Н. Петрова»**

Министерства здравоохранения Российской Федерации

На правах рукописи

МАЛЕК АНАСТАСИЯ ВАЛЕРЬЕВНА

**ВОЗМОЖНОСТИ ПРИМЕНЕНИЯ НАНОВЕЗИКУЛЯРНЫХ
ТЕХНОЛОГИЙ В ОНКОЛОГИИ**

14.01.12 – Онкология

ДИССЕРТАЦИЯ

на соискание ученой степени

доктора медицинских наук

Научные консультанты:

Доктор медицинских наук, профессор

Берштейн Лев Михайлович

Доктор биологических наук, профессор

Красильников Михаил Александрович

Санкт-Петербург – 2021г

ОГЛАВЛЕНИЕ

ВВЕДЕНИЕ.....	5
ГЛАВА 1. ОПРЕДЕЛЕНИЕ ОБЪЕКТА ИССЛЕДОВАНИЯ	24
1.1 История открытия и современная систематика внеклеточных нановезикул (ВНВ)	24
1.2 Методы визуализации и анализа структуры ВНВ.....	27
1.3 Биогенез и физиологические функции экзосом	31
1.4 Участие ВНВ в развитии онкологических заболеваний.....	34
1.5 Формулировка цели и задач исследования.....	39
ГЛАВА 2. РАЗРАБОТКА МЕТОДОВ ВЫДЕЛЕНИЯ ВНВ ИЗ БИОЛОГИЧЕСКИХ ЖИДКОСТЕЙ.....	42
2.1 Сравнительный обзор методологических подходов.....	42
2.2 Задача и подходы к ее решению.....	51
2.3 Методы и результаты	52
2.3.1 Стандартная технология: ультра-центрифугирование (УЦ).....	52
2.3.2 Выделение ВНВ из мочи путем агглютинации с помощью лектинов....	56
2.3.3 Выделение ВНВ из плазмы для последующего анализа экзосомальных микроРНК методом ОТ-ПЦР	62
2.3.4 Выделение ВНВ из плазмы для последующего анализа поверхностных белковых маркеров методом проточной цитометрии	67
2.4 Выводы и методологические рекомендации	73
ГЛАВА 3. ДИАГНОСТИЧЕСКИЙ ПОТЕНЦИАЛ АНАЛИЗА ЦИРКУЛИРУЮЩИХ ЭКЗОСОМ.....	74
3.1 Обзор литературы: состав ВНВ плазмы, его анализ и интерпретация	74
3.2 Задача и подходы к ее решению.....	80
3.3 Материалы и методы.....	81
3.3.1 Сбор и консервация биологического материала (плазмы, мочи)	81
3.3.2 Выделение ВНВ.....	82
3.3.3 Характеристика выделенных ВНВ	83
3.3.4 Выделение экзосомальной РНК.....	85

3.3.5 Количественный анализ микроРНК методом ОТ-ПЦР	85
3.4 Результаты.....	86
3.4.1 Диагностика колоректальной карциномы (КРК).....	86
3.4.2 Диагностика рака предстательной железы (РПЖ).....	94
3.4.3 Дифференциальная диагностика узловых заболеваний щитовидной железы (УОЩЖ).....	99
3.4.4 Прогноз эффекта нео-адьювантной терапии рака молочной железы (РМЖ)	111
3.4.5 Пути оптимизации методов анализа экзосомальных микроРНК.....	121
3.4.5.1 Возможности выделения фракции тканеспецифичных экзосом.....	122
3.4.5.2 Оптимизация методики анализа микроРНК с помощью ОТ-ПЦР.....	128
3.5 Выводы и оценка направлений дальнейших исследований	134
ГЛАВА 4. ИССЛЕДОВАНИЕ РОЛИ ВНВ ПЛАЗМЫ В ПРОЦЕССЕ	
МЕТАСТАТИЧЕСКОЙ ДИССЕМИНАЦИИ.....	
4.1 Обзор литературы: физиологические и патологические функции циркулирующих экзосом	136
4.2 Задача и подходы к ее решению.....	140
4.3 Материалы и методы.....	141
4.3.1 Выделение и характеристика ВНВ	141
4.3.2 Клеточные линии и <i>in vitro</i> эксперименты	142
4.3.3 Оценка инвазивности клеток в модели зебрафиш (<i>in vivo</i>)	143
4.4 Результаты.....	144
4.4.1 Характеристика ВНВ и анализ компонентов везикулярной поверхности.....	144
4.4.2 Эффект взаимодействия ВНВ плазмы и клеток РМЖ.....	150
4.4.3 Изменение стимулирующей активности экзосом после «удаления» плазменных белков	153
4.4.4 Оценка роли сигнального пути FAK в регуляции реакции клеток на «экзосомную» стимуляцию.....	156
4.5 Выводы и перспективы клинического применения	158

ГЛАВА 5. ОЦЕНКА ВОЗМОЖНОСТИ ДОСТАВКИ ЛЕКАРСТВЕННЫХ СРЕДСТВ С ПОМОЩЬЮ ВНВ.....	161
5.1 Обзор литературы: экзосомальная доставка терапевтических РНК, «state of the art»	161
5.2 Задача и подходы к ее решению	164
5.3 Материалы и методы.....	165
5.3.1 Выделение из культуральных сред, характеристика ВНВ.....	165
5.3.2 Формирование трансфекционных комплексов Ехo(PEI/miR)	165
5.3.3 Оценка свойств трансфекционных комплексов <i>ex vivo, in vitro, in vivo</i>	166
5.4 Результаты.....	167
5.4.1 Формирование и оценка стабильности комплекса Ехo(PEI/miR)	167
5.4.2 Анализ эффекта инактивации «таргетных» молекул <i>in vitro</i>	171
5.4.3 Оценка влияния источника ВНВ на их трансфекционную активность	173
5.4.4 Анализ терапевтического эффекта комплекса Ехo(PEI/siSurv)	176
5.4 Выводы и перспективы клинического применения	178
ЗАКЛЮЧЕНИЕ.....	181
СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ.....	186
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ	187
СПИСОК ИЛЛЮСТРАЦИЙ.....	228

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность темы и степень ее разработанности

В 2013 году работа трех исследователей (James E. Rothman, Randy W. Schekman, Thomas C. Südhof), описавших феномен везикулярного межклеточного транспорта, была отмечена Нобелевской премией по физиологии и медицине. Этот факт указал на значимость сделанного ими открытия и стимулировал дальнейшие исследования. За последние несколько лет существенно углубились фундаментальные представления о структуре и биологических функциях внеклеточных нановезикул (ВНВ), создана система классификации, организованы общедоступные базы экспериментальных данных. Достигнут значимый прогресс в понимании роли ВНВ в регуляции различных физиологических и патологических процессов, включая онкологические заболевания. Таким образом, концепция везикулярного межклеточного взаимодействия быстро заняла должное место в рамках фундаментальной дисциплины - физиологии. Следуя логике Альфреда Нобеля, объединившего исследования в области физиологии и медицины в одну категорию, можно было бы ожидать появления нового направления медицинской науки. Очевидно, что анализ везикулярного (субклеточного) состава физиологических сред, прежде всего циркулирующей плазмы, имеет диагностический потенциал, заполняя «слепую зону» между стандартными анализами клеточного и молекулярного состава крови (т.н. клинический и биохимический анализы). Возможность контролируемой модификации состава циркулирующих нановезикул открывает перспективы разработки новых терапевтических подходов в различных областях практической медицины. Но уверенное появление нового направления современной физиологии, сопровождается медленным развитием новой области медицинской науки. Поэтому перемещение фокуса исследований из плоскости фундаментальной биологии в плоскость практической медицины представляется необходимым.

Разработка прикладных аспектов «науки о везикулах» особенно важна в области онкологии, т.к. определяет возможности создания принципиально новых диагностических и лечебных подходов. Социальная значимость проблемы

своевременной диагностики и эффективной терапии онкологических заболеваний определяет актуальность темы данного исследования.

При достаточном объеме фундаментальных исследований, разработка и внедрение «нановезикулярных» технологий в практическую онкологию находится на начальном этапе развития. При этом требует отдельного рассмотрения два аспекта: разработка «стратегии» (что делать?) и «тактики» (как делать?) «нановезикулярных» подходов.

Тактика: степень разработанности и адаптации к клинической практике методов выделения и анализа ВНВ. Выделение ВНВ из физиологических жидкостей является нетривиальной задачей по ряду объективных причин, детальное обсуждение которых представлено в Главе 2 (параграф 2.1.). Методы, используемые в рамках фундаментальных исследований, основаны на различных (физических или биохимических) особенностях ВНВ и поэтому достаточно разнообразны. Так, известная физическая плотность везикул позволяет использовать технологию центрифугирования; с учетом размера везикул можно применять фильтрационные методики; особенности растворимости везикул и структуры их мембраны лежат в основе различных методов преципитации; специфические белковые маркеры на поверхности ВНВ позволяют использовать технологию иммуносорбции, и т.д. Но, все перечисленные подходы имеют недостатки (методологическая сложность, трудоемкость, высокая стоимость, недостаточная «чистота» или эффективность выделения), которые препятствуют их применению в рутинной клинической практике. Ситуация осложняется отсутствием простых и надежных методов контроля качества выделения ВНВ. Так, можно констатировать, что методы выделения ВНВ из физиологических сред требуют если не разработки, то существенной оптимизации и адаптации к задачам клинической онкологии. Этому была посвящена часть данного исследования (Глава 2).

Разработка диагностических методов основана на анализе биохимического состава ВНВ. В целом, состав везикул может быть исследован стандартными методами молекулярной биологии. Так, для широкого «профайлингового» анализа

белкового состава везикул применима масс-спектрометрия; оценка относительной концентрации определенных белковых молекул в составе ВНВ может быть проведена с помощью дот- / вестерн- блоттинга или проточной цитометрии. Для анализа нуклеиновых кислот (преимущественно РНК) в составе ВНВ применяются традиционные методы: секвенирование (по Сенгеру или т.н. технологии «нового поколения»: пиросеквенирование, лигазное секвенирование, Solexa, ионное полупроводниковое секвенирование), технология ДНК-микрочипов (micro-arrays) и различные вариации метода обратной транскрипции с последующей полимеразной цепной реакцией. В целом, все эти методы широко и активно применяются для анализа состава ВНВ, и большинство из перечисленных технологий были использованы в рамках представленного исследования.

Принципиальным недостатком всех упомянутых выше методов в контексте анализа ВНВ является невозможность их применения по отношению к единичной везикуле. Все эти методы предполагают исследование материала, полученного путем физической дезинтеграции (лизиса) популяции везикул, выделенных каким-либо образом из анализируемой жидкости. Поэтому результаты исследований, проведенных любым из упомянутых выше методов, во-первых, отражают статус, «усредненный» для популяции везикул, и, во-вторых, зависят от чистоты выделения последних. Так, например, плазма содержит гетерогенную популяцию везикул различного генеза, а богатый состав белков и липопротеинов плазмы определяет ту или иную степень контаминации анализируемого материала. Аналогичные факторы имеют место при анализе ВНВ, выделенных из любых других физиологических сред любыми другими методами. Эти аспекты должны быть учтены при интерпретации результатов анализа компонентов ВНВ с помощью перечисленных аналитических технологий.

Степень достоверности результатов, получаемых при анализе таких «комплексных» образцов может быть повышена путем оптимизации существующих методик выделения и анализа (параграф 3.4.5.1 и параграф 3.4.5.2), но качественное повышение информативности «нановезикулярной» диагностики будет достигнуто лишь путем разработки методов анализа отдельных везикул в

составе анализируемых образцов. Например, технология микрофлюидики создает возможность физической «изоляции» отдельных везикул, а феномен плазмонного резонанса позволяет детектировать отдельные молекулы в составе интактной нановезикулы. Но такие разработки не входили в план представленного исследования.

Стратегия: степень разработанности подходов к решению клинических (диагностических и терапевтических) задач. В базе данных PubMed (www.ncbi.nlm.nih.gov) опубликованы результаты нескольких сотен исследований диагностического значения циркулирующих нановезикул, но слишком «разнообразные» результаты таких работ затрудняют их сравнение, анализ и использование. В базе ClinicalTrials (www.clinicaltrials.gov) зарегистрированы несколько десятков клинических испытаний методов диагностики или прогнозирования течения онкологических заболеваний на основе анализа циркулирующих везикул. Рядом биотехнологических компаний ведутся разработки диагностических тест-систем. Пока лишь один тест (ExoDx®Prostate/IntelliScore) для диагностики рака предстательной железы (РПЖ) допущен к использованию (в США), но он пока не включен в обязательный диагностический алгоритм.

В силу отсутствия универсальных технологических решений, результаты научных исследований зависят от методов, выбранных исследователями. Редкие научные работы сфокусированы на поиске патогенетической связи между наблюдаемыми особенностями состава циркулирующих ВНВ и процессом развития онкологического заболевания. В целом, исследования в данной области имеют преимущественно описательный характер. Даже с учетом количества опубликованных исследований и ведущихся клинических испытаний, степень разработанности этой темы не может быть оценена как достаточная. Поэтому целью представленного исследования была оценка диагностического потенциала циркулирующих нановезикул в рамках нескольких нозологических форм (Глава 3, параграфы 3.4.1., 3.4.2., 3.4.3., 3.4.4.) с учетом использования доступных методологических подходов.

Разработка терапевтических решений, основанных на использовании ВНВ, ведется активно многими исследовательскими лабораториями и клиническими центрами, и по различным направлениям. База данных PubMed объединяет тысячи публикаций на эту тему. За последние годы в печати появилось множество экспериментальных исследований, формирующих концепцию «патологической» роли везикул, секретлируемых опухолевыми клетками (tumor-derived vesicles / tumor-derived exosomes) в процессе развития онкологических заболеваний. Не только описаны различные патологические эффекты этих везикул (обсуждается в Главе 1, параграф 1.4.), но и изучены молекулярные механизмы наблюдаемых явлений. В базе данных ClinicalTrials зарегистрировано несколько десятков клинических испытаний различных подходов адьювантной (дополнительной) терапии, в основе которой лежат методы модификации эффектов везикул, секретлируемых опухолевыми клетками. Разработан, запатентован и проходит стадию клинических испытаний аппарат для экстракорпорального выделения нановезикул из циркулирующей плазмы (NCT04453046, Aethlon Medical Inc.). В целом, степень разработанности методов терапевтического воздействия на ВНВ опухолевого происхождения соответствует, если не опережает, фундаментальным представлениям о патологических функциях этих везикул. Существенно меньшее внимание исследователей привлекает роль нормального пула ВНВ, циркулирующих с потоком плазмы. Единичные исследования не позволяют даже предположить характер (стимулирующий / угнетающий) воздействия нановезикул плазмы на опухолевые клетки. Этот аспект был практически не исследован, поэтому ему была посвящена существенная часть представленной работы (Глава 4).

Отдельного внимания заслуживают исследования собственно транспортной функции ВНВ и разработка систем доставки лекарственных средств на основе этого естественного феномена. В базе данных PubMed представлены сотни работ, в которых показана возможность, исследованы механизмы и биологические эффекты везикулярного межклеточного переноса различных молекул. Попытки практического «использования» транспортного потенциала ВНВ также формируют

область активных исследований (обсуждается в Главе 5, параграф 5.1.). Но работы в данной области пока слишком разнородны в плане природы лекарственных средств, источников ВНВ и используемых экспериментальных моделей (*in vitro*, *in vivo*), что затрудняет четкую оценку степени разработанности этой темы. В настоящее время зарегистрировано одно клиническое испытание системы доставки лекарственного препарата в клетки колоректальной карциномы (КРК) с помощью везикул растительного происхождения (NCT01294072), результаты этого исследования пока не известны. С учетом практической значимости разработки эффективных и безопасных систем адресной доставки противоопухолевых препаратов, частный аспект доставки терапевтических коротких РНК (сиРНК/siRNA, микроРНК/miRNA) был исследован в рамках представленной работы (Глава 5).

В целом разработка методов диагностики и терапии онкологических заболеваний на основе выделения, анализа и модификации состава циркулирующих нановезикул является активной, но относительно «молодой» областью медицинской науки. Для практической реализации имеющихся разработок фундаментального характера необходимы дальнейшие исследования.

Цель исследования

Целью диссертационного исследования является разработка новых подходов и оценка возможностей применения нановезикулярных технологий в клинической онкологии.

Задачи исследования

С учетом широкого диапазона возможных подходов к применению нановезикулярных технологий и недостаточной разработанности данной тематики, усилия были распределены между решением задач методологического характера, оценкой диагностического потенциала ВНВ и разработкой отдельных терапевтических направлений:

Задача 1. Разработка методов выделения ВНВ, применимых к решению клинических задач, в частности:

- 1.1. Оптимизировать стандартный протокол выделения экзосом из плазмы с помощью ультра-центрифугирования.
- 1.2. Разработать упрощенный (быстрый и экономичный) метод выделения экзосом из мочи.
- 1.3. Разработать метод выделения экзосом из плазмы, оптимизированный под задачу последующего ОТ-ПЦР анализа экзосомальных микроРНК.
- 1.4. Разработать метод выделения экзосом из плазмы, оптимизированный под задачу последующего анализа поверхностных белковых маркеров с помощью проточной цитометрии.

Задача 2. Оценка диагностической значимости методов анализа экзосомальных микроРНК на примере нескольких нозологий, определение путей оптимизации технологии анализа экзосомальной микроРНК, в частности:

- 2.1. Разработать методику и оценить диагностическую значимость анализа микроРНК из тотальной популяции экзосом плазмы для диагностики колоректальной карциномы (КРК).
- 2.2. Разработать методику и оценить диагностическую значимость анализа микроРНК из экзосом мочи для диагностики рака предстательной железы (РПЖ).
- 2.3. Разработать методику и оценить диагностическую значимость анализа микроРНК из тотальной популяции экзосом плазмы крови для дифференциальной диагностики узловых заболеваний щитовидной железы (УОЩЖ).
- 2.4. Разработать методику и оценить перспективы клинического применения анализа микроРНК из тотальной популяции экзосом плазмы крови с целью прогнозирования эффекта нео-адьювантной терапии рака молочной железы (РМЖ).
- 2.5. Оценить возможность и целесообразность выделения тканеспецифичной фракции экзосом из тотальной популяции экзосом плазмы с целью оптимизации показателей диагностической значимости разработанных ранее методик.
- 2.6. Оптимизировать методику анализа микроРНК с целью снижения стоимости и повышения технологичности ранее разработанных диагностических подходов.

Задача 3. Исследование патофизиологических эффектов и молекулярных механизмов взаимодействия нормального пула экзосом плазмы крови и опухолевых клеток, в частности:

- 3.1. Исследовать структуру (состав поверхности) экзосом плазмы.
- 3.2. Изучить в условиях эксперимента (*in vitro*, *in vivo*) биологические эффекты, которые оказывают экзосомы плазмы на опухолевые клетки.
- 3.3. Определить компоненты структуры экзосом плазмы, опосредующие (регулирующие) их взаимодействие с опухолевыми клетками.
- 3.4. Определить внутриклеточные сигнальные пути, опосредующие (регулирующие) реакцию опухолевых клеток на экзосомы плазмы крови.

Задача 4. Разработка и тестирование метода «нагрузки» экзосом «терапевтическими» РНК (сиРНК/siRNA, микроРНК/miRNA). В частности, предполагалось:

- 4.1. Разработать технологию «упаковки» комплексов РНК и катионных полимеров в экзосомы.
- 4.2. Оценить показатели трансфекционной эффективности комплексов Ехо(PEI/miR) в условиях *in vitro*.
- 4.3. Оценить влияние природы (источника) экзосом на свойства Ехо(PEI/miR) комплекса.
- 4.4. Оценить терапевтическую эффективность введения сиРНК, угнетающей синтез белка сурвивина (Survivin), в составе комплекса Ехо(PEI/siRNA) *in vivo*.

Научная новизна

В рамках представленного исследования:

1. Проведена оценка диагностической значимости экзосомальных микроРНК для ряда онкологических нозологий. В частности, впервые предложен метод дифференциальной диагностики узловых образований щитовидной железы и прогнозирования эффекта нео-адьювантной терапии рака молочной железы;
2. Проведен анализ белкового состава поверхности циркулирующих экзосом и получены новые данные о стимулирующем влиянии экзосом плазмы на циркулирующие (метастазирующие) опухолевые клетки;

3. Разработана новая технология «упаковки» терапевтических РНК в экзосомы и проведен анализ физических, биохимических и функциональных характеристик разработанной системы доставки РНК (*in vitro*, *in vivo*).

Теоретическая и практическая значимость

Теоретическая значимость характеризует результаты экспериментальных исследований, проведенных в рамках работы. В частности,

1. Анализ белкового состава поверхности циркулирующих ВНВ (экзосом) выявил факт наличия в составе везикулярной поверхности плазменных белков, которые определяют и отчасти унифицируют функциональные характеристики везикул.
2. Исследование эффекта, который оказывает контактное взаимодействие ВНВ (экзосом) плазмы и клеток рака молочной железы в условиях *in vitro* / *in vivo* экспериментов, выявило феномен стимуляции про-метастатической активности опухолевых клеток. Этот феномен может иметь значение в процессе метастатической диссеминации, что определяет возможность разработки новых подходов профилактики и/или лечения.
3. Экзосомальная стимуляция адгезивной и миграционной активности опухолевых клеток опосредуется сигнальной молекулой ФАК (focal adhesion kinase). Блокада ФАК-зависимого сигнального каскада существенно снижает способность опухолевых клеток отвечать на стимулирующее влияние ВНВ.
4. «Упаковка» трансфекционных комплексов, образованных катионным полимером (полиэтиленимином) и РНК (PEI/siRNA) в экзосомы, увеличивает их стабильность в условиях *in vitro* / *in vivo* экспериментов.
5. Трансфекционная активность экзосом, секретлируемых различными культурами опухолевых клеток, различна. Например, экзосомы, секретлируемые клетками рака яичников Skov-3, обладают наибольшей трансфекционной активностью по сравнению с везикулами, секретлируемыми другими клеточными линиями. Молекулярная основа этого феномена требует углубленного изучения, т.к. может открыть перспективы модификации трансфекционных характеристик везикул, используемых для доставки лекарственных средств.

Практическую значимость имеет ряд методологических разработок, проведенных в рамках представленного исследования. В частности,

1. Разработка новой технологии выделения ВНВ (экзосом) из мочи с целью последующего анализа экзосомальной микроРНК методом ОТ-ПЦР.
2. Разработка новой технологии выделения ВНВ (экзосом) из плазмы крови с целью последующего анализа экзосомальных микроРНК методом ОТ-ПЦР.
3. Разработка технологии выделения ВНВ (экзосом) из плазмы крови с целью последующего анализа поверхностных белковых маркеров методом проточной цитометрии.
4. Оптимизация технологии ОТ-ПЦР анализа микроРНК с целью повышения чувствительности методов оценки концентрации экзосомальных микроРНК.
5. Разработка технологии выделения тканеспецифичной фракции ВНВ (экзосом) плазмы с целью повышения диагностической значимости методов анализа экзосомальных микроРНК.

Методы и методология исследования

В работе были использованы различные методы, выбор которых определялся задачами исследования. Так, применялись стандартные методы выделения и анализа наноразмерных объектов, традиционные технологии молекулярной и клеточной биологии, в рамках *in vivo* экспериментов использовались эмбрионы рыб зебрафиш (*Danio rerio*) и бестимусные мыши. В исследовании был проведен анализ биологического материала (плазмы и мочи) от 262 пациентов с верифицированными онкологическими заболеваниями и 127 здоровых доноров.

В рамках исследований, посвященных разработке новых методов выделения ВНВ и описанных в Главе 2, была использована технология ультрацентрифугирования в качестве «референсного» метода. При разработке новых методов, оценка качества и количества ВНВ проводилась с помощью технологии лазерной корреляционной спектроскопии, нано-трекового анализа, атомной силовой микроскопии, крио-электронной микроскопии, проточной цитометрии, вестерн- / дот- блоттинга. Эти же технологии применялись в рамках других частей исследования при необходимости анализа структуры / состава ВНВ (экзосом).

В рамках исследований, посвященных анализу диагностического потенциала экзосомальных микроРНК (Глава 3), были использованы образцы плазмы и мочи здоровых доноров (n. 127) и онкологических пациентов (n. 262), проходивших стационарное лечение в НМИЦ онкологии им. Н.Н. Петрова Минздрава России и других стационарах г. Санкт-Петербурга и г. Москвы. ВНВ выделялись традиционным методом ультра-центрифугирования, для анализа концентрации экзосомальных микроРНК применялись различные модификации (стандартные (коммерческие) и оригинальные (home-made)) технологии обратной транскрипции с последующей полимеразной цепной реакцией.

В рамках исследования структуры и биологических функций ВНВ (экзосом) плазмы, описанного в Главе 4, была проведена масс-спектрометрия образцов ВНВ, для верификации полученных данных был использован вестерн-блоттинг. Для оценки эффекта экзосом плазмы на клетки опухоли были использованы стабильные культуры клеток рака молочной железы (MCF-7, MDA-MB-231). Поведение клеток в условиях с / без экзосомальной стимуляции оценивалось в ходе *in vitro* экспериментов (культивация в условиях неадгерентного роста, анализ активности миграции клеток по плоскости, анализ направленной миграции в трехмерном матриксе) и *in vivo* экспериментов (инъекция клеток в желточный мешок эмбрионов рыб зебрафиш). С целью анализа роли FAK-зависимого сигнального пути в регуляции ответа опухолевых клеток на экзосомальную стимуляцию, была использована линия клеток MDA-MB-231, в которых экспрессия FAK была стабильно подавлена.

В ходе заключительной части исследования (Глава 5) был разработан протокол формирования и проведен анализ различных характеристик трансфекционных нано-комплексов на основе ВНВ - Eхо(PEI/siRNA). Реагенты и процедура формирования трансфекционных комплексов описана в параграфе 5.3. (Глава 5). В рамках исследования был проведен анализ физических характеристик (размер, поверхностный заряд) комплексов и их стабильности. Для оценки трансфекционной активности комплексов были использованы различные линии опухолевых клеток (Skov-3, HCT-116, PC-3, Saos-2). Для анализа терапевтической

эффективности комплексов, в состав которых входила молекула «ингибитор» анти-апоптотического белка (Survivin), была использована модель: ксенографтная подкожная опухоль (PC-3) у иммуно-дефицитных (бестимусных) мышей линии Foxn1nu.

При сравнении результатов анализа групп образцов (клинических групп), оценку статистической значимости наблюдаемых различий проводили путем вычисления значения U-критерия Mann-Whitney (при сравнении двух групп) или критерия Kruskal-Wallis (при сравнении трех и более групп). Выбор метода статистического анализа определялся числом образцов в группах и характером распределения значений в группах. Статистические расчеты выполнены с помощью программ Graph Pad Prizm 6, Sigma Plot 12.

Положения, выносимые на защиту

1. Методы выделения ВНВ (экзосом) из биологических жидкостей могут быть оптимизированы для решения определенных аналитических задач и использования в рутинной клинической практике.
2. Экзосомальные микроРНК представляют собой перспективные маркеры, на основе которых могут быть созданы тест-системы для первичной и дифференциальной диагностики онкологических заболеваний.
3. Нормальный пул ВНВ (экзосом) плазмы стимулирует адгезивную и миграционную активность опухолевых клеток и может играть патологическую роль в процессе метастатической диссеминации.
4. ВНВ (экзосомы) могут быть использованы для формирования системы доставки терапевтических молекул РНК (siRNA/microRNA). «Упаковка» трансфекционных комплексов на основе катионных полимеров в экзосомы оптимизирует функциональные характеристики последних.

Степень достоверности и апробация результатов

Достоверность результатов, представленных в исследовании, определяется адекватным выбором методологических подходов, правильной техникой

проведения экспериментов, корректным анализом и интерпретацией полученных данных.

Так, результаты методологической части исследования (Глава 2) получены в ходе многократных экспериментов, хорошо воспроизводимы и не зависят от квалификации исполнителя. Разработанные методы выделения ВНВ (экзосом) из биологических жидкостей представлены в соответствующих публикациях и патентах:

- Самсонов Р.Б., Штам Т.А., Бурдаков В.С., Глотов А.С., Цырлина Е.В., Носов А.К., Евтушенко В.И., Филатов М.В. и Малек А.В. Выделение и анализ экзосомальной микро-РНК из мочи: новый метод диагностики рака предстательной железы. Экспериментальная и клиническая урология 2015, 4: 28-32
- Samsonov R., Shtam T., Burdakov V., Glotov A., Tsyrlina E., Berstein L., Nosov A., Evtushenko V., Filatov M. and Malek A. Lectin-induced agglutination method of urinary exosomes isolation followed by mi-RNA analysis: Application for prostate cancer diagnostic. Prostate 2016; 76(1): 68-79
- Патент на изобретение (№ 2741776 от 25.02.2020)
- Патент на изобретение (№ 2741638 от 11.03.2020)

Результаты исследования диагностического потенциала экзосомальных микроРНК, представленные в Главе 3, получены на достаточном по объему клиническом материале (262 пациента с верифицированными онкологическими заболеваниями и 127 здоровых доноров). Оценка качества выделенных ВНВ (экзосом) была проведена в соответствии с рекомендациями Международного Общества по изучению Внеклеточных Везикул (ISEV - International Society For Extracellular Vesicles) и включала анализ физических характеристик ВНВ (размер, морфология) и тестирование уровня экспрессии поверхностных экзосомальных маркеров. Качество выделения экзосомальной РНК контролировалось с помощью спектроскопии, ОТ-ПЦР проводилась с необходимыми контролями специфичности, нормализация и статистический анализ полученных результатов

проводились с помощью стандартных подходов. Результаты проведенных исследований представлены в ряде публикаций:

- Samsonov R., Shtam T., Burdakov V., Glotov A., Tsyrlina E., Berstein L., Nosov A., Evtushenko V., Filatov M. and Malek A. Lectin-induced agglutination method of urinary exosomes isolation followed by mi-RNA analysis: Application for prostate cancer diagnostic. *Prostate*. 2016; 76(1): 68-79
- Самсонов Р. Б., Бурдаков В. С., Ракитина Д. А., Нажмудинов Р. А., Васильев Д. А., Раджабова З. А., Филатов М. В., Малек А.В. Оценка диагностической роли микроРНК в составе экзосом циркулирующей крови при раке щитовидной железы Опухоли головы и шеи. 2015; 5(3): 45-49
- Самсонов Р.Б., Къези А., Малек А.В. Перспективы разработки методов диагностики и мониторинга онкологических заболеваний на основе анализа экзосом, секретируемых опухолевыми клетками. *Российский биотерапевтический журнал*. 2015; 14(4): 9-18
- Samsonov R, Burdakov V, Shtam T, Radzhabova Z, Vasilyev D, Tsyrlina E, Titov S, Ivanov M, Berstein L, Filatov M, Kolesnikov N, Gil-Henn H, Malek A. Plasma exosomal miR-21 and miR-181a differentiates follicular from papillary thyroid cancer. *Tumour Biol*. 2016; 37(9):12011-21
- Самсонов Р.Б., Бурдаков В.С., Штам Т.А., Раджабова З.А., Чебуркин Ю.В., Васильев Д.А., Цырлина Е.В., Титов С.Е., Иванов М.К., Филатов М.В., Берштейн Л.М., Колесников Н.Н., Малек А.В. Метод дифференциальной диагностики узловых заболеваний щитовидной железы: анализ комбинации микроРНК (миРНК-21, -181А и -146А). *Опухоли головы и шеи*. 2017; 2 (7):16-24
- Самсонов Р.Б., Тарасов М.А., Бурдаков В.С., Штам Т.А., Гуляев А.М. Ткаченко О.Б., Рыбаков Е.Г., Филатов М.В., Айгнер А., Малек А.В. Диагностическое значение экзосомальных МикроРНК при колоректальном раке. *Колопроктология*. 2018; 2(64): 25-31
- Коваленко И.М., Самсонов Р.Б., Штам Т.А., Цырлина Е.В., Камышинский Р.А., Дашян Г.А., Берштейн Л.М., Семиглазов В.Ф., Малек А.В. Экзосомальные

микро-рнк – потенциальный предиктивный маркер эффекта неoadъювантной терапии рака молочной железы Вопросы онкологии. 2018; 64(6): 758-767.

Результаты исследований с целью оптимизации методов анализа (Глава 3. параграф 3.4.5) также были опубликованы в профильном журнале:

- Коробкина Е.А., Князева М.С., Киль Ю.В., Титов С.Е., Малек А.В. Сравнительный анализ методов детекции микро-РНК с помощью обратной транскрипции и количественной полимеразной цепной реакции (ОТ-ПЦР) Клиническая лабораторная диагностика. 2018; 63(11): 722-728.

Достоверность результатов исследования эффекта взаимодействия ВНВ плазмы и опухолевых клеток (Глава 4) определяется технологическим уровнем проведенных экспериментов. Сделанные выводы основаны на экспериментальных данных, наблюдавшиеся в экспериментах эффекты были воспроизводимы и статистически значимы. Результаты исследования опубликованы в рецензируемых журналах:

- Самсонов Р.Б., Коваленко И.М., Васильев Д.А., Цырлина Е.В., Дашян Г. А., Шохат-Карвальо Х., Карасик Д., Берштейн Л.М., Лютынский В.В., Малек А.В. Стимуляция метастатической активности клеток рака молочной железы экзосомами плазмы. Российский Биотерапевтический Журнал. 2016; 15(2): 6-16
- Shtam T., Naryzhny S., Kopylov A., Petrenko E., Samsonov R., Kamyshinsky R., Zbrodskaya Y., Nikitin D., Sorokin M., Buzdin A., Malek A. Functional properties of circulating exosomes mediated by surface-attached plasma proteins. J Hematol 2018, 7(4):149-153.
- Shtam T., Naryzhny S., Samsonov R., Karasik D., Mizgirev I., Kopylov A., Petrenko E., Zbrodskaya Y., Kamyshinsky R., Nikitin D., Buzdin A., Malek A. Plasma exosomes stimulate breast cancer metastasis through surface interactions and activation of FAK signaling. Breast Cancer Res Treat 2019, 174(1):129-141.

Достоверность результатов, описанных в заключительной части исследования (Глава 5), подтверждается объективностью проведенных измерений: все эксперименты повторялись как минимум дважды, статистическая значимость полученных данных оценивалась стандартными методами. Результаты исследований опубликованы:

- Malek A., Merkel O., Fink L., Czubayko F., Kissel T. and Aigner A. In vivo tissue distribution and underlying mechanisms of various PEI(PEG)/siRNA complexes. *Toxicol. Appl. Pharmacol* 2009; 236(1): 97-108
- Malek A. Drug delivery approaches for ovarian cancer therapy. “Ovarian Cancer” *Methods Mol Biol.* 2013; 1049:437-42. ISBN 978-1-62703-547-7
- Zhupanyn P, Ewe A, Büch T, Malek A, Rademacher P, Muller C, Reinert A, Jaumes Y, Aigner A Extracellular vesicle (ECV)-modified polyethylenimine (PEI) complexes for efficient siRNA delivery in vitro and in vivo. *Journal of Controlled Release* 2020 (319): 63-76.

Основные положения диссертации были представлены на российских и международных конференциях в виде тезисов или устных докладов:

1. Секретируемые (экзосомальные) микроРНК – диагностическое и прогностическое значение в онкологии. // IX Съезд онкологов и радиологов стран СНГ и Евразии. Июнь - 2016, Минск, Беларусь.
2. Дифференциальная диагностика узловых образований щитовидной железы путем анализа внутриклеточных и секретируемых(экзосомальных) микро-РНК. // IX Съезд онкологов и радиологов стран СНГ и Евразии. Июнь - 2016, Минск, Беларусь.
3. Выделение и комплексный анализ биохимического состава экзосом плазмы – перспективный метод диагностики колоректального рака. // II Всероссийская конференция по Молекулярной онкологии. Декабрь - 2016, Москва.
4. Exosomal microRNA – diagnostic and prognostic value in oncology. // XIII Всероссийская научно-практическая конференция с международным участием «Отечественные противоопухолевые препараты» памяти А.Ю. Барышникова. Март - 2016, Москва.
5. Lectin-induced agglutination of urinary exosomes followed by mi-RNA analysis. // 3rd Baltic EAU Meeting. May - 2016, Tallin, Estonia.
6. Breast cancer cell migration is induced by exosomes via surface interaction and through the activation of FAK signalling. // The Fifth International Meeting of ISEV2016. May – 2016, Rotterdam, The Netherlands.

7. Анализ биохимического состава циркулирующих экзосом – метод первичной и дифференциальной диагностики онкологических заболеваний. // Международный конгресс: «Биотехнология: состояние и перспективы развития». Февраль - 2017, Москва.
8. Прогноз эффективности неоадьювантной полихимиотерапии рака молочной железы на основе анализа экзосомальных микроРНК // III Петербургский международный онкологический форум «Белые ночи» Июнь – 2017, СПб.
9. Физико-химические характеристики, сравнительный обзор методов выделения. // Научно-практическая конференция «Циркулирующие микровезикулы: практические аспекты исследований и клинические перспективы». Февраль - 2017, Санкт-Петербург.
10. Анализ циркулирующий экзосом – новый метод ранней и дифференциальной диагностики рака поджелудочной железы. // 43-я Научная сессия ЦНИИГ «От традиций к инновациям». Март - 2017, Москва.
11. Разработки методов ранней диагностики или оценки результата терапии онкологических заболеваний с помощью анализа состава циркулирующих микровезикул (экзосом). // Зимняя школа ПИЯФ по Биофизике Март - 2017, Рощино.
12. Анализ состава циркулирующих экзосом – метод диагностики и оценки эффекта терапии онкологических заболеваний. // XIV всероссийская научно-практическая конференция с международным участием имени А.Ю. Барышникова «Отечественные противоопухолевые препараты». Март - 2017, Москва.
13. Exosomes: Some Approaches to Cancer Diagnosis and Treatment. // International Conference “Physics of Cancer: Interdisciplinary Problems and Clinical Applications”. May - 2017, Tomsk.
14. Возможности применения метода корреляционная спектроскопия для анализа микровезикулярного состава плазмы онкологических пациентов. // Всероссийская конференция с международным участием “Биотехнология – медицине будущего”. Июль - 2017, Новосибирск.

15. Novel Approach for Isolation of Circulating Cell-Free DNA and Exosomes from Liquid Biopsies // 10 international symposium CNAPS 22-24. September - 2017, Montpellier, France.
16. Роль внеклеточных везикул в развитии онкологических заболеваний: патогенетические аспекты, возможности диагностики, перспективы терапии // IV Петербургский международный онкологический форум «Белые ночи». Июнь – 2018, Санкт-Петербург.
17. Proteomics approach reveals a possible way of involvement of exosomal proteins in breast cancer cells promotion // The FEBS Congress July - 2018 - Prague, Czech Republic.
18. Выделения специфических популяций экзосом с помощью аптамеров. // V Петербургский международный онкологический форум «Белые ночи». Июнь – 2019, Санкт-Петербург.
19. Анализ микро-рнк простат-специфичных экзосом – новый метод диагностики и мониторинга эффекта терапии рака предстательной железы // Конференция «Опухолевые маркеры: фундаментальные и клинические аспекты», посвященная памяти советского и российского учёного Гарри Израйлевича Абелева. Июнь - 2019, Горно-Алтайск.
20. Поведение нановезикул в двухфазных системах: перспективы разработки метода выделения экзосом в рамках решения клинических задач // V Всероссийская конференция по молекулярной онкологии. Декабрь – 2019 Москва.
21. Особенности экспрессии тканеспецифических маркеров на экзосомах, секретлируемых клетками колоректального рака. // V Всероссийская конференция по молекулярной онкологии. Декабрь – 2019 Москва.
22. Применение метода отбора аптамеров к поверхностным маркерам тканеспецифичных экзосом в рамках разработки метода диагностики онкологических заболеваний. // V Всероссийская конференция по молекулярной онкологии. Декабрь – 2019 Москва.

23. «Жидкостная биопсия» с использованием циркулирующих экзосом. // V Конгресс по молекулярной медицине им. Е. И. Шварца. Март – 2020 СПб.
24. Malek Anastasia // Plasma exosomes stimulate breast cancer metastasis via surface interaction and FAK signaling VI Sechenov International Biomedical Summit. November 2020, Moscow

ГЛАВА 1. ОПРЕДЕЛЕНИЕ ОБЪЕКТА ИССЛЕДОВАНИЯ

1.1 История открытия и современная систематика внеклеточных нановезикул (ВНВ)

Первые наблюдения мембранных внеклеточных везикул (ВНВ), или гранул, были опубликованы в научной литературе в конце семидесятых годов. Феномен секреции клетками нано-размерных везикул ассоциировался с процессом терминальной дифференцировки или созревания клеток различных тканей: кератиноцитов [1], тромбоцитов [2], фибробластов [3] и др. Большинство исследований имели сугубо описательный характер, отсутствие методов выделения и анализа долго не позволяло исследовать биологические функции наблюдаемых объектов. Первым научным предположением относительно роли, которую могут играть ВНВ в клеточной биологии, была идея о том, что они опосредуют удаление из клетки продуктов метаболизма, преимущественно мембранных белков [4]. Долгое время эта, отчасти интуитивная, теория не имела альтернатив, и внеклеточные везикулярные образования рассматривались просто как структурный компонент межклеточного пространства.

Исследования феномена ВНВ долгое время находились на этапе «накопления информации». С конца 80-ых годов в печати стали появляться работы, авторы которых описывали активное участие ВНВ в различных физиологических процессах. Так, например, R.M. Johnstone и соавторы (1987) предположили, что секреция ВНВ является этапом процесса созревания эритроцитов [5]. В работе G. Raposo и соавторов (1996) был описан феномен секреции антиген-презентирующих везикул В-лимфоцитами в процессе формирования адаптивной иммунной реакции [6]. В 2006 году J. Ratajczak, а в 2007 году H. Valadi экспериментально доказали, что ВНВ опосредуют межклеточный транспорт различных клеточных компонентов: белков, мРНК, микроРНК [7, 8]. Постепенно стало понятно, что ВНВ являются не просто продуктом клеточного метаболизма, или т.н. «дебрисом», а представляют собой элемент сложной системы межклеточных коммуникаций. Стало понятно, что они участвуют в интеграции клеток многоклеточного организма наряду с известными регуляторными системами (нервной, иммунной и

гормональной). Важность феномена «везикулярного транспорта» была отмечена присуждением в 2013 Нобелевской премии по физиологии и медицине трем исследователям (Thomas Sudhof, Randy Schekman, James Rothman), работавшим в данной области [9].

Параллельно с прогрессом в понимании биологической роли ВНВ накапливались знания о структуре этих образований. Работая с различными биологическими материалами и используя различные методы, исследователи описывали межклеточные везикулярные образования, которые отличались по размеру, механизму образования, биохимическому составу и биологическим функциям. Актуальность приобрела проблема систематизации и номенклатуры ВНВ. В настоящее время на основе комплексных отличий (размер, биогенез) более или менее уверенно выделяется три класса везикул: экзосомы, микровезикулы (или эктосомы) и апоптотические тельца. Так, экзосомы (exosomes) представляют собой везикулы размером 50-150 нм, которые образуются в процессе формирования мультивезикулярных телец (multivesicular bodies) и попадают в межклеточное пространство путем слияния последних с плазматической мембраны клетки. Размер микровезикул (или эктосом) в среднем несколько больше и колеблется в более широком диапазоне (100 – 1000 нм), эктосомы образуются путем «выпячивания и отделения» фрагмента поверхностной мембраны клетки (shedding vesicles). Апоптотические тельца имеют размер от 100 нм до 5 мкм, они образуются в процессе апоптоза и, в отличие от экзосом и эктосом, содержат компоненты не только цитоплазмы, но и ядра клетки [10]. Эта классификация не является совершенной по ряду причин. Во-первых, нет четкого принципа классификации, по которому три класса везикул могли бы быть уверенно дифференцированы. Во-вторых, изоляция (выделение) из биологических жидкостей везикул одного из трех типов технически затруднительна, выделенные препараты обычно представляют собой смесь везикул схожего размера. Эта техническая проблема затрудняет исследование и точное описание везикул определенного типа. Кроме того, в ряде работ было показано, что состав везикул каждого из трех классов (особенно экзосом и эктосом) не однороден. Так, например, экзосомы содержат

субпопуляции, отличающиеся по механизму образования, составу поверхностных белковых маркеров и морфологии [11, 12]. В целом, везикулярный состав биологических жидкостей является весьма комплексным. Для примера, на рисунке 1А представлено изображение плазмы крови здорового донора после 10-кратного разведения фосфатно-солевым буфером и удаления крупных частиц (>1000 мкм) путем фильтрации.

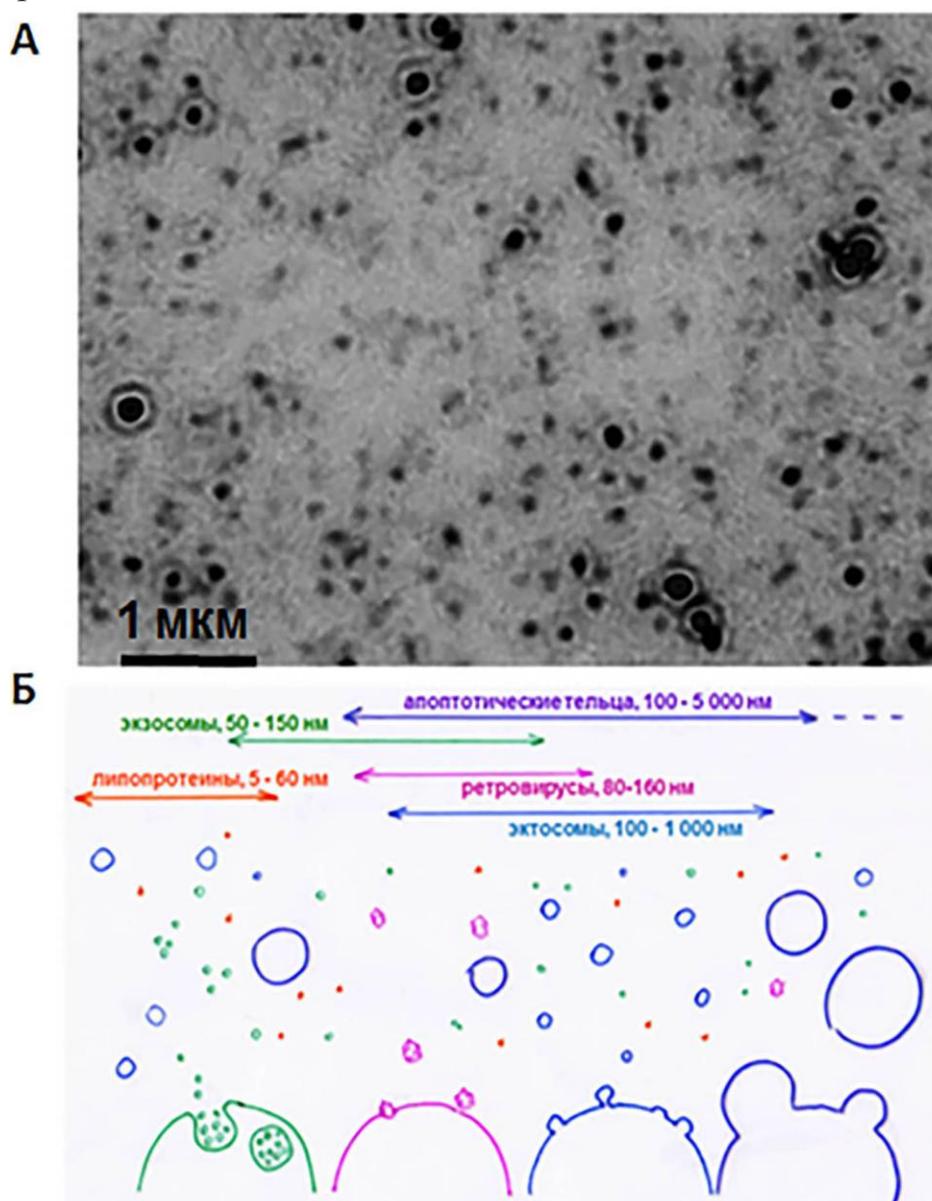


Рисунок 1 - Комплексный состав nano-размерных компонентов плазмы крови. А) Изображение получено с помощью комплекса для анализа концентрации и размеров наночастиц и макромолекул на платформе NanoSight NS300, для удобства восприятия изображение инвертировано; Б) Схематическая классификация внеклеточных нановезикул

Изображение получено методом анализа траекторий наночастиц (NTA, nanoparticle tracking analysis), который основан на детекции Броуновского движения отдельных объектов в растворе известной плотности. Так, плазма представляет собой концентрированную смесь нано-размерных частиц различной природы, включая везикулы. На рисунке 1Б схематично представлена современная классификация ВНВ, но следует учитывать, что она является относительной и, вероятно, будет модифицироваться и дополняться в процессе дальнейших исследований.

1.2 Методы визуализации и анализа структуры ВНВ

Размер ВНВ сопоставим с пределом разрешения светового микроскопа (0.2 мкм), традиционные технологии световой микроскопии могут быть использованы лишь в сочетании с флуоресцентным мечением экзосомальных компонентов и позволяет лишь оценить внутри- или внеклеточную локализацию везикул (Рисунок 2А).

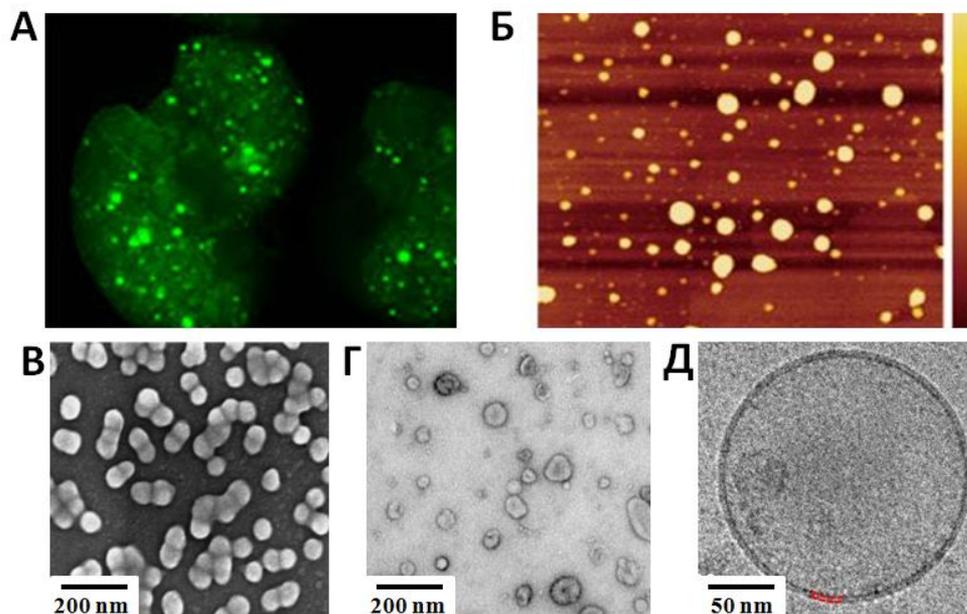


Рисунок 2 - Методы визуализации ВНВ (примеры) А) Флуоресцентная микроскопия (использование рисунка разрешено автором, Dr. Nazarenko I. / Univ. of Freiburg), Б) Сканирующая атомно-силовая микроскопия [13], В) Сканирующая электронная микроскопия [14], Г) Просвечивающая электронная микроскопия (использование рисунка разрешено автором, Dr. Edwin Pol / Univ. of Amsterdam), Д) Крио-электронная микроскопия [15]

Для получения более детальной информации о физических или биохимических качествах ВНВ необходимо использовать сложное и относительно дорогостоящее оборудование.

Морфология. Для анализа морфологии внеклеточных нановезикул применяются методы сканирующей атомно-силовой (АСМ) и электронной микроскопии (СЭМ). При этом везикулы фиксируются к подложке и поверхность образца «сканируется». В случае атомно-силовой микроскопии в качестве сканирующего «зонда» используется кантилевер с площадью острия в несколько атомов [16], а в случае сканирующей электронной микроскопии «зондом» является узкий интенсивный пучок электронов [14]. Компьютерная обработка данных формирует изображение (рельеф) поверхности, которое содержит важную информацию о размере, форме и гомогенности исследуемых везикул (Рисунок 2Б, 2В). Просвечивающая (трансмиссионная) электронная микроскопия (ТЭМ) – метод визуализации ультраструктуры тонких биологических образцов с помощью пучка электронов, проходящих сквозь них или взаимодействующих с ними (Рисунок 2Г). Одним из наиболее популярных при исследовании ВНВ методом является криоэлектронная микроскопия (Крио-ЭМ), когда образец исследуется при криогенных температурах (обычно в температуре жидкого азота), что позволяет визуализировать его в естественных условиях, без фиксации и/или окрашивания (Рисунок 2Д). В течение последних лет активно развиваются методы микроскопии сверхвысокого разрешения, основанные на феномене включения-выключения флуоресцентных красителей и технологиях оптической реконструкции изображений. Эти подходы по показателям разрешения в разы превосходят методы традиционной конфокальной микроскопии и позволяют использовать менее деструктивные технологии пробоподготовки, чем методы атомно-силовой или электронной микроскопии. Важность разработки методов микроскопии сверхвысокого разрешения была отмечена вручением Нобелевской премии по химии в 2014 (E. Betzig, S.W. Hell, W.E. Moerner). В современной литературе есть примеры использования отдельных технологий (stimulated emission depletion,

STED; stochastic optical reconstruction microscopy, STORM; photoactivated localization microscopy, PALM) для визуализации ВНВ и их компонентов.

Перечисленные методы микроскопии широко используются в исследовательской работе, но применение этих технологий в клинической практике маловероятно, по крайней мере, в обозримом будущем, в силу их сложности и высокой стоимости.

Размер и количество. Методика лазерной корреляционной спектроскопии (ЛКС) или динамического светорассеяния (DLS, dynamic light scattering) применяется для оценки размера микро- и/или нано-частиц в суспензии (Рисунок 3А).

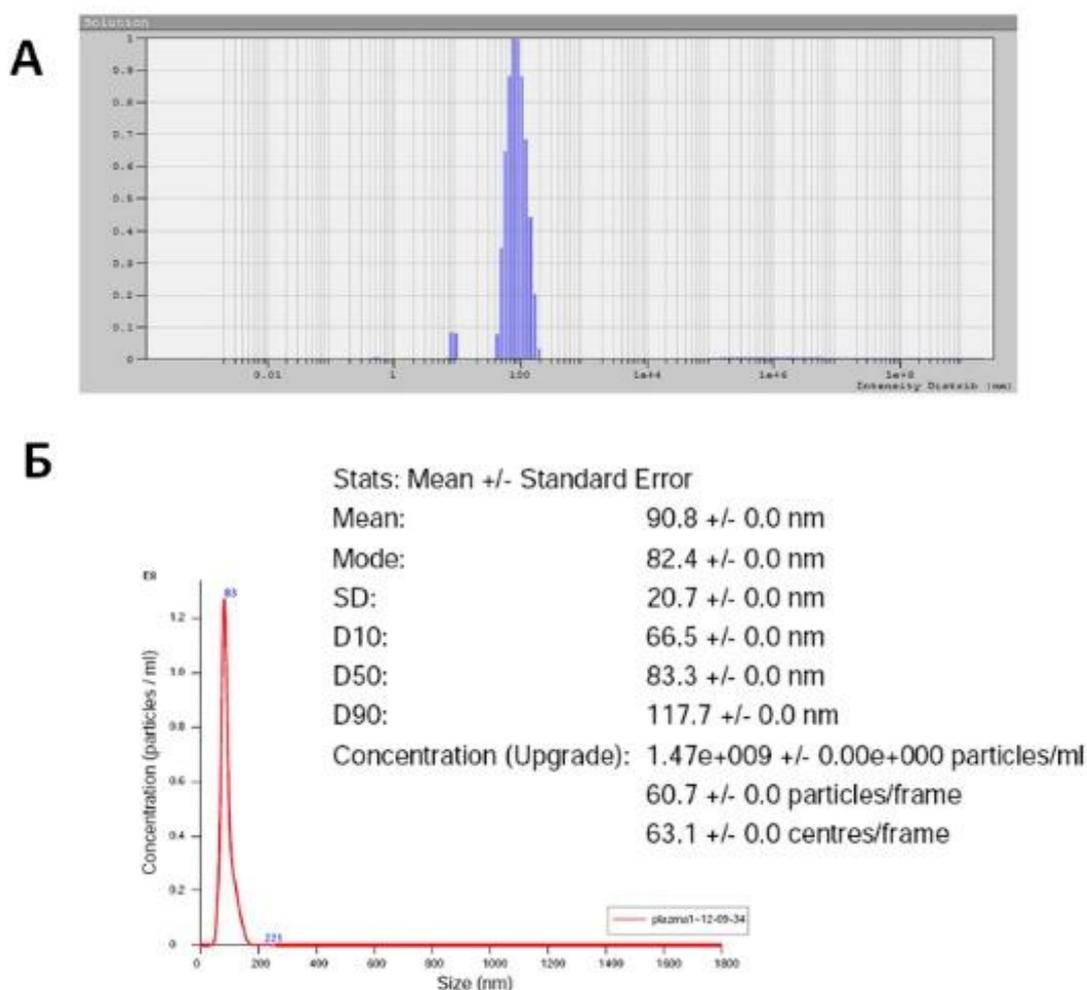


Рисунок 3 - Примеры результатов анализа относительно чистой популяции ВНВ, выделенных из плазмы методом дифференциального ультрацентрифугирования А) Лазерная корреляционная спектроскопия, ЛКС; Б) Анализ траекторий наночастиц, АТН

При прохождении пучка когерентного и монохроматического света через суспензию происходит его «упругое» (рэлеевское) рассеяние. Оценка временного изменения интенсивности рассеиваемого излучения (расчет автокорреляционной функции) позволяет оценить размер частиц в суспензии. Метод имеет ряд важных ограничений. Во-первых, размер частиц в суспензии должен быть того же порядка, что и длина волны рассеиваемого света. Во-вторых, частицы должны быть гомогенны по размеру, иначе измерение частиц меньшего размера будет существенно затруднено. Но даже с учетом перечисленных особенностей, метод относительно прост, не требует пробоподготовки и может быть использован для первичной оценки распределения по размеру ВНВ в составе популяции, выделенной из биологических образцов. На рисунке 3А представлен пример результатов измерения суспензии везикул, выделенных из плазмы.

Относительно недавно разработанный метод анализа траекторий наночастиц, или нано-трековый анализ (НТА) (NTA, nanoparticles tracking analysis), предполагает детекцию отраженного излучения с помощью ультрамикроскопа и анализ характеристик движения каждой отдельной частицы. Этот метод позволяет оценить размеры частиц, концентрацию частиц разных размеров и интенсивность рассеяния света индивидуальной частицей. Результаты анализа траекторий наночастиц могут быть представлены в виде изображения (Рисунок 1А), в виде двумерной диаграммы распределения частиц по размеру (Рисунок 3Б) или трехмерной диаграммы, отражающей размер, концентрацию и свойства поверхности частиц, что определяет удобство использования и интерпретации полученных данных.

Биохимический состав. Анализ биохимического состава ВНВ предполагает их дезинтеграцию и получение результатов, «усредненных» для популяции. Так, профайлинг белков или нуклеиновых кислот в составе экзосом может быть проведен с помощью масс-спектрометрии или методами секвенирования нового поколения соответственно. Принципы этих методов не предполагают никаких особенностей при анализе ВНВ. Анализ отдельных молекул в составе ВНВ также может быть проведен традиционными методами молекулярной биологии (Вестерн-

блоттинг, ОТ-ПЦР). Широкое применение имеет технология проточной цитометрии, модифицированная для анализа наноразмерных везикул. Так, с использованием флуоресцентно меченных антител, можно провести количественную оценку уровня экспрессии одного или нескольких белков на поверхности везикул. Но, как и в случае со световой микроскопией, малый размер везикул затрудняет непосредственное применение этой технологии. Проблема решается с помощью латексных или силиконовых микрочастиц (1-5 мкм), к поверхности которых (селективно или неселективно) фиксируются ВНВ перед инкубацией с мечеными антителами и анализом на проточном цитометре. При этом исследовании ВНВ не разрушаются, но полученный результат имеет «интегральный» характер, т.е. показывает средний для популяции исследуемых везикул уровень экспрессии определенного белка.

Особый интерес представляет разработка и внедрение таких методов оценки биохимического состава ВНВ, которые бы позволяли сохранить целостность отдельных везикул и провести «персональную» оценку каждой везикулы. Так, на стадии разработки находится ряд подходов, сочетающих в себе технологию сепарации ВНВ в микро-объемных потоках жидкости (микрофлюидика) [17], и комплекс методов детекции единичных молекул, основанных на феномене плазмонного резонанса [18]. Применение таких технологий позволяло бы проводить количественную оценку ВНВ с характерными «патологическими» сочетаниями различных компонентов (белковых маркеров, липидов, метаболитов, мРНК, микроРНК) в составе биологических жидкостей, что открывает перспективы создания инновационных диагностических методов.

1.3 Биогенез и физиологические функции экзосом

Механизм образования (биогенез) ВНВ является одним из основных критериев классификации: на основе специфического биогенеза выделяется класс везикул – экзосомы. Так как именно эти везикулы преимущественно исследовались в рамках диссертационной работы, особенности образования и биологические функции этих везикул будут представлены в этом разделе.

Гипотетическая модель формирования экзосом внутри т.н. «поздней» эндосомы с образованием мультивезикулярного тельца была впервые предложена в 2002 году [19]. Последующие исследования подтвердили правильность и детализировали эту модель [10]. Так, процесс формирования экзосом многие авторы условно разделяют на три внутриклеточных этапа (инициация, эндоцитоз, формирование мультивезикулярных телец), предшествующих секреции экзосом во внеклеточное пространство. После активации белка Rab5 «запускается» каскад реакций (перемещение эффекторных белков фосфоинозитол-3-киназы, раннего эндосомального антигена 1, рабенозины-5), формирование комплекса обмена GDP/GTP Rabex-5, и связывание белков комплекса ESCRT-0 (Endosomal Sorting Complex Required for Transport). После «сборки» комплекса ESCRT-0 на сформировавшейся эндосомальной мембране инициируется сборка комплексов ESCRT-I и ESCRT-II, опосредующих в дальнейшем инвагинацию мембраны и образование комплекса ESCRT-III. Этот комплекс имеет критическое значение в процессе формирования так называемых интралюминальных везикул (ИЛВ) и их «отшнуровывания» в полость эндосомы, которая превращается в мультивезикулярное тельце, МВТ (Рисунок 4).

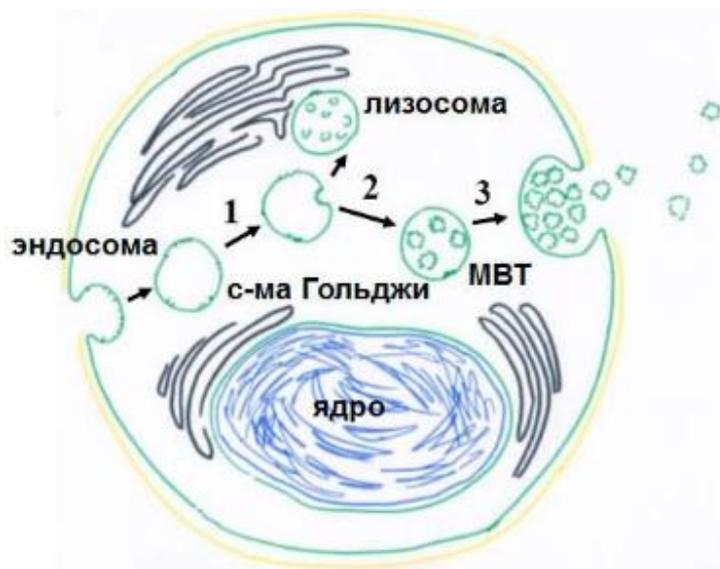


Рисунок 4 - Биогенез экзосом (схема) 1) Образование эндосомы; 2) Формирование мультивезикулярного тельца (МВТ); 3) Секреция экзосом во внеклеточное пространство

Этот механизм образования ИЛВ был описан первым и, вероятно, является основным. Вскоре было показано, что этот путь формирования экзосом не единственный, и существует альтернативный, ESCRT-независимый механизм [20]. После формирования МВТ возможны два варианта развития событий: либо его взаимодействие с лизосомами и деградация, либо транспортировка к цитоплазматической мембране и секреция его содержимого в виде экзосом во внеклеточное пространство.

Механизмы регуляции этих процессов пока изучены недостаточно, но известно, что активными регуляторными факторами являются GTP-аза семейства Rab: Rab4, Rab6, Rab7, Rab11, Rab27A, Rab27B и другие [21, 22]. Эти белки осуществляют регуляцию т.н. «базального» уровня секреции экзосом. Кроме того, секреция нановезикул изменяется (обычно усиливается) под влиянием различных внешних факторов, таких как закисление среды [23], повышение температуры [24], рост концентрации ионов кальция внутри клетки [25], потеря адгезивного контакта с матриксом или соседними клетками [26]. Так, можно уверенно предположить, что секреция экзосом является одним из базисных компонентов клеточного гомеостаза, который участвует в процессе взаимодействия клетки с окружающей средой и имеет комплексную и многофакторную систему регуляции. За последние полтора-два десятилетия концепция биогенеза экзосом и механизмов его регуляции принципиально не изменилась, но существенно обогатилась новыми экспериментальными данными. Прогресс в этой области может быть оценен по хронологическому ряду обзорных публикаций [19, 27, 28].

Постепенно развиваются и представления о физиологических функциях ВНВ вообще и экзосом, в частности. Так, первые исследования описывали участие экзосом в процессе созревания ретикулоцитов и рециркуляции трансферрина [4, 29]. Чуть позднее было показано, что экзосомы участвуют в процессе антиген-презентации и регуляции работы иммунной системы [6, 30, 31]. С учетом публикаций последних пяти - десяти лет, экзосомы можно считать одним из основных механизмов межклеточного взаимодействия, своего рода системой коммуникаций клеток и тканей многоклеточного организма, дополняющей

функции нервной и эндокринной систем [32]. Получены данные, указывающие на важную роль экзосом в ряде физиологических процессов, включая эмбриональное развитие, иммунные реакции, процесс регенерации тканей. Особый интерес представляет участие экзосом в развитии различных хронических патологий, включая нейродегенеративные, аутоиммунные заболевания, заболевания сердечно-сосудистой системы и инфекционные процессы [33, 34].

Несмотря на обилие научных данных (экспериментального и описательного характера), пока недостаточно ясно выглядит общая концепция работы системы экзосомальных межклеточных коммуникаций. Особый интерес представляют исследования, проясняющие механизмы внутриклеточного «сортировки» молекул в процессе формирования экзосом и секреции клетками экзосом, различных по составу и биологической активности [28, 35]. Также интересным представляется тот факт, что в процессе циркуляции экзосомы взаимодействуют с компонентами биологических сред, это взаимодействие изменяет их биохимический состав и, вероятно, биологические функции [36]. На современном этапе трудно дать четкое и исчерпывающее определение биологической роли экзосом. Эмпирически, это определение может быть преобразовано из определения биологической функции эндокринной системы, как «системы регуляции деятельности внутренних органов посредством гормонов, выделяемых эндокринными клетками в межклеточное пространство» (Wikipedia), с двумя существенными поправками. В отличие от гормонов, экзосомы, во-первых, выделяются практически всеми клетками, и, во-вторых, являются мультимолекулярными образованиями.

1.4 Участие ВНВ в развитии онкологических заболеваний

В современной научной литературе можно найти данные, указывающие на возможность «трансформирующего» эффекта экзосом в экспериментальных условиях [37, 38]. Но результаты, представленные авторами таких работ, пока не позволяют предполагать возможность этиологической роли экзосом в процессе неопластической трансформации. Инвазивный рост и диссеминация состоявшейся злокачественной опухоли безусловно сопровождается взаимодействием опухолевых клеток и нормальных клеток организма, и это взаимодействие во

многим опосредовано ВНВ. Поэтому участие ВНВ и, в частности, экзосом в процессе развития онкологического заболевания сомнению не подлежит. При анализе этого участия необходимо учитывать тот факт, что экзосомы секретируются как опухолевыми клетками, так и нормальными клетками различных тканей. Логично предположить, что опухолевые экзосомы (ОЭ) и гетерогенный пул нормальных экзосом играют различные роли и оказывают различные эффекты на опухолевый процесс.

Эффекты ВНВ, секретируемых опухолевыми клетками. Неопластическая трансформация сопровождается изменением (увеличением) количества и биохимического состава экзосом, секретируемых клеткой во внеклеточное пространство. Предполагается, что гипоксия и метаболический стресс являются основными «триггерами» активации продукции экзосом опухолевыми клетками [39, 40]. Экзосомы, секретируемые опухолевыми клетками (или опухолевые экзосомы - ОЭ), оказывают комплексное влияние на процесс развития заболевания (Рисунок 5, Таблица 1).

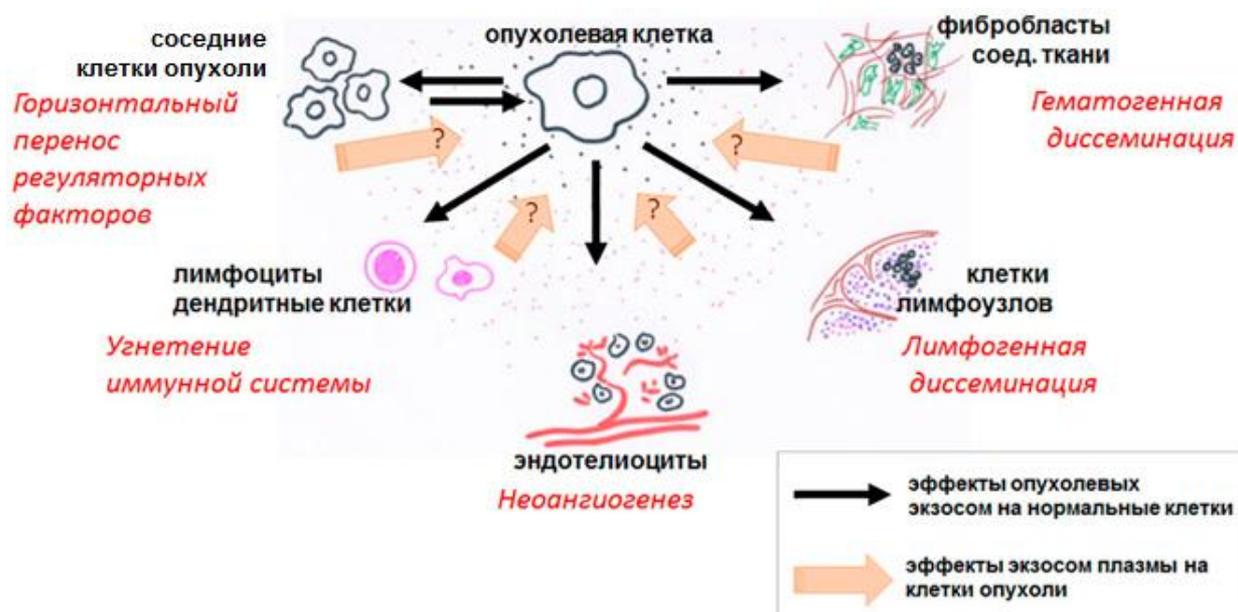


Рисунок 5 - Патологические эффекты опухолевых экзосом (схема)

В частности, экзосомы, секретируемые клетками первичной опухоли, переносят сигнальные молекулы в клетки окружающей стромы (фибробласты, эндотелиоциты, тканевые макрофаги) и в соседние опухолевые клетки. Таким

образом, осуществляется локальная паракринная координация процесса роста опухоли и ее инвазии в окружающие ткани (Таблица 1, а). В ряде исследований было показано, что ОЭ активно взаимодействуют с различными клетками иммунной системы и в большинстве случаев угнетают их активность (Таблица 1, с). Разнородность данных, представленных в современной печати, вероятно, отражает многообразие функций иммунной системы и разнообразие эффектов, которые ОЭ могут оказывать на различные аспекты ее функциональной активности. Кроме того, не всегда есть возможность получить и сопоставить клинические данные описательного характера и результаты экспериментальных исследований, поэтому не все наблюдаемые эффекты имеют удовлетворительные объяснения. В целом, экзосомы, выделенные из плазмы онкологических пациентов, содержат больше различных медиаторов иммуно-супрессии (FasL, PD-L1, TRAIL, IL-10, TGF- β 1) по сравнению с экзосомами, выделенными из плазмы здоровых доноров. Выделенные из плазмы пациентов экзосомы угнетают активность различных иммунокомпетентных клеток в системах *in vitro* (Таблица 1, с). Все эти наблюдения определили возможность разработки методики стимуляции противоопухолевого иммунитета онкологических пациентов путем тотального удаления экзосом плазмы [41]. Понятно, что такая процедура имеет симптоматический характер и временный эффект, но она свидетельствует в пользу предположения об «иммуносупрессивном» действии ОЭ в целом. Кроме иммуно-супрессии, ОЭ стимулируют метастатический процесс. Так, например, в ряде экспериментальных исследований было показано, что экзосомы, секретлируемые клетками опухоли «доходят» до тканей – т.н. «мишеней» метастатической диссеминации. Поглощение опухолевых экзосом клетками анатомически отдаленных тканей приводит к высвобождению ряда регуляторных молекул, изменению профиля экспрессии клеток и морфологии тканей, что облегчает процесс последующей метастатической диссеминации (Таблица 1, b). В различных *in vivo* системах такой феномен был продемонстрирован в ходе диссеминации экспериментальной опухоли в лимфоузлы, легкие, печень и костный мозг (Таблица 1, b). Как показано рядом авторов, ОЭ участвуют в процессе адаптации опухоли к

проводимой терапии и развитию феномена т.н. лекарственной резистентности. Такие наблюдения, в большинстве случаев, сделаны в ходе *in vitro* экспериментов (Таблица 1, d). Так, например, клетки рака молочной железы MCF-7 после длительной культивации в среде, содержащей тамоксифен, конкурентный ингибитор периферических рецепторов эстрогена, приобретают относительную резистентность к этому препарату. Причем такие резистентные клетки секретируют в среду экзосомы, которые «передают» качество резистентности клеткам исходно чувствительным к антипролиферативному эффекту тамоксифена [42]. Понимание молекулярных механизмов этого феномена могло бы облегчить поиск аналогичного эффекта в контексте развития резистентности к гормональной терапии пациенток с ER(+) раком молочной железы и, возможно, лечь в основу разработки методов диагностики или прогнозирования такого состояния на основе анализа циркулирующих экзосом.

Таблица 1 - Роль ОЭ в процессе прогрессии опухолевого заболевания

Патологический эффект экзосом, секретируемых клетками опухоли	Ссылка
а. Стимуляция локального роста и инвазии	
Аутокринная стимуляция пролиферации и угнетение апоптотической активности	[43, 44]
Стимуляция секреторной и инвазивной активности	[45]
Стимуляция локального неоангиогенеза	[46, 47]
Аутокринная стимуляция миграционной активности	[48, 49]
Воздействие на активность иммунных клеток и перитуморальной соединительной ткани	[50]
Горизонтальный перенос канцерогенных регуляторных факторов (данные <i>in vitro</i>)	[38]
б. Стимуляция процесса метастатической диссеминации	
Стимуляция адгезивной активности циркулирующих опухолевых клеток	[26]

Активация коагуляции, образования тромбов и фиксации циркулирующих опухолевых клеток	[51, 52]
Стимуляция формирования костных метастазов путем изменения экспрессионного профиля клеток и морфологии костного мозга	[53]
Стимуляция формирования метастазов в лимфатических узлах и легких путем изменения генной экспрессии клеток и морфологии соответствующих тканей	[54]
Стимуляция формирования метастазов в печени	[55]
Стимуляция неоангиогенеза в очагах метастатической диссеминации	[56, 57]
с. Регуляция функциональной активности иммунной системы	
Угнетение гуморальной (антительной) противоопухолевой реакции	[58]
Стимуляция апоптоза Т-лимфоцитов, регулирующих противоопухолевую реакцию	[59, 60]
Угнетение активности дендритных клеток, дифференцировки Т-лимфоцитов и формирование иммунотолерантности.	[61]
d. Формирование лекарственной резистентности	
Горизонтальная передача экзосомальных миРНК, которые опосредуют формирование устойчивости к цитостатикам (доцетаксел) и гормональной терапии	[62-64]
Непосредственное участие в процессе «выведения» молекул цитостатических препаратов из клеток, снижение чувствительности к химиотерапии	[65]
Горизонтальный транспорт молекул, участвующих в «выведении» молекул цитостатических препаратов из клеток опухоли и снижение чувствительности к терапии	[66]

Эффекты ВНВ, циркулирующих в плазме. По сравнению с ОЭ, нормальный пул циркулирующих экзосом привлекает существенно меньше внимание исследователей. Это смесь везикул, секретируемых преимущественно клетками крови и эндотелия, содержащая лишь незначительную фракцию экзосом, источником которых являются клетки различных тканей. Как было показано в ряде публикаций, гетерогенная по составу популяция экзосом плазмы повышает метастатический потенциал циркулирующих опухолевых клеток [67-70]. Учитывая гетерогенность состава экзосом плазмы, можно предполагать, что этим феноменом не ограничивается участие везикул в опухолевом процессе. Понимание этого аспекта требует дополнительных исследований.

1.5 Формулировка цели и задач исследования

На основе анализа современной литературы можно сделать уверенное заключение о том, что экзосомы играют важную роль в нормальных физиологических процессах и вносят значимый вклад в развитие и прогрессирование онкологических заболеваний. Разработка методов выделения и анализа циркулирующих экзосом, исследование механизмов участия экзосом в онкологическом процессе необходимы для создания и внедрения в клиническую практику новых диагностических и терапевтических методик. С учетом этого общего заключения была сформулирована цель диссертационной работы: оценить возможности применения нановезикулярных технологий в клинической онкологии.

Достижение этой цели предполагало проведение исследований по ряду направлений и решение соответствующих задач:

Задача 1. Разработка таких методов выделения ВНВ, которые могли бы быть применимы к решению клинических задач. Малый размер экзосом предполагает использование технически сложных, дорогих и трудоемких методов выделения. Существующие технологии, используемые в рамках фундаментальных исследований, мало приемлемы для рутинной клинической практики. Поэтому необходимо разработать такие методы выделения экзосом, которые обеспечат

оптимальное сочетание эффективности и стоимости, и могут быть предложены для клинического применения.

Задача 2. Оценка диагностической значимости методов анализа экзосомальных микроРНК на примере нескольких нозологий, определение путей оптимизации технологий анализа. Молекулярный состав экзосом отчасти отражает молекулярный состав клеток, а, следовательно, их физиологическое и патологическое состояние. Экзосомы, секретлируемые опухолевыми клетками, имеют характерные особенности биохимического состава. Анализ циркулирующих экзосом имеет очевидный диагностический и/или прогностический потенциал [71]. Поэтому необходимо определить диагностически значимые компоненты экзосом, разработать и оптимизировать методы анализа таких компонентов и оценить показатели диагностической / прогностической значимости разработанных методов.

Задача 3. Исследование патофизиологических эффектов и молекулярных механизмов взаимодействия нормального пула экзосом плазмы и опухолевых клеток. Экзосомы (секретлируемые клетками опухоли и нормальный пул циркулирующих экзосом плазмы) принимают участие в процессе роста и диссеминации опухоли. Исследование механизмов взаимодействия циркулирующих экзосом и клеток опухоли может сформировать предпосылки для разработки новых подходов профилактики и/или лечения метастатического процесса [72]. Поэтому необходимо исследовать патофизиологические эффекты и молекулярные механизмы взаимодействия циркулирующих экзосом и опухолевых клеток.

Задача 4. Разработка и тестирование метода «нагрузки» экзосом терапевтическими РНК (сиРНК/siRNA, микроРНК/miRNA). Одной из основных физиологических функций экзосом является межклеточный транспорт различных молекул. Таким образом, эти везикулы могут представлять собой естественную систему транспорта терапевтических препаратов. Исследования в этом направлении формируют предпосылки для разработки новой технологии создания биосовместимых лекарственных форм для лечения онкологических заболеваний

[73]. Это определяет важность разработки и апробации методов «нагрузки» экзосом потенциально анти-опухолевыми веществами, анализа стабильности и трансфекционной эффективности таких комплексов.

Материал диссертации был структурирован в соответствии с поставленными задачами. Каждая из четырех последующих глав включает обзор литературы, развернутое представление задачи и подходов к ее решению, описание использованных методов, полученных результатов и сделанных выводов.

ГЛАВА 2. РАЗРАБОТКА МЕТОДОВ ВЫДЕЛЕНИЯ ВНВ ИЗ БИОЛОГИЧЕСКИХ ЖИДКОСТЕЙ

2.1 Сравнительный обзор методологических подходов

Выделение экзосом из многокомпонентных биологических жидкостей (плазмы, мочи и др.) является нетривиальной задачей по двум причинам принципиального характера. С одной стороны, любая биологическая жидкость имеет комплексный состав, который (в интересующем нас размерном диапазоне 30 нм – 300 нм) содержит различные компоненты: белки, белковые комплексы, липопротеины различной плотности, мембранные везикулы различного генеза, невезикулярные мембранные образования и др.

С другой стороны, экзосомы не имеют абсолютных критериев отличия (физических, биологических, биохимических), на основе которых их можно было бы отделить от всех других компонентов биологической жидкости. В настоящее время в лабораторной практике существует ряд методов выделения экзосом, но каждый из них не идеален, и представляет собой компромисс нескольких критериев «чистоты выделения», «эффективности», «стоимости», «трудоемкости». В большинстве случаев выбор метода определяется задачами эксперимента и возможностями экспериментатора.

Проблематичность ситуации заключается в том, что получаемые и публикуемые научные результаты зависят от выбранного исследователями метода и часто оказываются несопоставимы. Попыткой решения этой проблемы являются «правила», публикуемые периодически международным обществом по изучению внеклеточных везикул (ISEV, International Society for Extracellular Vesicles), которые регламентируют основные методологические аспекты работы с экзосомами и другими ВНВ [74, 75]. Это вынужденная мера, целью которой является возможность сопоставлять данные, полученные в разных лабораториях. Но полезность такой регламентации не очевидна, т.к. она компрометирует адекватность выбора методики и возможность ее оптимизации в процессе решения конкретной научной задачи в случае, если автор исследования планирует опубликовать его результаты.

В целом, традиционные методы выделения экзосом основываются на тех или иных характеристиках этих везикул. Например, на особенностях размера и физической плотности экзосом основаны такие методы как ультрацентрифугирование [76], микрофльтрация [77], и гель-фльтрация [78]. Препараты везикул, выделенных этими методами, обычно (и неизбежно) контаминированы компонентами биологических жидкостей, имеющими схожие размеры и плотность.

Несколько альтернативных подходов основаны на особенностях «поведения» мембранных везикул в суспензии и их «склонности» к агглютинации в присутствии синтетических [79] или натуральных [80] полимеров, протаминов [81], солей [82]. При этом выделенные экзосомы обычно контаминированы различными везикулами и белками (или белковыми комплексами) с похожими особенностями межмолекулярного взаимодействия.

Отдельную группу образуют методы, в основе которых лежат реакции аффинного (специфического) взаимодействия антител и белковых молекул везикулярной мембраны, т.н. «экзосомальных» маркеров. Эти методы основаны на предположении о том, что «экзосомальные» маркеры экспрессируются *только* на экзосомах и *на всех* экзосомах одинаково, что не совсем верно [12, 35].

Ультра-центрифугирование. Этот классический метод выделения экзосом признан «золотым стандартом», с которым принято сравнивать любые вновь предлагаемые технологии [76]. Методика предполагает 2-3 раунда предварительного центрифугирования с постепенно возрастающим ускорением:

- 300-400 xG / 10 мин (осаждение клеток)
- 1000-2000 xG / 20 мин (осаждаются фрагменты клеток, т.н. «дебрис»)
- 10 000 xG / 30-60 мин (осаждаются биополимеры, крупные белковые комплексы, апоптотические тельца)

После каждого этапа супернатант аккуратно отбирается и используется для последующего раунда. Таким образом, биологическая жидкость очищается от крупных примесей. В ней, предположительно, остаются везикулы, белки и

липопротеины. Последний этап ультра-центрифугирования проводится при ускорении 100.000 – 150.000 xG в течение 1-6 часов.

Выбор параметров определяется обычно эмпирически или подбирается экспериментально для каждого типа исходной жидкости, используемых объемов и оборудования. В процессе ультрацентрифугирования происходит седиментация нановезикул и сходных с ними по показателям плотности частиц. Из-за взаимодействия (агрегации) нановезикул с меньшими по размеру молекулами или мульти-молекулярным комплексами, эти компоненты биологической жидкости могут контаминировать осадок. В надосадочной жидкости остаются белки, липопротеины и другие низкомолекулярные компоненты.

Для снижения содержания в осадке примесей невезикулярной природы, его можно ре-суспендировать в большом объеме буфера и осадить повторным ультра-центрифугированием. Но при этом повышение «чистоты» выделенных везикул достигается ценой снижения их количества, т.е. параметры качества и количества связаны обратной зависимостью.

Бесспорным преимуществом этого метода является возможность стандартизации. К недостаткам можно отнести трудоемкость и высокую стоимость оборудования. Кроме того, как упоминалось выше, получаемый при ультра-центрифугировании осадок всегда (более или менее) контаминирован компонентами плазмы, имеющими близкие значения физической плотности. Эта проблема может быть отчасти решена путем проведения дополнительного раунда ультра-центрифугирования выделенного предварительно препарата в различных субстратах с т.н. «градиентом» плотности.

Как показывает обзор литературы, метод ультра-центрифугирования, как таковой, или в комбинации с другими методиками используется чаще других [83] (Рисунок 6).



Рисунок 6 - Результаты оценки практики работы с ВВВ 196 исследователей из 30 стран, проведенной Международным обществом по изучению внеклеточных везикул, The International Society for Extracellular Vesicles, ISEV. Модифицирован из [83, 84] А) Соотношение используемых методов выделения ВВВ; Б) Соотношение используемых методов в зависимости от объема исследуемого образца

Ультра-центрифугирование в градиенте плотности. Этот метод является вариантом оптимизации ранее описанной процедуры с целью выделения более «чистой» фракции экзосом. При этом препарат везикул «наслаивают», не перемешивая, на буферный раствор, и в процессе центрифугирования компоненты препарата седиментируют «сквозь» этот буфер, причем скорость седиментации зависит от их физической плотности. Центрифугирование заканчивают прежде, чем самые легкие частицы достигнут дна пробирки, и на них начнут наслаиваться более тяжелые. Затем дно пробирки прокалывают и последовательно собирают

фракции исходного препарата с различными (возрастающими) показателями плотности. Известно, что плотность экзосом колеблется в диапазоне 1,10 – 1,19 г/мл [85]. Выделенная фракция препарата с такими показателями плотности представляет собой практически «чистый» препарат экзосом. Стабильность градиента плотности в процессе центрифугирования достигается применением растворов углеводов или коллоидного силикогеля, концентрация которых возрастает от поверхности к дну пробирки, формируя т.н. постепенный градиент (continuous gradient). Альтернативный вариант – формирование путем наслаивания растворов разных концентраций т.н. дискретного градиента (discrete gradient). Методика, оптимизированная под задачу выделения экзосом, заключается в формировании т.н. «подушки сахарозы»: создание двух «слоев» сахарозы с различной концентрацией (1 и 2 моль/л). В процессе центрифугирования большие везикулы и крупные мульти-молекулярные комплексы задерживаются в слое более концентрированной сахарозы, экзосомы – в слое менее концентрированной сахарозы, а более легкие молекулы – остаются в верхних слоях [86, 87]. Основным преимуществом этого метода является «чистота» выделения, которая достигается ценой низкой продуктивности и высокой трудоемкости. Вторым параметром может быть компенсирован стоимостью. В настоящее время можно купить готовые пробирки для ультра-центрифугирования, уже заполненные субстратом, формирующим нужный градиент плотности, например, OptiPrep / Axis-Shield [88].

Ультрафильтрация. Это один из методов выделения экзосом из биологических жидкостей, основанный на их размере. В основе метода лежит процедура фильтрации жидкости через фильтр с порами определенного размера. Обычно используются коммерческие фильтры из гидрофильных полимеров (например, из дифлюорида поливинилидина, polyvinylidene difluoride, VVLP / Millipore) с низкой аффинностью к белкам [89]. По аналогии с последовательными раундами центрифугирования проводится несколько последовательных процедур фильтрации через фильтры с порами диаметром 0,8, 0,45, 0,22 (и иногда 0,1) микрометра. Соответственно, размер частиц в фильтрате постепенно уменьшается, и после последней процедуры фильтрат содержит везикулы с размером не больше

размера пор последнего фильтра. Преимуществом метода является его технологичность: процедура не требует специального оборудования, особой квалификации и не является трудозатратной. К недостаткам методики следует отнести тот факт, что компоненты биологической жидкости невезикулярной природы с размером равным и меньшим, чем экзосомы остаются в фильтрате. Кроме того, авторами многих методологических работ было показано, что сами везикулы имеют тенденцию абсорбироваться на мембране фильтра, что существенно снижает продуктивность метода [90]. Этот аспект особенно актуален, когда стоит задача выделения экзосом из малого объема плазмы. С учетом перечисленных недостатков, оптимальным представляется сочетание метода ультрафильтрации с ультра-центрифугированием [91, 92].

Гидростатический фильтрационный диализ. Этот метод, основанный на том же принципе размерной селекции, имеет не столь широкое распространение. Он был впервые предложен для выделения экзосом из мочи [93]. Перед началом процедуры, клетки, клеточный «дебрис» и крупные мульти-молекулярные агрегаты должны быть удалены из биологической жидкости (мочи) путем центрифугирования при 2000-3000 xG. Идея метода – использование диализной мембраны, пропускающей частицы с молекулярным весом до 1000 кДа. Диализ частиц такого и меньшего размера через мембрану происходит под действием гидростатического давления, при этом под действием осмотического давления через мембрану из образца «уходит» вода, т.е. происходит концентрация суспензии везикул. К преимуществам этого метода можно отнести минимум потерь: практически все везикулы, которые содержались в образце биологического материала, остаются в полученной суспензии. Кроме того, процедура не предполагает воздействия на везикулы избыточного давления (как при ультра-центрифугировании или при ультрафильтрации), что, вероятно, позволяет избежать дополнительных потерь. На основе ограниченного количества публикаций [93, 94] пока трудно судить, насколько эта методика приемлема для жидкостей с большим, чем моча, содержанием белков (например, для плазмы).

Гель-фильтрация или эксклюзионная хроматография. Эта методика давно и широко применяется для разделения биополимеров на основе гидродинамического радиуса. В ряде исследований было показано, что этот метод вполне приемлем и для выделения экзосом из биологических жидкостей. В настоящее время на рынке представлены хроматографические колонки для выделения везикул различного размера, наполнения и производства, что облегчает внедрение этого метода в лабораторную практику, но определяет относительно высокую стоимость его использования. Недостатком метода является необходимость подготовки образцов к процедуре путем предварительной очистки от крупных примесей и концентрации.

Преципитация везикул. Это комплекс методов, основанных на феномене преципитации везикул в растворах супер-гидрофильных полимеров с образованием больших агрегатов, которые можно «осадить» при щадящих условиях центрифугирования. Бесспорным «плюсом» этого подхода является простота исполнения. Различные модификации этого метода с использованием полиэтиленгликоля (PEG, polyethyleneglycole) представлены на рынке в коммерческих наборах: ExoQuick / System Bioscience, Total Exosomes Isolation Reagent / Invitrogen, ExoPrep / HansaBioMed, miRCURY Exosomes Isolation Kit / Exiqon. К особенностям этой технологии можно отнести относительно высокую эффективность (т.е. выделение экзосом происходит с минимальными потерями), но низкую «чистоту» (т.е. полученный образец экзосом содержит много примесей). Следует учитывать, что преципитирующий агент также содержится в полученном препарате. Кроме того, в ряде случаев образование плотных агрегатов затрудняет ре-суспендирование везикул и ограничивает возможности последующего анализа. Кроме полиэтиленгликоля, схожий эффект преципитации везикул может оказывать ацетат натрия [82], протамины (низкомолекулярные основные белки ядер сперматозоидов) [81, 95] и ряд других веществ. Несколько иной принцип лежит в основе метода выделения экзосом путем преципитации белков с помощью органических растворителей – после седиментации белковых агглютинатов гидрофобные ВНВ остаются в растворе [96, 97].

Двухфазные водные растворы были предложены недавно в качестве системы выделения экзосом [98, 99]. Эта технология основана на феномене разделения или формирования двух отдельных фаз в растворе двух полимеров, например, полиэтиленгликоля (ПЭГ) и декстрана. В силу физико-химических особенностей взаимодействия полимеров с мембраной везикул, последние преимущественно концентрируются в одной из фаз – растворе декстрана, в то время как белки «переходят» в раствор ПЭГа. Для более полной очистки везикул от белков ПЭГ-содержащая фаза может быть заменена несколько раз. В теории, методика кажется очень простой, дешевой и эффективной. Но для применения ее на практике нужно учитывать некоторые особенности. Во-первых, процесс формирования двух фаз зависит от многих факторов (молекулярной массы и концентрации двух полимеров). Таким образом, подбор оптимальных условий разделения является нетривиальной задачей. Во-вторых, везикулы выделяются в растворе декстрана, что может затруднять некоторые последующие аналитические процедуры (например, ПЦР).

Неспецифическое связывание компонентов мембран. Как и поверхностная клеточная мембрана, мембрана ВНВ также имеет тенденцию аффинного взаимодействия с рядом биологических молекул. Например, лектины (гликопротеины преимущественно растительного происхождения) [100, 101], гепарин (серосодержащий гликозамонгликан – естественный антикоагулянт) [102], белки – лиганды фосфатидилсерина (например, Аннексин 5) [103] при добавлении к биологической жидкости связываются с мембранами и вызывают агрегацию мембранных везикул. Взаимодействие не специфично, поэтому для получения оптимального результата клетки и крупные мембранные везикулы должны быть удалены из образца перед преципитацией. Образовавшиеся преципитаты осаждаются также путем центрифугирования, и ресуспендируются в нужном буфере. Особенности процедуры и состав примесей, ко-преципитированных вместе с везикулами, определяется биохимией используемого вещества. В целом эта группа методов характеризуется относительной простотой исполнения, но низкой «чистотой» выделения ВНВ. В случае если состав контаминирующих

компонентов биологических жидкостей не мешает последующему использованию выделенных везикул, технологии, основанные на неспецифическом связывании компонентов мембран, имеют перспективы применения в клинической практике [80].

Специфическое связывание мембранных белков. В биогенезе экзосом принимает участие ряд мембранных белков, которые концентрируются и «экспонируются» на поверхности экзосомальной мембраны после секреции везикул в межклеточное пространство. Так, например, некоторые тетраспанины (TSPAN28/CD81, TSPAN29/CD9, TSPAN30/CD63) – белки с характерной структурой из четырех трансмембранных доменов – концентрируются в мембране экзосом и считаются т.н. «экзосомальными» маркерами. Антитела к этим (и некоторым другим) экзосомальным маркерам могут быть использованы для иммуно-преципитации везикул. При этом антитела своими Fc –доменами могут быть фиксированы к различным химически инертным носителям (латекс, силикон) в различном исполнении: микрочастицы (beads) - Dynabeads / Thermo Fisher Scientific, спин-колонки (spin column) - Exo Trap Exosomes Isolation Spin Column / Cosmo Bio, модифицированные наконечники для пипеток (monolithic silica microtips) - MSIA D.A.R.T. / Thermo Fisher Scientific, дно 96-луночного микропланшета для ИФА (enzyme-linked immunosorbent assay) - Immunoplate for EV capture / HansaBioMed и, вероятно, другие варианты. Так, один принцип метода может быть реализован в различных вариантах, что определяет разнообразие применения. Взаимодействие фиксированного на матрице антитела и антигена на мембране экзосомы является относительно сильным, что позволяет «отмыть» везикулы от компонентов биологической среды и даже провести различные исследования по принципу иммуноферментного анализа или проточной цитометрии. В самом банальном случае везикулы могут быть лизированы для последующего выделения и анализа их отдельных компонентов (белков, РНК). Основным «плюсом» технологии иммуноаффинного связывания является «чистота» выделения, которая определяется специфичностью антиген-антительного взаимодействия. Этот фактор специфичности следует, однако,

учитывать при оценке репрезентативности получаемых результатов. Нет оснований предполагать, что все экзосомы имеют идентичный, качественно и количественно, состав «экзосомальных» маркеров на поверхности [12]. Поэтому методика иммуно-преципитации неизбежно приводит к получению фракции везикул, поверхностная мембрана которых «обогащена» определенным маркером. К «минусам» технологии также относится ограниченная продуктивность, высокая стоимость и трудность (невозможность) отделения везикул от антител при необходимости их дальнейшего использования.

2.2 Задача и подходы к ее решению

В целом, обилие существующих подходов к проблеме изоляции экзосом из биологических сред свидетельствует об отсутствии универсального метода. Классические методики выделения нановезикул, основанные на физических характеристиках экзосом (размер и/или плотность), – варианты ультрацентрифугирования и ультрафильтрации – представляются слишком технологически сложными и трудоемкими для рутинного применения в клинической практике. Задачей данной части исследования была разработка таких методов, которые могли бы быть использованы в рутинной практике клинической лаборатории. Поставленная задача решалась несколькими подходами. Предполагалось:

- Оптимизировать стандартный протокол выделения экзосом из плазмы и мочи с помощью ультра-центрифугирования.
- Разработать упрощенный (быстрый и экономичный) метод выделения экзосом из мочи.
- Разработать метод выделения экзосом из плазмы, оптимизированный под задачу последующего ОТ-ПЦР анализа экзосомальных микроРНК.
- Разработать метод выделения экзосом из плазмы, оптимизированный под задачу последующего анализа поверхностных белковых маркеров с помощью проточной цитометрии.

При разработке методов, оптимизированных под решение определенных клинических вопросов, предполагалось что каждый новый метод должен быть проще, дешевле или эффективней существующих технологий и должен позволять получать материал (экзосомы) в качестве и количестве достаточном для последующего анализа.

2.3 Методы и результаты

2.3.1 Стандартная технология: ультра-центрифугирование (УЦ)

Стандартная технология выделения экзосом, как было описано в разделе 2.1., предполагает проведение нескольких раундов центрифугирования с постепенным повышением величины центробежного ускорения (xG). Последний этап этой процедуры – ультра-центрифугирование с рекомендованным ускорением более 100.000 xG. Но детальные условия (подготовка материала, параметры раундов центрифугирования, необходимость повторов) могут отличаться и должны быть оптимизированы под конкретное оборудование и экспериментальные задачи. Так, в рамках данной работы были использованы две центрифуги и соответствующие роторы: Настольная центрифуга Eppendorf 5810-R, ротор (F-34-6-38) и пластиковые адапторы для использования пробирок типа Falcon объемом 15 или 50 мл; и напольная препаративная ультрацентрифуга Optima XPN90, роторы 90Ti и 70Ti для ультра-центрифужных пробирок объемом 13.3 мл и 39 мл, соответственно.

В рамках исследования было проведено тестирование различных режимов центрифугирования. Сравнительный анализ выделенных везикул был проведен методом ЛКС, АТН, проточной цитометрии и криоэлектронной микроскопии:

1. Лазерная корреляционная спектроскопия (ЛКС) была использована для оценки размеров и степени гетерогенности выделенных наночастиц с помощью прибора Nanotrac Wave II MN42x («Microtrac, Inc.», США). Обработка результатов проводилась в FLEX Software («Microtrac, Inc.», США). Объем образцов «доводился» до 1 мл фосфатно-солевым буфером (ФСБ), детектировалась обратное рассеяние, время накопления сигнала – 30 секунд, для одного образца производилось 3 измерения, с последующим усреднением.

2. Анализ траекторий наночастиц (АТН) использовали для определения размера и концентрации выделенных наночастиц. Измерения проводились на анализаторе Nanosight NS300 («Malvern», США). Обработка спектров проводилась в Nanosight NTA 3.2 Software. Уровень камеры: 14, ползунок затвора: 1259, усиление ползунка: 366, пороговый уровень: Для осадка – 5, для ВФ2 – 6. Каждый образец прокачивался через камеру наблюдения анализатора так, чтобы провести 4-5 измерений на разных микрообъемах одного и того же образца. Каждое измерение имело длительность 60 с, что соответствовало 1498 кадрам.
3. Проточная цитометрия осуществлялась с помощью коммерческого набора Echo-FACS («HansaBioMed», Эстония) согласно протоколу производителя и предполагала фиксацию ВНВ к латексным микрочастицам. Детекция экзосмального маркера CD63 была проведена с помощью антитела, конъюгированного с флуоресцентной меткой FITC (ab18235) («Abcam», США). Данные проточной цитометрии были получены на анализаторе Cytotflex (Beckman Coulter, США), оборудованном аргоновым лазером с длиной волны 488 нм для измерения прямого рассеяния света (FSC) и бокового рассеяния (SSC) и детекции ФИТЦ-сигнала. В качестве негативного контроля использовали латексные частицы, проведенные через все этапы пробоподготовки кроме инкубации с ВНВ. Для получения позитивного контроля частицы инкубировали с контрольными (в составе набора) экзосомами, затем, в соответствии с протоколом, с антителами к CD63.
4. Криоэлектронная микроскопия проводилось на микроскопе Titan Krios 60-300 TEM/STEM («FEI», США), оснащенном высокочувствительным DED (Direct electron detector) детектором электронов Falcon II (FEI, США) и корректором сферических аберраций (CEOS, Германия). Электронно-микроскопические медные сетки, покрытые тонким слоем аморфного углерода, были гидрофилизированы в тлеющем разряде с использованием установки Pelco easiGlow. Далее на сетки наносили 3 мкл препарата, и, с помощью установки Vitrobot Mark IV (FEI, США), проводили процедуру витрификации образцов в жидком этане, охлажденном до температуры жидкого азота. В результате

образцы были зафиксированы в тонком слое аморфного льда, что позволило исследовать везикулы в нативном состоянии. Для минимизации радиационных повреждений набор данных проводился с помощью программного обеспечения EPU (FEI, США) в режиме малых доз.

Согласно полученным результатам был оптимизирован протокол УЦ:

1. Собрать венозную кровь в вакутейнеры с EDTA
2. Отделить плазму от эритроцитарной массы в течение 5-10 минут после забора крови. (Стандартные условия – 300 xG – 10 мин.) Плазму перенести в чистые пробирки (аликвотировать), использовать непосредственно для последующих этапов выделения или заморозить
3. Центрифугировать 2 000 xG – 10 мин, супернатант перенести в чистую пробирку
4. Центрифугировать 10 000 xG – 30 мин, супернатант перенести в чистую пробирку
5. Супернатант развести ФСБ в соотношении 1:1, профильтровать через фильтр с диаметром пор 0.45 мкм
6. Центрифугировать 120 000 xG – 90 мин, супернатант удалить, осадок аккуратно суспендировать в 100 - 150 мкл ФСБ

Полученные везикулы могут быть использованы для дальнейших исследований, таких как: анализ белковых маркеров методом проточной цитометрии, анализ белков в составе везикул методом Вестерн- или Дот- блота, анализ нуклеиновых кислот методом ПЦР. В последних двух случаях осадок может быть непосредственно растворен в соответствующем лизис-буфере.

В случае, если планируется последующий анализ структуры везикул (микроскопия) или анализ белкового состава везикул (масс-спектрометрия), – рекомендуется провести дополнительный раунд ультра-центрифугирования, который (неизбежно) приведет к потере 30-60 % материала, полученного на шестом этапе.

7. Довести объем суспензии до полного объема ультра-центрифужной пробирки.
8. Центрифугировать 120 000 xG – 90 мин, супернатант удалить, осадок аккуратно суспендировать в 50 - 100 мкл ФСБ.

В случае использования везикул для последующих *in vitro/in vivo* экспериментов, суспензию рекомендуется заморозить и хранить при -80°C или в жидком азоте. Для решения аналитических задач, везикулы можно хранить до недели при $+4^{\circ}\text{C}$ или до нескольких месяцев при -80°C .

На рисунке 7 представлены результаты примеры результатов анализа ВНВ плазмы, выделенных согласно предложенному протоколу. Так средний размер везикул соответствовал 100 – 130 нм (118 на Рисунке 7А) и 80 – 110 нм (104 нм на Рисунке 7Б) при анализе с помощью ЛКС и АТН, соответственно.

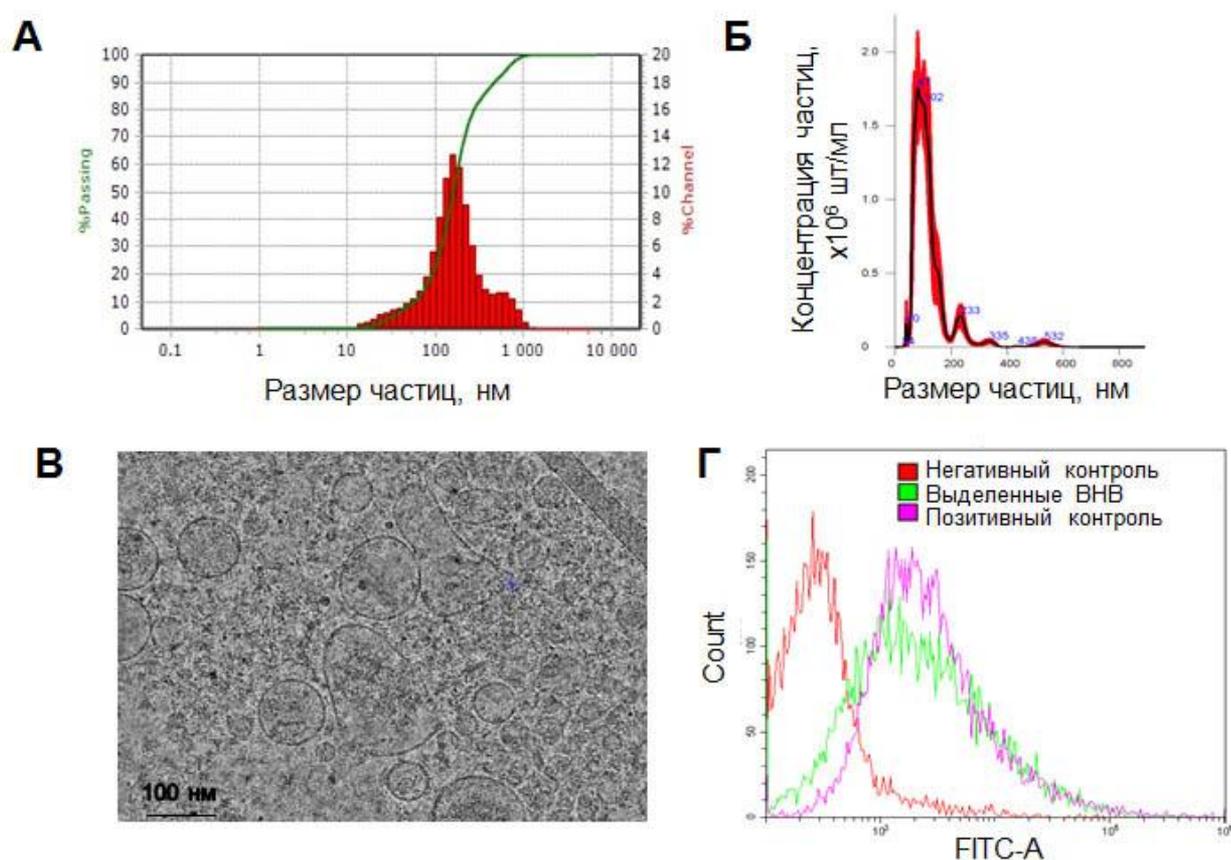


Рисунок 7 - Характеристика ВНВ, выделенных из плазмы методом ультрацентрифугирования. А) Лазерная корреляционная спектроскопия; Б) нанотрековый анализ; В) Криоэлектронная микроскопия; Г) Проточная цитометрия выполнена с помощью набора ExoFACS/HansaBioMed: негативный контроль – латексные частицы после инкубации с антителами к CD63-FITC, позитивитивный контроль – латексные частицы после инкубации с экзосомами (в составе набора) и антителами к CD63-FITC

Наблюдаемая разница в результатах измерений, проведенных этими методами, допустима и объясняется особенностями используемых параметров корреляционной функции. С помощью проточной цитометрии (набор Echo-FACS, Hansa BioMed) показано наличие на везикулярной мембране специфического белкового маркера CD63 (Рисунок 7Г). Как можно видеть на рисунке 7В, выделенные нано-частицы имеют везикулярную структуру. Так, представленный протокол может быть использован для выделения нановезикул из плазмы, характеристики везикул позволяют утверждать, что это в состав смеси входят экзосомы.

2.3.2 Выделение ВНВ из мочи путем агглютинации с помощью лектинов

На основе анализа экзосом из мочи активно развиваются методы диагностики различных системных заболеваний [104, 105] и онкологических заболеваний органов мочевыделительной системы [106]. В основе первой, разрешенной к применению, системы ранней диагностики рака предстательной железы - ExoDx Prostate(IntelliScore) / Exosomes Diagnostics Inc. – лежит именно технология выделения и анализа экзосом мочи.

С точки зрения методики выделения экзосом, имеют значение некоторые очевидные особенности биохимического состава мочи. Во-первых, в моче (в нормальном состоянии) практически нет плазменных белков. В мочу активно экскретируется почечный гликопротеин уромодулин (или белок Тамма-Хорсфалла). Но присутствие этого белка не мешает проведению реакций агглютинации или преципитации мембранных везикул с помощью различных реагентов, взаимодействующих с клеточной мембраной. Во-вторых, диагностически значимые молекулы РНК (мРНК, микроРНК), которые присутствуют в моче, могут быть по-разному представлены в экзосомах и вне экзосом [107]. Это указывает на необходимость в ходе разработки диагностических тест-систем выделения и анализа отдельных фракций мочи.

Так, принципиальная возможность и практическая необходимость разработки метода выделения экзосом из мочи была реализована в ряде работ [108-111]. Около половины предложенных методов основаны на применении различных соединений, связывающих мембранные везикулы и индуцирующие «слипание» везикул в мультивезикулярные конгломераты. Анализ литературных данных позволил предположить, что лектины могут оказаться оптимальным реагентом для «склеивания» везикул [112]. Это гликопротеины (растительного или животного происхождения), основные биологические функции которых основаны на связывании углеводных остатков на поверхности клеточных мембран. Таким образом, потенциал «склеивания» или агглютинации экзосом определяется естественными характеристиками этого класса биологических молекул.

С целью проверки этой гипотезы, эксперименты по формированию везикулярных агглютинатов с помощью лектинов были проведены с использованием среды, полученной после культивации клеток рака предстательной железы, РС-3. Для этого клетки культивировали в стандартных условиях (среда RPMI, 10% FBS, 37°C, 5% CO₂) до 60-70% конfluence. Затем среду заменяли на аналогичную, но в ее состав входила сыворотка без экзосом (exosome-depleted FBS, A2720802, ThermoFisher Scientific, США), и продолжали культивацию до 90-95% конfluence. Среду собирали, фильтровали (фильтр с диаметром пор 1 мкм) и хранили в стеклянной посуде до необходимого объема 40 мл. Перед выделением экзосом среду центрифугировали дважды (2000 xG – 20 мин, 15000 xG – 30 мин) с целью удаления клеток, дебриса и крупных везикул. Затем к среде добавляли Конканавалин А (финальная концентрация 1 мг/л) и инкубировали в течение ночи при 4°C. Осаждение агглютинатов проводили путем центрифугирования (20 000 xG – 90 мин, 4°C). Принципиально аналогичный протокол был использован для выделения ВНВ из мочи, финальный вариант представлен в конце главы.

Оценка выделенных везикул была проведена с помощью метода ЛКС (описан ранее), сканирующей атомно-силовой микроскопии (АСМ), анализ белков и

размера РНК в составе везикул был оценен с помощью вестерн-блоттинга и микроэлектро-фореза, соответственно:

1. Атомно-силовая микроскопия (АСМ) проводилась для визуализации везикули и агрегатов. Для этого препараты промывали ФСБ и наносили на свежесколотую слюду, фиксировали 0,5% раствором глутарового альдегида, промывали дистиллированной водой и высушивали при комнатной температуре. Исследование проводили с помощью сканирующего зондового микроскопа SolverBio (NT-MDT, Зеленоград, Россия) в полуконтактном режиме сканирования на воздухе. Использовали зонды серии NSG03 (NT-MDT, Зеленоград, Россия) с константой жесткости порядка 5 Н/м, амплитуда сканирования составляла 4 нм, скорость сканирования – 1 Гц. Полученные изображения были обработаны с помощью программного обеспечения Image Analysis Nova (NT-MDT, Зеленоград, Россия).
2. Для проведения вестерн-блоттинга образцы были лизированы (0,05 М Tris-HCl, pH 7,4; 0,15 М NaCl, 1% Triton X-100, 1% SDS) в присутствии смеси ингибиторов протеолиза P8340 (Sigma Aldrich, USA) в течение часа, при +40С. После центрифугирования (17 000 xG, 20 минут, +40С), экстракты протеинов были нормализованы с помощью BCA Protein Assay Kit (Thermo Scientific, USA). Электрофорез проводился в 10% SDS-PAAG, для нанесения использовался стандартный нередуцирующий буффер (Laemlli Sample Buffer), в лунку наносили 20 мкг белка. Разделенные электрофорезом белки переносили на поливиниловую мембрану, которую блокировали в течение часа в 0,1% растворе казеина в трис-солевом буфере с твином-20 и инкубировали с первичными антителами: TSG101 (H-2) sc-22774, CD9 (H-110) sc-9148, eIF2C/Ago1-4 (H-300) sc-32977, затем с вторичными антителами, меченными пероксидазой хрена IgG-HRP (sc-2301). Визуализацию проводили с помощью реагента Luminol Reagent (sc-2048) (все от Santa Cruz, США) на аппарате Quantitative Western Blot – LI-COR Biosciences (LICOR Biotechnology, USA).
3. РНК выделяли с помощью набора для выделения (BioSilica, Россия). Для анализа РНК использовали Agilent RNA 6000 Nano Kit (Agilent Technologies Inc.,

USA), измерения проводили в соответствии с протоколом разработчика технологии на аппарате Tape Station 2200 (Agilent Technologies Inc., USA)

Так, при анализе ВНВ культуральной среды удалось наблюдать процесс образования мультивезикулярных конгломератов. На рисунке 8 представлены изображения везикул из среды, сделанные с помощью сканирующей атомно-силовой микроскопии.

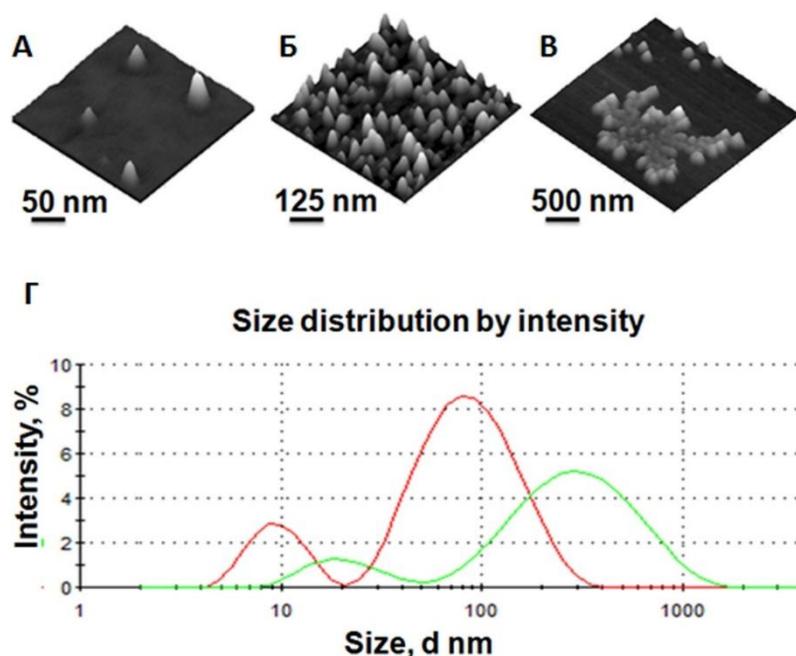


Рисунок 8 - Характеристика ВНВ, выделенных из культуральной среды путем агглютинации лектинами А) Сканирующая атомно-силовая микроскопия, АСМ; Б) лазерная корреляционная спектроскопия, ЛКС

Первое изображение (Рисунок 8А) получено при анализе свежей среды – содержит минимум везикул, второе изображение (Рисунок 8Б) получено при анализе среды после 5 дней инкубации клеток – содержит много везикул, третье изображение (Рисунок 8В) получено после добавления к среде лектина (Конканавалина А) (1 мг/л) и инкубации в течение ночи – заметно образование везикулярных конгломератов. Этот же процесс образования везикулярных агглютинатов был проанализирован с помощью ЛКС (Рисунок 8Г). Так, в исходном состоянии среды детектировалось два «пика», соответствующих фракции белков и везикул (красная линия). Добавление Конканавалина А индуцировало агглютинацию (зеленая линия), этот процесс увеличения размеров и снижения

числа (концентрации) частиц в суспензии отражался сдвигом (вправо) и понижением высоты пиков «пиков». Так, с помощью экспериментов с культуральной средой удалось оптимизировать условия реакции агглютинации.

Затем, аналогичные процедуры были проделаны с образцами мочи. После нескольких этапов оптимизации был выработан протокол выделения экзосом из мочи:

1. Образцы мочи (40 мл) охладить до +4°C
2. Добавить смесь ингибиторов протеиназ (Protease Inhibitor Cocktail, Roche)
3. Центрифугировать (20 000 xG – 45 мин) для удаления клеток, дебриса и крупных везикул.
4. Супернатант аккуратно перенести в чистую пробирку и добавить раствор Конканавалина А до финальной концентрации 2 мг/л
5. Инкубировать на качалке, в течение ночи, при +4°C
6. Центрифугировать (20 000 xG – 90 мин) для осаждения везикулярных агглютинатов.

Полученный таким образом осадок можно ресуспендировать в смеси растворов трипсина 0.25% и Версена 0.02% (1:3) в течение 30-60 минут. После тщательного растворения осадка размер везикул может быть оценен с помощью ЛКС (Рисунок 9А) или НГА.

При необходимости последующего анализа белков или нуклеиновых кислот, осадок может быть непосредственно растворен в соответствующем буфере. На рисунке 9Б представлены результаты сравнительного анализа (Вестерн-блот) т.н. «экзосомальных» маркеров в лизатах клеток РС-3 и везикул, выделенных из культуральной среды (РС-3 cells). Параллельно проведен анализ осадка, полученного после первого раунда центрифугирования мочи (20 000 xG – 45 мин, пункт 3 протокола) и везикул, выделенных после инкубации с Конконавалином А и заключительным центрифугированием (20 000 xG – 90 мин, пункт 6 протокола).

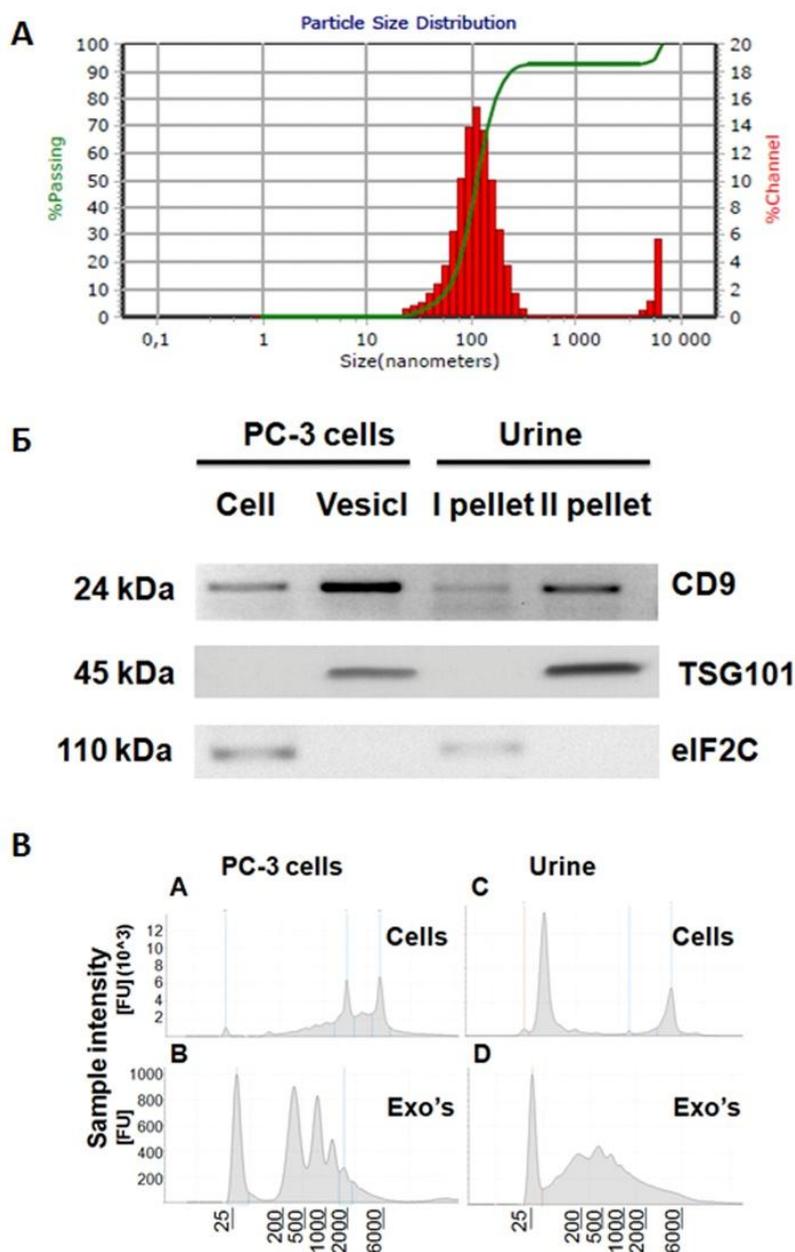


Рисунок 9 - Характеристика ВНВ, выделенных из культуральной среды и мочи методом агглютинации лектином А) Распределение по размеру ВНВ, выделенные из мочи, ЛКС; Б) Анализ белкового состава ВНВ, выделенных из среды и мочи, вестерн-блоттинг; В) Анализ размера РНК в составе везикул, выделенных из среды и мочи, микроэлектрофорез

Относительно высокое содержание белков CD9 и TSG101 и относительно низкое содержание белка eIF2C (Ago2) в материале осадков, полученных после инкубации с Конконавалином А, подтверждают факт выделения ВНВ экзосомальной природы. Дополнительно был проведен анализ

(Микроэлектрофорез на аппарате Agilent 2200 TapeStation System) РНК, выделенной стандартным методом фенольно-хлороформной экстракции, из клеток и везикул, выделенных из среды и мочи. Как видно на рисунке 9В, размерный профиль РНК клеток и везикул существенно отличается. Везикулы содержат большое количество относительно коротких молекул РНК, выполняющих, вероятно, регуляторные функции. Основной фракцией РНК, выделенной из клеток, ожидаемо оказались рибосомальные РНК (18S, 28S).

Полученные данные показывают, что разработанный метод может быть использован для выделения из мочи везикул, которые имеют размер порядка 100 нм, экспрессируют характерные «экзосомальные» белковые маркеры и имеют специфический (отличный от клеточного) состав РНК. По сравнению с ультрацентрифугированием предложенный метод проще, экономичнее, и не требует использования специального оборудования. В рамках исследования не ставилась задача оценки количества выделенных везикул и эффективности предложенной технологии по сравнению с методом ультрацентрифугирования. Но количество ВНВ, выделяемых из 20 мл мочи было достаточно для последующего анализа как везикулярных белков, так и РНК, что обеспечивало решение диагностических задач.

2.3.3 Выделение ВНВ из плазмы для последующего анализа экзосомальных микроРНК методом ОТ-ПЦР

МикроРНК в составе экзосом плазмы является перспективным маркером различных заболеваний, включая онкологические. Циркулирующая в плазме микроРНК представлена тремя фракциями: микроРНК в составе экзосом, микроРНК в составе липопротеинов и микроРНК в комплексе с белком Ago2, компонентом внутриклеточного комплекса RISC. Секреция экзосом и «сортировка» микроРНК из цитоплазмы в состав везикул являются активными и регулируемыми процессами. Это дает основание предполагать, что именно экзосомальная фракция микроРНК имеет максимальный диагностический потенциал, т.к. она может точнее отражать патологические изменения, происходящие с клетками.

Разработка методов диагностики онкологических заболеваний на основе анализа экзосомальных микроРНК «упирается» в проблему низкой концентрации

аналита. Объективно трудно выделить нужное количество экзосомальной РНК из такого объема плазмы, которое можно использовать для диагностики (6-10 мл крови / 3-5 мл плазмы). Количество микроРНК в составе тотальной РНК, выделенной из такого объема плазмы доступными коммерческими наборами (БиоЛабМикс, БиоСилика, АртБиотех, Beckman Coulter, Exiqon, Invitrogen), основанными на сорбции РНК на силике в составе спин-колонок или на поверхности магнитных микрочастиц столь мало, что его нельзя оценить методами спектроскопии. Косвенная оценка может быть проведена лишь путем микроэлектрофореза или анализа известных «house-keeping» молекул путем ОТ-ПЦР. Очевидно, что низкие концентрации аналита позволяют проводить измерения на пороге чувствительности измерительных методик, что компрометирует результаты. Можно предположить, что эффективное выделение из плазмы ВНВ, которые содержат существенную часть циркулирующих микроРНК, является вариантом решения проблемы.

Для решения поставленной задачи нужно было разработать метод, который бы позволял максимально эффективно концентрировать (преципитировать) везикулы, и при этом обеспечивать минимальную контаминацию выделяемого препарата плазменными белками и липопротеинами (которые содержат «балластные» фракции микроРНК плазмы). На основе анализа литературных данных и общих понятий о принципах выделения экзосом из плазмы было сделано предположение, что технология, основанная на феномене формирования двух фаз в водном растворе двух полимеров, может обеспечить оптимальное решение поставленной задачи. Известно, что при определенном сочетании молекулярных масс и концентраций декстран и полиэтиленгликоль формируют двухфазную систему. При этом везикулы концентрируются в фазе (p-pe) декстрана, а белки преимущественно «переходят» в фазу (p-p) полиэтиленгликоля. Принцип работы такой системы представлен в ряде исследований [98, 99] и отчасти реализован в коммерческих наборах (ExoQuick / System Bioscience, Total Exosomes Isolation Reagent / Invitrogen, ExoPrep / HansaBioMed), в которых не происходит классического разделения раствора на две водные фазы, но принципиально

используется тоже свойство супер-гидрофильности полиэтиленгликоля. Классический метод двухфазного разделения обеспечивает «чистоту» получаемого препарата экзосом за счет нескольких последовательных раундов замены «верхней» фазы, содержащей протеины, но при этом критично снижается количество экзосом в «нижней» фазе. Методы, реализованные в коммерческих наборах, не предполагают таких «сложных» процедур последовательного очищения от белков. Они лишь обеспечивают эффективное выделение везикул, но вместе с везикулами выделяются белки и липопротеины, что компрометирует результаты последующего анализа экзосомальных микроРНК.

В рамках исследования были протестированы полимеры (компоненты двухфазной системы) различной молекулярной массы: Декстран 20–200 кДа (Serva), Декстран 450–650 кДа (Sigma-Aldrich), Полиэтиленгликоль 6 кДа (Serva), Полиэтиленгликоль 15; 20 кДа (Loba Chemi), Полиэтиленгликоль 35 кДа (Sigma-Aldrich). Эффективность выделения экзосом в ходе работы оценивалась с помощью ЛКС, присутствие на везикулах экзосомальных маркеров проверялось с помощью дот-блота. Для этого пробы переносили на поливиниловую мембрану, которую блокировали в течение 45 минут в 5% растворе БСА в трис-солевом буфере, затем инкубировали в 0,1% растворе БСА в трис-солевом буфере с 0,05% твином-20 с первичными антителами (CD63 (ab68418, Abcam, USA), CD9 (ab18241, Abcam, USA), HSP70 (ab181606, Abcam, USA), CANX (ab238078, Abcam, USA) and HAS (4T24, HyTest, Finland) в течение ночи при +4°C. Визуализацию блотов проводили с помощью вторичных антител (ab6721 and ab6789, Abcam, USA), конъюгированных с пероксидазой антираббит IgG H&L (HRP), набора Pierce™ ECL Western Blotting Substrate («Thermo Fischer Scientific», США) на аппарате IBright FL1000 («Thermo Fischer Scientific», США). После подтверждения экзосомальной природы ВНВ, выделенных предложенным методом, было проведено сравнение его эффективности с тремя коммерческими наборами: EXO-Prep (HansaBioMed, Эстония), SubX (Capital Bioscience, США) и Total Exosome Isolation Kit (Invitrogen, США). Была использована смесь из пяти образцов. ВНВ были выделены разными методами из 1.5 мл плазмы параллельно. Затем из полученных образцов выделили

везикулярную РНК с помощью коммерческого набора «Лири+» (Биолабмикс, Россия). Количественный анализ трех молекул микроРНК был проведен с помощью наборов AL21-5p, AL126-3p, AL451a-5p (АльгимедТехно, Беларусь) по протоколу производителя на амплификаторе CFX96 Real-Time PCR («Bio-Rad», США). Так, после сравнительной оценки эффективности различных модификаций технологии путем анализа размера частиц в составе фаз методом ЛКС был сформулирован оптимальный протокол, который позволял добиваться максимального очищения экзосом от плазменных белков в ходе двух раундов разделения (Рисунок 10).

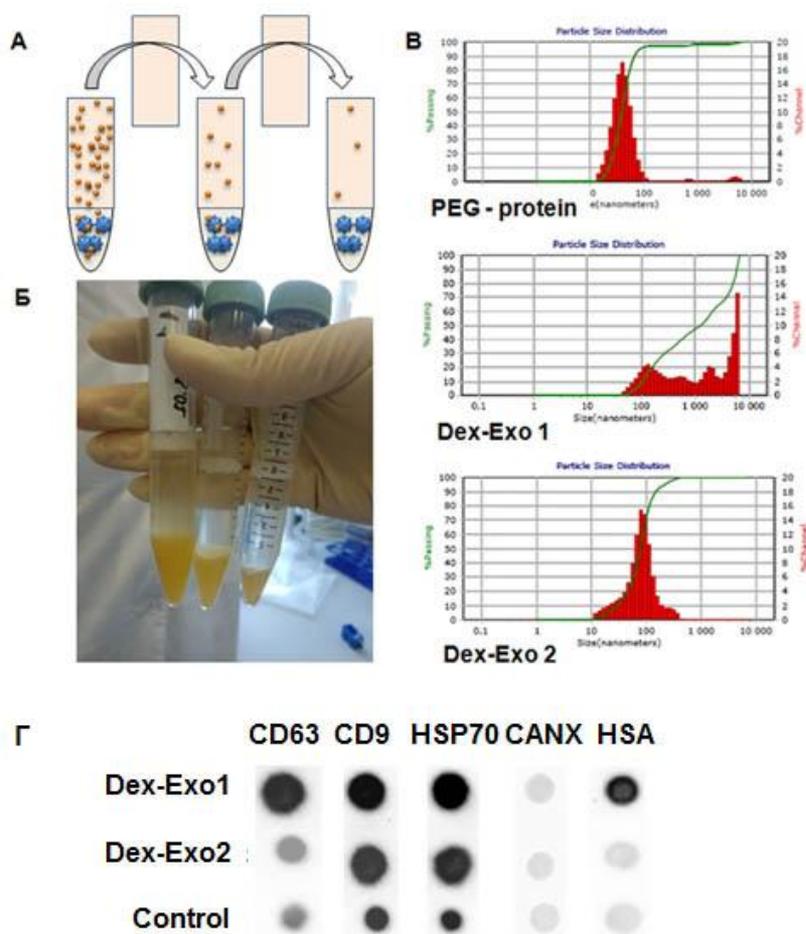


Рисунок 10 - Выделения ВНВ с помощью модифицированного метода двухфазного разделения А) Схема; Б) Пример работы системы с плазмой; В) ЛКС: верхняя фаза (PEG-протеины), после первого разделения (Dex-Exo1), нижняя фаза после повторного разделения (Dex-Exo2); Г) Дот-блот нижних фаз, контроль – ВНВ плазмы выделенные методом УЦ

На рисунке 10 представлена принципиальная схема метода, фотографии пробирок с плазмой после трех последовательных раундов разделения фаз, примеры результатов ЛКС и результаты оценки концентрации маркерных белков в нижних фазах (Dex-Exo1, Dex-Exo2) после двух последовательных раундов разделения фаз.

В результате проведенных исследований был сформирован протокол, предполагающий стартовый объем плазмы - 1.5 мл:

1. Центрифугировать плазму 2 000 xG – 10 мин, супернатант перенести в чистую пробирку
2. Центрифугировать супернатант 10 000 xG – 30 мин, супернатант перенести в чистую пробирку
3. В две центрифужные пробирки объемом 2 мл добавить по 0,0225г декстрана M = 450 – 650 кДа и по 0,0525 г полиэтиленгликоля M = 20 кДа
4. В первую пробирку добавить 1.5 мл супернатанта (п.1-2), во вторую – 1,5 мл ФСБ
5. Хорошо перемешать на вортексе, чтобы полимерная навеска плавала в объеме
6. Инкубировать (до полного растворения полимеров) 1 ч при +4°C, периодически перемешивая
7. Центрифугировать при 1000 xG - 10 минут при +4°C
8. Удалить супернатант из первой пробирки и добавить 1,4 мл раствора из второй (заменить верхнюю фазу системы на основе плазмы, обогащенной белками, верхней фазой системы на основе ФСБ).
9. Центрифугировать при 1000 xG - 10 минут при +4°C
10. Удалить супернатант, осадок лизировать в буфере для последующего выделения РНК

Для оценки эффективности выделения экзосомальной микроРНК экзосомы были выделены из идентичного по качеству и количеству стартового материала (1.5 мл плазмы) предложенным методом и несколькими коммерческими наборами. РНК была выделена из всех полученных осадков. Для ОТ-ПЦР анализа микроРНК были использованы коммерческие системы ОТ-ПЦР, основанные на двух-

фланговом праймировании обратной транскрипции и последующей ПЦР (Альгимед Техно, Беларусь). Все реакции были проведены в трех повторах, разница полученных значений не превышала 0.3 цикла. Результаты представлены в таблице 2, в виде значений пороговых циклов, усредненных для трех технических повторов (\pm SD).

Таблица 2 - Эффективность выделения экзосомальной микроРНК (Ct)

микроРНК	УЦ	ExoPrep HansaBioMed	SubX Capital Biosc	ExosomeIsoKit Invitrogen	Dex550/PEG20
miR451	31.1 \pm 0.2	27.8 \pm 0.5	26.1 \pm 0.2	26.9 \pm 0.6	27.1 \pm 0.2
miR375	36.3 \pm 0.4	29.6 \pm 0.3	28.6 \pm 0.1	29.8 \pm 0.5	27.4 \pm 0.3
miR21	37.4 \pm 0.4	34.3 \pm 0.5	32.9 \pm 0.4	34.2 \pm 0.6	31.7 \pm 0.2

В плане выделения экзосомальной микроРНК предложенный метод существенно более эффективен по сравнению с ультра-центрифугированием, он также вполне сопоставим с несколькими коммерческими аналогами. Протокол предложенной методики несколько сложнее, чем протоколы коммерческих наборов, но стоимость необходимых реагентов существенно ниже стоимости любого коммерческого набора.

2.3.4 Выделение ВНВ из плазмы для последующего анализа поверхностных белковых маркеров методом проточной цитометрии

Состав белковых маркеров на поверхности циркулирующих экзосом отражает многие физиологические аспекты, включая тканевую принадлежность и состояние клеток, секретировавших везикулы. Так называемые «экзосомальные» маркеры (CD63, CD9, CD81 и др.) появляются на мембране экзосом в процессе их формирования и представлены в той или иной степени на всех экзосомах. Экзосомы, секретлируемые клетками определенных тканей, «несут» на поверхности тканеспецифичные маркеры. Например, экзосомы, секретлируемые клетками предстательной железы, «несут» на своей поверхности простат-специфический

мембранный гликопротеин 2-го класса [113]. Активация анаэробного гликолиза в клетках приводит к активации секреции клеткой специфических мембранных белков, опосредующих трансмембранный транспорт протонов, например, PM9SF4 (патент WO2015185730A3). Поэтому предполагается, что мембрана везикул, секретлируемых такими клетками, также содержит этот белок. Таким образом, технология оценки белковых маркеров на поверхности экзосом имеет перспективы клинического применения.

В ряду стандартных исследовательских методов (дот-/вестерн- блоттинг) и высокотехнологичных инновационных технологий, основанных на эффекте плазмонных резонаторов, рамановской спектроскопии и т.д., перспективным с позиции возможности клинического применения методом оценки белковых маркеров на поверхности экзосом является проточная цитометрия. Размер экзосом сопоставим с порогом чувствительности большинства цитометров, поэтому для получения надежных результатов при работе с наноразмерными везикулами технология проточной цитометрии требует определенных модификаций. Экзосомы могут быть фиксированы на поверхности латексных микрочастиц размером несколько микрометров, которые уверенно детектируются цитометром. Существуют коммерческие наборы, предназначенные для анализа экзосом (например, ExoFACS/HansaBioMed, Dynabeads Magnetic Beads / ThermoFisher Scientific), в которых реализованы различные механизмы взаимодействия экзосом с поверхностью частиц. После фиксации везикул к микрочастицам проводятся стандартные процедуры иммуно-детекции белковых молекул с помощью флуоресцентно меченых антител. В ходе проведения анализа каждая микрочастица «воспринимается» цитометром как одно «событие» (event), а интенсивность флуоресцентного сигнала интегрально отражает уровень экспрессии детектируемого маркера и количество везикул «сидящих» на микрочастице. Даже с учетом этой особенности, проточная цитометрия представляется перспективным методом анализа белковых маркеров на поверхности экзосом.

Но эта методика имеет ряд ограничений, в основном касающихся механизма «фиксации» везикул к микрочастицам. Так, в случае неспецифической фиксации

(когда везикулы фиксируются на поверхности частицы в результате, например, электростатического взаимодействия) – экзосомы должны быть предварительно выделены, причем очень «чисто», чтобы избежать контаминации поверхности микрочастиц белками или мембранными фрагментами не экзосомальной природы. Альтернативный вариант специфической фиксации предполагает использование антител к экзосомальным маркерам, которые предварительно «пришиты» к поверхности микрочастиц. На поверхность таких частиц экзосомы можно «сажать» непосредственно из плазмы, минуя этап выделения. Но удобство такой системы (т.н. иммуно-частиц, *immune-beads*) имеет «обратную сторону медали». Во-первых, антитела в составе иммуно-частиц определяют их высокую стоимость и ограниченный срок использования. Во-вторых, экзосомы, «фиксированные» к иммуно-частицам, практически невозможно от них отделить, что затрудняет последующий анализ физических характеристик (ЛКС, НТА) или морфологии (АСМ, СЭМ, Крио-ЭМ) везикул. Так, задачей этого этапа работы было создание метода выделения экзосом из плазмы и «фиксации» их к частицам для последующего анализа методом проточной цитометрии. Анализ литературы подсказал возможное решение этой задачи с помощью аптамеров.

Аптамеры - короткие одноцепочечные олигонуклеотиды, способные с высокой аффинностью и специфичностью связываться с молекулами различной природы. Аффинность взаимодействия некоторых аптамеров с «мишенями» сопоставима или даже превышает аффинность реакции антиген-антитело. По сравнению с антителами аптамеры существенно дешевле и химически стабильны (имеют практически неограниченный срок хранения в условиях глубокой заморозки) [114].

В рамках представленной работы был использован аптамер, последовательность которого описана в литературе [115]: СА ССС САС СТС GCT ССС GTG АСА СТА АТG СТА (ООО «Синтол», Москва). Эта синтетическая молекула формирует вторичную структуру, которая специфично взаимодействует с экзосомальным тетрапептидом CD63. Для «фиксации» аптамера к микрочастице,

5'-конец аптамера был модифицирован биотином, для оценки фиксации к частицам, 3'-конец аптамера был модифицирован флуоресцентной меткой Cy5.5.

В качестве микрочастиц, были использованы супер-парамагнитные частицы (СПМЧ), к поверхности которых был ковалентно фиксирован стрептавидин (ООО «Силекс», Москва). Так, взаимодействие аптамера с магнитной частицей обеспечивалось высокой энергией формирования комплекса «биотин-стрептавидин». Процедура последовательного формирования комплекса для проточной цитометрии включала: (1) связывание магнитных частиц (СПМЧ) и аптамеров с образованием комплекса СПМЧ/АптCD63-Cy5,5; (2) связывание этого комплекса и экзосом, формирования нового комплекса СПМЧ/АптCD63-Cy5,5/Ехо (3) стандартная процедура детекции с использованием флуоресцентно-меченных антител: СПМЧ/АптCD63-Cy5,5/Ехо/abCD9-FITC. Схематично, итоговый мульти-молекулярный комплекс представлен на рисунке 11А.

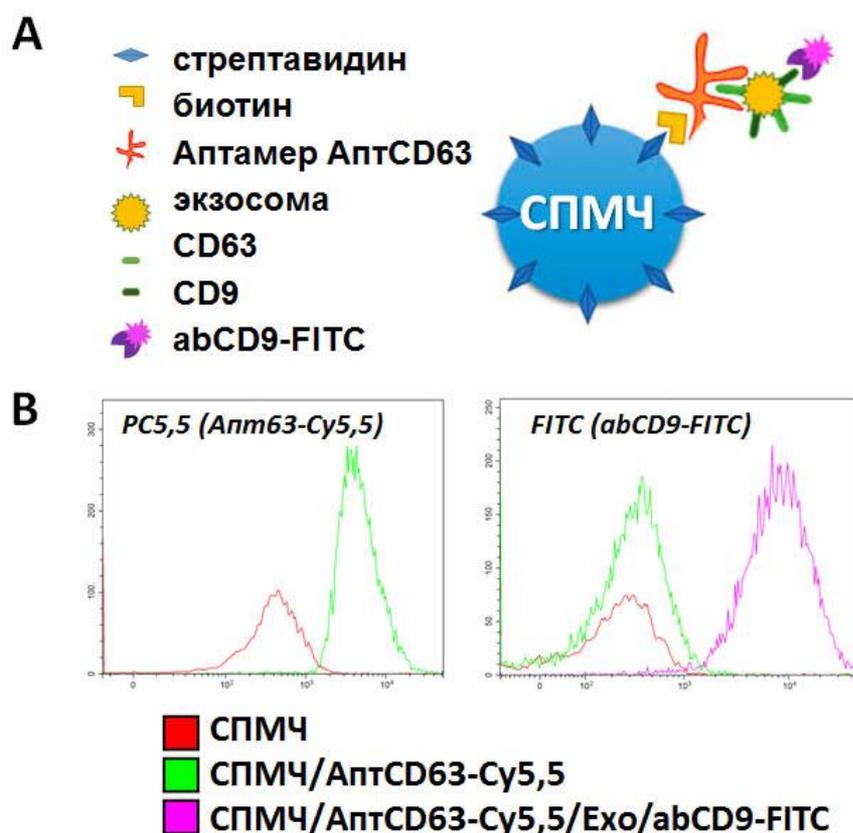


Рисунок 11 - Выделение ВНВ с помощью магнитных частиц и аптамеров А) Схематическое изображение комплекса; Б) Результат детекции маркера CD9 на поверхности экзосом с помощью проточной цитометрии (пояснения в тексте)

Для оценки эффективности выделения CD63(+) везикул комплексы отмывали трижды ФСБ и концентрировали на магнитном штативе, затем добавили 200 мкл 0,2% блокирующего буфера Tropix i-Block (ThermoFisher, США), инкубировали в течение 1 часа при +4°C. Далее проводили мечение маркерных белков в мембране связанных везикул. Для этого комплексы инкубировали с антителами к мембранным белкам CD9 (V P018, BioLegends, США) в течение 2 часов при +4°C. В качестве негативного контроля использовали образец комплекса без ВНВ. Эффективность окрашивания антителами образцов наблюдали на проточном цитометре CytoFLEX (Beckman Coulter, США). Полученные данные анализировались с помощью программного обеспечения CytExpert (Beckman Coulter, США) и Excel (Microsoft Office, США).

После завершения работы по оптимизации условий проведения реакций, был выработан протокол:

А. Подготовка компонентов

1. Для удаления клеток и крупных частиц центрифугировать плазму (2.0 мл) последовательно: 300 xG - 5 мин, 1000 xG - 5 мин, 2500 xG - 5 мин, 10000 xG - 10 мин, перенося супернатант каждый раз в чистую пробирку.
2. Подготовка частиц: 10 мкл суперпарамагнитных частиц (ООО «Силекс», Москва) отмыть трижды фосфатно-солевым буфером, собирая частицы на магнитном штативе в течение 1-2 минут и отбирая супернатант. Ресуспендировать частицы в 10 мкл фосфатно-солевого буфера.
3. Подготовка аптамера: исходную концентрацию аптамера доводят до концентрации 1 нмоль/мл.

Б. Формирование комплекса СПМЧ-АптCD63

4. комплекс СПМЧ-АптCD63 формируется с использованием 1 микрограмма СПМЧ, покрытых стрептавидином и 5 пикомолей Апт-CD63-Cy5,5, модифицированного биотином по 3'-концу и флуоресцентной меткой Cy5,5 по 5'-концу путем инкубации в течение 30 мин при комнатной температуре в 100 мкл фосфатно-солевого буфера.

5. Комплексы СПМЧ-АптCD63 отмываются трижды ФСБ от свободных аптамеров. При необходимости оценки эффективности связывания аптамера, на этом этапе можно оценить интенсивность сигнала СПМЧ с помощью проточной цитометрии.
 6. Отмытые комплексы инкубируют с плазмой (100 мкл 50% р-ра плазмы в ФСБ) в течение 1-3 часов при комнатной температуре, либо в течение ночи (т.е. 12-24 часов) при +4 °С. Инкубация более 24 часов снижает эффективность формирования комплекса.
 7. Образовавшийся комплекс СПМЧ-АптCD63-Ехо собрать на магнитном штативе в течение 1-2 мин, удалить супернатант и промыть комплекс трижды фосфатно-солевым буфером.
- В. Мечение ВНВ (экзосом) в составе комплекса и проточная цитометрия
8. Комплекс СПМЧ-АптCD63-Ехо блокировать с помощью раствора БСА (2%) или другого плокирующего буфера (Fc-block, казеин) в течение 30 мин при +4 °С.
 9. Комплекс СПМЧ-АптCD63-Ехо инкубировать с антителами (АТ) к поверхностному маркеру (например, CD9-FITC) в течение 60 мин при +4 °С. При выборе метки антитела, необходимо учитывать характеристики метки на аптамере.
 10. Комплексы СПМЧ-АптCD63-Ехо-АТ промыть трижды фосфатно-солевым буфером, провести детекцию флуоресцентного сигнала с помощью проточной цитометрии.

На рисунке 11Б представлены результаты анализа СПМЧ и комплексов, сформированных на их основе. Так, при анализе нативных СПМЧ и комплекса СПМЧ-АптCD63-Су5.5 наблюдался сдвиг сигнала в канале-1 (CP5.5), что подтверждало образование связи СПМЧ с аптамерами. Анализ этих двух образцов и комплекса СПМЧ-АптCD63-Ехо-АТCD9-FITC канале-2 (FITC), показывал отсутствие сигнала от комплексов, не содержащих ВНВ, и отчетливый сигнал от комплекса, содержащего везикулы, меченные антителом АТCD9-FITC (Рисунок 11Б).

Так, разработанный метод позволяет выделять экзосомы непосредственно из плазмы и фиксировать к микрочастицам для последующего анализа с помощью проточной цитометрии. Предложенная технология имеет принципиальное сходство с методами на основе иммуно-частиц, но ее реализация существенно дешевле, т.к. функции белковой молекулы антитела выполняет ДНК-аптамер. Более того, использование аптамера предполагает возможность отделения ВНВ путем «изменения» его сторичной структуры с помощью антисмысловой последовательности или условий среды. Таким образом, предложенная технология имеет потенциал дальнейшей оптимизации: создания метода обратимой «фиксации» экзосом к магнитным частицам.

2.4 Выводы и методологические рекомендации

В Главе 2 представлены результаты прикладных исследований, основной целью которых было создание методов выделения везикул, адаптированных к последующему применению в клинической практике. Такая оптимизация была проведена с учетом: (1) особенностей биологического материала (кровь, моча); (2) практической цели дальнейшего анализа везикул (микроРНК/ОТ-ПЦР, белки/проточная цитометрия); (3) стоимости и технической исполнимости. Так, представленные в Главе 2 результаты позволяют сделать следующие выводы:

1. Метод выделения экзосом из мочи с целью последующего анализа экзосомальных микроРНК с помощью лектинов является простым, экономичным и может быть рекомендован для дальнейшего использования [80].
2. Перспективным методом выделения экзосом из плазмы с целью последующего анализа экзосомальных микроРНК (ОТ-ПЦР) является модифицированная технология двухфазного разделения (патент 27417765).
3. Перспективным методом выделения экзосом из плазмы с целью последующего анализа поверхностных белковых маркеров (проточная цитометрия) является технология на основе аптамеров (патент 2741638).

ГЛАВА 3. ДИАГНОСТИЧЕСКИЙ ПОТЕНЦИАЛ АНАЛИЗА ЦИРКУЛИРУЮЩИХ ЭКЗОСОМ

3.1 Обзор литературы: состав ВНВ плазмы, его анализ и интерпретация

Количество и происхождение. Биохимический состав экзосом отражает состав, тканевую принадлежность и состояние клеток, продуцирующих эти везикулы. Экзосомы, секретлируемые клетками определенных тканей, присутствуют в различных биологических средах: моче, ликворе, слюне, семенной жидкости, секрете бронхов, молоке, и др. [116, 117]. В одном миллилитре плазмы содержится $1 - 2 \times 10^{10}$ экзосом [118]. Можно предполагать, что везикулярный состав плазмы является «интегральным» пулом везикул, представляющим клетки всех тканей и органов в соотношении, отражающем их относительную массу, секреторную активность и степень васкуляризации. В контексте задачи разработки методов диагностики онкологических заболеваний плазма представляется наиболее перспективным материалом.

Популяция циркулирующих в плазме экзосом весьма разнородна и динамична. Согласно опубликованным данным, 70-90% экзосом плазмы секретлируются тромбоцитами [119]. Клетки и предшественники клеток крови (лимфоциты, ретикулоциты, дендритные клетки и макрофаги) и эндотелиоциты также вносят существенный вклад в везикулярный состав плазмы. Рядом исследований было показано, что уровень (концентрация) экзосом в плазме выше у пациентов с онкологическими заболеваниями по сравнению со здоровыми донорами [53, 120]. Возможно, оценка концентрации экзосом в плазме может найти клиническое применение в процессе или после лечения пациентов с онкологическими заболеваниями с целью мониторинга состояния и ранней диагностики рецидива. Например, у пациентов с острой миелоидной лейкемией проходивших курс стандартной химиотерапии, снижение уровня циркулирующих экзосом коррелировало с эффектом терапии, т.е. снижением бластных форм в биоптате костного мозга. Более того, у пациентов, находящихся в состоянии стабильной ремиссии, уровень циркулирующих экзосом был сопоставим с показателями здоровых доноров [121]. В другом исследовании уровень экзосом

плазмы определялся у пациентов с рецидивом злокачественной глиомы, проходивших курс иммунотерапии (аутологичными дендритными клетками) [122]. При этом исследуемый показатель, определенный до начала терапии, статистически достоверно коррелировал со степенью злокачественности опухоли. У многих пациентов отмечалось снижение уровня экзосом в плазме после начала терапии и его корреляция с клиническим и иммунологическим ответом [122]. Так, анализ количества циркулирующих экзосом может вероятно быть использован в клинической практике как неспецифический показатель активности (агрессивности) онкологического процесса. Однако, для внедрения такого анализа в практику необходимо оценить зависимость этого параметра от других физиологических показателей. Более «специфические» характеристики опухолевого процесса могут вероятно отражаться не количественными, а качественными изменениями состава циркулирующих экзосом [123].

Диагностическое значение экзосомальных протеинов. В состав экзосом входят мембранные и цитоплазматические белки, состав которых имеет «черты» белкового профиля клеток, секретирующих эти везикулы. К настоящему времени опубликованы сотни работ с результатами т.н. протеомных исследований экзосом, выделенных из плазмы пациентов с онкологическими заболеваниями, и/или экзосом, выделенных из культуральной среды опухолевых клеток после культивации в условиях *in vitro*. Такие исследования, как правило, носят описательный характер, и авторы предполагают потенциальную возможность использования выявленных опухоль-ассоциированных (*cancer-associated*) белковых молекул в качестве диагностических маркеров, например, маркеров рака мочевого пузыря [124], лимфомы [125], мезотелиомы [126], рака поджелудочной железы [127], рака легких [128], остеосаркомы [129], папиллярного рака щитовидной железы [130] и других. Хотя в большинстве случаев такие потенциальные маркеры имеют те же недостатки, что и циркулирующие т.н. онко-маркеры: ПСА, СА125, HE4, СА19-9, белок S100, нейроспецифическая элоназа NSE, пируваткиназа TM2, фрагменты цитокератина 19 CYFRA 21-1 и другие: они являются тканеспецифичными, но не опухоль-специфичными белками или

гликопротеинами. Повышение в плазме концентрации такого маркера может быть вызвано воспалением, гипертрофией, травмой или другим неопухолевым процессом в соответствующей ткани. В этом случае оценка именно экзосомальной фракции такого онко-маркера не имеет принципиального преимущества перед анализом его тотальной концентрации в плазме. Но исследования в данной области ведутся все более и более активно. В таблице 3 представлен ряд белковых молекул, выделенных из экзосом плазмы или мочи пациентов с различными онкологическими заболеваниями.

Таблица 3 - Белковые молекулы, выделенные в качестве маркеров из ВНВ плазмы или мочи пациентов с различными онкологическими заболеваниями

Нозологическая форма заболевания	Протеин в составе экзосом	Ссылка
Плазма / сыворотка		
Глиобластома	EGFR VIII mut	[131, 132]
Рак предстательной железы	PTEN	[133]
Рак молочной железы	Survivin	[134]
Рак яичников	Claudin-4, TFG- β	[135]
Меланома	TYRP2, VLA-4, HSP70, Caveolin, CD63, Met (phosphorylated)	[53]
Немелкоклеточный рак легких	EGRF, CEA	[136]
Рак носоглотки	Galectin-9	[137]
	LMP-1	[138]
Плоскоклеточные опухоли головы и шеи	FasL	[139]
Рак поджелудочной железы	KRAS	[55]
Рак толстой кишки	CEA	[136]

Моча		
Рак предстательной железы	PSMA	[140]
Рак почки	MMP-9, Carbonic anhydrase	[141]
Рак мочевого пузыря	α 6-integrin, MUC-1	[124]
Немелкоклеточный рак легких	LRG-1	[142]

Накопление научной информации приведет к качественно новому пониманию диагностических возможностей анализа экзосомальных белков. Исследования в этой области активно ведутся в нашей стране [143]. В настоящее время можно предположить два вероятных направления:

1. Разработка методов «параллельного» анализа нескольких тканеспецифичных маркеров в составе каждой отдельной везикулы. Такие решения могут быть реализованы в рамках т.н. микрофлюидных технологий, основанных на особенностях поведения малых объемов и потоков жидкостей. Например, в ряде публикаций описаны микрофлюидные чипы, разработанные для диагностики рака яичников путем детекции на поверхности экзосом плазмы нескольких маркеров: EGFR, HER2, CA125, FR α , CD24, EpCAM, CD9 и CD63 [144, 145].
2. Поиск белковых маркеров, характерных именно для везикул трансформированных клеток. Так, например, опухолевые клетки в большинстве случаев характеризуются аномально активным метаболизмом или активацией процесса анаэробного гликолиза, что приводит к повышению концентрации специфических белков (например, TM9SF4) в составе их поверхностной мембраны и, следовательно, в составе мембраны секретируемых этими клетками экзосом (патент WO2015185730A3). Антитела к этим белкам могут быть использованы для иммуноаффинной «пре-селекции» экзосом, секретируемых опухолевыми клетками и последующим анализом именно таких везикул. Этот подход имеет ряд принципиальных ограничений, компрометирующих специфичность такой диагностики. Но он уже успешно

реализован в наборе для выделения из плазмы опухолевых экзосом (Tumor-derived exosomes isolation Kit / Hansa BioMed), и в настоящее время ведутся работы над созданием аналогичной диагностической тест-системы.

Диагностическое значение экзосомальных РНК. В 2007г. впервые было показано наличие нуклеиновых кислот в составе экзосом и возможность их переноса с помощью экзосом из клетки в клетку [8]. С тех пор сотни новых исследований были опубликованы, и ряд компаний работает над созданием диагностических тестов на основе анализа экзосомальных РНК [146-149]. Особый интерес фокусируется на экзосомальных микроРНК (миРНК) – коротких одноцепочечных РНК, регулирующий экспрессию генов на пост-транскрипционном уровне [150, 151]. Интерес определяется несколькими факторами. Во-первых, молекула микроРНК представляет собой мощный регуляторный фактор, перенос которого с помощью экзосом из клетки-продуцента в клетку-реципиент может оказать существенное влияние на биологию последней. Например, было показано, что молекулярными эффекторами морфологических изменений, которые индуцируют ОЭ в тканях–мишенях метастатической диссеминации, являются именно микроРНК [54]. Во-вторых, число известных микроРНК существенно меньше, чем число известных мРНК (информационных РНК), что упрощает анализ и увеличивает возможность определения диагностически значимых комбинаций этих молекул.

Важной особенностью экзосомальных микроРНК является существенное отличие их состава от состава внутриклеточной цитоплазматической микроРНК. Этот феномен был показан для клеток рака молочной железы [152] и колоректальной карциномы [153] в условиях культивации *in vitro*. Есть основания предполагать аналогичную ситуацию *in vivo*: профиль микроРНК клеток опухоли не обязательно «отражается» в изменениях профиля микроРНК циркулирующих экзосом, индуцируемых этой опухолью. С одной стороны, это отчасти осложняет верификацию «опухолевого» происхождения экзосом плазмы, которое можно было бы произвести путем простого сравнения профилей микроРНК плазмы и ткани опухоли. С другой стороны, в основе наблюдаемого феномена лежит

механизм т.н. «активной сортировки» или специфической внутриклеточной селекции молекул микроРНК в процессе формирования экзосом. Можно предполагать, что такая селекция «должна отвечать» потребностям локального роста и метастатической диссеминации опухоли, т.е. может отчасти «унифицировать» профиль микроРНК в составе опухолевых экзосом. Эта гипотеза подтверждается многими исследованиями, описывающими специфические изменения профиля микроРНК в экзосомах, выделенных из плазмы пациентов с раком молочной железы [154], колоректальным раком [155], раком легких [156] и других онкологических заболеваний. Рост объема и активности исследований в этой области в течение последних нескольких лет является косвенным подтверждением огромного потенциала, который может иметь анализ микроРНК экзосом, выделенных из циркулирующей плазмы для диагностики и мониторинга онкологических заболеваний. Работы в этом направлении ведутся и в нашей стране [157].

Диагностическое значение экзосомальных ДНК. Наличие в составе экзосом ядерной ДНК является дискуссионным вопросом. Так, биогенез экзосом (последовательное формирование эндосомы, мультивезикулярного тельца) не предполагает попадание в секретируемые везикулы содержимого клеточных ядер. Но в базе научных публикаций можно найти достаточно статей, авторы которых выделяют и анализируют «экзосомальную ДНК» [118]. Так, например, было показано, что чувствительность метода диагностики немелкоклеточного рака легкого на основе детекции мутантного гена рецептора эпидермального фактора роста в образцах циркулирующей ДНК выше при использовании образцов ДНК, выделенной вместе с экзосомами [158]. Наличие геномной ДНК в образцах экзосом, полученных из плазмы пациентов с раком предстательной железы, и возможность анализа этой ДНК с диагностической целью были продемонстрированы группой исследователей из Университета Хельсинки [159]. Если согласиться с допущением, что геномная ДНК не попадает в экзосомы в процессе их формирования, можно допустить, что либо экзосомы содержат митохондриальную ДНК, либо циркулирующая ДНК связывается и абсорбируется

на поверхности везикул из плазмы. Это не исключает возможность использовать эту ДНК в качестве маркера для диагностики рака.

3.2 Задача и подходы к ее решению

С учетом приведенных литературных данных, короткие регуляторные молекулы РНК – т.н. микроРНК – представляются наиболее перспективным компонентом циркулирующих экзосом в плане разработки новых методов диагностики и мониторинга онкологических заболеваний. Профиль экспрессии микроРНК в опухолевых клетках имеет характерные (для каждой нозологической формы) особенности, которые могут отражаться в специфике профиля микроРНК экзосом, секретируемых такими клетками. Это предположение находит подтверждение в десятках публикаций [150, 160]. Например, экзосомальная микроРНК может рассматриваться, как потенциальный био-маркер колоректального рака [161, 162] и рака предстательной железы [163]. Очевидную роль играет экзосомальная микроРНК в процессе развития рака молочной железы, что может иметь прикладное значение не только в плане диагностики этого заболевания, прогноза течения и предикции ответа на неоадьювантную терапию [164-167]. Одной из основных задач данного исследования была оценка перспектив разработки и внедрения в лабораторную и клиническую практику методов диагностики и мониторинга онкологических заболеваний на основе анализа экзосомальной микроРНК. Поставленная задача решалась с помощью нескольких методов. Предполагалось:

- Разработать методику и оценить диагностическую значимость анализа микроРНК из тотальной популяции экзосом плазмы для диагностики колоректальной карциномы (КРК)
- Разработать методику и оценить диагностическую значимость анализа микроРНК из экзосом мочи для диагностики рака предстательной железы (РПЖ)
- Разработать методику и оценить диагностическую значимость анализа микроРНК из тотальной популяции экзосом плазмы для дифференциальной диагностики узловых заболеваний щитовидной железы (УОЩЖ)

- Разработать методику и оценить перспективы клинического применения анализа микроРНК из тотальной популяции экзосом плазмы с целью прогнозирования ответа на нео-адьювантную терапию рака молочной железы (РМЖ)
- Оценить возможность и целесообразность выделения тканеспецифичной фракции экзосом из тотальной популяции экзосом плазмы с целью оптимизации показателей диагностической значимости разработанных ранее методик.
- Оптимизировать методику анализа микроРНК с целью снижения стоимости и повышения технологичности ранее разработанных диагностических подходов.

3.3 Материалы и методы

3.3.1 Сбор и консервация биологического материала (плазмы, мочи)

Материал для исследования собирался в нескольких клиниках: ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Петрова» Минздрава России (СПб), ФГБУ «ГНЦК им. А.Н. Рыжих» (Москва), СПбГУ «Клиника высоких медицинских технологий им. Н.И. Пирогова» (СПб). Перед включением в исследование все пациенты ознакомились и подписали информированное согласие на участие в исследовании и сдаче материала. После сбора материала и формирования базы данных вся клиническая информация деперсонализировалась. В таблице 4 представлены характеристики пациентов.

Таблица 4 - Образцы клинического материала (плазма, моча)

	Нозологическая форма (гистологический тип)	Стадия	Мужчины /женщины	Средний возраст	Количество образцов
1	Колоректальная карцинома (плазма)	T ₍₁₋₃₎ N ₀ M ₍₀₋₁₎	61/49	64	110
2	Рак предстательной железы (моча)	T ₍₁₋₃₎ N ₀ M ₀	25/0	65	25

	Рак предстательной железы (плазма)	$T_{(1-3)}N_xM_x$	20/0	68	20
3	Рак щитовидной железы (плазма)	$T_{(1-4)}N_0M_0$	14/46	53	60
4	Рак молочной железы (плазма)	$T_{(2-3)}N_{(0-1)}M_0$	47	54	47
5	Здоровые доноры		95/32	55	127

Венозная кровь собиралась в вакутейнеры с ЭДТА, плазма отделялась от эритроцитарной массы через (максимум) 10 минут после сбора крови с целью минимизации в плазме количества везикул, секретлируемых тромбоцитами. Плазма аликвотировалась и хранилась при -80°C .

Образцы мочи центрифугировали (300 xG, в течение 15 мин, при $+4^{\circ}\text{C}$), супернатант переносили в чистые пробирки и хранили при -80°C .

3.3.2 Выделение ВНВ

Для выделения экзосом из плазмы использовали стандартную методику [76] с незначительными модификациями. Образцы (2 мл) размораживали до $+4^{\circ}\text{C}$, разводили 1:1 в фосфатно-солевом буфере (ФСБ) и последовательно центрифугировали при 300 xG, 2 000 xG и 10 000 xG в течение 30 минут для осаждения клеточного детрита и крупных мембранных везикул. Экзосомы выделяли из супернатанта путем ультрацентрифугирования (Beckman Coulter, США) при 110.000 xG, в течение 90 мин, при $+4^{\circ}\text{C}$. Осадок, содержащий экзосомы, разводили в 100 мкл ФСБ, и замораживали при -80°C или хранили при $+4^{\circ}\text{C}$ и использовали для последующих экспериментов в течение 2-3 дней.

Для выделения экзосом из мочи пробы медленно размораживали до $+4^{\circ}\text{C}$ и центрифугировали (20 000 xG, 45 мин) для удаления клеточного детрита, инкубировали с Конканавалином А (2 мг/л) на качалке при $+4^{\circ}\text{C}$ в течение ночи и

снова центрифугировали при 20 000 xG, 90 мин. Осадок, содержащий экзосомы, растворяли в фосфатно-солевом буфере и хранили при - 80°C или при +4°C в случае использования для последующих экспериментов в течение 2-3 дней.

3.3.3 Характеристика выделенных ВНВ

Динамическое светорассеяние (dynamic light scattering, DLS) или лазерная корреляционная спектроскопия была использована в качестве основного метода оценки размера и относительной «чистоты» везикул, выделенных из биологических жидкостей. Измерения проводили на лазерном анализаторе Nanotrac Wave II, (Microtrac, Германия). Размер везикул (гидродинамический радиус) рассчитывался на основе данных о коэффициенте диффузии при установленных параметрах вязкости и температуры. Результат измерений представлен в виде гистограммы распределения частиц по размерам (гистограмма фракционного состава), в которой ось абсцисс – шкала размеров представлена в нанометрах, а по оси ординат - вклад в общее рассеяние образца частиц данного размера в процентах.

Нано-трековый анализ (Nano-particles tracking analysis, NTA) использовался для более точной оценки размера везикул и определения их концентрации в выделенном образце. Измерения проводили на аппарате NanoSight NS300 (Malvern) при нескольких разведениях в соответствии с инструкциями производителя.

Проточную цитометрию (flow cytometry) применяли для оценки экспрессии поверхностных белковых молекул – т.н. экзосомальных маркеров. Для анализа экзосом (размер которых соизмерим с пороговым размером частиц, детектируемых цитометром) традиционная технология проточной цитометрии была модифицирована: использовались латексные микрочастицы диаметром 4 мкм неспецифично связывающие мембранные везикулы (Exo-FACS / HansaBioMed). Оценку экспрессии экзосомальных маркеров на поверхности экзосом проводили после инкубации комплексов «микрочастица-экзосомы» с флуоресцентно мечеными антителами: anti-CD9 и anti-CD63 (Abcam, США). Измерения проводили на аппарате CytoFLEX (Beckman Coulter).

В ряде случаев был использован альтернативный вариант анализа белковых компонентов экзосом – *вестерн-блоттинг* (*Western-blotting*). В этом случае образцы выделенных везикул растворялись в лизис-буфере (0,05 М Tris-HCl, pH 7,4; 0,15 М NaCl, 1% Triton X-100, 1% SDS) в присутствии смеси ингибиторов протеолиза P8340 (Sigma Aldrich, USA) в течение часа, при +4°C. После центрифугирования (17 000 xG, 20 минут, +4°C), экстракты протеинов были нормализованы по концентрации белка с помощью BCA Protein Assay Kit (Thermo Scientific). Электрофорез проводился в 10% SDS-ПААГ, для нанесения использовался стандартный нередуцирующий буфер (Laemlli Sample Buffer), в лунки наносили равное количество (от 20 до 30 мкг) белка. Разделенные электрофорезом белки переносили на поливиниловую мембрану, которую блокировали в течение часа в 0,1% растворе казеина в трис-солевом буфере с твином Tween-20 и инкубировали с антителами против TSG101 или CD9 производства компании Santa Cruz, США. Визуализацию блотов проводили с помощью вторичных антител, меченных пероксидазой хрена (ab6721 and ab6789, Abcam, USA), набора Pierce™ ECL Western Blotting Substrate kit (Thermo Fischer Scientific, USA) на аппарате Quantitative Western Blot – LI-COR Biosciences (LICOR Biotechnology).

Криоэлектронная микроскопия (Cryo-EM) проводилась с целью оценки морфологии выделенных экзосом на просвечивающем криоэлектронном микроскопе Titan Krios 60-300 TEM/STEM (FEI), оснащенном высокочувствительным DED (Direct electron detector) детектором электронов Falcon II (FEI) и корректором сферических аберраций (CEOS). Электронно-микроскопические медные сетки, покрытые тонким слоем аморфного углерода, были обработаны в тлеющем разряде с использованием установки Pelco easi Glow для получения гидрофильной поверхности. Далее на сетки наносили 3 мкл препарата, и, с помощью установки Vitrobot Mark IV (FEI), проводили процедуру мгновенной заморозки образцов в жидком этане, охлажденном до температуры жидкого азота (-196 °C). В результате образцы были зафиксированы в тонком слое аморфного льда, что позволило исследовать везикулы в нативном состоянии. Для

минимизации радиационных повреждений набор данных проводился с помощью программного обеспечения EPU (FEI) в режиме малых доз.

3.3.4 Выделение экзосомальной РНК

РНК из экзосом выделяли с помощью набора для выделения «Лира+» (БиоЛабМикс). Для количественного и качественного анализа РНК использовали приборы: NanoDrop 2000 (Thermo Scientific), и Tape Station 2200 (Agilent Technologies Inc.), измерения проводили в соответствии с инструкциями производителей.

3.3.5 Количественный анализ микроРНК методом ОТ-ПЦР

Для количественного анализа молекул микроРНК, содержащихся в экзосомах были использованы два принципиально разных подхода:

- «Профайлинг», или одновременный (параллельный), анализ концентрации 84 микро-РНК, ассоциированных с развитием онкологических заболеваний, был проведен для широкой сравнительной оценки статуса многих молекул с целью последующей «валидации» результатов. Эти исследования были сделаны с использованием реагентов компании Exiqon (Дания): miRCURY LNA Universal RT microRNA Polyadenylation and cDNA synthesis Kit, Cancer Focus microRNA PCR Panels, ExiLent SYBR Green master mix. В среднем такой подход помогал сравнивать профиль экспрессии микроРНК в разных образцах, сопоставлять полученные данные и определять «потенциально» маркерные молекулы.
- С целью валидации данных «профайлингового» анализа и оценки уровня экспрессии отдельных молекул микроРНК в образцах клинического материала были использованы различные методики обратной транскрипции и ПЦР. В большинстве случаев была использована реагентика (системы для ОТ-ПЦР анализа отдельных микроРНК) производства компании Algimed Techno / Беларусь. В ряде случаев дизайн олигонуклеотидов производился самостоятельно (последовательности праймеров для обратной транскрипции и ПЦР могут быть предоставлены автором по запросу), синтез олигонуклеотидов проводился разными компаниями (ООО «Синтол» / Москва, ЗАО «ВекторБест» / Новосибирск,

ОДО «Праймтех» / Минск, «Exiqon» Ltd. / Дания). Прочие компоненты реакций обратной транскрипции и ПЦР (ферменты, буферы, нуклеотиды) были произведены ООО «БиоЛабМикс» / Новосибирск. ПЦР проводили на аппарате CFX96 Touch™ Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad, США). Все реакции проводили в трех повторах, результаты усредняли. Нормализацию производили относительно референсных микроРНК (U6 snRNA, miR-191-5p) или относительного среднего для каждого эксперимента значения C_t по формуле $2^{(C_t \text{ reference} - C_t \text{ target})}$. При формировании и сравнение результатов анализа групп образцов (клинических групп), оценку статистической значимости наблюдаемых различий проводили путем вычисления значения U-критерия Mann-Whitney (при сравнении двух групп) или критерия Краскела-Уоллиса (при сравнении трех и более групп). Выбор метода статистического анализа определялся малым числом образцов в группах и характером (непараметрическим) распределения значений в группах. Статистические расчеты выполнены с помощью программы Graph Pad Prism 6, Sigma Plot 12.

3.4 Результаты

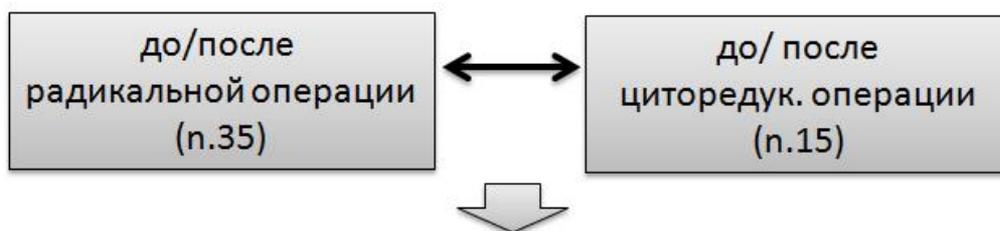
3.4.1 Диагностика колоректальной карциномы (КРК)

Концепция. Потенциальная возможность разработки метода диагностики КРК на основе анализа микроРНК, выделенной из экзосом плазмы, была показана в ряде публикаций. Первое исследование, выявившее диагностический потенциал экзосомальных микроРНК при КРК, было опубликовано группой японских исследователей в 2014 [155]. Авторы этой работы описали несколько молекул микроРНК, концентрация которых отличала пациентов с КРК от здоровых доноров, а также пациентов до и после хирургического лечения. За последующие три года в печати появилось еще несколько аналогичных исследований [168-170], в которых были показаны диагностические/предиктивные значения определенных микроРНК. В большинстве случаев проводилось сравнение двух групп: пациентов и здоровых доноров, которое выявляло различия уровней концентрации тех или иных микроРНК, выделенных из экзосом плазмы. Эти работы доказывали возможность использования экзосомальных микроРНК в качестве «маркеров»

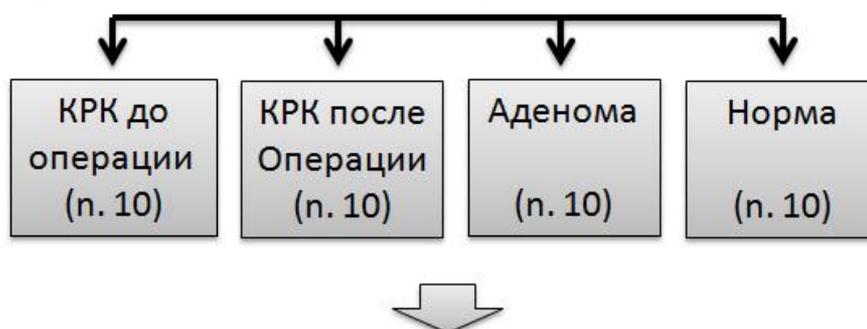
КРК, но перспективы практического применения и клинической интерпретации этих полученных данных обсуждались авторами осторожно. В целом, результаты опубликованных к настоящему моменту исследований представляются слишком сырыми и разнородными чтобы послужить основой для создания и внедрения в клинику диагностических тест-систем. Кроме упомянутой ранее проблемы отсутствия стандартов работы с ВНВ (экзосомами), причиной такого «разнообразия» научных данных могут служить и объективные физиологические и/или патофизиологические факторы: индивидуальные особенности пациентов, коморбидный статус, течение основного заболевания, эффект лечения и др. С учетом цели исследования и литературных данных задачей данного этапа исследований была оценка перспектив разработки метода диагностики КРК на основе анализа экзосом плазмы.

Дизайн исследования. Данное исследование было спланировано с целью получения достоверных результатов на относительно небольшой группе пациентов и исключения влияния на результаты анализа дополнительных факторов (наркоза, операции и послеоперационного периода). В работу был включен материал (плазма) от пациентов до и после операции. Сравнение проводилось между пациентами двух групп: пациенты, перенесшие радикальную (1) и циторедуктивную (2) операцию. Профиль концентрации экзосомальных микроРНК оценивался с целью выделения молекул «ушедших» из циркуляции после операции, но лишь в группе 1. Это позволяло предполагать, что относительное повышение концентрации таких молекул ассоциировано с фактом наличия опухоли. Валидацию полученных данных проводили на независимой выборке пациентов четырех групп: здоровых доноров, пациентов с доброкачественными образованиями толстой кишки, пациентов с КРК до операции и после операции. В заключение, оценка параметров диагностической значимости предложенного метода была проведена на материале, полученном от 20 пациентов с КРК и 10 здоровых доноров. Дизайн исследования представлен на рисунке 12.

**1. Широкий «профайлинг»
Опухоль-ассоциированных микроРНК (n. 84)**



**2. Валидация данных
дифференц. экспрессии выбранных микроРНК (n.12)**



**3. Оценка диагностической значимости
пары «реципрокных микроРНК» miR-223/miR-181a**

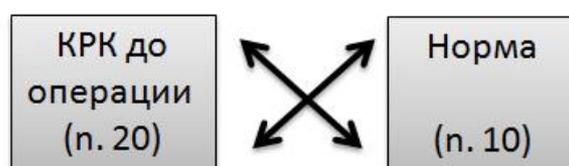


Рисунок 12 - Дизайн исследования 1) Широкий «профайлинг» микроРНК в двух группах с целью определения потенциально «маркерных» молекул; 2) Сравнительный анализ выбранных потенциально «маркерных» в четырех клинических группах с целью валидации; 3) Оценка диагностической значимости разработанного критерия – соотношения концентрации двух молекул с реципрокным характером болезнь-ассоциированных изменений (реципрокных пар)

Выделение ВНВ. Везикулы выделяли методом дифференциального центрифугирования и анализировали в соответствии с рекомендациями ISEV (International Society of Extracellular Vesicles) [74]. Так, по результатам ЛКС, размер

выделенных везикул колебался в диапазоне 90-250 нм (Рисунок 13А). По результатам крио-ЭМ единичные везикулы представляли собой «пузырьки», ограниченные двуслойной мембраной (Рисунок 13В). С помощью проточной цитометрии на поверхности везикул определялись т.н. «экзосомальные» маркеры: тетраспанины CD9 (Рисунок 13С) и CD63.

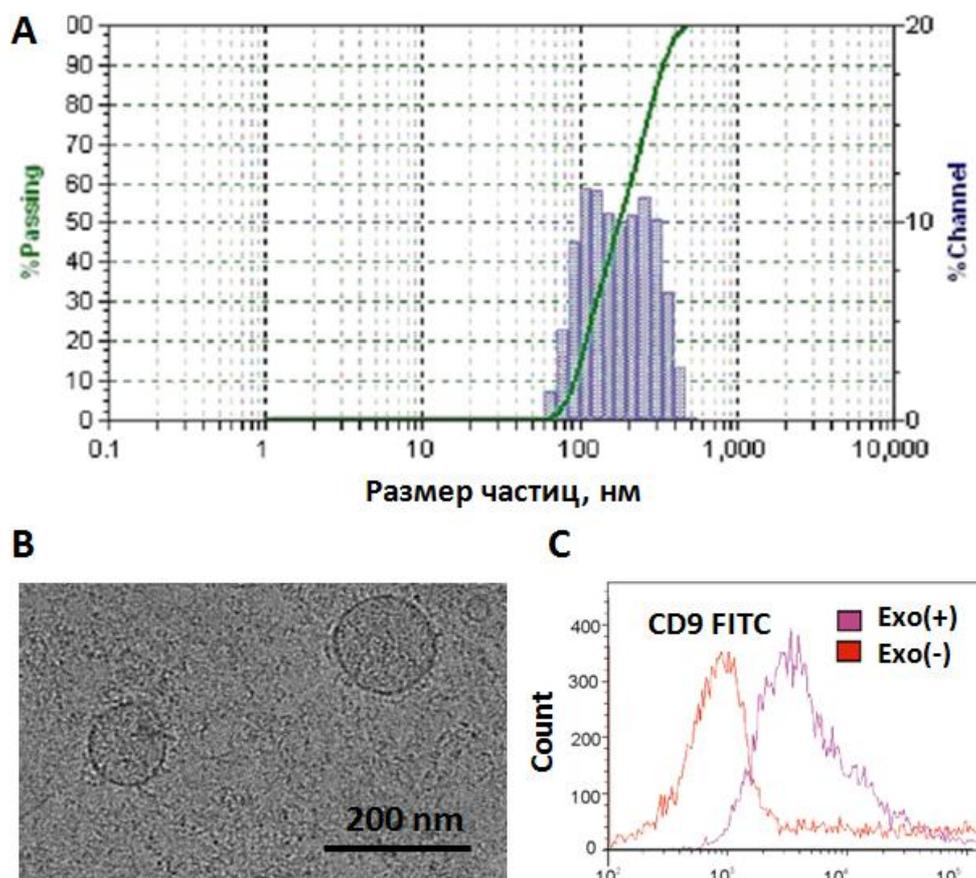


Рисунок 13 - Физико-химические характеристики везикул, выделенных из плазмы А) определение размера везикул методом ЛКС; В) результаты крио-ЭМ; С) характеристика везикул по поверхностным маркерам при помощи проточной цитометрии (набор ExoFACS/HansaBioMed), негативный контроль Exo(-) - латексные частицы после инкубации с антителами к CD9-FITC, Exo(+) – латексные частицы после инкубации с ВНВ, антителами к CD9-FITC

Полученные данные в совокупности позволяли полагать, что в анализируемых препаратах содержались ВНВ и часть которых имела экзосомальную природу. В соответствии с отработанным протоколом были

выделены ВНВ плазмы 110 пациентов и 10 здоровых доноров. Объем плазмы составлял 3 мл, осадок, содержащий ВНВ ресуспендировали в 100 мкл ФСБ.

Выделение РНК и анализ микроРНК. Из ВНВ была выделена тотальная РНК, анализ концентрации («профайлинг») отдельных микроРНК в каждом образце был проведен с помощью реакции ОТ-ПЦР, «панель» включала 84 молекулы. Полученные результаты (значения Ct) нормализовывали относительно среднего для панели значения (global Ct), затем результаты анализа отдельных панелей «выравнивали» с помощью калибраторов (inter-plate calibrators) и проводили сравнение данных анализа образцов каждого пациента до и после операции. На рисунке 14 представлен пример результатов такого сравнения для одного пациента по всем тестируемым молекулам микроРНК (расположены по оси X). Отклонение по оси Y соответствует изменению концентрации определенной молекулы (значение соотношений двух концентраций представлены как $\text{Log}(2)$, так чтобы в случае идентичных уровней экспрессии отдельной молекулы в сравниваемых образцах значение относительной концентрации оценивалось как 0).

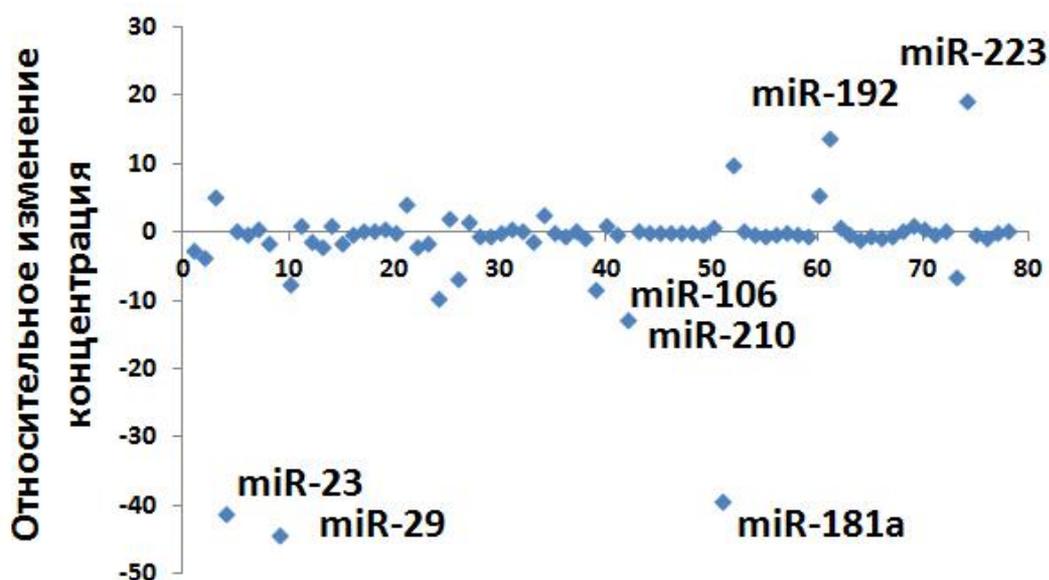


Рисунок 14 - Сравнение экспрессии 84 микорРНК в образцах пациента N до и после операции, по оси X расположены тестируемые молекулы микроРНК, по оси Y - изменение концентрации молекул

Молекулы, концентрация которых не отличалась в образцах, полученных до и после операции, обозначены точками, расположенными на (вдоль) оси X. Так, на представленном рисунке видно, что концентрация большинства микроРНК не изменилась после (из-за) операции. Изменилась концентрация лишь нескольких микроРНК: концентрация miR-23, miR-29, miR-181 понизилась, а miR-192, miR-223 повысилась.

Результаты, полученные на данном этапе анализа при сравнении групп пациентов, не были статистически значимыми. Но на основе этих данных удалось выбрать 12 «потенциально маркерных» молекул, однонаправленные изменения концентрации которых были ассоциированы с перенесенной радикальной операцией более чем у половины пациентов группы 1 (n=35), но не наблюдалось у пациентов, перенесших циторедуктивную операцию группы 2, (n=15). Было сделано предположение, что наблюдаемые изменения могут быть связаны с фактом существования опухоли.

С целью проверки этого предположения анализ концентрации таких «потенциально маркерных» молекул был проведен на независимых группах: здоровых донорах; пациентах, перенесших диагностическую колоноскопию; пациентах с диагнозом «аденоматозный полип»; пациентах с диагнозом КРК (аденокарцинома) и пациентах с КРК после радикальной операции. В каждой группе было по 10 пациентов.

Анализ отдельных молекул проводился с использованием аналитических систем для ОТ-ПЦР (Альгимед Техно, Беларусь). Нормализация результатов проводилась относительно уровня экспрессии miR-191-5p, для которой был выявлен относительно стабильный уровень экспрессии в ходе первого этапа исследования (geNorm N = 1,21). При анализе данных, полученных для разных клинических групп, был выявлен ряд статистически значимых ассоциаций (Рисунок 15).

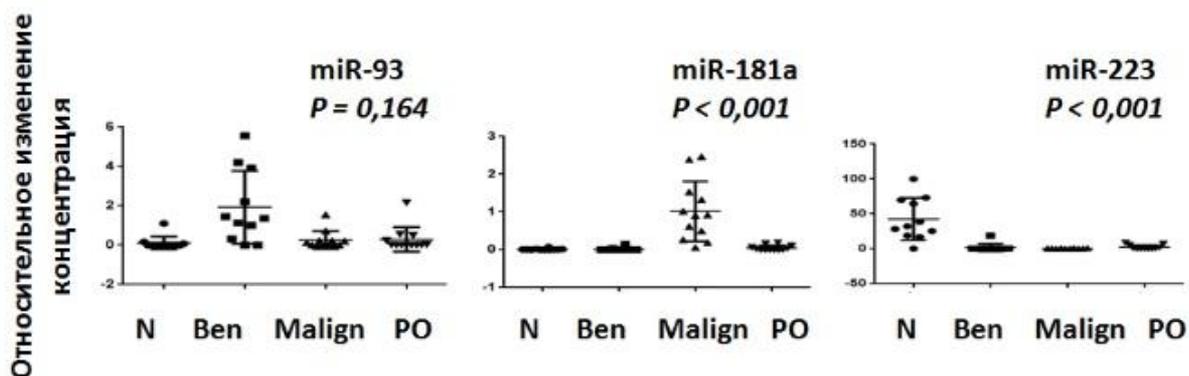


Рисунок 15 - Анализ экспрессии miR-93, miR-181a и miR-223 в материале ВНВ плазмы, N –здоровые доноры (n=10), Ben - пациенты с доброкачественными новообразованиями кишечника (n=10), Malign - пациенты с диагнозом КРК (n=10), PO - пациенты с КРК после радикальной операции (n=10). Результаты нормализованы относительно уровня экспрессии miR-191-5p, оценка статистической значимости разницы, наблюдаемой при сравнении групп, проведена с помощью критерия Kruskal–Wallis

Например, концентрация экзосомальной фракции miR-93 была выше в группе пациентов с доброкачественными образованиями толстой кишки по сравнению с другими группами, но эта разница не была статистически значимой. Концентрация miR-223 у здоровых доноров была выше, чем у всех пациентов, повышение концентрации miR-181a наблюдалось у пациентов с КРК. В этих случаях этих случаях наблюдаемая разница была статистически значима.

Целью данной работы была оценка диагностической значимости метода, т.е. потенциал его применения с целью ранней диагностики / скрининга КРП. Эта задача предполагала поиск параметра, который не просто отличает группы пациентов, но может быть использован для персонализированной диагностики, т.е. для оценки состояния одного пациента. В ряде опубликованных ранее работ [171, 172] нами был предложен метод оценки соотношения т.н. «реципрокных микроРНК пар» - расчет соотношения концентраций молекул, имеющих тенденцию к разнонаправленным болезнь-ассоциированным экспрессионным изменениям. В основе этого подхода лежит предположение о сочетанных

регуляторных изменениях, когда развитие заболевания ассоциировано с активацией экспрессии одной и угнетением экспрессии другой молекулы. Было показано, что такие соотношения могут иметь относительно высокие показатели диагностической значимости. Основным достоинством этого метода является отсутствие необходимости нормализации данных ПЦР, что в случае анализа микроРНК существенно усложняет интерпретацию данных [173]. Так, используя разработанный ранее алгоритм было подобрано несколько «реципрокных микроРНК пар» и проведена оценка диагностической ценности каждой такой пары с помощью ROC-анализа. Для этого был использован клинический материал независимой выборки пациентов с диагнозом КРР (n=20) и здоровых доноров (n=10). Оптимальные результаты были получены для пары miR-223/miR-181a (Рисунок 16): AUC=0,96; чувствительность = 0,93; специфичность = 0,88 (при значении Cutoff = 1,53).

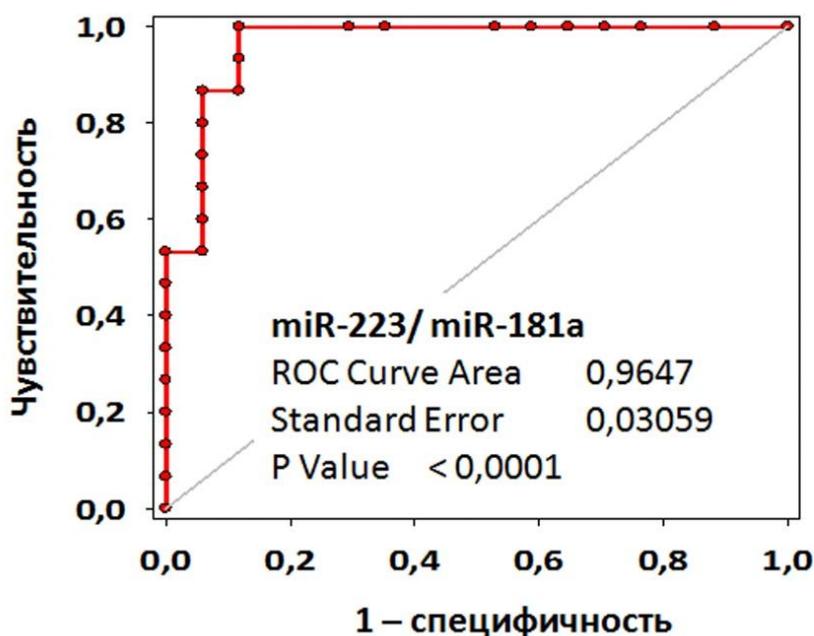


Рисунок 16 - Оценка диагностической ценности «реципрокной микроРНК пары» - miR-223/miR-181a с помощью ROC-анализа: AUC = 0,96; чувствительность = 0,93; специфичность = 0,88 (при значении Cutoff = 1,53)

Полученные результаты демонстрируют возможность разработки метода диагностики КРК на основе анализа микроРНК из ВНВ плазмы, пути реализации этой возможности обсуждаются в заключение главы.

3.4.2 Диагностика рака предстательной железы (РПЖ)

Концепция. Разработка методов диагностики РПЖ на основе анализа ВНВ проводится активно по ряду причин социального и экономического характера. В течение последних лет были разработаны и предложены для клинического применения десятки лабораторных тестов для диагностики и/или мониторинга течения РПЖ (phi, ProgenSA, Prostarix, Oncotype DX Prostate Cancer Assay, ConfirmMDx, Prostate Core Mitotic Test и др.). Но в рутинной работе все еще широко используется тест на ПСА, который является весьма неспецифичным лабораторным параметром и помогает в решении лишь ограниченного круга клинических вопросов. Поэтому разработка новых диагностических подходов является актуальной проблемой.

В современной научной литературе представлены десятки статей, описывающих возможности использования экзосом и экзосомальных микроРНК для диагностики, мониторинга течения РПЖ [174-177]. Причем одинаково активно исследуются экзосомы из мочи и плазмы. Важным этапом на пути разработки тест-систем на основе анализа экзосом явилось создание нового теста «Prostate Cancer Liquid Biopsy Test», в основе которого лежит анализ микроРНК из экзосом мочи (Exosomics Diagnostics). С учетом цели исследования и литературных данных задачей данного этапа работы была оценка перспектив разработки метода диагностики РПЖ на основе анализа экзосом мочи.

Дизайн исследования. В работе был использован материал пациентов с верифицированным РПЖ и здоровых доноров соответствующей возрастной группы, не имеющих клинических проявлений РПЖ, с уровнем ПСА менее 4 нг/мл. Клинические данные представлены в таблице 5. В рамках исследования проводилось сравнение двух групп: пациентов и здоровых доноров.

Таблица 5 - Клиническая характеристика пациентов

		РПЖ	Контроль
Возраст, медиана [IQR]		65 [43-78]	67 [63-75]
ПСА, нг/мл	< 10	9	
	10 - 20	10	
	≥ 20	6	
Сумма Глисона	< 6	0	
	6 - 7	20	
	≥ 8	5	
Стадийность	T1	3	
	T2	15	
	T3	7	
Общее кол-во		25	25

Выделение экзосом. Экзосомы выделяли из 30 мл мочи с помощью разработанного ранее метода агглютинации лектином (Конканавалином А), подробно описанного в параграфе 2.3.2. Для оценки качества выделенных везикул использовали традиционные методы (Рисунок 17). По данным нано-трекового анализа (НТА) выделенные ВНВ имели диаметр около 100 нм (Рисунок 17 А). Концентрация везикул на этом этапе работы не оценивалась, т.к. количества материала заведомо хватало для последующего выделения РНК. Наличие на поверхности везикул т.н. экзосомальных маркеров (CD63, CD9) было оценено в нескольких образцах с помощью проточной цитометрии (Рисунок 17 Б).

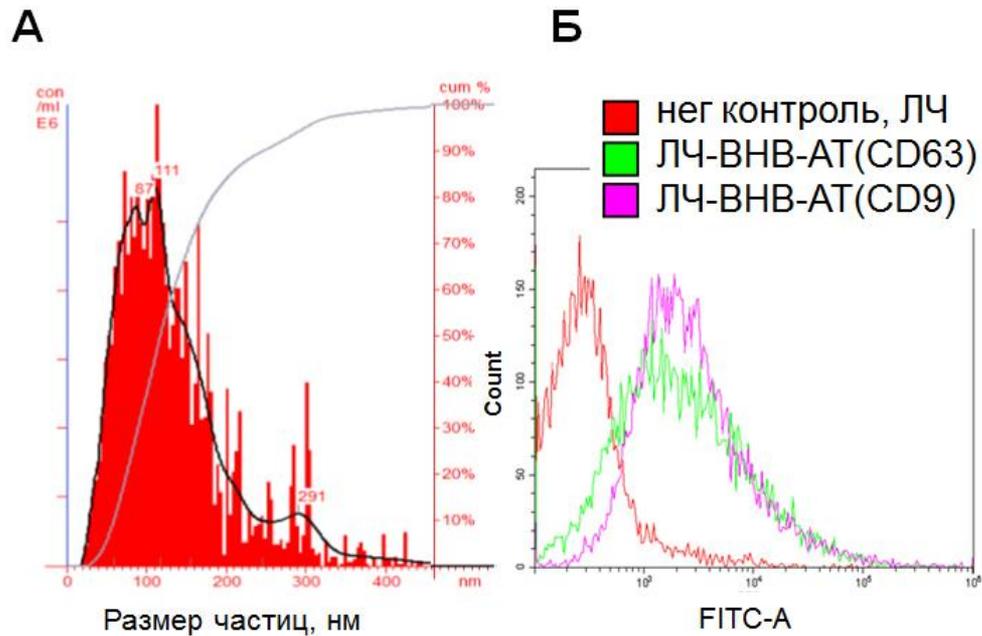


Рисунок 17 - Физико-химическая характеристика везикул, выделенных из мочи: А) Определение размера везикул методом НТА; Б) Оценка поверхностных маркеров при помощи проточной цитометрии (с использованием набора EchoFACS / HansaBioMed), в качестве негативного контроля использовали латексные частицы (ЛЧ), которые были «проведены» через все этапы пробоподготовки кроме инкубации с ВНВ. Пик флуоресценции по FITC при анализе двух проб свидетельствует о наличии экзосомальных маркеров CD9 (роз.) и CD63 (зел.) на поверхности выделенных везикул

Выделение РНК и анализ микроРНК. Как отмечено ранее, фундаментальные исследования и разработка методов диагностики на основе анализа ВНВ в области РПЖ идет достаточно активно и публикуемые результаты вполне сопоставимы (по сравнению с аналогичными работами в области КРК). Поэтому, анализ научной литературы, посвященной изменениям состава микроРНК в экзосомах плазмы и/или мочи, ассоциированных с развитием РПЖ, позволил выбрать несколько «потенциально маркерных» молекул микроРНК. Так, в рамках данного раздела работы не проводился поисковый «профайлинговый» анализ, исследование было

сразу сфокусировано на двенадцати молекулах, участвующих в развитии РПЖ согласно данным литературы (Таблица 6).

Таблица 6 - МикроРНК, включенные в исследование: результаты проведенных исследований и ссылки на литературу

микроРНК	Результаты ОТ-ПЦР		Ссылка
	соотношение Ca/N	P	
Hsa-miR-21-5p	4,05	0,0128	[178-180]
Hsa-miR-107	1,1	0,9781	[181]
Hsa-miR-141-5p	11,7	0,0023	[178, 181, 182]
Hsa-miR-221-5p	*		[178, 183]
Hsa-miR-298	*		[182]
Hsa-miR-326	2,21	0,9912	[181, 182]
Hsa-miR-375	1,55	0,8315	[181]
Hsa-miR-432-5p	*		[181]
Hsa-miR-574-3p	3,90	0,0017	[181]
Hsa-miR-2110	1,25	0,1911	[181]
Hsa-miR-625-5p	*		[181]
Hsa-miR-301a-5p	*		[181]

миРНК, помеченные * были обнаружены менее чем у половины пациентов и были исключены из дальнейшего исследования

Выделение РНК из везикул проводилось согласно методике, описанной в разделе 3.3.4. Количественный анализ 12 выбранных молекул микроРНК (представлены в Таблице 6) был проведен с помощью реагентов производства компании Qiagen / Дания согласно методике, описанной в разделе 3.3.5. ПЦР проводили в трех повторах и оценивали средние значения Ct. Из 12 молекул микроРНК пять были обнаружены менее чем в половине образцов мочи пациентов с РПЖ, они были исключены из дальнейшего анализа (обозначены * в Таблице 6). Данные, полученные по остальным микроРНК, были нормализованы относительно

значений, полученных для референсных РНК (U6 малой ядерной РНК и hsa-miR-191-5p), с использованием стандартного подхода ($2^{\Delta(\text{Ct reference}-\text{Ct miR})}$). После усреднения результатов для двух клинических групп (РПЖ vs. Контроль), посчитано соотношение этих значений (Таблица 6: соотношение Ca/N). Статистическая значимость наблюдаемой разницы была оценена с помощью теста Mann-Whitney. Согласно полученным результатам, miРНК-574-3p, miРНК-141-5p и miРНК-21-5p представлены в более высокой концентрации в моче мужчин с РПЖ по сравнению с контрольной группой (Рисунок 18А).

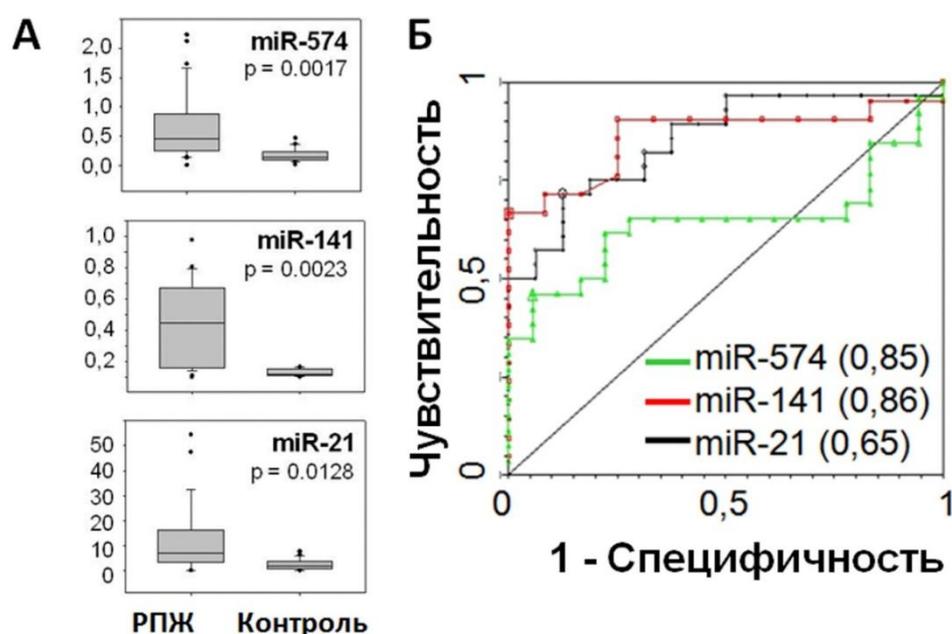


Рисунок 18 - Результаты анализа микроРНК из экзосом мочи: А) Сравнительный анализ содержания микроРНК в экзосомах, выделенных из мочи пациентов с РПЖ и здоровых доноров. Статистический анализ проведен с помощью U-теста Mann-Whitney; Б) Оценка диагностической значимости анализа «маркерных» микроРНК с помощью построения ROC кривой, в скобках приведены значения AUC

В заключении показатели диагностической значимости для трех «маркерных» микроРНК были определены с учетом результатов проведенного

анализа 25 пациентов с РПЖ и 25 здоровых доноров (Таблица 7)

Таблица 7 - Показатели диагностической значимости молекул микроРНК в экзосомах мочи

	Чувствительность	Специфичность	PPV*	NPV*
miR-574-3p	0,71	0,72	0,68	0,76
miR-21-5p	0,66	0,8	0,75	0,66
miR-141-5p	0,47	0,77	0,66	0,63

* PPV- прогностическая ценность положительного результата, NPV- прогностическая ценность отрицательного результата.

Представленные результаты продемонстрировали возможность применения разработанной технологии выделения ВНВ из мочи последующего анализа везикулярных микроРНК в качестве основы для разработки диагностической тест-системы. В работе не ставилась цель поиска новых маркеров: проводился анализ молекул, участие которых в развитии РПЖ уже показано с использованием более сложных и дорогостоящих технологий. В рамках данного исследования были использованы относительно простые и экономичные методы, которые позволили дифференцировать пациентов с верифицированным РПЖ от здоровых доноров с относительно высокой точностью (параметры диагностической значимости представлены в Таблице 7). Таким образом, анализ микроРНК из ВНВ мочи может быть признан перспективным методом диагностики РПЖ, пути реализации этой возможности обсуждаются в заключение главы.

3.4.3 Дифференциальная диагностика узловых заболеваний щитовидной железы (УОЩЖ)

Концепция. Злокачественные новообразования, развивающиеся из фолликулярных клеток щитовидной железы, формируют разнородную группу онкологических заболеваний. Их классификация основана на степени дифференцировки и форме гистопатологического строения опухолевой ткани. Наиболее часто встречающаяся форма – папиллярная карцинома – характеризуется относительно благоприятным прогнозом [184]. При выявлении на ранних стадиях

90% пациентов проживают 5 и более лет [185]. Но даже с учетом относительно благополучных показателей эпидемиологической статистики диагностика и лечение папиллярного рака щитовидной железы часто представляют собой нетривиальную клиническую задачу [186]. Вторая по частоте встречаемости форма – фолликулярная карцинома – имеет большую склонность к метастатической диссеминации и худший прогноз. В отдельную группу выделяется т.н. фолликулярный вариант папиллярного рака, имеющий особенности клинического течения, отличающие этот вариант УОЩЖ. С учетом биологических и клинических особенностей, различные формы УОЩЖ предполагают различную лечебную тактику, в частности, различный объем хирургических вмешательств [187]. В настоящее время «золотым стандартом» предоперационной дифференциальной диагностики УОЩЖ считается тонкоигольная аспирационная пункционная биопсия (ТАПБ) с последующим цитологическим исследованием аспирата. Такое исследование требует большого опыта от исполнителя и относительно часто приводит к ошибкам [188]. Более того, даже при адекватном заборе материала в 30% случаев заключение оказывается неопределенным, поскольку цитологических признаков недостаточно для разделения доброкачественных и злокачественных фолликулярных опухолей. В этих случаях приходится проводить лобэктомия для установления окончательного диагноза. С другой стороны, в 15-40% случаев цитологический диагноз констатирует атипию неясного значения, что требует повторной биопсии [189]. В результате часть злокачественных опухолей не подвергается своевременному лечению. Но на практике более актуальна проблема гипердиагностики, большое число ненужных операций и соответствующих осложнений. Эта ситуация определяет необходимость поиска надежных (специфических и чувствительных) биомаркеров, которые бы оптимизировали как первичную, так и дифференциальную диагностику УОЩЖ [190].

На данный момент на практике для предоперационной диагностики уже разработаны тест-системы, основанные на выявлении соматических мутаций (ThygoSeq®, CBLPath), анализе профилей экспрессии множества белок-

кодирующих генов (Afirma® Gene Expression Classifier и Genomic Sequencing Classifier, Veracyte), микроРНК-профилировании (Rosetta GXReveal, Rosetta Genomics) или комбинации анализа соматических мутаций и микроРНК (ThyGenX/ThyraMIR, Interpace diagnostics). Эти решения имеют достаточно высокие показатели диагностической ценности [191], но они предполагают проведение дополнительной процедуры ТАПБ, имеют относительно высокую стоимость и на практике пока недоступны в пределах нашей страны.

Так, изменения профиля микроРНК в клетках УОЩЖ относительно хорошо изучены, а их диагностическая значимость доказана успешным внедрением в клиническую практику соответствующих диагностических методик. Это дает основания предполагать, что определенные изменения могут наблюдаться и в составе микроРНК экзосом, которые секретируются клетками ЩЖ (или УОЩЖ) в кровотоке. С учетом высокой метаболической активности ткани ЩЖ и хорошей васкуляризации органа можно предполагать, что клетки ЩЖ вносят определенный вклад в пул циркулирующих в плазме экзосом, и изменения состава микроРНК в этой (ЩЖ-специфичной) фракции экзосом могут быть детектированы методом ОТ-ПЦР.

Дизайн исследования. Как и в разделе 3.4.1., первым этапом работы был «профайлинг» относительно большого числа микроРНК, имеющих известное значение в развитии онкологических заболеваний, с целью выбора наиболее перспективных «маркерных» молекул. Был проведен сравнительный анализ экзосомальной фракции микроРНК, полученной из плазмы пациентов (n=10) с папиллярным РЩЖ до тиреоидэктомии и через 7-10 дней после нее. Предполагалось, что удаление опухоли приведет к снижению содержания опухолевых ВНВ в кровотоке и, следовательно, к изменению профиля детектируемых микроРНК. В результате из 84 было выбрано 9 микроРНК, детектируемый уровень содержания которых в экзосомах снижался после операции. С учетом отсутствия в научной литературе данных об изменениях профиля экзосомальных микроРНК при развитии УОЩЖ (в отличии от ситуации с КРК и РЩЖ), план исследования был дополнен анализом экспрессии выбранных

9 «маркерных» молекул в ткани папиллярного рака ЩЖ и в ткани нормальной ЩЖ. Эти результаты должны были стать основанием для предположения о том, что именно ткань злокачественного узла ЩЖ (папиллярной карциномы) является источником экзосом с высоким содержанием «маркерных» микроРНК. Параллельно, была проведена валидация диагностической значимости выбранных потенциальных «маркеров» путем анализа их концентрации в экзосомах плазмы пациентов с разным клиническим статусом заболевания и здоровых доноров (n=60). В исследование были включены следующие группы: пациенты с аденомой ЩЖ (n=8), пациенты с начальной стадией фолликулярного РЩЖ - T₁N₀M₀ (n=8), и пациенты с различными стадиями папиллярного РЩЖ: T₁N₀M₀ (n=10); T₂₋₄N₀M₀ (n=9); T_xN_nM_n (n=12) и группа здоровых доноров (n=13). Дизайн исследования схематично представлен на рисунке 19.



Рисунок 19 - Дизайн исследования: 1) Широкий «профайлинг»: анализ экспрессии 84 молекул в образцах ВНВ, выделенных из плазмы 10 пациентов до и после операции. 2) Валидация данных, полученных для 9 молекул, была проведена путем анализа их концентрации в ВНВ из плазмы пациентов с разным статусом (стадией) заболевания (2а) и анализа их экспрессии в ткани папиллярного РЩЖ и в здоровой ткани. В исследование были включены две референсные молекулы (U6, miR-197-3p), общее число молекул, включенных в исследование составило 11

Выделение экзосом. Экзосомы выделяли из 2 мл плазмы по протоколу, описанному в разделе 3.3. После ультрацентрифугирования осадок, содержащий

везикулы, разводили в фосфатно-солевом буфере для оценки физических параметров или в соответствующем лизис-буфере для выделения белков или РНК.

С целью визуализации и оценки формы и размера, экзосомы фиксировали на поверхности и исследовали с помощью АСМ. На рисунке 20 А изображение экзосом смоделировано в 2D и 3D формате.

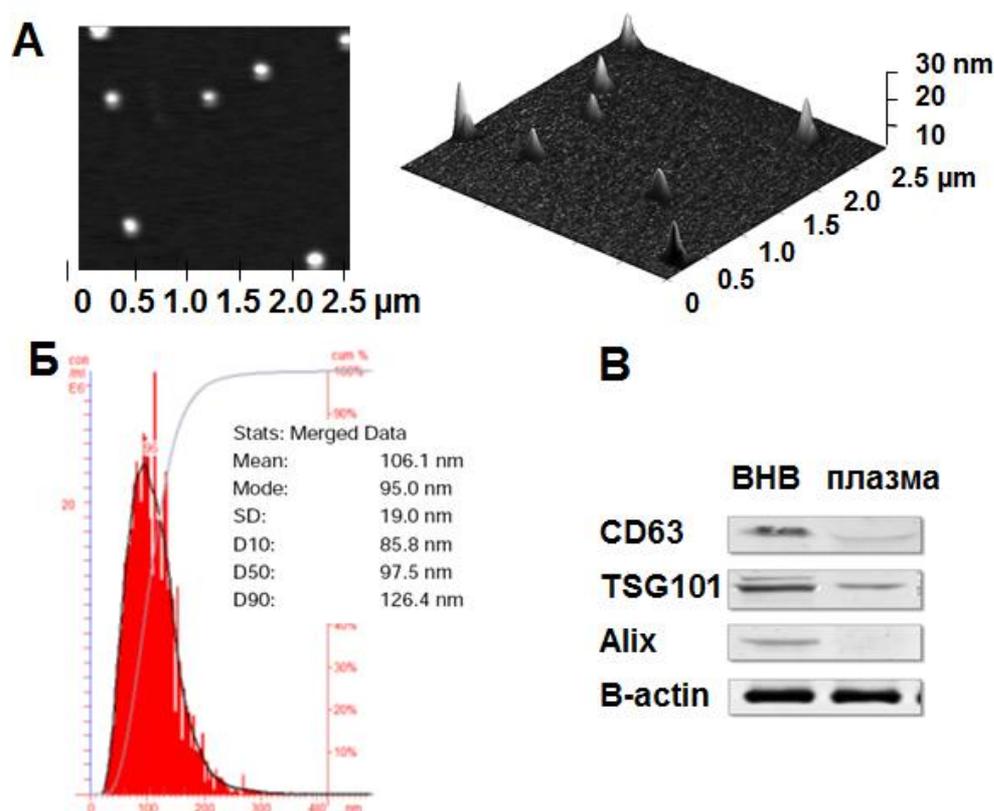


Рисунок 20 - Физико-химические характеристики везикул, выделенных из плазмы: А) Визуализация с помощью сканирующей атомно-силовой микроскопии; Б) Анализ размера ВНВ помощью НТА; В) Оценка концентрации экзосомальных маркеров (CD63, TSG101, Alix) в выделенной суспензии везикул по сравнению с исходной плазмой, для оценки эквивалентного количества белка (loading control) – проведен анализ концентрации белка «домашнего хозяйства» (housekeeping)

В обоих случаях можно сделать заключение о том, что это отдельные структуры почти или практически округлой формы, размеры которых колеблются в пределах 50 – 300 нм. Более детальное представление о размере экзосом может быть получено с помощью НТА (Рисунок 20 Б). Так, согласно этим измерениям,

средний размер везикул в популяции составил 106 нм. Анализ концентрации «экзосомальных» маркеров в осадке, полученном после ультрацентрифугирования, в сравнении с исходной плазмой был проведен с помощью Вестерн-блоттинга. Как видно на рисунке 20 В, смесь везикул, получаемая в результате ультрацентрифугирования, существенно обогащена экзосомальными маркерами: компонентом эндосомального комплекса внутриклеточного транспорта (Endosomal Sorting Complexes Required for Transport, ESCRT) - TSG101 и мембранным белком семейства тетраспанинов - CD63. На основе этих данных можно сделать заключение о том, что получаемая смесь везикул обогащена экзосомами, но методы, использованные в данном исследовании, не позволяют определить точный состав смеси и оценить присутствие других типов везикул.

Выделение РНК и анализ микроРНК. РНК была выделена из полученных образцов традиционным методом (3.3.4.). Как и в разделе 3.4.1. первым этапом исследования был проведен профайлинг опухоль-ассоциированных молекул микроРНК и выбор потенциально «маркерных» молекул. В целом было проведено 1680 тестов: уровень экспрессии 84 молекул микроРНК был оценен в 20 пробах (10 пациентов с папиллярным РЩЖ, до и после тиреоидэктомии). Детектируемое количество молекул микроРНК было выявлено в 36% наблюдений (в 608 случаях из 1680). Два типа молекул (miR-16-5p и miR-186-5p) не были детектированы ни в одном случае, 40 молекул были детектированы меньше, чем в половине тестов (<10 случаев) и уровень экспрессии 42 молекул был выше порога чувствительности метода более, чем в половине проведенных тестов (≥ 10 случаев). Полученные результаты (значения Ct) нормализовывали относительно среднего для панели значения (global Ct), затем результаты анализа отдельных панелей «выравнивали» с помощью калибраторов (inter-plate calibrators).

Средние значения нормализованных показателей экспрессии этих 42 микроРНК у 10 пациентов до операции показаны на рисунке 21. Стандартные отклонения показывают степень флюктуации результатов в рамках группы. Выделены молекулы, для которых было выявлено снижение концентрации после (из-за) перенесенной операции.

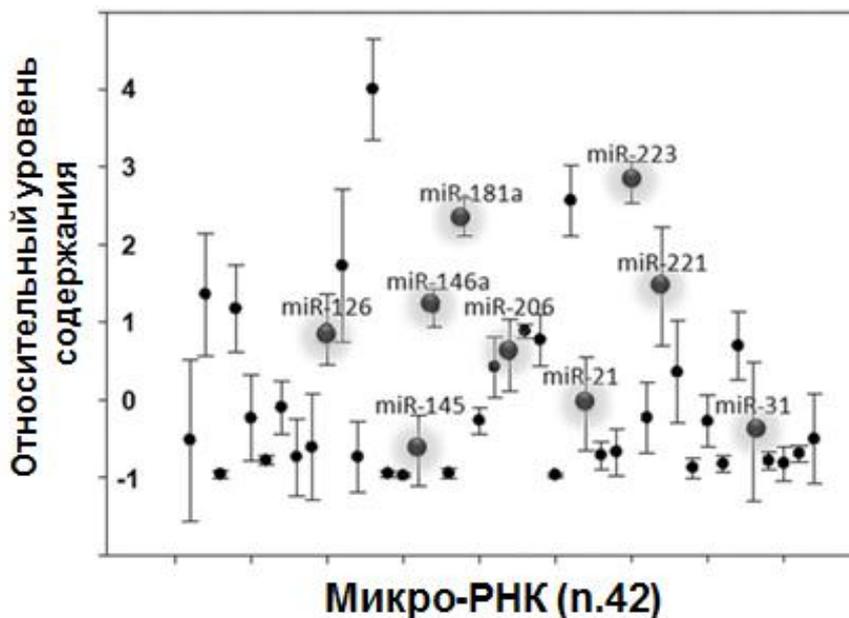


Рисунок 21 - Содержание микроРНК в ВЭВ из плазмы пациентов с папиллярным РЩЖ

На рисунке заметна разница между количеством отдельных молекул экзосомальных микроРНК: уровни экспрессии некоторых молекул отличаются в разы. Аналогичные данные были получены в других исследованиях [192]. Кроме того, рисунок 21 отражает стандартные отклонения, которые характеризуют размах флуктуаций представленности различных молекул микроРНК, определенный в ходе анализа. Для большинства молекул рассчитанное значение стандартного отклонения оказывается незначительным. Это свидетельствует о том, что представленность таких молекул в экзосомах мало отличается между анализируемыми образцами и они, возможно, могут служить нормализаторами при оценке изменений концентраций «маркерных» молекул.

Представленность ряда других молекул микроРНК в экзосомах заметно варьировалась, хотя эти изменения в большинстве случаев носили случайный характер.

Целью данного этапа работы было определение таких микроРНК, количество которых снижалось бы после операции. Статистически значимого снижения представленности не было выявлено ни для одной из 42 микроРНК, включенных в

анализ и представленных на рисунке 21. При более детальном рассмотрении, мы отобрали девять микроРНК, представленность которых в экзосомах плазмы пациентов с РЩЖ имела тенденцию к снижению после операции: miR-126-3p, miR-145-5p, miR-146a-5p, miRNA-181a-5p, miR-206, miR-21-5p, miR221-3p, miR-223-3p, miR-31-5p.

Полученные данные не дают возможности определить, что именно снизилось: содержание микроРНК в циркулирующих экзосомах или количество циркулирующих экзосом, содержащих определенные микроРНК. С учетом литературных данных [193], второй вариант более вероятен.

Следующим этапом работы был анализ экспрессии 9 потенциальных «маркерных» молекул микроРНК в опухолевой и нормальной ткани ЩЖ. Целью данного этапа была оценка возможной корреляции между наличием потенциальных «маркерных» микроРНК в экзосомах плазмы и уровнем экспрессии их в ткани папиллярного РЩЖ. Тотальная РНК была выделена из опухолевой и нормальной (визуально) ткани (10 пар образцов от 10 пациентов), полученной после тиреоидэктомии, и уровень экспрессии 9 микроРНК был оценен с помощью реакции микроРНК-специфической обратной транскрипции и последующей ПЦР. Параллельно проводился анализ U6 snRNA и miR-191-5p, которые использовались в качестве нормализаторов (показатель стабильности концентрации miR-191-5p в 20 ранее проанализированных образцах $geNormN = 1,29$). Результаты по каждому образцу ткани были получены в ходе трех параллельных ОТ-ПЦР, усреднены и нормализованы относительно U6 snRNA (small nuclear RNA) и miR-191-5p. Учитывались данные совпадающие нормализации относительно двух разных молекул.

При анализе результатов по 10 пациентам статистически значимое повышение уровня экспрессии в ткани опухоли относительно нормальной ткани ЩЖ было определено только для 3 из 9 микроРНК (Рисунок 22).

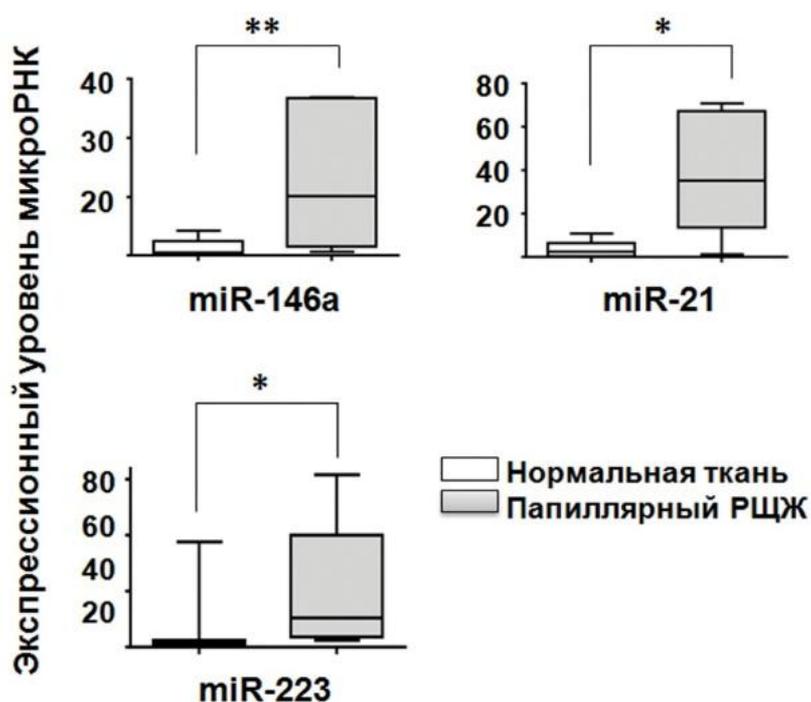


Рисунок 22 - Анализ экспрессии микроРНК в ткани папиллярного РЦЖ и в участках нормальной ткани железы: Результаты нормализованы относительно Ub snRNA, усреднены для групп (РЦЖ = 10, контроль = 10), статистическая значимость разницы оценена с помощью U-критерия Mann-Whitney

В остальных случаях наблюдалась аналогичная, но статистически незначимая разница уровней экспрессии «маркерных» микроРНК в опухолевой ткани относительно нормальной. Ни одна из 9 включенных в анализ миРНК не была экспрессирована в нормальной ткани выше, чем в опухолевой. Эти результаты дают основание предполагать, что опухолевая ткань могла быть источником экзосом, содержащих эти молекулы.

С другой стороны, полученные данные не позволяют исключить возможность того, что другие ткани могут секретировать в кровоток экзосомы, содержащие «маркерные» микроРНК вне зависимости или в связи с опухолевым процессом.

Кроме того, в нескольких экспериментальных исследованиях было показано наличие механизма внутриклеточного «сортинга» микроРНК в процессе формирования экзосом и доказана разница между профилем микроРНК внутри клетки и в экзосомах, секретлируемых клеткой [194]. В целом, этот вопрос имеет,

скорее, фундаментальное, а не прикладное значение, т.к. для практического использования микроРНК в качестве онкомаркера важна связь между наличием опухоли и уровнем микроРНК в плазме.

В заключение, была проведена валидация полученных данных и оценка клинической значимости анализа экзосомальных микроРНК. Для определения диагностической значимости выбранных в ходе первого этапа работы потенциальных «маркерных» микроРНК, их представленность в экзосомах плазмы пациентов с различным статусом заболевания (аденома щитовидной железы, фолликулярный РЩЖ, начальная стадия папиллярного РЩЖ, местнораспространенный и метастатической папиллярный РЩЖ) и здоровых доноров была оценена методом микроРНК-специфической ОТ-ПЦР. Результаты по каждому образцу плазмы были получены в ходе трех параллельных ОТ-ПЦР, усреднены и нормализованы относительно U6 snRNA и miR-191-5p, имеющей относительно стабильный уровень экспрессии.

Наиболее значимые результаты, полученные после объединения данных по клиническим группам, показаны на рисунке 23.

По представленным данным можно проследить характерные изменения уровней экзосомальных микроРНК, отражающие процесс прогрессирования заболевания. Например, уровень miRNA-181a повышен у пациентов с аденомой по сравнению с группой здоровых доноров и с больными РЩЖ. Причем, эта разница статистически значима в случае местнораспространенного или метастатического РЩЖ. Похожий, но несколько «сглаженный» профиль изменения уровня экзосомальных микроРНК в соответствии со статусом заболевания, был выявлен для miRNA-31 и miRNA-145. Максимальный уровень представленности этих микроРНК характерен для доброкачественной опухоли ЩЖ, в то время как развитие фолликулярного или папиллярного РЩЖ сопровождается, как следует из полученных данных, снижением уровня miRNA-31 и miRNA-145 в составе циркулирующих экзосом.

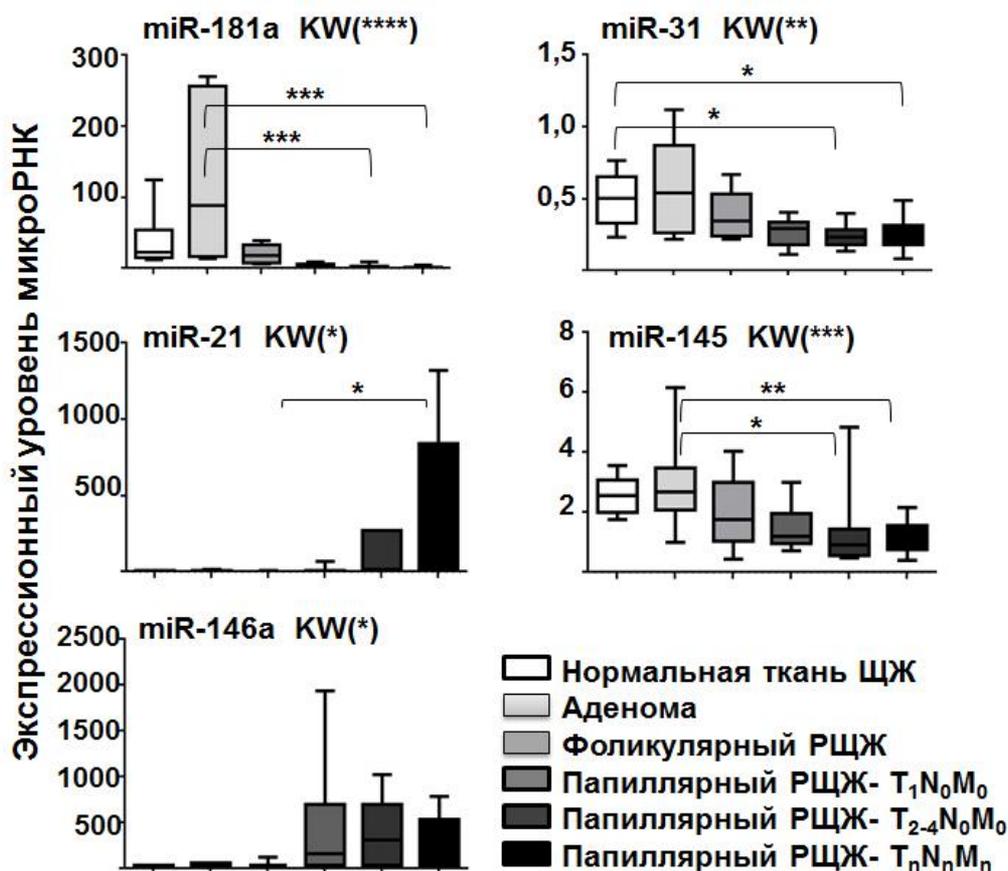


Рисунок 23 - Анализ концентрации микроРНК в экзосомах плазмы пациентов с различными УОЗЩ: Анализ проведен методом ОТ-ПЦР, результаты нормализованы по значению экспрессии малой ядерной РНК U6, после этого определено среднее значение для группы. Статистическая значимость оценена путём расчета критерия Kruskal–Wallis и в случаях значимости разницы между группами показана как * ($P < 0.05$), ** ($P < 0.005$), *** ($P < 0.0005$)

При папиллярном РЩЖ повышается уровень экзосомальных miRNA-146a и miRNA-21, причем, для последней это изменение отчетливо коррелирует с прогрессией заболевания и в случае метастатического РЩЖ является статистически значимым.

В целом, представленные данные демонстрируют связь между уровнем «маркерных» экзосомальных микроРНК и клиническим статусом пациентов с пролиферативными (доброкачественными и злокачественными) заболеваниями ЩЖ. Хотя исследование не привело к открытию «идеального» маркера папиллярного РЩЖ, связь между уровнем экзосомальных «маркерных» микроРНК и развитием/прогрессией заболевания прослеживается достаточно очевидно.

Клиническая значимость оценки уровня «маркерных» микроРНК может быть повышена путем параллельного анализа нескольких молекул.

Особый интерес представляет поиск возможностей и разработка новых методов дифференциальной диагностики фолликулярной аденомы и фолликулярной карциномы. В отличие от папиллярного рака, который имеет отчетливые критерии цитологической диагностики, опухоли фолликулярной природы неотличимы на этапе цитологического анализа материала пункционной аспирационной биопсии. В данном исследовании был проведен анализ ограниченного количества образцов фолликулярной аденомы (n. = 8) и фолликулярной карциномы (n. = 8), но даже этот дизайн позволил выявить различия в концентрации везикулярных микроРНК у пациентов двух групп. Например, на рисунке 24 представлены данные для трех микроРНК (miRNA-181a, miRNA-146a и miRNA-21), концентрация которых отчетливо отличается в случаях фолликулярной аденомы и фолликулярного рака.

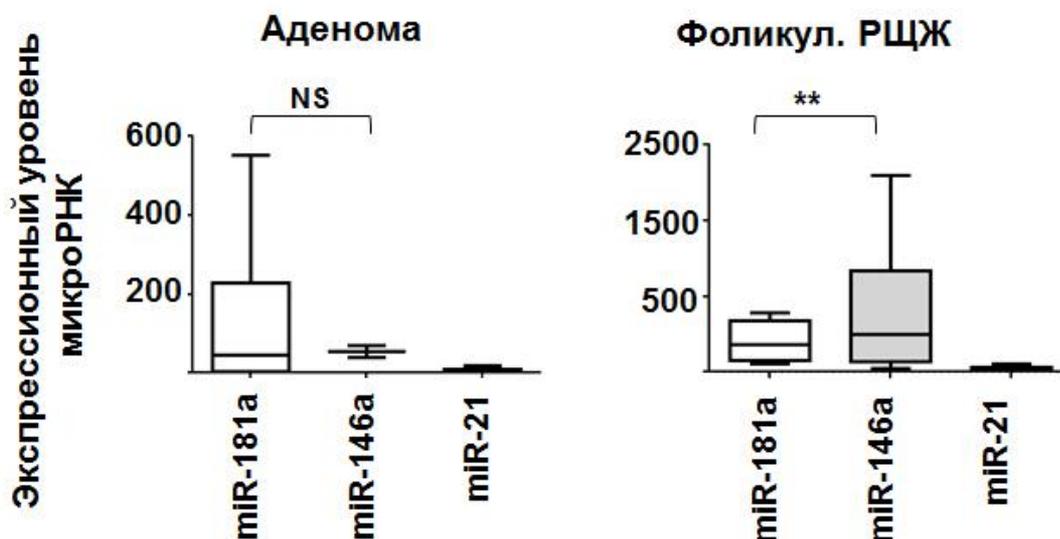


Рисунок 24 - Пример диагностически информативной комбинации микроРНК: miR-181a, miR-146a, miR-21 в фолликулярных УОЩЖ: Статистическая значимость оценена путём расчета критерия Kruskal–Wallis и в случаях значимости разницы между группами показана как * ($P < 0.05$), ** ($P < 0.005$), *** ($P < 0.0005$)

В данной ситуации для молекул miR-181a и miR-146a, например, характерно т.н. «реципрокное» (или разнонаправленное) изменение экспрессионной активности: в случае фолликулярной аденомы в плазме определяется относительно

высокое содержание везикулярной формы miR-181a и низкое содержание - miR-146a, а в случае фолликулярного рака наблюдается обратное соотношение. Так, оценка соотношения концентраций этих молекул может иметь высокий диагностический потенциал. В рамках данного исследования такой анализ не проводился в силу недостаточного количества образцов.

Таким образом, оценка профиля нескольких «маркерных» миРНК может иметь практическое значение для динамического наблюдения за больными с доброкачественными или «латентными» узлами ЩЖ, в качестве дополнительного метода дифференциальной диагностики растущих новообразований и контроля рецидивов или метастатической диссеминации РЩЖ после проведенного лечения.

3.4.4 Прогноз эффекта нео-адьювантной терапии рака молочной железы (РМЖ)

Концепция. Нео-адьювантная (предоперационная) химиотерапия является одним из основных этапов комплексного лечения операбельного или условно операбельного рака молочной железы (РМЖ) [195]. НХТ делает возможным оперировать ранее неоперабельные формы местно-распространенного РМЖ, в большинстве случаев НХТ позволяют уменьшить размеры опухоли и оптимизировать объём оперативного вмешательства [196, 197]. В качестве первой линии химиотерапии, как правило, используются комбинации препаратов, обладающих наиболее выраженной активностью при РМЖ – антрациклины и таксаны. Но до настоящего времени в клинической практике нет надежных маркеров предикции эффективности этих препаратов [198]. В части случаев НХТ не приводит к ожидаемому клиническому эффекту: на фоне терапии размеры опухоли увеличиваются, возможности проведения органосохраняющей операции снижаются, риск диссеминации опухоли растет. В клинической практике решение о назначении и выборе режима НХТ принимается с учетом общего состояния пациентки, стадии опухолевого процесса и молекулярно-биологического подтипа опухоли [199]. Но, очевидно, эти характеристики недостаточны для надежного прогнозирования эффекта НХТ, которое для ряда пациенток оборачивается лишь долгим периодом ожидания необходимой

операции. Соответственно, совершенствование принципов отбора пациенток для проведения НХТ и методов персонализированного выбора оптимальных режимов терапии является важной научной и клинической задачей.

Судя по количеству публикаций, участие внутриклеточных молекул микроРНК в формировании лекарственной резистентности клеток РМЖ изучается давно и интенсивно [167, 200, 201]. Так, для ряда молекул были описаны специфические регуляторные функции, которые имеют значение при формировании резистентности к определенным препаратам. Например, miR-192 снижает чувствительность клеток РМЖ к доксорубину [202], miR-182 регулирует устойчивость клеток к трастузумабу. Mir-155 нарушает работу механизмов, формирующих резистентность клеток РМЖ к паклитакселу, делая клетки вновь чувствительными к этому препарату [203], miR-124 оказывает аналогичный эффект относительно доксорубина [204], miR-381 – относительно цисплатина [205]. В ряде обзорных статей авторы делают заключения о возможности прогнозировать эффект химиотерапии РМЖ на основе анализа профиля экспрессии микроРНК [206]. Относительно недавно в научной литературе нашел отражение интерес к роли экзосомальной фракции микроРНК в контексте резистентности/чувствительности клеток РМЖ к химиотерапии. Первые работы в данной области, сделанные в Китае [62, 207, 208] и в России [209, 210], показывали ключевое значение экзосомальных микроРНК в горизонтальном переносе «качества резистентности» от одной опухолевой клетки к другой. Позднее были опубликованы результаты аналогичных исследований, подтвердившие существование и клиническую значимость такого феномена. В недавнем обзоре представлены соображения группы авторов относительно перспектив прогнозирования или мониторинга эффекта терапии РМЖ на основе анализа микроРНК в циркулирующих экзосомах [164]. Недавно были опубликованы результаты работы группы испанских исследователей, которые пытались оценить корреляцию между уровнем концентрации ряда молекул микроРНК в экзосомах пациенток с локализованным РМЖ в ходе проведения НХТ [211]. В этой работе было показано, что концентрация экзосомальной miR-21 в

плазме пациенток во время лечения имеет прямую корреляцию с размерами опухоли и обратную – с уровнем экспрессии маркера пролиферации Ki67. Более того, концентрация трех молекул микроРНК (miR-21, miR-222, miR-155) ассоциирована с наличием в циркуляции опухолевых клеток. Но авторы работы не предложили никаких алгоритмов прогнозирования эффекта НХТ, которые могли бы иметь важное клиническое значение. Так, вопрос, на котором сфокусирован данный фрагмент работы, относительно слабо изучен, и в научной литературе нет аналогичных исследований. Поэтому, была поставлена задача увидеть / оценить разницу концентрации ряда микроРНК в экзосомах из плазмы пациенток, ответивших «хорошо» или «плохо» на НХТ. МикроРНК были выбраны на основе анализа литературных данных.

Дизайн исследования. Биологический материал (плазма) был получен от 47 пациенток. В исследование были включены пациентки с РМЖ клинической стадии ПА (T2N0M0) и ПВ (T2N1M0, T3N0M0). Средний возраст пациенток, включенных в исследование, составил 54,5 года (± 7 лет). Перед началом НХТ всем пациенткам был проведен стандартный комплекс диагностических исследований, включая УЗИ исследование молочных желез (с измерением размеров опухолевого узла), трепан-биопсию и ИГХ анализ биоптата. С учетом данных ИГХ всем пациенткам было рекомендовано проведение таксан-содержащей нео-адьювантной полихимиотерапии. После 6 циклов НХТ оценка ее эффекта была проведена с помощью УЗИ. На основании данных о размерах опухоли до и после лечения, были вычислены размеры «резидуальной» опухоли в % от размеров исходной опухоли – этот параметр прямо отражал эффект проведенной терапии. Интересно отметить, что распределение всех пациенток, включенных в исследование, по этому параметру имело близкий к Гауссовскому характер (Рисунок 25А). Это позволяет предполагать, что используемая в работе выборка является вполне репрезентативной и отражает ситуацию в целом.

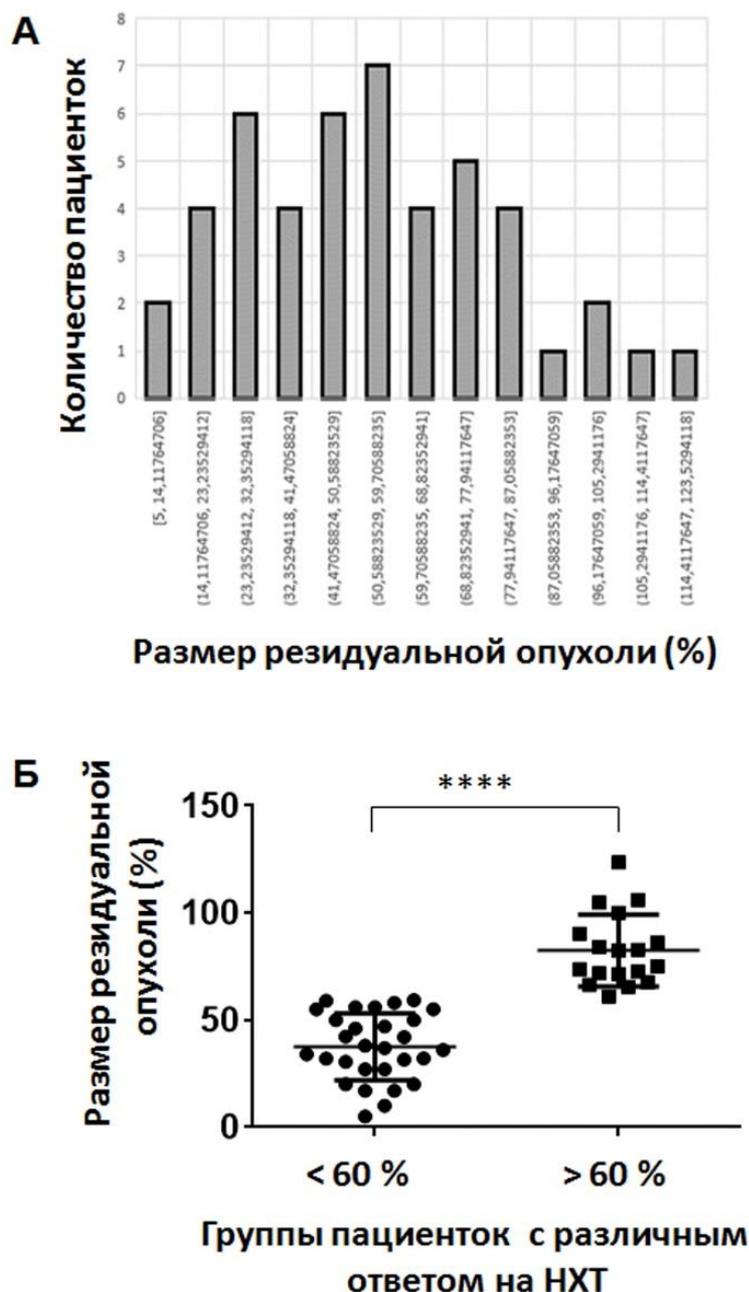


Рисунок 25 - Выборка пациентов и распределение по группам сравнения

С учетом вычисленного таким образом значения (относительного размера резидуальной опухоли) все пациентки были разделены на две равные по численности группы: условно названные «хорошо» ответившими (<60%) и «плохо» ответившими (>60%) на проведенную таксан-содержащую НХТ. Такое деление несколько отличалось от принятых в клинической практике критериев (RECIST), когда ответ на НТХ расценивается как «хороший» (complete response CR, partial response PR) в случае если размер опухоли после лечения составляет менее 70% от размера опухоли до начала терапии (reduction of >30% in total tumor size).

Очевидно также, что такое деление не совсем оправдано с биологической точки зрения, т.к. реакция опухоли на терапию не определяется по принципу «да/нет», а может варьировать градуально (меняясь в ту или другую сторону постепенно, небольшими «шагами»). Но описанный подход был оправдан задачей исследования, поскольку, во-первых, позволял сформировать сопоставимые по размеру (числу пациенток) группы сравнения, и, во-вторых, позволял оценить связь между ответом на терапию и уровнем концентрации ряда молекул микроРНК в экзосомах плазмы пациентов.

По результатам анализа литературы было выбрано 15 молекул микроРНК, роль которых в процессе формирования лекарственной резистентности была показана ранее (Таблица 8). В рамках исследования было проведено сравнение уровня концентрации каждой из этих 15 молекул в экзосомах плазмы между группами пациенток.

Таблица 8 - МикроРНК, играющие роль в формировании феномена лекарственной резистентности и включенные в исследование

микроРНК	Материал	Источник
miR-451, miR -21, and -205	ткань опухоли	[212-214]
miR-26a	ткань опухоли, клеточные линии	[215, 216]
miR-29b	клеточные линии	[217, 218]
miR-31, miR-375, miR-21	ткань опухоли	[219]
miR-34a, miR -125b, miR -126	клеточные линии	[213, 216, 218, 220]
miR-106	клеточные линии	[221]
miR-141	клеточные линии	[222]
miR-146a/miR-146b	клеточные линии	[213, 223]
miR-155	ткань опухоли	[224]
miR-181a	клеточные линии	[225]

miR-200a	in vivo модель	[226]
miR-210	ткань опухоли	[216]
miR-214	клеточные линии	[227]
miR221/222	ткань опухоли	[218]
miR-342	ткань опухоли	[216]

Уровень экспрессии каждой из 15 молекул был оценен в каждом из 47 образцов. Реакции ОТ-ПЦР проведены в трех повторах. Результаты нормализовывались по каждой пациентке (по уровню U6 и miR-191).

Выделение экзосом. Образцы плазмы (4 мл) были получены от пациенток до начала НХТ. Экзосомы были выделены с помощью латексных микрочастиц с фиксированными на поверхности антителами к экзосомальному маркеру CD63 (HansaBioMed, Эстония).

Физико-химические характеристики везикул были оценены в соответствии с рекомендациями ISEV (International Society of Extracellular Vesicles) [74]. Так, средний размер (гидродинамический радиус) выделенных везикул был оценен как 162 нм, при этом выделенные везикулы представляли собой относительно гомогенную по размеру популяцию (Рисунок 26А).

Единичные везикулы имели вид «пузырьков», ограниченные двухслойной мембраной (Рисунок 26Б), на поверхности везикул определялся один из т.н. «экзосомальных» маркеров: тетраспанин CD63 (Рисунок 26В), что подтверждало факт иммуно-сорбции именно CD63(+)ВНВ.

По совокупности полученных данных можно было полагать, что в анализируемых препаратах содержались нановезикулы экзосомальной природы.

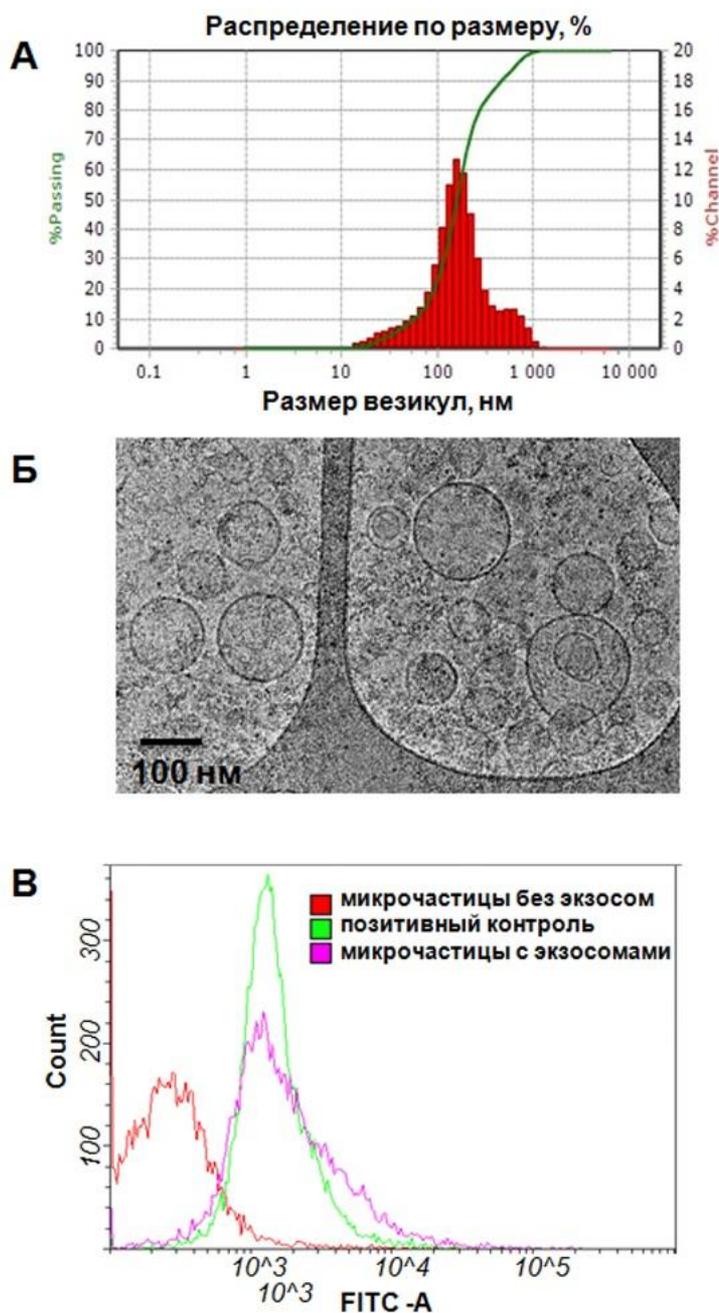


Рисунок 26 - Физико-химические характеристики везикул, выделенных из плазмы: А). Анализ размера и концентрации с помощью ЛКС; Б) Визуализация везикул с помощью криоэлектронной микроскопии; В) Оценка экспрессии экзосомальных маркеров (CD63) на поверхности ВНВ с помощью проточной цитометрии (набор ExoFACS/Hansa BioMed). Негативный контроль: латексные микрочастицы без инкубации с ВНВ, но после инкубации с антителами CD63-FITC. Позитивный контроль: латексные частицы после инкубации контрольными экзосомами (в составе набора), антителами к CD63-FITC.

Выделение РНК и анализ микроРНК. Из экзосом была выделена тотальная РНК с помощью наборов для выделения экзосомальной РНК. Концентрация РНК колебалась в пределах 200-600 нг/мкл, но общее количества материала полученного таким методом было не достаточно для анализа 17 молекул (15 «маркерных», 2 референсных). Поэтому, анализ микроРНК был проведен с помощью реакции универсальной (не специфической) обратной транскрипции, и последующей ПЦР в режиме реального времени с использованием реагентов компании Exiqon, Дания. Такой подход предполагал проведение одной реакции, сочетающей полиаденилирование и обратную транскрипцию с универсальным поли-Т праймером, для каждого образца РНК. В анализ были включены 15 молекул (Таблица 8). Результаты были нормализованы тремя способами (относительно среднего значения Ct, относительно Ct определенного для малой ядерной РНК U6, относительно Ct определенного для miR-191). Достоверными были признаны результаты сравнения уровней концентрации в двух исследуемых группах, полученные при всех трех вариантах нормализации. Так, для пяти молекул из 15 была показана статистически значимая разница концентрации в двух сравниваемых группах (т.е., у «ответивших» и «не ответивших» на таксан-содержащую НХТ), в остальных десяти случаях результаты либо не отличались в двух этих группах пациенток, либо зависели от метода нормализации. Хороший ответ на терапию (группа 1, размер резидуальной опухоли <60% от исходного) сочетался с относительно низким содержанием miR-34a в составе экзосом плазмы и высоким содержанием miR-126, miR-106, miR-342, miR-451 по сравнению с группой 2 (размер резидуальной опухоли > 60%). Результаты по этим пяти молекулам, включая показатели относительного уровня экспрессии (нормализация по U6) и показатели статистической значимости различий, наблюдаемых между двумя группами образцов, приведены в таблице 9.

Таблица 9 - Молекулы миРНК, различающиеся своей концентрацией в плазме пациенток, ответивших (sensitive) и не ответивших (resistant) на НХТ

миРНК	Нормализованный показатель концентрации		Статистическая значимость наблюдаемой разницы (Mann-Whitney test)
	Группа 1, Sensitive (PPO <60%)	Группа 2 Resistant (PPO >60%)	
miR-34a	4,06	9,35	****
miR-451	3,10	2,12	*
	1,46	1,14	**
miR-126a	0,064	0,014	**
miR-342	0,49	0,16	***

PPO – размер резидуальной опухоли

p < 0,5 (*); p < 0,05 (**); p < 0,005 (***); p < 0,0005 (****)

Перспективная цель представленного исследования – это разработка и внедрение в клиническую практику метода персонализированного подбора схемы НХТ для пациенток с РМЖ. Для достижения этой цели необходимо разработать алгоритм интерпретации результатов анализа экзосомальной миРНК в образце, полученном от конкретной пациентки. Результаты сравнения групп пациенток, полученные в рамках данного исследования, поставленной задачи не решали. В ряде ранее опубликованных работ [228, 229] нами был предложен метод интерпретации результатов анализа миРНК в единичном образце. Этот метод основан на предположении, что изменение экспрессии некоторых молекул имеет реципрокный характер: активация функциональной активности / повышение концентрации одной молекулы сочетается со снижением функциональной активности/ понижением концентрации другой молекулы (рисунок 27А). Биологическая основа наблюдаемых реципрокных изменений концентрации

микроРНК требует дополнительных исследований, но диагностическая значимость анализа таких «реципрокных» пар была показана в цитируемых работах [228, 229].

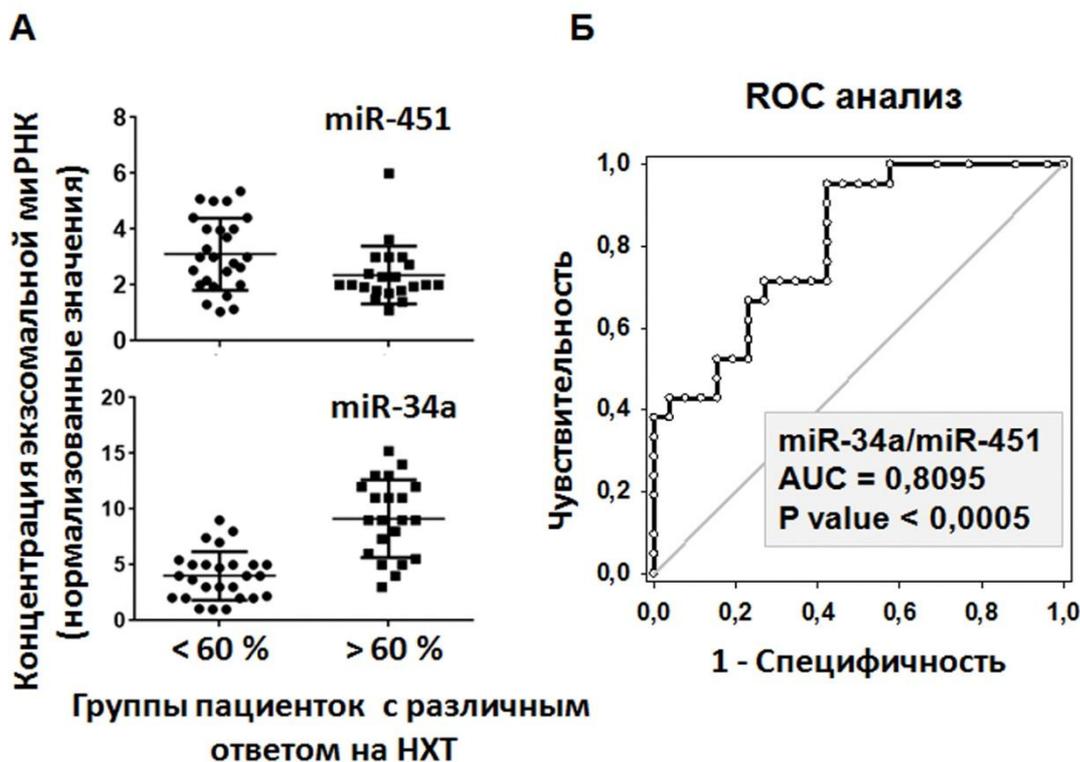


Рисунок 27 - Анализ концентрации экзосомальной фракции циркулирующих микроРНК (miR-34a, miR-451) в плазме пациенток с РМЖ в двух группах с разным ответом на НХТ: А) Репрезентативные данные, показывающие разный уровень концентрации исследуемых молекул (miR-34a, miR-451), в двух группах пациенток с различным эффектом НХТ. Представлены данные, полученные путем ОТ-ПЦР анализа и нормализованные относительно уровня экспрессии малой ядерной РНК U6); Б) Диагностическая значимость показателя, вычисленного как отношение уровней концентраций молекул miR-34a и miR-451, была оценена с помощью ROC (receiver operating characteristic) анализа.

Результаты, полученные в данном исследовании, позволяли сформировать четыре т.н. «реципрокные» пары и рассчитать соотношения значений Ct для таких пар: miR-34a/miR-126, miR-34a/ miR-106, miR-34a/ miR-342, miR-34a/ miR-451. Оценка диагностической значимости этих значений была проведена с помощью ROC анализа. В одном из четырех случаев (соотношение концентраций miR-34a/miR-451 = $2^{\text{miR34a-miR451}}$) рассчитанный параметр имел статистически

достоверную диагностическую значимость: $AUC = 0,809$, $p < 0,0005$ (Рисунок 27Б). Таким образом, оценка концентрации экзосомальных miR-34a и miR-451 могла бы служить прогностическим маркером ответа пациенток с РМЖ на таксан - содержащие схемы НХТ. Полученные результаты указывают на то, что «разнонаправленное» (реципрокное) изменение экспрессии, выявляемое при анализе групп, не всегда означает сочетанный характер этих изменений у каждого пациента. В нашем случае, лишь в одном из четырех случаев сочетание изменений экспрессии двух молекул повторялось и всех пациенток и, соответственно, соотношение концентраций молекул «реципрокной пары» miR-34a/miR-451 имело диагностический (прогностический) потенциал.

Очевидно, что валидация полученных результатов на более репрезентативной выборке пациенток необходима для понимания целесообразности внедрения такого метода в клиническую практику. Кроме того, биологические основы феномена «реципрокных» экспрессионных изменений ждут более глубокого изучения.

3.4.5 Пути оптимизации методов анализа экзосомальных микроРНК

Исследования, результаты которых описаны в параграфах 3.4.1., 3.4.2., 3.4.3. и 3.4.4., выявили некоторые методологические аспекты, которые могут играть значимую роль в достижении необходимых показателей эффективности разрабатываемых методик и перспектив их введения в клиническую практику.

- Так, в частности, все представленные выше результаты были получены при работе с тотальной популяцией экзосом плазмы или мочи. В составе этой популяции лишь «минорные» фракции везикул имеют тканеспецифичное происхождение. Но можно предположить, что именно тканеспецифичные везикулы несут основную диагностическую информацию. Выделение такой фракции и последующий анализ микроРНК только из этих везикул могли бы существенно повысить специфичность разрабатываемых тест-систем.
- В исследовании была использована технология ОТ-ПЦР для оценки концентрации микроРНК. Этот метод имеет высокую, но не абсолютную чувствительность. С учетом особенностей структуры и биологии микроРНК,

диагностически значимые концентрационные изменения могут лежать ниже порога чувствительности обычных методик ОТ-ПЦР анализа. Разработка и оптимизация новых методик анализа микроРНК могли бы существенно повысить чувствительность разрабатываемых тест-систем.

В заключительных параграфах Главы 3 описаны результаты работ по оптимизации методов анализа экзосомальных микроРНК в диагностических целях.

3.4.5.1 Возможности выделения фракции тканеспецифичных экзосом

Как обсуждалось выше, мажорная фракция экзосом плазмы представлена везикулами, которые секретируют тромбоциты, клетки крови и эндотелия. При развитии онкологического заболевания диагностически значимые изменения содержания микроРНК (или других компонентов) можно ожидать в везикулах, продуцируемых клетками опухоли. В большинстве случаев злокачественная трансформация не приводит к полной потере клеткой маркеров тканевой дифференцировки (исключение могут, вероятно, составить недифференцированные опухоли). Можно предполагать, что экзосомы, секретируемые клетками определенной ткани или клетками опухоли, развившейся из такой ткани, «несут» на своей мембране соответствующие маркеры. В рамках данного исследования, эта гипотеза была проверена на примере рака предстательной железы.

В ряде работ [133, 230], опубликованных разными авторами, было показано, что на поверхности экзосом, секретируемых клетками РПЖ, детектируется трансмембранный белок – мембранная форма простат-специфического антигена (ПСМА / PSMA, prostate-specific membrane antigen). Это цинксодержащий металлофермент (глутаматкарбоксипептидаза 2-го класса), который участвует в метаболизме фолатов и катализирует расщепление ацетиласпартилглутамата до глутамата и ацетиласпартата. В последующих исследованиях были предложены различные методологические подходы к задаче выделения ПСМА(+) экзосом из пула экзосом плазмы с целью количественного или качественного анализа [113, 231-233].

В рамках данного исследования была поставлена задача сначала оценить (детектировать) популяцию ПСМА (+) экзосом в плазме здоровых мужчин, затем выделить такие экзосомы из плазмы здоровых доноров и пациентов с РПЖ с целью оценки гипотезы о возможности повышения специфичности разрабатываемых диагностических методов в целом.

В работе была использована плазма здоровых доноров. Экзосомы (тотальная популяция) были выделены классическим методом ультра-центрифугирования. С учетом ранее проведенных исследований с целью характеристики ВНВ, выделенных этим методом, и строго стандартизированной процедуры, анализ физико-химических характеристик ВНВ в рамках этого исследования не проводился. После выделения везикулы были ресуспендированы в ФСБ и адсорбированы на поверхность латексных микрочастиц с помощью антител к экзосомальному маркеру CD63 (Hansa BioMed. Эстония). Детекция ПСМА на мембране везикул проводилась с помощью первичных антител к этому белку (ab133579 AbCam, США; sc-73651 Santa-Cruz, США) и вторичных антител, меченных флуоресцентным красителем FITC. На рисунке 28А представлена принципиальная схема эксперимента.

Исследование было проведено на пяти образцах плазмы здоровых женщин и десяти образцах плазмы здоровых мужчин. На рисунке 28Б представлены репрезентативные результаты двух измерений. Как видно на графике, в пробах экзосом из плазмы мужчин интенсивность сигнала выше, чем в пробах экзосом из плазмы женщин. Это говорит о том, что в плазме мужчин больше ПСМА(+) везикул (CD63(+)/PSMA(+)). Но вполне измеряемая интенсивность сигнала, наблюдаемая в контроле и с образцами из женской плазмы, и относительно «слабая» разница между мужскими и женскими образцами указывает на условную специфичность ПСМА как «маркера» простат- (или РПЖ-) специфичных экзосом. Вероятно, этот белок секретируется также клетками других тканей организма. Но этот факт не исключает возможность использования ПСМА в качестве «якоря» для изоляции (точнее, обогащения) простат-специфичных экзосом из плазмы мужчин.

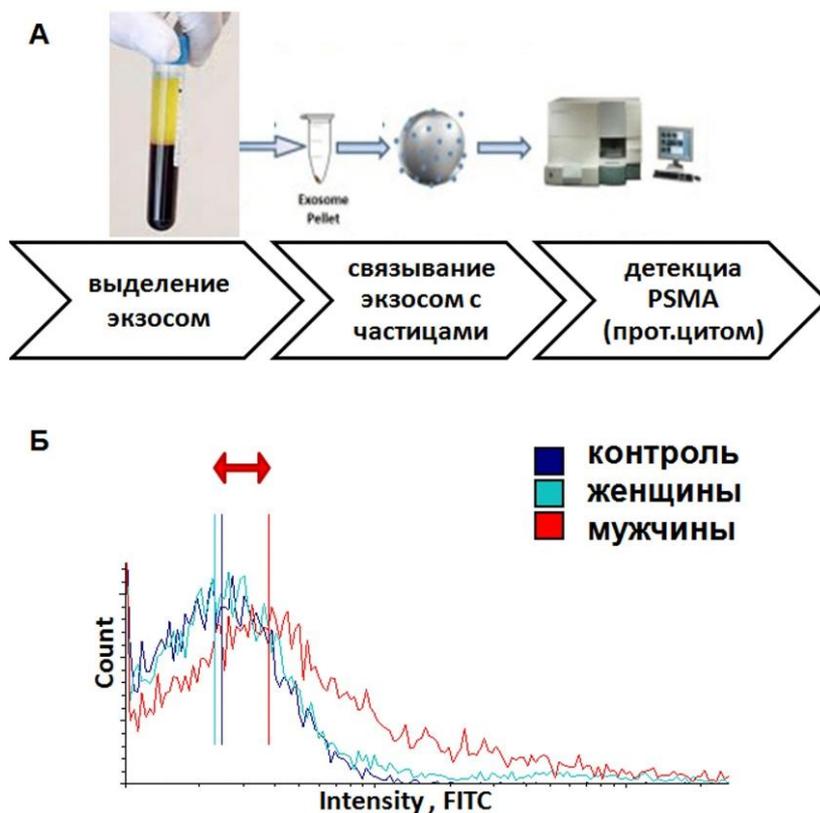


Рисунок 28 - Детекция ПСМА(+) экзосом в плазме здоровых мужчин и женщин: А) Последовательность процедуры Б) Проточная цитометрия: CD63(+)ВНВ фиксированы к катексным частицам, помечены с помощью первичных антител к PSMA, затем вторичных антител anti-mouse-FITC. Представлены результаты анализа трех образцов: контроль – частицы без инкубации с ВНВ, частицы после инкубации с ВНВ из плазмы женщин, частицы после инкубации с ВНВ из плазмы мужчин. Остальные этапы пробоподготовки образцов были идентичны

В рамках последующих экспериментов была создана система для выделения ПСМА(+) везикул. Для этого были использованы антитела к ПСМА, меченные биотином, и магнитные частицы с фиксированным к поверхности стрептавидином. После инкубации экзосом и антител ПСМА(+) экзосомы связывались с магнитными частицами за счет образования прочной связи биотин-стрептавидин. После лизирования везикул и выделения РНК концентрация в пробе определенных микроРНК была оценена с помощью ОТ-ПЦР. На рисунке 29А представлена принципиальная схема эксперимента. РНК была выделена из везикул, связанных с

микрочастицами (т.е. ПСМА(+)) и везикул, оставшихся в суспензии после реакции иммуно-преципитации (тотальная популяция).

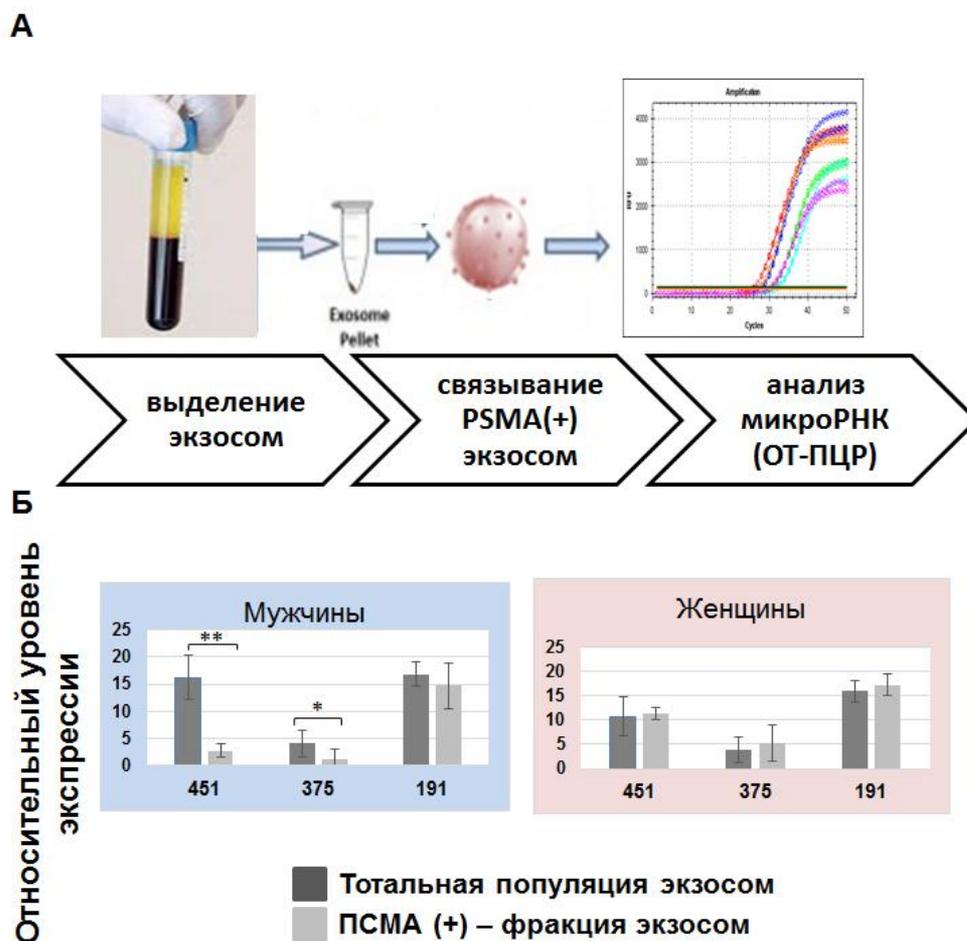


Рисунок 29 - Выделение ПСМА(+) везикул и анализ экзосомальных микроРНК: А) Последовательность процедуры Б) Анализа концентрации микроРНК (miR-451, miR-375, miR-191) в двух популяциях ВНВ (тотальной популяции и ПСМА(+)), выделенных из плазмы мужчин или женщин, методом ОТ-ПЦР. Статистическая значимость наблюдаемых различий оценена с помощью U-критерия Mann-Whitney, $p < 0,5$ (*); $p < 0,05$ (**).

Была оценена концентрация трех молекул микроРНК, имеющих различную вероятность присутствия в ПСМА(+) везикулах. Так, молекула miR-375, в частности экзосомальная форма этой молекулы, является потенциальным маркером РПЖ, согласно данным многочисленных исследований [234-237]. Также было показано, что miR-451 участвует в развитии РПЖ и может быть детектирована в РПЖ-специфичных экзосомах [238, 239]. Молекула miR-191 рекомендована как «референсная» молекула для анализа микроРНК, циркулирующих в плазме, т.к. во многих исследованиях было показано, что концентрация этой молекулы в плазме относительно высока и стабильна [240, 241].

Как видно на рисунке 29Б разница в содержании miR-451 и miR-375 между фракцией ПСМА(+) везикул и тотальной популяцией экзосом плазмы была определена только в случае анализа образца мужской плазмы. В образце женской плазмы эти молекулы содержались в практически одинаковых концентрациях в обеих пробах. Как можно было ожидать, референсная молекула miR-191 была представлена в одинаковой концентрации во всех экзосомальных популяциях. Эти результаты косвенно показывают, что в случае образцов мужской плазмы выделения ПСМА (+) экзосом приводит к «обогащению» таких молекул микроРНК, которые могут иметь отношение к развитию РПЖ.

Для уточнения этого предположения, разработанная технология была использована для выделения ПСМА(+) экзосом из плазмы здоровых доноров (n.15) и пациентов с верифицированным РПЖ (n.20). Представленность miR-451, miR-375 и miR-191 была оценена в ПСМА(+) везикулах, и соотношение концентраций этих молекул (miR-191 была использована в качестве «нормализатора») было усреднено для двух исследуемых групп. На рисунке 30А представлены результаты этого сравнения - статистически значимая разница между группами была получена только в случае анализа miR-451 и последующей нормализации относительно miR-191. Ожидаемая разница в концентрации miR-375 в данном исследовании не подтвердилась.

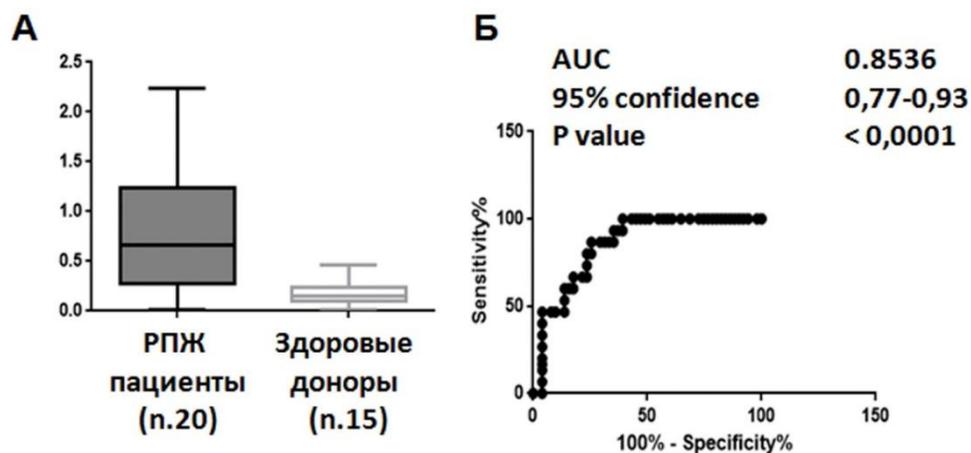


Рисунок 30 - Анализ концентрации молекулы miR-451 в ПСМА(+) экзосомах здоровых доноров и пациентов с РПЖ: А) Уровень концентрации miR-451 нормализован относительно miR-191 для каждой пробы, затем вычислены средние значения для сравниваемых групп, статистическая разница определена с помощью U-теста Mann-Whitney, $p=0,05$. Б) Оценка диагностической значимости показателя проведена путем построения ROC кривой, значения AUC и показатели статистической значимости представлены на рисунке

Далее была проведена оценка диагностической значимости такого показателя как соотношение miR-451/miR-191, вычисленное как $2^{\text{miR451-miR191}}$, и по сути представляющее собой вариант нормализации экспрессии miR-451 относительно miR-191 (dCt) [242]. Результаты, представленные на рисунке 30Б, указывают на достаточно высокое прогностическое значение этого показателя (AUC=0,85), хотя эти результаты сопоставимы с данными, описанными в разделе 3.4.2. Возможно ПСМА не является идеальным «маркером» для везикул, секретлируемых клетками предстательной железы. Поиск и валидация более тканеспецифичных молекул необходимы для решения задачи повышения специфичности диагностических методик, основанных на анализе циркулирующих экзосом.

Так, проведенные исследования показали целесообразность дальнейшей работы с целью поиска «надежных» тканеспецифичных маркеров, и оптимизации методики выделения тканеспецифичных везикул.

3.4.5.2 Оптимизация методики анализа микроРНК с помощью ОТ-ПЦР

В рамках данного исследования, разработка диагностических методик на основе анализа компонентов циркулирующих экзосом сфокусирована на экзосомальных микроРНК. Это короткие одноцепочечные молекулы, которые регулируют экспрессию генов на посттранскрипционном уровне путем комплементарного взаимодействия с молекулами информационной (матричной) РНК [243]. Основной функцией микроРНК считается подавление экспрессии генов на пост-транскрипционном уровне посредством связывания с участками в нетранслируемых областях мРНК, приводящего к деградации или обратимой инактивации последних. Предполагается, что микроРНК могут контролировать экспрессию до 60% генов человека и выступают микро-регуляторами экспрессии или «скульпторами транскриптома», образуя своеобразную «страховочную сеть», препятствующую бесконтрольному изменению экспрессии клеточных белков. К настоящему времени описано около 3 тысяч молекул, представленных в специализированной базе данных www.miRbase.org, которая постоянно пополняется и имеет открытый доступ [244]. Состав микроРНК и их количественный уровень (иными словами, профиль) специфичен для клеток различных тканей и характеризуется несколькими десятками или сотнями т.н. «мажорных» молекул. Физиологические и/или патологические изменения состояния клеток ассоциированы со специфическими изменениями профиля внутриклеточных микроРНК. В частности, неопластическая трансформация клеток сопровождается характерными изменениями состава микроРНК. Оценка этих изменений имеет большой диагностический потенциал [245].

В дополнение к регуляторным функциям внутри клетки, микроРНК секретируется клетками во внеклеточное пространство. В настоящее время выделяют основные формы «внеклеточных» микроРНК: микроРНК в составе комплекса с протеином Ago2 (который остается после диссоциации в цитоплазме регуляторного комплекса RISC; микроРНК в составе комплексов с липопротеинами высокой плотности и микроРНК в составе различных везикулярных образований, включая экзосомы. Из перечисленных вариантов,

секреция микроРНК в составе ВНВ представляется активным и регулируемым процессом. Опухолевые клетки активно секретируют микроРНК в составе ВНВ различных типов, включая экзосомы. В развитии и прогрессии онкологических заболеваний внеклеточные формы микроРНК играют важную роль [246]. Состав микроРНК в экзосомах клетки является неслучайным, и многие патологические эффекты опухолевых экзосом опосредуются именно экзосомальными молекулами микроРНК [165]. В многочисленных экспериментальных работах было показано, что экзосомальные микроРНК опосредуют как локальный инвазивный рост опухоли [247], так и процесс метастатической диссеминации [54]. Очевидно, что экзосомальные микроРНК, секретируемые опухолевыми клетками, имеют определенный диагностический потенциал [248]. Поэтому разработка и использование надежных технологий анализа микроРНК является необходимым условием успешного клинического применения соответствующих методов лабораторной диагностики.

Для количественного анализа микроРНК принципиально применимы те же методы, что традиционно используются для анализа матричной РНК: метод обратной транскрипции с последующей полимеразной цепной реакцией, ОТ-ПЦР (RT-qPCR) [249], технология микрочипов (micro-arrays) [250], секвенирование, включая полногеномное секвенирование РНК (RNA-seq) [251]. В процессе более или менее активной разработки находится несколько альтернативных технологий [252-254]. В настоящее время, метод ОТ-ПЦР является наиболее часто используемым подходом для анализа микроРНК в силу его надежности и относительно низкой стоимости. Но несмотря на широкое распространение в исследовательской практике, использование метода ОТ-ПЦР для анализа микроРНК является нетривиальной задачей. В дополнение к известной проблеме качества и стабильности препаратов РНК, выделяемых из биологических образцов [255], в случае микроРНК имеют значение такие аспекты как наличие «незрелых» форм [256] и небольшой размер «зрелых» молекул [249]. Длина «зрелой» молекулы микроРНК сопоставима по размеру с длиной праймеров, пара которых должна «иметь места посадки» на протяжении детектируемой молекулы для инициации

полимеразной цепной реакции. Поэтому, перед проведением реакций обратной транскрипции и аналитической ПЦР необходимым этапом является «удлинение» молекулы микроРНК.

Этот этап синтеза молекулы ДНК, которая частично комплементарна детектируемой микроРНК и имеет длину как минимум 50-60 оснований, представляется критичным аспектом методики анализа микроРНК с помощью ОТ-ПЦР [249].

В настоящее время существует несколько подходов к решению этой задачи. Исторически первым был предложен метод обратной транскрипции микроРНК с помощью праймера, формирующего т.н. «петлю» (stem-loop primer) [257] – рисунок 31А.

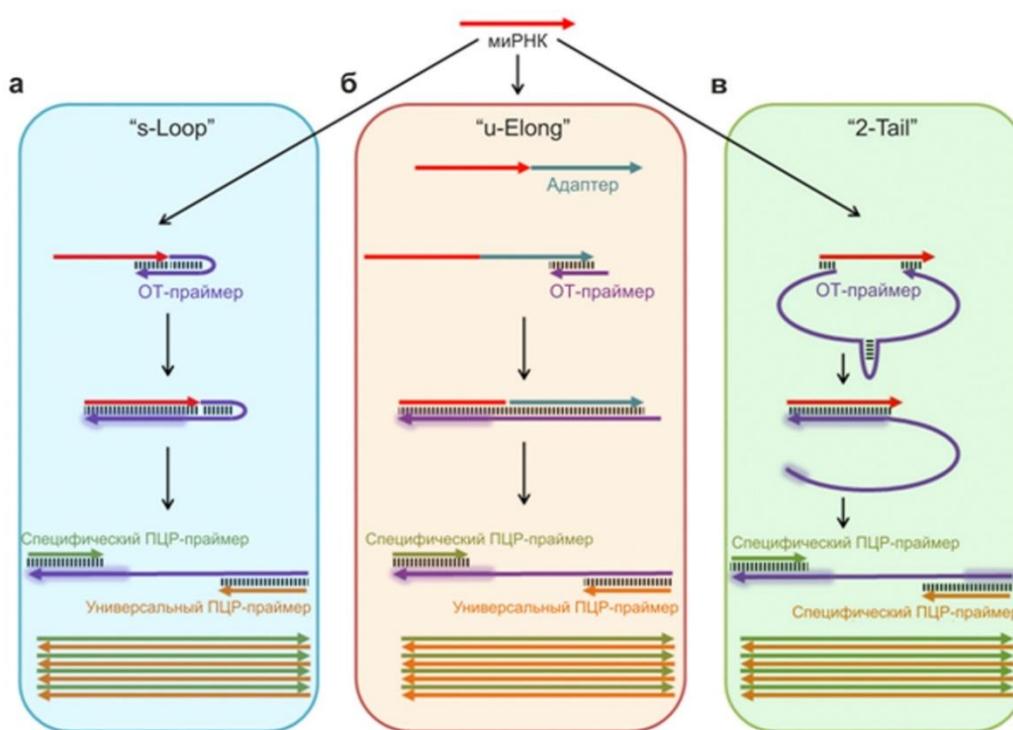


Рисунок 31 - Схематическое изображение различных методов ОТ-ПЦР для анализа микроРНК

Диссоциация этой петли после реакции обратной транскрипции позволяет получить молекулу кДНК нужной длины и обеспечивает возможность использования такой молекулы в качестве матрицы для последующей ПЦР. В течение последующих лет этот метод был оптимизирован многими исследователями. Теперь он широко используется и позволяет получать достоверные результаты [258]. Позднее были разработаны еще несколько методов синтеза удлиненной кДНК на основе короткой молекулы микроРНК. Удлинение микроРНК проводилось путем полиаденилирования (достраивания поли-А участка) [259] или путем лигирования (ферментативного присоединения) ДНК-фрагмента, так называемого адаптора, рисунок 31Б [260]. В целом, наличие множества способов синтеза кДНК на основе микроРНК говорит об отсутствии универсального метода. Недостатки каждого из возможных подходов должны учитываться при решении определенных экспериментальных задач. Основным требованием к методу, который предполагается использовать в клинической диагностике, является надежность, т.е. оптимальное сочетание показателей чувствительности и специфичности.

Оригинальный метод «удлинения» и обратной транскрипции был недавно предложен группой чешских исследователей [261]. Этот метод предполагает использование для ОТ относительно длинного праймера, который формирует «петлю» в середине молекулы, а два его конца комплементарно связывают концы детектируемой миРНК, располагаясь «навстречу» друг другу (Рисунок 31В). Реакция ОТ инициируется одним из концов (3'-) праймера, при этом в процессе транскрипции происходит диссоциация второго конца (5'-) и синтез фрагмента кДНК, комплементарного полноразмерной молекуле миРНК. Таким образом получается молекула кДНК достаточной длины, и оба конца этой молекулы имеют участки, комплементарные детектируемой миРНК, что позволяет использовать два миРНК-специфичных праймера для ПЦР. Влияние специфической структуры олигонуклеотида – праймера ОТ на эффективность (специфичность и чувствительность) предложенного метода детекции миРНК детально обсуждается авторами в опубликованной работе [261]. Предположительно, такой подход

должен обеспечивать максимальную специфичность анализа, т.к. взаимодействия ОТ-праймера и «таргетной» микроРНК происходят по двум участкам.

Основной целью данного исследования являлась реализация этой технологии, и оценка ее специфичности и чувствительности по сравнению с существовавшими ранее методами. В рамках исследования было проведено прямое сравнение нескольких ОТ-ПЦР технологий анализа микроРНК, схематически представленных на рисунке 31 и обозначенных далее в тексте как «s-Loop», «u-Elong» и «2-Tail».

Для решения поставленной задачи были использованы т.н. «мимики» - синтетические аналоги молекул микроРНК. На основе исходного образца синтетической с концентрацией 100 пикоМ была создана серия последовательных десятикратных разведений таким образом, чтобы реакция ОТ-ПЦР стартовала в каждом случае в диапазоне от 10 до 10 миллионов молекул микроРНК. Реакция ОТ проводилась согласно рекомендованному разработчиками протоколу, использовалась реагентика производства компании БиоЛабМикс (Новосибирск). ПЦР проводилась по идентичному протоколу во всех трех случаях. Эффективность ПЦР оценивалась в режиме реального времени (real-time) путем детекции сигнала флуоресцентного свечения интеркалирующего агента SYBR-green.

На рисунке 32 представлен репрезентативный пример результатов, полученных при анализе эффективности детекции синтетической miR-451. Линейная зависимость между концентрацией детектируемой молекулы микроРНК и данными ОТ-ПЦР наблюдалась в случае использования систем s-Loop и 2-Tail в диапазоне концентраций 10^7 - 10^3 молекул на реакцию.

При снижении концентрации детектируемой молекулы наблюдалась стабилизация значения Ct на 33-33,5 (2-Tail) или 35-36 (s-Loop) циклах ПЦР, т.е. эффективность ПЦР «выходила на плато». Аналогичные результаты были получены для других «мимиков»: miR-375, miR-29b (данные опубликованы [262], и ряду других молекул (miR-126, miR-34a, miR-1247, miR-196).

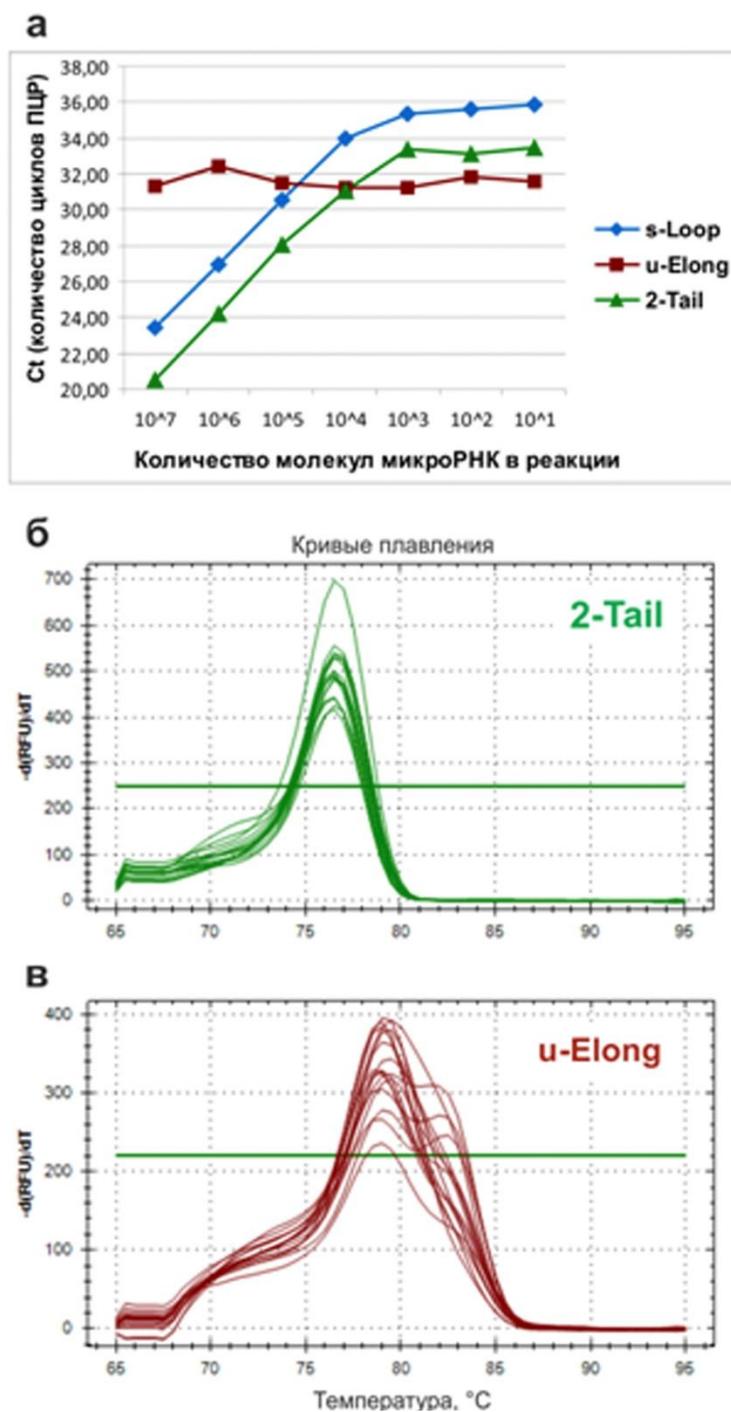


Рисунок 32 - Результаты сравнительного анализа ОТ-ПЦР систем для детекции miR-451: А) Динамический диапазон регистрируемых концентраций миРНК; кривые плавления конечного продукта ПЦР, получаемого методами 2-Tail (Б) и u-Long (В)

Методика, предполагающая «лигирование» молекулы микроРНК с помощью адаптора, «u-Elong» [260], в большинстве случаев оказывалась не эффективной, и

была исключена из дальнейшего анализа. Во всех случаях сравнения методов «s-Loop» и «2-Tail» график зависимости эффективности ПЦР (значение C_t) от концентрации «мирика», полученный с помощью системы «2-Tail», оказывался «ниже», т.е. детекция равного количества «таргетных» молекул этим методом происходила на более ранних циклах ПЦР. Иными словами, чувствительность системы «2-Tail» оказалась выше по сравнению с системой «s-Loop».

Так, на основе полученных данных можно сделать вывод, что тестируемая система, «2-Tail» обладает не только высокой специфичностью (теоретически предполагаемой на основе структуры ОТ-праймера и механизма реакции ОТ), но и высокой чувствительностью. В дополнение к параметрам диагностической значимости, методика «2-Tail» является относительно простой в исполнении и может быть реализована с помощью отечественной реagenтики.

3.5 Выводы и оценка направлений дальнейших исследований

В Главе 3 описаны результаты работы, целью которой была оценка перспектив разработки и внедрения в клиническую практику диагностических методик на основе выделения экзосом и анализа экзосомальных компонентов (микроРНК). Полученные результаты позволяют сделать следующие выводы:

1. Профиль микроРНК, выделенных из экзосом плазмы пациентов с КРК, имеет характерные и детектируемые изменения. Их оценка может быть основой метода диагностики КРК. Соотношение концентраций miR-223/miR-181a является перспективным диагностическим параметром [229]
2. МикроРНК в составе экзосом мочи, выделенных с помощью агглютинации лектинами, имеют диагностический потенциал. В частности, оценка концентрации miR-574, miR-141 и miR-21 может быть использована как основа системы для диагностики РПЖ [80, 263].
3. «Маркерные» микроРНК (miR-21, miR-146a и miR-181a) имеют характерный профиль представленности в экзосомах плазмы пациентов с различными УОЩЖ. Анализ таких молекул может лежать в основе метода дифференциальной диагностики папиллярной и фолликулярной формы РЩЖ [171, 264, 265].

4. МикроРНК в составе экзосом, выделенных из плазмы пациенток с РМЖ, могут быть использованы как маркеры эффективности неоадьювантной химиотерапии. В частности, соотношение концентраций miR-34/miR-451 представляется перспективным прогностическим критерием [266].
5. Технология изоляции из плазмы тканеспецифичной фракции экзосом является перспективным способом повышения специфичности диагностических методов, основанных на анализе экзосомальных микроРНК.
6. Технология «2-tail» ОТ-ПЦР анализа микроРНК является перспективным способом повышения чувствительности диагностических методов, основанных на анализе экзосомальных микроРНК [262].

В целом, разработка методов первичной и/или дифференциальной диагностики, и мониторинга и/или прогнозирования эффекта лечения онкологических заболеваний на основе анализа экзосомальных микроРНК является перспективным направлением прикладных исследований. Такая работа требует сочетания возможности использования передовых аналитических технологий и доступа к достаточному объему клинического материала. Повышение показателей диагностической значимости методов анализа экзосомальных микроРНК может быть достигнуто путем разработки технологии выделения тканеспецифичных экзосом и оптимизации метода количественного анализа микроРНК.

ГЛАВА 4. ИССЛЕДОВАНИЕ РОЛИ ВНВ ПЛАЗМЫ В ПРОЦЕССЕ МЕТАСТАТИЧЕСКОЙ ДИССЕМИНАЦИИ

4.1 Обзор литературы: физиологические и патологические функции циркулирующих экзосом

В зависимости от метода анализа концентрация экзосом в плазме оценивается как $8.5 - 10.5 \times 10^{10}$ везикул в миллилитре [101]. Протеины плазмы, циркулирующие в составе экзосом, составляют около 0.1-0.3% от общего состава белков плазмы. По разным (часто противоречивым) данным экзосомы содержат от 5 до 50% циркулирующих РНК, включая матричные РНК, длинные некодирующие РНК и короткие регуляторные микроРНК. В современной литературе пока нет внятных данных о том, какая часть липидов плазмы приходится на циркулирующие везикулы, включая экзосомы. Таким образом, экзосомы составляют относительно небольшую массовую часть циркулирующей плазмы. Но тысячи исследований, опубликованных за последние 10 – 15 лет, ясно указывают, что экзосомы представляют собой физиологически значимый компонент, участвующий в процессах иммунной защиты, гемостаза и межклеточных коммуникаций, что, вероятно, определяется высокой степенью и регулярностью их пространственной организации. Пул циркулирующих экзосом преимущественно представлен везикулами, секретруемыми тромбоцитами, клетками крови и эндотелиоцитами. Минорная фракция представлена везикулами, секретруемыми клетками различных тканей. Количество тканеспецифичных везикул, вероятно, пропорционально секреторной активности и относительной массе ткани. Состав циркулирующих экзосом меняется при развитии различных физиологических (беременность [267, 268], физическая нагрузка [269, 270], стресс [271], старение [272, 273]) и патологических состояний (нейро-дегенеративные заболевания [274, 275], метаболические заболевания [276, 277], заболевания центральной нервной системы [278], онкологические заболевания). Можно предполагать, что активные исследования структуры и функций циркулирующих экзосом в обозримом будущем приведут к качественному «скачку» в понимании их физиологии и,

вероятно, анализ везикулярного состава плазмы займет место в ряду рутинных клинических анализов.

В процессе развития онкологического заболевания состав экзосом плазмы изменяется. Неопластические клетки, как и другие клетки организма человека, способны секретировать экзосомы в межклеточное пространство, непосредственно в лимфатическую или кровеносную капиллярную сеть. С током крови опухолевые экзосомы (ОЭ) переносятся к отдаленным тканям и органам, опосредуя отдаленные эффекты растущей опухоли, определяя генерализованный характер онкологического заболевания. Исходно предполагалось, что опухолевые экзосомы (tumor-derived exosomes) участвуют в процессе «презентации» опухолевых антигенов дендритным клеткам и таким образом формируют противоопухолевый иммунный ответ, т.е. выполняют своего рода защитную («анти-опухолевую») функцию [279]. Но дальнейшие исследования выявили ряд «про-опухолевых» эффектов экзосом, секретлируемых злокачественными клетками.

Так, воздействие опухолевых экзосом на гранулярные лимфоциты, или естественные киллеры (natural killer cells, NK cells), приводит к снижению в них секреции цитотоксических белков (перфоринов) и активности сигнальных молекул (JAK3). Это приводит к снижению эффективности клеточного звена противоопухолевого иммунитета, что может объяснить ускорение прогрессии экспериментальной опухоли молочной железы на фоне введения животным препарата опухолевых экзосом, полученных *in vitro* [280]. Активация иммуносупрессорных клеток или малодифференцированных миелоидных прекурсоров (myeloid-derived suppressor cells, MDSCs) представляет собой один из многих возможных механизмов подавления противоопухолевой иммунной реакции, регулируемый опухолевыми экзосомами [281]. Экзосомы могут индуцировать апоптоз активированных цитотоксических Т-лимфоцитов с помощью лиганда белка CD95 (Fas/APO-1), Fas лиганда (FasL). Этот эффект был описан в ряде экспериментальных работ [282, 283]. Кроме того, ОЭ угнетают процесс дифференцировки и снижают активность созревших антиген-презентирующих клеток (antigen-presenting cells, APCs) [284, 285], подавляя

эффективность клеточного и гуморального иммунитета. В целом, анализ литературы показывает, что с помощью секреции экзосом опухолевые клетки эффективно ингибируют работу иммунной системы, способствуя локальному росту и отдаленной диссеминации опухоли.

Кроме воздействия на различные типы иммунных клеток, опухолевые экзосомы могут индуцировать специфические изменения в клетках соединительной ткани и эндотелиоцитах. Например, в условиях гипоксии клетки опухоли продуцируют экзосомы, которые индуцируют неоангиогенез [286, 287]. Этот эффект опосредуется рядом ростовых факторов (TFG- β , VEGF, IL-6, IL-8, angiogenin), которые стимулируют образование сосудов. Интересным, но пока мало изученным феноменом является локальный, паракринный характер этого эффекта – новые кровеносные сосуды образуются лишь на периферии растущей опухоли и метастазов, что предполагает наличие механизмов адресной доставки (или воздействия) экзосомальных сигналов. В дополнение, описано взаимодействие клеток опухоли и стромы, опосредованное экзосомами, приводящее к изменению морфологии фибробластов и усилению локальной опухолевой инвазии. Этот паракринный эффект опосредуется сигнальными хемокинами (CX3CL1/CX3CR1) и ростовыми факторами (TGF- β , FGF) в составе экзосом. Так, взаимозависимая экзосомальная стимуляция клеток растущей опухоли и окружающей соединительной ткани была описана для различных нозологических форм, включая РПЖ [288, 289], РМЖ [290] и другие.

В ряде исследований были описаны примеры и исследованы механизмы отдаленных эффектов опухолевых экзосом. Например, была показана роль экзосомальных коммуникаций клеток рака яичников и брюшины в процессе интраперитонеальной диссеминации [291, 292]. Экзосомы клеток меланомы индуцируют такие морфологические изменения в «сигнальных» лимфатических узлах (sentinel lymph nodes), которые «задерживают» в них опухолевые клетки и стимулируют формирование метастазов [293]. Интересные данные были получены в экспериментальной работе с использованием модели рака поджелудочной железы. Экзосомы, продуцируемые клетками инвазивного рака *in vitro* и вводимые

экспериментальным животным подкожно, обнаруживались преимущественно в клетках стромы лимфатических узлов и легочных фибробластах. После такой «подготовки» наблюдалась активная диссеминация малоинвазивной формы рака поджелудочной железы [54]. Результаты этого исследования наглядно показывают значимость, если не решающее значение, опухолевых экзосом в процессе метастатической диссеминации. В этой же работе было показано, что морфологические изменения в «таргетных» тканях определяются преимущественно действием экзосомальных микроРНК и сопровождаются специфическим изменением экспрессионного профиля клеток стромы. В частности, изменялась экспрессия генов, кодирующих адгезионные молекулы, ферменты протеолиза, лиганды хемокинов фибробластами. Эти молекулярные изменения приводят к изменению структуры межклеточного матрикса и определяют возможность формирования в нем метастазов клетками опухоли с низким метастатическим потенциалом [294].

В целом, складывается впечатление, что секреция экзосом определяет потенциал паракринного и эндокринного (дистантного) воздействия злокачественной опухоли на здоровые клетки, и это воздействие ускоряет процесс метастатической диссеминации. Но реальная картина оказывается несколько сложнее. Например, описана разница состава и, следовательно, патофизиологических эффектов экзосом, секретлируемых клетками первичной опухоли и метастазов [295]. Кроме того, экзосомы опосредуют взаимодействие клеток опухоли, т.е. представляют собой компоненты механизма аутокринной регуляции [296].

Кроме того, ауто-, пара- и эндокринные эффекты опухолевых экзосом наблюдаются на фоне физиологической (нормальной) активности системы экзосомального взаимодействия клеток различных органов и тканей. Система «экзосомального» межклеточного сигналинга, которая функционировала до появления опухоли, не может не оказывать влияние на процесс ее развития. Этому аспекту участия экзосом в процессе развития онкологических заболеваний уделяется критически мало внимания. Хотя очевидно, экзосомы плазмы не могут

не контактировать с клетками первичной опухоли, и тем более с циркулирующими опухолевыми клетками и клетками, формирующими метастатические очаги. В современной литературе практически не представлены исследования роли циркулирующих экзосом в процессе метастатической диссеминации. Оценка и исследования этой роли представляются крайне важными в свете двух очевидных фактов:

- Развитие метастазов – это основная причина онкологической смертности;
- Пул циркулирующих экзосом доступен для анализа и терапевтической коррекции.

Поэтому, исследования механизмов и эффектов взаимодействия опухолевых клеток и циркулирующих экзосом может открыть перспективы разработки новых методов контроля (профилактики и/или лечения) опухолевой диссеминации.

4.2 Задача и подходы к ее решению

С учетом представленных выше литературных данных, основной задачей данного фрагмента диссертационной работы было исследование молекулярных механизмов и биологических эффектов взаимодействия экзосом плазмы и опухолевых клеток. Поставленная задача решалась несколькими подходами. Предполагалось:

- Исследовать структуру (состав поверхности) экзосом плазмы.
- Изучить в условиях эксперимента (*in vitro*, *in vivo*) биологические эффекты, которые оказывают экзосомы плазмы на опухолевые клетки.
- Определить компоненты структуры экзосом плазмы, опосредующие (регулирующие) их взаимодействие с опухолевыми клетками.
- Определить внутриклеточные сигнальные пути, опосредующие (регулирующие) реакцию опухолевых клеток на экзосомы плазмы.

Решение поставленной задачи позволило оценить перспективы и обозначить возможные направления разработки методов контроля процесса метастатической диссеминации путем терапевтического воздействия на пул циркулирующих экзосом.

4.3 Материалы и методы

4.3.1 Выделение и характеристика ВНВ

Образцы венозной крови (8-10 мл) были получены от здоровых женщин доноров, в течение 5-10 минут плазма была отделена от эритроцитарной массы и клеток с целью минимизации количества везикул, секретируемых вне кровяного русла. Для *in vitro* и *in vivo* экспериментов экзосомы выделялись классическим методом дифференциального ультра-центрифугирования [76]: образцы плазмы разводились 1:1 с фосфатно-солевым буфером и центрифугировались последовательно:

2 000 xG – 30 минут,

17 000 xG – 60 минут, и

100 000 xG – 90 минут.

Первые два этапа позволяли осадить клетки и клеточный детрит, при этом экзосомы оставались в супернатанте. Экзосомы осаждались в ходе заключительного этапа ультра-центрифугирования в виде светлого осадка, который легко ресуспендировался в ФСБ.

Физические характеристики экзосом оценивались традиционными методами лазерной корреляционной спектроскопии (ЛКС), нано-трекового анализа (НТА) (размер, концентрация), сканирующей атомно-силовой микроскопии (АСМ) и криоэлектронной микроскопии (Крио-ЭМ) (морфология). Экзосомальные маркеры на поверхности экзосом оценивались с помощью проточной цитометрии (были использованы наборы Echo-FACS, HansaBioMed). Метод сравнительного анализа специфических белков (Western blot) описан ранее [297]. Коротко, осадки экзосом, полученные после центрифугирования, были лизированы (0.05 М Tris-HCl, pH 7.4; 0,15 М NaCl, 1% Triton X-100, 1% SDS) в присутствии смеси ингибиторов протеолиза P8340 (Sigma Aldrich, USA) в течение 30 минут, при +4 °C. Лизаты были вновь центрифугированы для удаления фрагментов мембран, экстракты протеинов были нормализованы по концентрации, определенной методом Бредфорда (Bio-Rad Laboratories Ltd., США), наносилось 20 мкг белка в лунку. Электрофорез проводился в 10% SDS-PAAG, для нанесения использовался стандартный

нередуцирующий буфер (Laemlli Sample Buffer). Разделенные электрофорезом белки переносили на поливиниловую мембрану, которую блокировали в течение часа в 0,1% растворе казеина в трис-солевом буфере с твином-20 и инкубировали с соответствующими антителами: anti-CD63 (ab68418), anti-Fibronectin (ab2413), anti-beta actin (ab8227), anti-FAK (ab40794) производства компании Abcam, USA. Визуализацию блотов проводили с помощью вторичных антител, конъюгированных с пероксидазой anti-rabbit IgG H&L (HRP) – ab6721 (Abcam, USA), набора Pierce™ ECL Western Blotting Substrate (Thermo Fischer Scientific, USA) на аппарате LAS-4000 (General Electric, USA).

Эксперименты *in vitro* проводились при концентрации экзосом $1-2 \times 10^{11}$ везикул/мл. В ходе *in vivo* эксперимента инкубация и трансплантация клеток РМЖ проводилась в суспензии экзосом, концентрация которых соответствовала составляла $1-2 \times 10^{12}$ везикул/мл.

Анализ профиля экзосомальных белков (протеомный анализ) был проведен с помощью масс-спектрометрии, как описано ранее [298]. Биоинформатический анализ данных масс-спектрометрии был проведен с помощью баз данных и программного обеспечения, доступного в сети Интернет: DAVID, Database for Annotation, Visualization and Integrated Discovery [299, 300]; BioCarta (https://cgap.nci.nih.gov/Pathways/BioCarta_Pathways), KEGG [301], NCI [302], Reactome [303] и SABiosciences Pathway Central (<http://www.sabiosciences.com/pathwaycentral.php>).

4.3.2 Клеточные линии и *in vitro* эксперименты

В работе была использована стабильная культура клеток РМЖ, MDA-MB-231, полученная из клеток плеврального экссудата. Клетки культивировались в стандартных условиях: среда RPMI-1640 с L-глутамином и 10% эмбриональной сыворотки телят (БиоЛот СПб), при 37 °C и 5 % CO₂. В исследовании были использованы модифицированные клеточные линии MDA-MB-231/GFP (кат. AKR-201, Cell BioLabs Inc., США) и MDA-MB-231/FAK-KD1, стабильно экспрессирующая последовательность 5'-GGGCATCATTCAGAAGATA-3' в составе pLKO.2 плазмиды. Обе линии были получены в рамках сотрудничества с

коллегами из Университета Бар-Илана (Dr. Nava Gil-Henn). Стандартный культуральный пластик (ПанЭко, Москва) использовался для культивации клеток в адгерентном монослое, для анализа неадгерентного (суспензионного) роста клеток пластик предварительно покрывали раствором полимера (Poly-Nema; Sigma-Aldrich, Москва) по методу, описанному ранее [304]. При необходимости применения среды без экзосом, использовалась сыворотка Eho-FBS (SBI, USA). Пролиферативная активность клеток определялась с помощью колориметрического теста (CK04-13 CELL COUNTING KIT-8; Dojindo Molecular Technologies, Inc. USA). Для анализа движения клеток по плоскости была использована система (IN Cell Analyzer HCA Systems; GE Healthcare Life Sciences, USA), с помощью которой проводилось автоматическое фотографирование клеток каждые 5 минут в течение 8 часов. Полученные данные анализировались с помощью программ ImageJ (NIH, USA) и Chemotaxis and Migration Tool (Ibidi GmbH, Germany). Для оценки способности клеток направленно мигрировать в трехмерном матриксе, были использованы специальные культуральные камеры (Corning® Transwell® polycarbonate membrane cell culture inserts), проницаемое дно которых покрывалось тонким слоем геля (Matrigel Basement Membrane Matrix; BD Biosciences, USA) и камера помещалась в лунку 12-луночного планшета. Среда «внутренней» камеры содержала с 0,5% сыворотки, в нее помещались клетки; а среда «внешней» камеры содержала 10% сыворотки. Градиент питательных веществ и хемоаттрактантов стимулировал перемещение клеток из внутренней камеры во внешнюю. После 12 часов инкубации клетки, «переместившиеся» из внутренней камеры, оказывались на нижней поверхности мембраны, где они фиксировались (10% р-ром метанола) и окрашивались (Bromophenol Blue, Sigma Aldrich, Москва). Клетки фотографировались и подсчитывались в шести полях зрения для каждого эксперимента.

4.3.3 Оценка инвазивности клеток в модели зебрафиш (*in vivo*)

В работе была использована линия рыбок zebrafish “casper” [305], у которых в результате гомозиготных мутаций в двух генах снижено число пигментных клеток, что делает такую модель удобной для экспериментальных трансплантаций.

Кроме того, иммунная система эмбрионов в течение первой недели не сформирована достаточно для отторжения ксенографтных клеток. Поэтому имплантация опухолевых клеток человека в ходе коротких экспериментов не требует специальных усилий для угнетения иммунитета. Эмбрионы (48 часов после оплодотворения) помещались в раствор трикаина (Tricaine, 80-100 мкг/мл) для анестезии и седации за 5-10 минут до инъекции. Адгерентно растущие клетки РМЖ (MDA-MB-231) отделялись от пластика традиционным методом с помощью трипсина, дважды «отмывались» фосфатно-солевым буфером, и после центрифугирования осадок клеток ресуспензировался в буфере, содержащем или не содержащем (контроль) экзосомы. Клетки РМЖ инкубировались в суспензии экзосом приблизительно соответствующей концентрации экзосом в плазме. После 30 минут инкубации суспензия клеток и экзосом трансплантировалась в желточный мешок эмбрионов с помощью тонкой стеклянной иглы (\varnothing 15 микрометров) и автоматической помпы, позволяющей дозированно инъецировать объем, содержащий 250-300 клеток. Эффективность имплантации и жизнеспособность эмбрионов оценивались через 30 минут, эмбрионы помещались в лунки 96-луночного планшета и инкубировались еще 2 дня при температуре 35°C. Каждая экспериментальная группа включала 30 эмбрионов. Результаты (наличие и распределение флуоресцентных клеток) оценивались с помощью флуоресцентного микроскопа, после эвтаназии концентрированным раствором трикаина.

4.4. Результаты

4.4.1 Характеристика ВНВ и анализ компонентов везикулярной поверхности

Анализ физических характеристик и морфологии выделенных из плазмы экзосом был проведен традиционными методами. Так, выделенные везикулы имели средний размер (гидродинамический радиус) 146 нм по данным лазерной корреляционной спектроскопии (Рисунок 33А). На поверхности везикул детектировались экзосомальные маркеры CD9, CD63 с помощью проточной цитометрии (Рисунок 33Б). Характерная для экзосом морфология наблюдалась с помощью сканирующей атомно-силовой и криоэлектронной микроскопии

(Рисунок 33 В и Г). Так, комплекс полученных данных позволял считать, что выделенные из плазмы везикулы представляют собой (преимущественно) ЭКЗОСОМЫ.

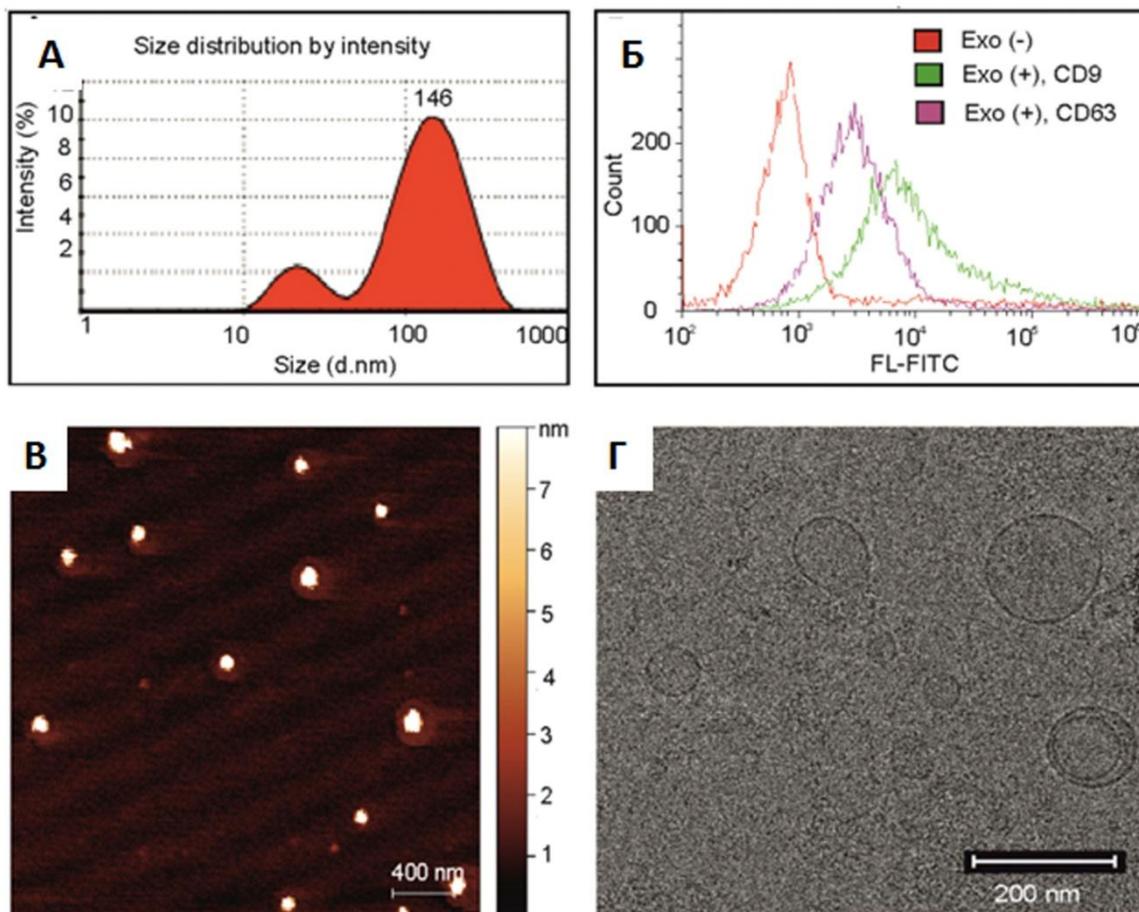


Рисунок 33 - Характеристика ВНВ, выделенных из плазмы: А) Лазерно-корреляционная спектрометрия, ЛКС; Б) Проточная цитометрия выполнена с помощью набора ExoFacs (HansaBioMed), Exo(-) – негативный контроль: латексные частицы, проведенные через все этапы пробоподготовки кроме инкубации с ВНВ; В Сканирующая атомно-силовая микроскопия; Г) Крио-электронная микроскопия

В ряде исследований было показано, что циркуляция экзосом в плазме приводит к взаимодействию (прилипанию) их поверхности компонентов плазмы, включая белки и циркулирующую ДНК. Один из возможных механизмов такого контактного взаимодействия был описан для экзосом, секретируемых клетками миеломы [306]. В этой работе было показано, что контакт экзосом с клеточной

мембраной опосредуется молекулами фибронектина (fibronectin, FN), фиксированными на поверхности экзосом. FN является мажорным белком плазмы и может неспецифично связываться с поверхностью циркулирующих везикул вне зависимости от их происхождения. Практически циркулирующие экзосомы контактируют со всеми плазменными белками, т.е. вероятность связывания этих белков с экзосомальной мембраной должна зависеть от концентрации конкретного белка и аффинности его контакта с мембранным гликокаликсом. Так, слой «налипших» плазменных белков может изменять структуру и свойства везикул. Для проверки этой гипотезы экзосомы были обработаны раствором трипсина (фермент класса гидролаз) в концентрации 0,25% в течение часа, отмыты ФСБ и седиментированы путем УЦ. По результатам измерений, проведенных методом нано-трекового анализа, (Рисунок 34А) процедура привела к ожидаемому снижению концентрации и некоторому уменьшению размера частиц. Кроме того, АТН на аппарате NanoSight NS300 позволяет интегрировать данные о концентрации, размере и характере отраженного от поверхности частиц излучения и представить эти данные в виде трехмерной диаграммы. Изменения последнего параметра, который характеризует структуру поверхности, показаны по оси Z рисунка 34Б. Как видно при сравнении верхней и нижней панели (Рисунок 34Б), обработка трипсином привела к существенному изменению структуры поверхности экзосом. В заключении, эквивалентное (по содержанию белка) количество нативных и обработанных трипсином частиц было сконцентрировано, и использовано для анализа содержания экзосомального маркера CD63 и FN методом Вестерн блоттинга (Рисунок 34В). Как предполагалось, инкубация с раствором трипсина привела к снижению содержания экзосомального фибронектина, но не повлияла на содержание в препарате трансмембранного тетраспанина CD63. В совокупности, описанные результаты показали, что обработка трипсином приводит к незначительному уменьшению размера, существенному изменению структуры поверхности ВНВ и частичному удалению фибронектина из их состава. Аналогичный анализ был проведен с экзосомами, секретлируемым клетками РМЖ (MDA-MB-231) в условиях *in vitro*. Интересно, что

экзосомы из культуральной среды «очистились» от FN значительно эффективней, чем экзосомы плазмы (Рисунок 34В, правая и левая панель). Это может быть связано с тем, что культуральная среда содержала лишь 10% сыворотки, которая является источником FN, поэтому экзосомы из среды содержали меньше FN чем экзосомы из плазмы.

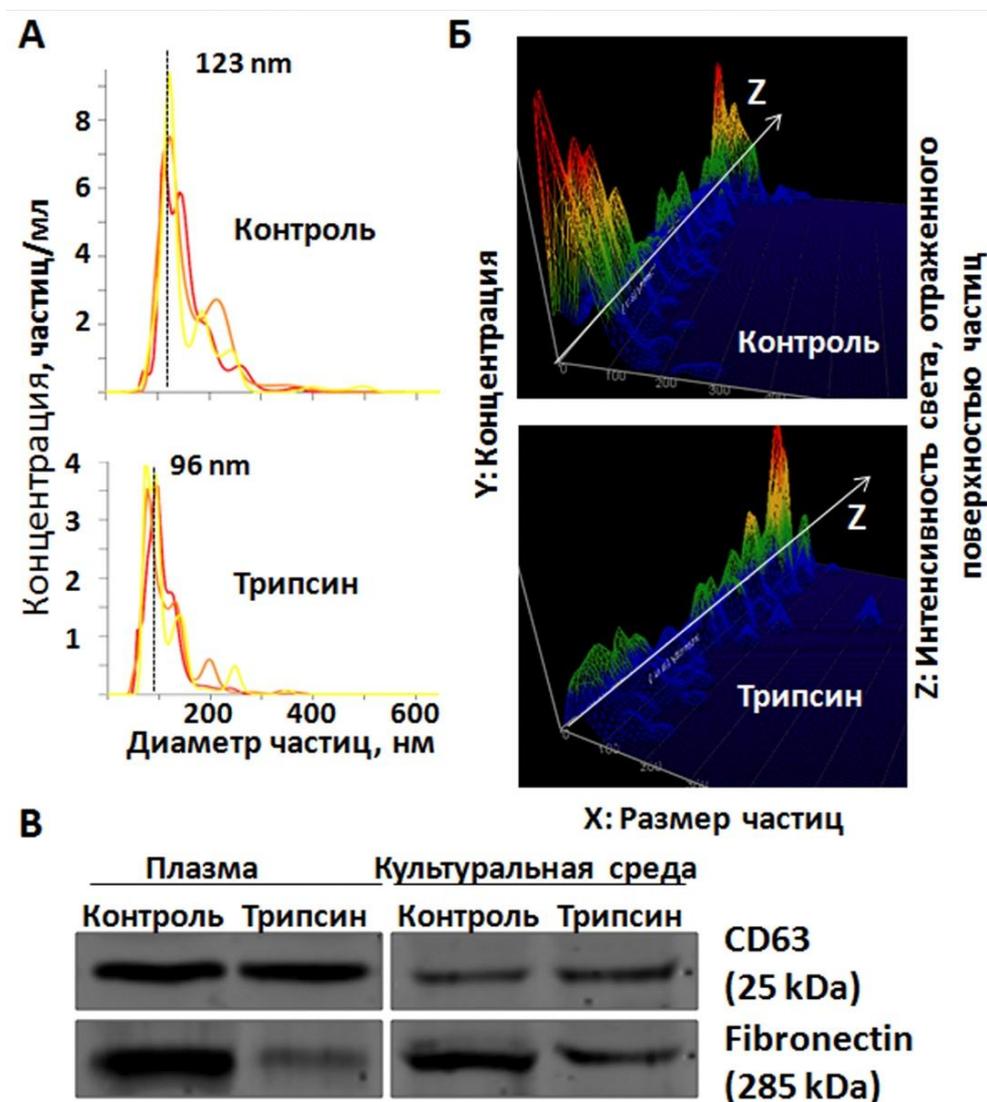


Рисунок 34 - Изменение характеристик ВНВ после обработки трипсином: А) Размер везикул, определенные с помощью АТН: тремя цветами показаны результаты трех экспериментов; Б) Структура поверхности везикул, определенная с помощью НТА; В) Вестерн-блот анализ экзосом после обработки трипсином

Очевидно, что фибронектин не единственный белок плазмы, который может взаимодействовать с поверхностью везикул. Для более «масштабной» оценки состава экзосомальной поверхности, был проведён протеомный анализ образцов

экзосом, контрольных (интактных) и обработанных трипсином. Данные масс-спектрометрии представлены в опубликованных работах [298]. Анализ полученных результатов позволил «выделить» из общего списка идентифицированных протеинов те белки, которые локализуются в клеточной мембране или являются секреторными, т.е. могут либо быть в составе экзосомальной поверхности с момента секреции везикул, либо абсорбироваться на экзосомальную поверхность в процессе циркуляции. Затем показатели относительных концентраций таких протеинов в парных образцах были сопоставлены с целью идентифицировать молекулы, которые были «сняты» с поверхности везикул в результате обработки трипсином. Выборочные результаты такого анализа представлены в таблице 10, более подробные данные изложены в опубликованных работах [70, 298]. Интересно, что в таблице 10 представлен белок плазмы фибронектин, для которого уже был показан факт взаимодействия с мембраной циркулирующих везикул [306]. Таким образом, полученные данные не противоречат результатам других исследований.

В целом, молекулы, перечисленные в таблице 10 представляют собой компоненты межклеточного матрикса или компоненты плазмы, функции которых связаны с обеспечением или регуляцией межклеточного взаимодействия. Эти молекулы легко «снимаются» с поверхности везикул в результате «щадящего» трипсинирования, при этом несколько уменьшается их размер, но сохраняется целостность. Нельзя исключать, что белковый состав везикулярной мембраны преимущественно формируется в процессе внутриклеточного биогенеза ВНВ, т.е. является тканеспецифичным. Но полученные данные позволяют предположить, что белки плазмы и/или межклеточного матрикса «осаждаются» на мембрану везикул и циркулируют вместе с ними. В таком случае процесс циркуляции приводит отчасти к «унификации» состава и функциональных характеристик везикулярной поверхности. Следующие эксперименты были спланированы с целью оценки влияния этой «короны» из плазменных белков на функции экзосом.

Таблица 10 - Выборочные данные масс-спектрометрии

Номенклатура	Название	UniProt ID	Представленность в образце экзосом (emPAI)*		Молекулярная функция (UniProt)	ExoCarta ID	Участие в ФАК-зависимых сигнальных путях
			Трипсин (-)	Трипсин (+)			
ECM1	Extracellular matrix protein 1, Iso1	Q16610	0.17	0.02	Структура хрящевой и костной ткани, регуляция пролиферации эндотелия	1893	[307]
FGA	Fibrinogen alpha chain, Iso 1	P02671	0.87	0.04	Компонент системы гемостаза, регулятор раневого процесса	2243	[308, 309]
VTN	Vitronectin, Iso 1	P04004	0.51	0.12	Регулятор межклеточного взаимодействия и адгезии	7448	[310]
FN1	Fibronectin, Iso1	P02751	1.31	0.19	Регулятор клеточной адгезии, взаимодействия с матриксом и подвижности	2335	[311]

TRM4	Tropomyosin alpha-4 chain	P67936	1.18	0.4	Компонент мышечной ткани, регулятор функции сокращения	7171	[312]
------	---------------------------	--------	------	-----	--	------	-------

Представлены результаты, полученные при анализе двух образцов экзосом: Трипсин (-) – исходные интактные везикулы, Трипсин (+) – везикулы, обработанные трипсином

4.4.2 Эффект взаимодействия ВНВ плазмы и клеток РМЖ

Целью следующего эксперимента было подтверждение результатов, опубликованных ранее J. Ochieng с соавторами [67] в условиях *in vitro* и *in vivo*. Авторы этого исследования утверждали, что экзосомы плазмы стимулируют адгезивное взаимодействие клеток рака молочной железы, что повышает их жизнеспособность или метастатический потенциал. В рамках представленного исследования были использованы две линии клеток РМЖ, MCF7 и MDA-MB-231, которые культивировались в обычных условиях, но на «неадгезивной» поверхности. Для оценки эффекта, который могут оказывать экзосомы на способность клеток к суспензионному росту, культуральный пластик был покрыт полимером, который предотвращает адгезию клеток (Poly-Nema), как описано в ранних работах [304]. Клетки культивировались в присутствии эмбриональной телячьей сыворотки, не содержащей телячьих экзосом. В параллельных экспериментах в культуральную среду были добавлены (или не добавлены, в контроле) экзосомы, выделенные из плазмы доноров. Эффект оценивался каждый час, в течение 6 часов. Аналогичные эксперименты были проведены с использованием экзосом из плазмы пациенток с РМЖ и экзосом, полученных в ходе культивации клеток той же линии. Во всех трех экспериментах наблюдался схожий эффект: в присутствии экзосом клетки образовывали многоклеточные конгломераты сферической или неправильной формы в течение 2-3 часов культивации (Рисунок 35, две левые панели). В «Ехо(-)» среде межклеточное

взаимодействие также наблюдалось, но оно было существенно менее выражено (Рисунок 35, две правые панели). Дополнительно был оценен эффект экзосом на пролиферативную активность клеток. В течение 4 дней наблюдений заметного влияния экзосом на рост клеток не было зафиксировано.

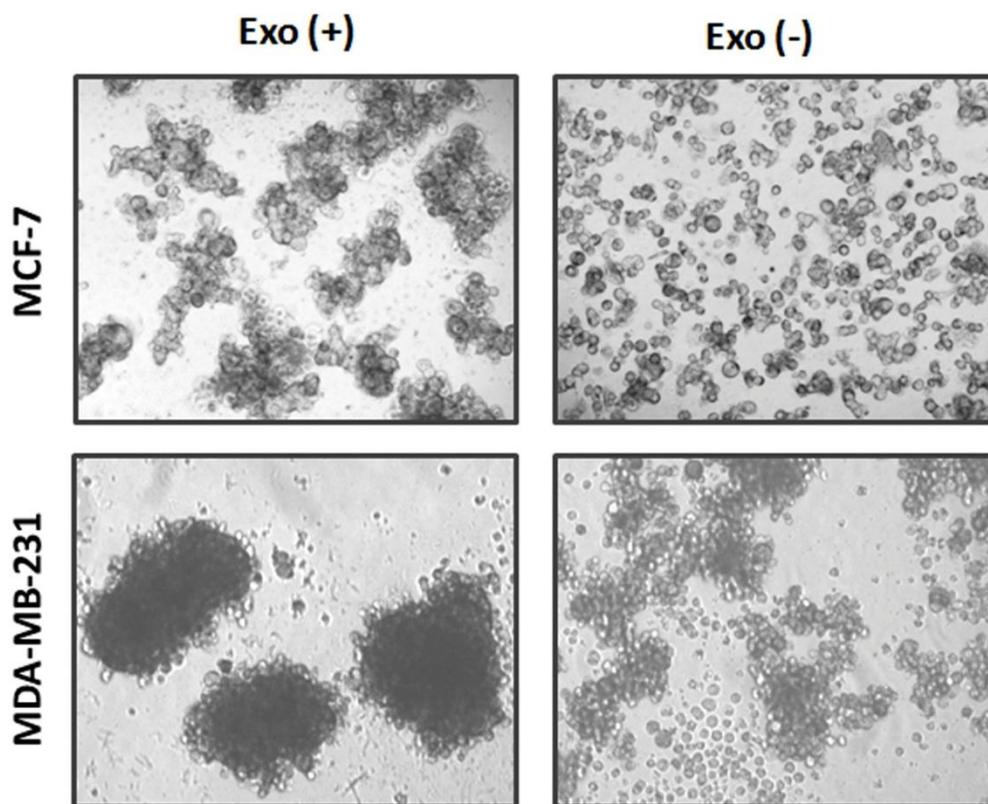


Рисунок 35 - Эффект воздействия ВНВ из донорской плазмы на адгезивные характеристики клеток РМЖ *in vitro*: Клетки РМЖ (MDA-MB-231, MCF-7) культивировались в условиях неадгезивного роста (PolyHEMA coated plastic). Представлен эффект присутствия донорских ВНВ в течение 3 часов в концентрации 2×10^{11}

Сама по себе способность эпителиальных клеток к формированию адгезивных контактов с базальной мембраной и соседними клетками является нормальным качеством, которое имеет тенденцию утрачиваться в результате трансформации. Злокачественный фенотип определяется сочетанием специфических адгезивных характеристик и двигательной активности. Для оценки функционального эффекта воздействия экзосом на клетки РМЖ, мы использовали

in vivo модель (эмбрионы данио-рерио, zebrafish), которая позволяла приблизить условия эксперимента к реальной ситуации. Клетки линии MDA-MB-231, экспрессирующие флуоресцентный протеин, в состоянии суспензии инкубировались с экзосомами, выделенными из донорской плазмы, и инъецировались в желточный мешок эмбрионов. Наличие, пролиферация и локализация клеток РМЖ в теле эмбриона оценивалась через 48 часов с помощью флуоресцентной микроскопии. Репрезентативные результаты представлены на рисунке 36. В присутствии экзосом опухолевые клетки были способны мигрировать из желточного мешка в различные части эмбрионов (Рисунок 36, левая панель). В контрольной группе (Рисунок 36, правая панель) флуоресцирующие клетки заметны только в пределах желточного мешка. Эти данные показывают, что экзосомы стимулируют эффективную комбинацию адгезивной и двигательной активности клеток РМЖ, что может определять повышение метастатического потенциала.

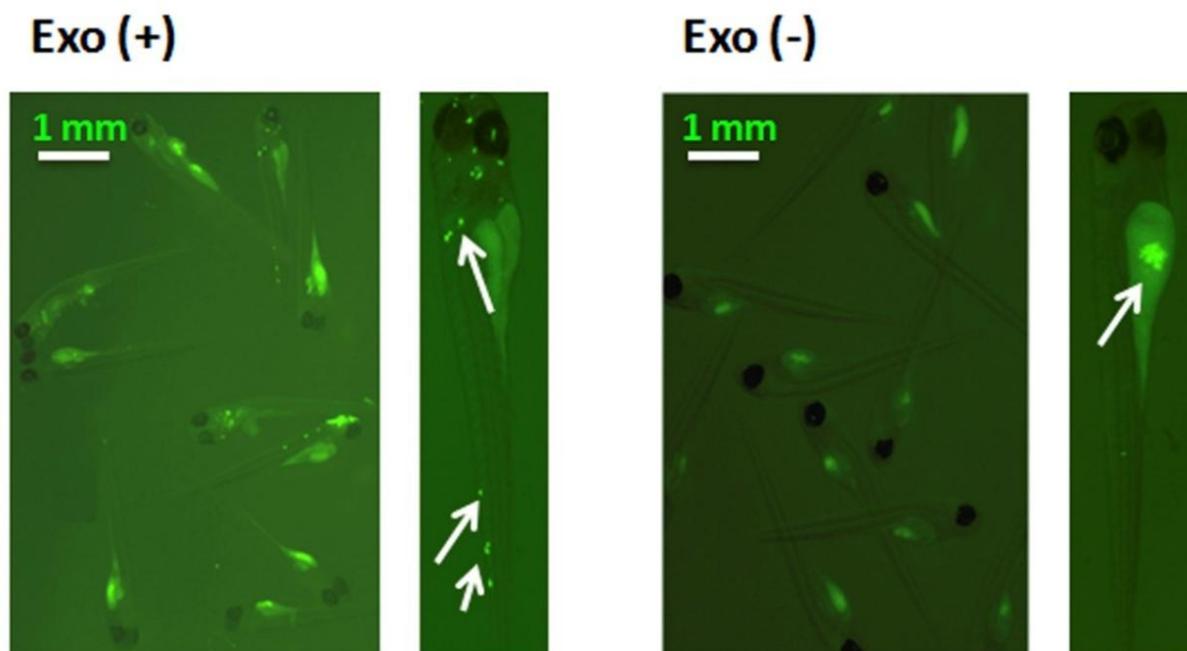


Рисунок 36 - Эффект воздействия ВНВ из донорской плазмы на распределения клеток РМЖ (MDA-MB-231) из места инъекции (желточный мешок) в толще тела эмбриона zebra-fish

4.4.3 Изменение стимулирующей активности экзосом после «удаления» плазменных белков

Следующие эксперименты были спланированы для количественной оценки влияния экзосом на адгезивные и миграционные характеристики клеток РМЖ и с целью определения роли плазменных белков, адсорбированных на мембране экзосом, на их стимулирующую активность. Были использованы *in vitro* модели, которые симулируют условия миграции опухолевых клеток по плоскости (2D) или в толще ткани (3D).

Так, при культивации на адгезивном пластике клетки РМЖ «передвигаются» по его плоскости. Это движение характеризуется определенной цикличностью и сопровождается изменением формы клеток, образованием псевдоподий на «лидирующем» крае клетки, формированием «фокальных» контактов клетки с матриксом, «подтягиванием» клетки к переднему краю и т.д. Такое движение приблизительно отражает перемещение клеток вдоль плотных образований типа поверхности эпителия или базальной мембраны.

В условиях 2D эксперимента миграцию клетки можно наблюдать в течение времени, что позволяет оценить траекторию, перемещение и подсчитать скорость движения (Рисунок 37А). В нашем эксперименте наблюдение проводилось за клетками, которые культивировались в различных условиях (в среде, не содержащей экзосомы / содержащей экзосомы плазмы / содержащей экзосомы плазмы, обработанные трипсином) в течение 8 часов. На рисунке 37Б показаны траектории движения 16 клеток (8 – в среде, содержащей экзосомы, 8 – в среде без экзосом) после сопоставления точек старта. На рисунке 37В представлены сравнительные результаты трех экспериментов: параметры движения клеток в среде без экзосом, в среде, содержащей нативные экзосомы, и в среде, содержащей экзосомы, «очищенные» от плазменных белков. Эти результаты позволяют сделать вывод, что экзосомы стимулируют 2D миграционную активность клеток, но

стимулирующий эффект зависит от наличия компонентов плазмы «абсорбированных» на поверхности экзосом.

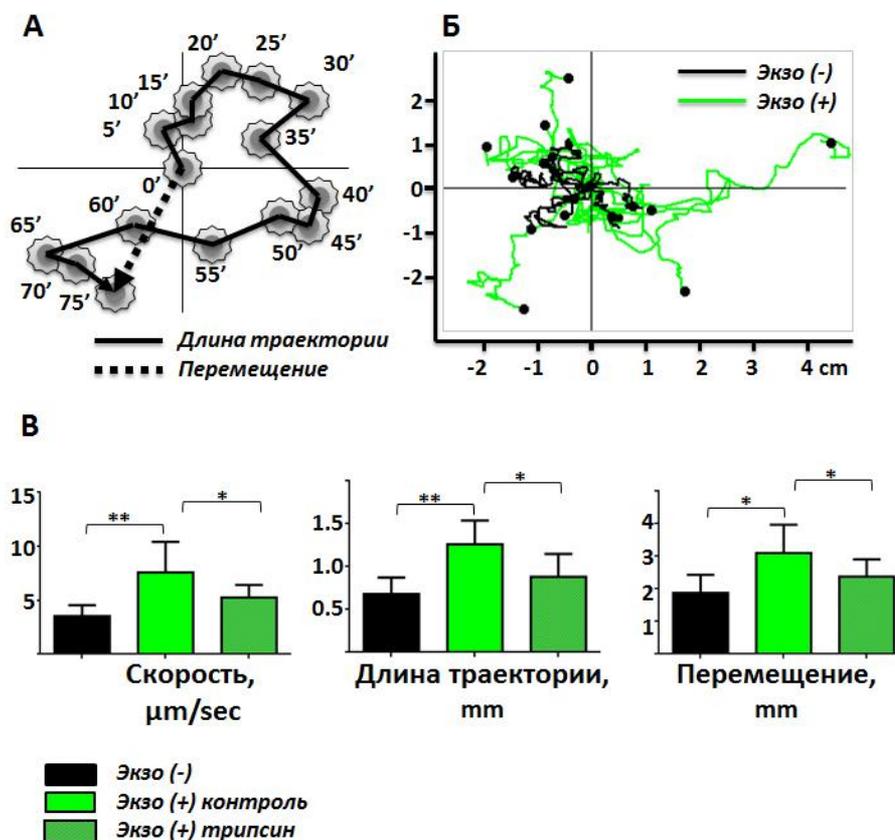


Рисунок 37 - Оценка миграции клеток РМЖ (MDA-MB-231) по поверхности пластика, и влияния ВНВ плазмы на активность миграции: А) Пример траектории перемещения одной клетки в течение 60 минут. Б) Траектории движения клеток в условиях отсутствия экзосом (черные линии) и в присутствии экзосом (зеленые линии). Точки старта совмещены. В) Количественная оценка различных параметров движения клеток: скорость, длина траектории, перемещение. Данные усреднены для 8 экспериментов (клеток), статистическая достоверность определена с помощью критерия Kruskal-Wallis

В следующем эксперименте была использована камера, разделенная проницаемой для клеток мембраной и слоем геля (trans-well chamber). Эта камера позволяет несколько приблизить условия *in vitro* эксперимента к реальности (Рисунок 38А). Для стимуляции направленного движения клеток из одной камеры в другую был создан градиент питательных веществ и хемокинов (10% vs. 0,5%

эмбриональной телячьей сыворотки). Как и в предыдущем случае, сравнение проводилось между клетками, которые культивировались в среде без экзосом, среде, содержащей нативные экзосомы, и в среде, содержащей экзосомы, «очищенные» трипсином от компонентов плазмы.

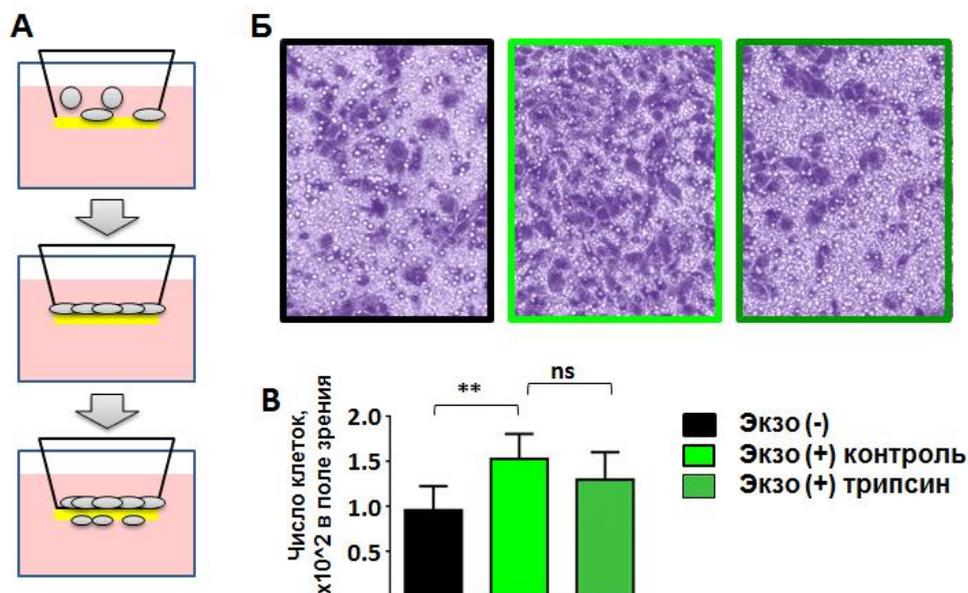


Рисунок 38 - Оценка миграции клеток РМЖ (MDA-MB-231) в 3-мерном пространстве и влияния экзосом плазмы на активность миграции: А) Схема эксперимента. Б) Клетки на нижней стороне мембраны после фиксации и окраски. Количество клеток отражает активность их миграции через матри-гель. В) Оценка интенсивности окраски мембраны (отражающая количество окрашенных клеток). Представлены средненные рез-ты подсчета клеток в 12 полях зрения (в 6 камерах) \pm CD. Статистическая достоверность определена с помощью критерия Kruskal-Wallis

Клетки в трех параллельных экспериментах «продвигались» сквозь гель в направлении среды с высоким содержанием сыворотки в течение суток. Количество клеток на нижней стороне мембраны оценивалось путем микроскопии после фиксации и окраски. После подсчета клеток в шести полях зрения данные усреднялись. Так, отсутствию ВНВ существенно ослабляло способность клеток двигаться сквозь мембрану, ВНВ имела аналогичный, но менее выраженный (статистически не значимый) эффект (Рисунок 38 Б и В). В целом, представленные данные указывают на способность ВНВ плазмы стимулировать миграцию (на

плоскости и в пространстве) клеток РМЖ и зависимость этого феномена от структуры экзосомальной поверхности.

4.4.4 Оценка роли сигнального пути ФАК в регуляции реакции клеток на «экзосомную» стимуляцию.

Анализ биологических функций белков, которые «снимались» с поверхности экзосом после инкубации с трипсином, и литературных данных о возможных регуляторных эффектах этих молекул выявил интересные закономерности. Так, большинство белков, представленных в таблице 10, способны стимулировать различные рецепторные молекулы на поверхности клеток, или играть роль лигандов таких рецепторов. Это взаимодействие часто опосредуется интегринами и приводит к активации внутриклеточных сигнальных путей, в состав которых входит киназа фокальных контактов (ФАК, focal adhesion kinase) [313]. Ссылки на литературные данные, указывающие на участие плазменных белков в стимуляции ФАК-каскада, приведены в таблице 10 (правый столбец). Схема предполагаемой регуляторной цепочки представлена на рисунке 39.

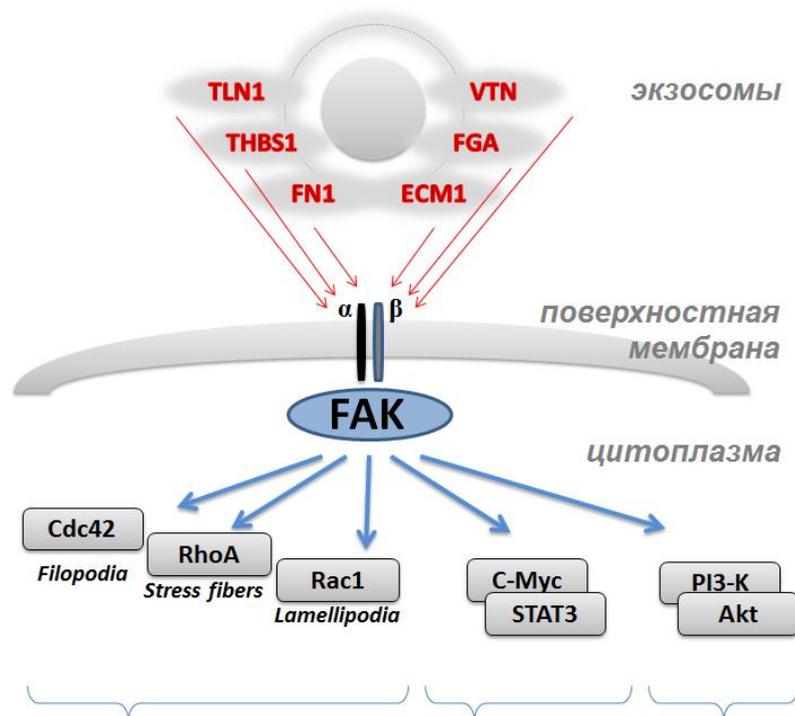


Рисунок 39 - Активация ФАК-зависимых сигнальных каскадов плазменными белками на поверхности ВНВ (схема)

Патологическая активация FAK часто сопровождает процесс малигнизации клеток разных типов [314], включая протоковый эпителий молочных желез [315]. На основе сказанного было сделано предположение, что FAK может участвовать в передаче/регуляции активирующего сигнального каскада, который инициируется в результате контакта экзосом (или плазменных белков, адсорбированных на поверхности экзосом) и рецепторных интегринов в составе поверхностной мембраны клеток РМЖ.

С целью проверки этого предположения, FAK была стабильно ингибирована в клетках MDA-MB-231 [70, 316]. Эффективность инактивации синтеза FAK оценена с помощью вестерн-блота (Рисунок 40А).

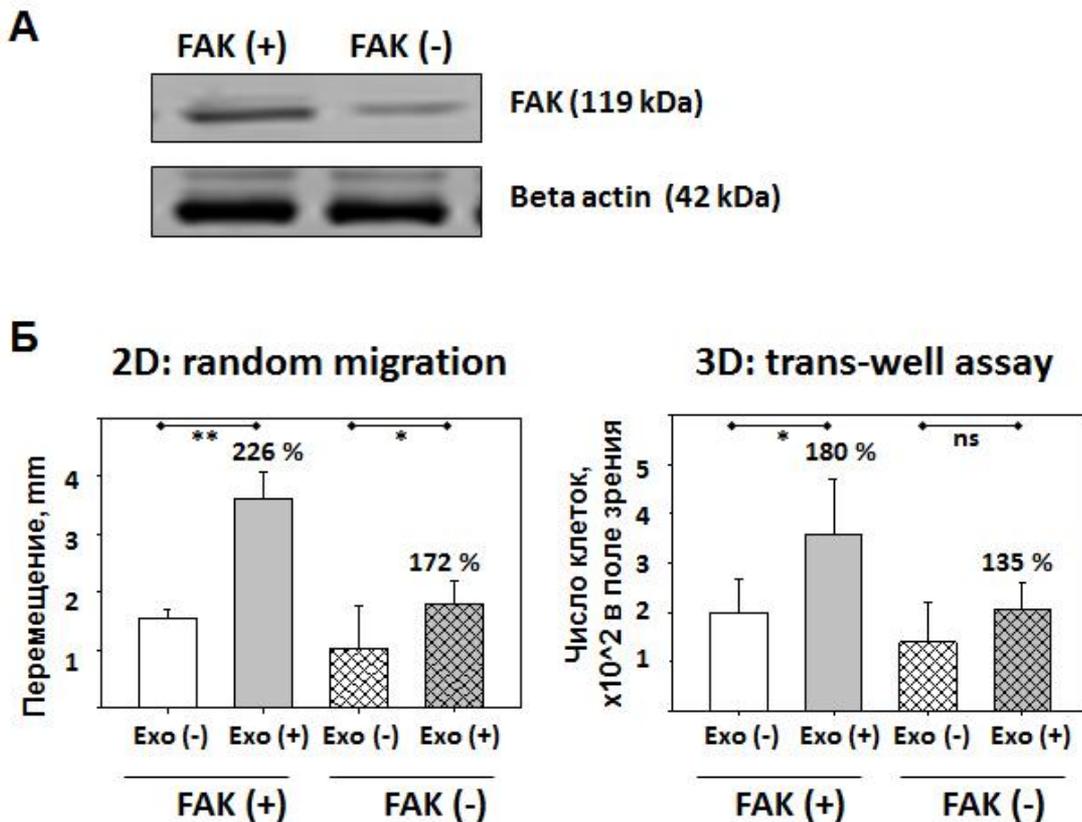


Рисунок 40 - Оценка роли киназы FAK в трансляции стимулирующего эффекта ВНВ в культуре клеток РМЖ (MDA-MB-231): А) Оценка эффективности инактивации FAK, Вестерн-блот; Б) Анализ миграционного поведения клеток на плоскости (2D) и в пространстве (3D).

В каждом случае проводилось параллельно 4 эксперимента: две культуры клеток ((ФАК(+), ФАК(-)) культивировались в присутствии Ехо(+) и отсутствии Ехо(-) донорских ВНВ. 2D: усредненные рез-ты оценки перемещения 16 клеток \pm CD. 3D: Усредненные рез-ты подсчета клеток в 12 полях зрения \pm CD. Обозначен процент прироста измеряемых показателей в случаях культивации Ехо(+). Статистическая достоверность определена с помощью критерия Kruskal-Wallis.

Активность миграции модифицированных и контрольных клеток в условиях 2D и 3D была оценена в параллельных экспериментах с использованием интактных экзосом, выделенных из плазмы здоровых доноров. Инактивация ФАК снижала способность клеток «отвечать» на стимулирующее влияние экзосом. Как представлено на рисунке 40Б, появления в среде ВНВ повышало способность клеток с сохранной функцией ФАК перемещаться по пластику на 226%, а клетки с подавленной экспрессией ФАК «ускорялись» только на 172%. Аналогичный эффект наблюдался в условиях 3D эксперимента. Интересно отметить, что у клеток MDA-MB-231/ФАК(-), снижалась, но не пропадала способность реагировать на экзосомы. Это может отражать эффект остаточной активности ФАК-каскада или наличие дополнительных ФАК-независимых возможностей «трансляции» стимулирующего влияния экзосом.

4.5 Выводы и перспективы клинического применения

В Главе 4 представлены результаты экспериментальной работы, целью которой была оценка роли циркулирующих экзосом в процессе метастатической диссеминации клеток РМЖ. В рамках подготовки к исследованию был проведен масс-спектрометрический анализ белкового состава экзосом, обнаружено присутствие плазменных белков в составе везикул. Показано, что эти белки (в частности, фибронектин) «абсорбированы» на мембране ВНВ донорской плазмы и участвуют в механизмах взаимодействия везикул и клеток РМЖ. В экспериментах *in vitro* и *in vivo* исследованы биологические эффекты взаимодействия экзосом плазмы и клеток РМЖ, и изучены молекулярные механизмы этого взаимодействия. Полученные результаты позволяют сформулировать следующие выводы:

1. В состав поверхностной мембраны циркулирующих ВНВ входят белковые компоненты плазмы (фибронектин), которые могут быть ферментативно «удалены» без нарушения целостности везикул [298].
2. ВНВ плазмы стимулируют адгезивную и миграционную активность клеток РМЖ в условиях *in vitro* и *in vivo* экспериментов [317].
3. Компоненты плазмы, «абсорбированные» на поверхности циркулирующих ВНВ, играют важную роль в процессе взаимодействия везикул с клетками РМЖ и стимуляции миграции клеток в условиях 2D и 3D экспериментов *in vitro* [70].
4. Стимулирующий эффект ВНВ плазмы опосредуется взаимодействием белков, «абсорбированных» на мембране везикул, и рецепторов на мембране опухолевых клеток. ФАК–зависимый сигнальный каскад участвует в трансляции активирующего воздействия ВНВ плазмы на клетки РМЖ [70].

В основе представленного исследования лежало предположение, что в процессе диссеминации опухолевых клеток (вообще, и клеток рака молочной железы, в частности) имеет значение взаимодействие этих клеток и экзосом межклеточной среды и плазмы. Как впервые показано в данном исследовании, контакт с экзосомами стимулирует межклеточную адгезию и двигательную активность опухолевых клеток - качества, прямо определяющие метастатический потенциал. Состояние или структура поверхности ВНВ во-многом определяет их способность стимулировать опухолевые клетки. На основе сходства состава белков «смываемых» с поверхности ВНВ и состава белков плазмы, можно предполагать, что плазменные белки «адсорбируются» на мембране ВНВ в процессе циркуляции и отчасти опосредуют стимулирующий эффект везикул. Причем в таком случае стимулирующий эффект ВНВ не должен зависеть от их происхождения, а должен быть относительно универсальным. В рамках исследования показан только частный эффект влияния белков везикулярной мембраны на способность везикул стимулировать отдельные характеристики клеток РМЖ. Точное определение состава и происхождения везикулярной «короны», так же как разнообразные механизмы взаимодействия ВНВ и опухолевых клеток (стимуляция поверхностных рецепторов, перенос сигнальных молекул, мРНК, микроРНК и т.д.)

требуют углубленного изучения. Но все эти вопросы относятся к области фундаментальной биологии, их изучения не входило в план данного исследования.

В целом, представленные результаты указывают на значимую роль, которую играют ВНВ плазмы в процессе метастатической диссеминации. Исследование было сфокусировано не на т.н. опухолевых экзосомах, а именно на тотальной популяции ВНВ плазмы. Разработка методов оценки, осмысленного анализа и коррекции состава этих компонентов может быть основой для нового подхода к профилактике или терапии процесса метастатической диссеминации. Теоретически, удаление экзосом из плазмы или модификация их поверхности могут изменять судьбу циркулирующих опухолевых клеток и, соответственно, прогноз развития заболевания.

ГЛАВА 5. ОЦЕНКА ВОЗМОЖНОСТИ ДОСТАВКИ ЛЕКАРСТВЕННЫХ СРЕДСТВ С ПОМОЩЬЮ ВНВ

5.1 Обзор литературы: экзосомальная доставка терапевтических РНК, «state of the art»

Предполагается, что одна из основных биологических функций экзосом – это межклеточная коммуникация и перенос различных структурных или сигнальных молекул. Экзосомы являются естественной системой межклеточного транспорта. Это дает основания предполагать, что эти нановезикулы естественным образом «выигрывают» у любых искусственных систем доставки лекарственных препаратов по показателям биосовместимости, эффективности, неиммуногенности, что определяет огромный научный интерес к проблеме создания новой «drug delivery system» на основе аутологичных, гетерологичных или искусственных экзосом [318]. Теоретически, экзосомы могут быть использованы для доставки в клетки любых биологических молекул или фармакологических соединений. Но так как короткие молекулы РНК (микроРНК) являются естественным содержимым экзосом, то разработка методов доставки таких молекул представляется логичным началом работы по созданию новой фармакологической формы [319, 320]. Как минимум, можно предполагать, что искусственная «загрузка» экзосом короткими молекулами РНК не должна как-либо изменять их физические свойства.

Развитие представлений о механизмах РНК-интерференции и биологической роли молекул микроРНК стимулировали научную работу над созданием систем доставки коротких терапевтических молекул РНК. Как хорошо известно, РНК крайне нестабильна в биологических средах, а физико-химические характеристики этих молекул (размер, негативный заряд, гидрофильность) препятствуют их проникновению через клеточную мембрану. Разработка лечебных методик на основе феномена РНК-интерференции тормозилась отсутствием технологии доставки микро/сиРНК (micro/siRNA) молекул к клеткам-мишеням, эта ситуация стимулировала поиск методов и разработку систем «siRNA/miRNA delivery».

На первых этапах активно развивались «не экзосомальные» системы. К ним относятся вирусы [321], липосомы [322] и катионные полимеры [323-325]. Каждая из перечисленных систем доставки обладает характерными преимуществами и недостатками [326]. Так, основной проблемой при использовании вирусных частиц является их потенциальная иммуногенность [327]. Кроме того, вирусные частицы имеют ограниченную «емкость», а процедура «упаковки» терапевтических молекул в вирусный капсид весьма нетривиальна, требует специальных условий и оборудования и трудно поддается стандартизации. Катионные полимеры представляют собой большую группу трансфекционных реагентов, которые активно используются для доставки микроРНК или сиРНК. Большая часть исследований в этой области сфокусированы на полиэтиленимине, ПЭИ (polyethylenimine, PEI) [328]. Это синтетический полимер, который может иметь различную структуру (линейную, разветвленную, сетчатую) и может синтезироваться в широком размерном диапазоне. В физиологических условиях положительно заряженный ПЭИ формирует комплексы с отрицательно заряженными молекулами РНК. Такие комплексы «уплотняют», «защищают» и обеспечивают «трансмембранный перенос» молекул РНК. Трансфекционная активность таких микро/сиРНК-ПЭИ комплексов может быть сопоставима с вирусной. Но, высокая трансфекционная активность этих комплексов всегда сочетается с высокой токсичностью. Кроме того, комплексы РНК с полимерами не стабильны (должны быть использованы сразу после приготовления), им характерна низкая биосовместимость (они выводятся из циркуляции в течение минут) [325]. Наиболее перспективным методом доставки микро/сиРНК представляется использование различных по химическому составу липидов, которые формируют так называемые «липосомы» [329, 330]. Липосомы также имеют определенные недостатки, в основном аналогичные тем, что характерны для полимеров. Но тот факт, что липосомальные формы цитостатических препаратов (например, липосомальный доксорубин – Келикс) уже используются в клинической практике, а терапевтические микроРНК, «упакованные» в липосомы, проходят клинические испытания [331], указывает на преимущества именно этой системы

доставки. В принципе, липосомы более всего «похожи» на экзосомы, и современное развитие «липосомальных» технологий плавно встает на путь создания «искусственных» экзосом (exosome engineering) [332]. Кроме того, перспективной стратегией является совмещение различных материалов, что позволяет оптимизировать системы доставки микро/сиРНК, сочетая «плюсы» и минимизируя «минусы» отдельных компонентов. Так, например, комплексы РНК, полимеров и липидов, «полиплексы», демонстрируют оптимальное сочетание таких характеристик как трансфекционная эффективность и токсичность [333, 334].

Несмотря на очевидный прогресс в развитии синтетических систем доставки микро/сиРНК, использование для этой цели экзосом было и остается «заманчивой» стратегией. Просто потому, что эта оптимальная «drug delivery system» создана природой. Как система доставки микроРНК/сиРНК, экзосомы в принципе не имеет недостатков: они не токсичны, не иммуногенны, стабильны в кровяном русле и *ex vivo*, и, главное, им характерна высокая трансфекционная активность. Фундаментальная научная проблема сводится к тому, чтобы научиться использовать эту естественную систему для решения клинических задач. Первые научные работы, показавшие возможность использования экзосом для доставки РНК в клетки, были опубликованы относительно недавно, в 2011-2012 годах [335, 336]. Причем показательно, что уже первые исследования с целью использования экзосом для доставки синтетических РНК проводились в условиях *in vivo*. За годы интенсивной работы, были опубликованы результаты десятков исследований. В таблице 11 представлены лишь некоторые работы, сфокусированные на проблеме доставки противоопухолевых микро/сиРНК.

Таблица 11 - Примеры использования экзосом для доставки микро/сиРНК (microRNA/siRNA)

Тип РНК (мишень)	Источник экзосом	Метод «упаковки»	Метод валидации	Ссылка
сиРНК (RAD51)	HELA, HT1080	электропорация, хим. трансфекция	In vitro	[337]

сиРНК (luciferase)	эндотелиоциты мышь	электропорация	In vitro	[338]
сиРНК (TGF- β 1)	фибробласты саркомы мышь	трансфекция клеток и сбор экзосом	In vivo	[339]
микроРНК let-7a	HEK293	трансфекция клеток и сбор экзосом	In vivo	[340]
микроРНК (не определен)	HLSCs	трансфекция клеток и сбор экзосом	In vivo	[341]

В целом, анализ литературы позволяет отметить активность исследовательской работы в области «адаптации» экзосом в качестве системы доставки лекарственных средств вообще и микро/сиРНК молекул, в частности. Это является косвенным признаком научной актуальности и практической значимости проблемы. Но анализ опубликованных данных не дает однозначных ответов на три практических вопроса относительно:

- Оптимального источника экзосом (среда после культивации клеток, биологические жидкости);
- Оптимального метода «упаковки» микро/сиРНК в экзосомы (трансфекция клеток, продуцирующих экзосомы, химическая трансфекция экзосом, трансфекция экзосом путем электропорации или ультразвука);
- Возможность/необходимость оптимизации процедуры «упаковки» микро/сиРНК в экзосомы и характеристик готовых трансфекционных комплексов с помощью дополнительных реагентов (полимеров, липидов).

Эти аспекты требуют дополнительных исследований, которые необходимы для понимания перспектив внедрения метода доставки терапевтических микро/сиРНК в клиническую практику.

5.2 Задача и подходы к ее решению

С учетом литературных данных и собственного опыта работы с трансфекционными реагентами на основе катионных полимеров [323-325],

основной задачей данного фрагмента диссертационной работы была оценка возможности и эффекта совмещения двух стратегий доставки в опухолевые клетки терапевтических РНК (сиРНК, микроРНК). В рамках работы предполагалось провести «упаковку» комплекса, образованного ПЭИ и РНК, в экзосомы и оценить основные физические, биологические и терапевтические характеристики новой системы доставки «Ехо(PEI/miR)». В частности, предполагалось:

- Разработать технологию «упаковки» комплексов РНК и катионных полимеров в экзосомы;
- Оценить показатели трансфекционной эффективности комплексов Ехо(PEI/miR) в условиях *in vitro*;
- Оценить влияние природы (источника) экзосом на свойства Ехо(PEI/miR) комплекса;
- Оценить терапевтическую эффективность введения сиРНК, угнетающей синтез белка сурвивина в составе комплекса Ехо(PEI/siRNA) *in vivo*.

5.3 Материалы и методы

5.3.1 Выделение из культуральных сред, характеристика ВНВ

В исследовании были использованы клеточные линии: Skov-3, PC-3, HCT-116, Saos-2. Клетки культивировались в стандартных условиях: в среде DMEM / 10% FCS, 5% CO₂, при 37°C. Для получения везикул культуральная среда собиралась, фильтровалась и подвергалась дифференциальному центрифугированию (10 000 xG – 30 мин, 100 000 xG – 90 мин). После ультрацентрифугирования осадок, содержащий везикулы, растворялся в 100 мкл ФСБ. Для характеристики везикул использовались методы, описанные в разделе 3.3.3.: ЛКС, НТА, проточная цитометрия.

5.3.2 Формирование трансфекционных комплексов Ехо(PEI/miR)

Для формирования комплексов был использован полимер – низкомолекулярный разветвленный полиэтиленимин, PEI F25-LMW [342, 343], полученный методом хроматографии из полимера PEI (25 kDa), производства компании Sigma Aldrich. Комплексы полимера и РНК готовились при соотношении

масс 1: 5 или 1: 7.5, исходя из расчета усредненной молекулярной массы сиРНК – 13.300 г/моль, микроРНК – 6.650 г/моль. Для приготовления трансфекционных комплексов для стандартного эксперимента (в 24 – луночном планшете) использовали 60 пикомоль (или 0.8 мкг) сиРНК (или соответствующее количество микроРНК), разведенной в 25 мкл раствора глюкозы 5%. Отдельно готовился раствор полимера от 2 до 3 мкг в 25 мкл раствора глюкозы 5%. Раствор РНК добавлялся к раствору полимера, смесь перемешивалась с помощью «вортекса» и инкубировалась при комнатной температуре 45 мин. Готовая смесь трансфекционных комплексов «PEI/siRNA» либо использовалась для трансфекции, либо хранилась при -20 °С, либо использовалась для образования комплексов с экзосомами.

Для формирования комплексов Echo(PEI/siRNA) предварительно выделенные экзосомы добавлялись к комплексам PEI/siRNA ($0.5 - 5.0 \times 10^5$ / 60 пикомоль сиРНК), компоненты аккуратно перемешивались (без «вортекса»), инкубировались при комнатной температуре 15 мин и обрабатывались УЗ в течение 3 минут. Формирование трансфекционных комплексов обычно проводили в 1.5 мл пробирке, накануне экспериментов *in vitro* или *in vivo*.

5.3.3 Оценка свойств трансфекционных комплексов *ex vivo*, *in vitro*, *in vivo*

Ex vivo. Для оценки физических характеристик трансфекционных комплексов были использованы стандартные методы: ЛКС и НТА.

In vitro. Трансфекции клеток проводили в 24- или 96- луночных планшетах, в которых накануне высаживалось 30 000 или 1 500 – 2 500 клеток / лунку, соответственно. Количество материала для приготовления трансфекционных комплексов использовалось из расчета РНК: 5-10 пикомоль / лунку 96-луночного планшета, или 60 пикомоль / лунку 24-луночного планшета, соответственно. Анализ трансфекционной активности комплексов проводилась путем оценки эффективности угнетения активности фермента люциферазы. Для этого использовали клеточные линии, стабильно экспрессирующие этот фермент: Skov-3/Luc (кат. AKR-232, Cell BioLabs Inc., США), PC-3/Luc, HCT-116/Luc и Saos-2/Luc

были получены путем стабильной трансфекции плазмиды pCCLc-MNDU3-Luciferase-PGK-EGFP-WPRE (Addgene, Watertown MA, США). Оценка люциферазной активности проводилась через 72 часа после трансфекции с помощью набора Beetle-Juice Kit (Promega, США). Для этого среда удалялась, клетки лизировались в течение 30 мин, затем клеточный лизат (10 мкл) смешивался с люциферинным субстратом (25 мкл). Интенсивность люминисценции измерялась с помощью люцинометра в течение 1-2 минут. Оценка пролиферативной активности клеток проводилась с помощью колориметрии. Использовались наборы MTT (Promega, США), WST-1 (Roche, США), и Cell Counting Kit-8 (Dojindo Molecular Technology, Китай). Подготовку клеток и измерения проводились в соответствии с инструкциями производителей наборов.

In vivo. Бестимусные мыши (Foxn1nu) содержались в стандартных условиях вивария (23°C, световой режим 12/12, нормальный корм). Для формирования подкожных ксенографтных опухолей взвесь клеток PC-3 (1×10^6 / инъекцию) в 150 мкл ФСБ вводилась внутрикожно в кожу боковой части с двух сторон. Когда опухоли достигали размера 200-300 мм³ мыши рандомно распределялись на две группы («siSurv» и «siContr») по 20 особей. Тестируемый препарат вводился в хвостовую вену в виде суспензии объемом 150 мкл.

5.4 Результаты

5.4.1 Формирование и оценка стабильности комплекса Exo(PEI/miR)

Экзосомы были выделены из среды после культивации клеток колоректального рака HCT116 методом дифференциального центрифугирования. Выбор клеточной линии определялся высокой скоростью ее пролиферации и стабильной способностью эффективной секреции ВНВ. Средний размер везикул составил 111 нм (по данным ЛКС), на поверхности везикул были представлены экзосомальные маркеры CD63, CD9 (по данным проточной цитометрии), что позволяло утверждать, что выделенные везикулы преимущественно экзосомы. Анализ физико-химических характеристик везикул был проведен в начале исследования. В ходе работы использовался стандартный протокол, что

предполагало выделение ВНВ идентичного состава и характеристик. После выделения экзосомы хранились в фосфатно-солевом буфере до 3 дней при +4⁰С.

Комплексы ПЭИ и сиРНК были приготовлены согласно ранее разработанному протоколу [324, 325], описанному в разделе 5.3.2. непосредственно перед использованием. Для предварительной оценки эффективности формирования комплекса «Ехо(PEI/miR)» из сиРНК, ПЭИ и экзосом были использована синтетическая молекула РНК - siLuc3, комплементарная мРНК и, соответственно, инактивирующая синтез белка люциферазы (sense: 5'-CUUACGCUGAGUACUUCGAdTdT-3', anti-sense: 5'-UCGAAGUACUCAGCGUAAGdTdT-3'), Discovery, Lafayette, CO, USA. В качестве контроля специфичности эффекта была использована синтетическая молекула siLuc2 с аналогичными характеристиками, но случайной последовательностью (sense: 5'-CGUACGCGGAAUACUUCGAdTdT-3', anti-sense: 5'-UCGAAGUAUUCGCGUACGdTdT-3'), Discovery, Lafayette, CO, USA. Трансфекционные комплексы готовили в соответствии с протоколом (раздел 5.3.2.).

Оценку эффективности образования комплексов проводили путем измерения размера и Z потенциала (поверхностного заряда) комплексов с помощью ЛКС и анализа эффективности угнетения люциферазной активности при инкубации клеток Skov-3/Luc, стабильно экспрессирующих экзогенную люциферазу, в растворе люциферинового субстрата. В рамках исследования были протестированы разные методы «упаковки» комплексов PEI/siRNA в везикулы: инкубация при комнатной температуре, электропорация, сонификация (или обработка ультразвуком, УЗ). Два первых не давали никаких детектируемых результатов. Согласно полученным данным, ни простая инкубация, ни электропорация не являются эффективными способами формирования комплексов «Ехо(PEI/miR)». Более того, электропорация дестабилизировала и вызывала агрегацию комплексов PEI/miR. Напротив, воздействие на смесь экзосом и комплексов PEI/miR ультразвука (УЗ) приводило к формированию новых комплексов, размер которых был больше любого из исходных, а значение Z

потенциала «усреднялось». В таблице 12 представлены результаты измерений, проведенных с помощью ЛКС.

Таблица 12 - Физические характеристики частиц и комплексов (диаметр и Z-потенциал)

	Экзосомы, Ехо	Комплекс, PEI/miR	Комплекс, Ехо(PEI/miR) после воздействия УЗ
Z потенциал, mV	-16 ± 5	26 ± 2	9 ± 3
Размер, nm	112 ± 16	110 ± 4	181 ± 11

Для формирования комплекса «Ехо(PEI/miR)» были использованы ВНВ из среды клеток линии НСТ116.

После подтверждения факта формирования новых комплексов, Ехо(PEI/miR), была проведена оценка их функциональной активности путем трансфекции клеток Skov-3/Luc. В случае эффективной трансфекции, клетки должны были терять люциферазную активность (способность синтезировать фермент люциферазу, который катализирует биolumинисцентную реакцию). Так, на рисунке 41 (левая панель) представлены результаты эксперимента.

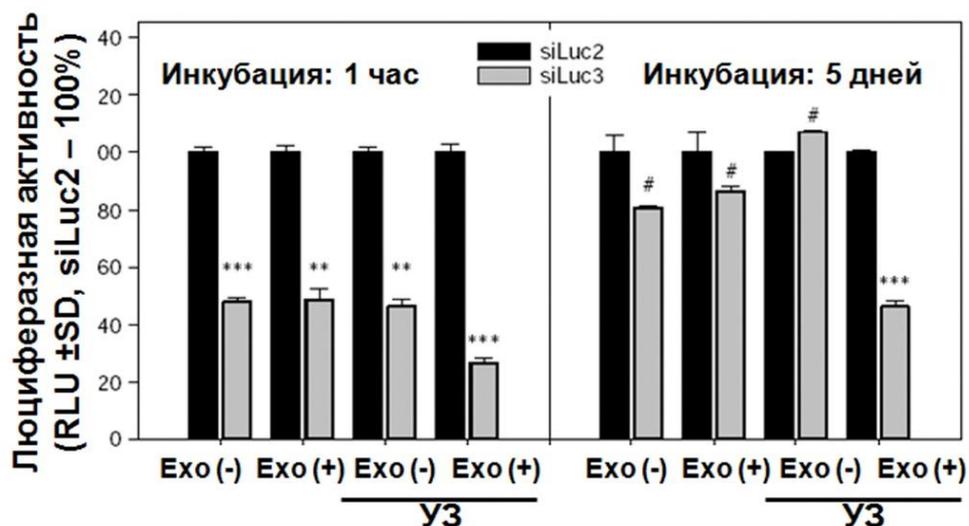


Рисунок 41 - Оценка эффективности трансфекционного комплекса Ехо(PEI/miR): В состав комплексов входили молекулы siLuc2 (негативный контроль) или siLuc3 (активная молекула – ингибитор люциферазы). Комплексы формировались с / без ВНВ, выделенных из среды клеток КРК НСТ116: Ехо(+)/Ехо(-).

Для оценки эффекта процедуры сонификации, проводили оценку смеси компонентов обработанных УЗ и не обработанных. На левой панели представлены результаты оценки люциферазной активности лизата клеток Skov-3, трансфекция была проведена через час после формирования трансфекционных комплексов Eho(PEI/siLuc). Представлены усредненные данные 8 измерений, проведены попарные сравнения, статистическая значимость оценена с помощью U-критерия Mann-Whitney. На правой панели представлены аналогичные результаты, но трансфекция была проведена через 5 дней после формирования трансфекционных комплексов Eho(PEI/siLuc).

Черные столбики диаграммы отражают нормальную люциферазную активность в случае трансфекции контрольным комплексом, содержащим функционально не активную молекулу siLuc2. Это значение принималось за 100% (максимальный уровень активности люциферазы), относительно него вычислялось значение активности фермента в клетках, трансфецированных активной молекулой siLuc3. Снижение люциферазной активности до 50% от исходной наблюдалось при трансфекции комплексом PEI/siLuc3. Присутствие в смеси везикул (без обработки УЗ) или обработка комплексов УЗ (без добавления везикул) не влияло на результаты. Более выраженный эффект инактивации люциферазы (до 23%) наблюдался при трансфекции комплексом Eho(PEI/siLuc3), т.е. в случае предварительной обработки смеси везикул и полимерных комплексов ультразвуком. Эти данные ясно показывают, что «упаковка» комплекса PEI/miR в экзосомы повышает их трансфекционную активность.

На правой панели рисунка 41 представлены результаты аналогичного эксперимента, проведенного через 5 дней после формирования комплексов Eho(PEI/miR). Как видно на диаграмме, трансфекционная активность комплексов PEI/miR резко снизилась. В то же время, комплекс Eho(PEI/miR) сохранил биологическую активность, хотя эффективность инактивации люциферазы несколько уменьшилась. Так, полученные результаты показывают, что «упаковка» комплекса PEI/miR в экзосомы повышает не только его трансфекционную активность, но и стабильность.

5.4.2 Анализ эффекта инактивации «таргетных» молекул *in vitro*

Следующим этапом исследования был анализ биологического эффекта трансфекции опухолевых клеток терапевтическими молекулами сиРНК (siRNA) в составе комплекса Eхо(PEI/miR). В этой работе использовались стабильные клеточные рака предстательной железы (РС-3) и колоректальной карциномы (HCT116). В качестве терапевтической молекулы использовалась двух-цепочечная синтетическая сиРНК (siRNA-surv: 5'-GCAUCUCUACAUAUCAAGAA-3', 5'-UUCUUGAAUGUAGAGAUGC-3'), «мишенью» которой является мРНК анти-апоптотического белка Сурвивина (Survivin). Экспрессия этого протеина активирована в клетках многих опухолей, и он рассматривается как потенциальная терапевтическая мишень в случае рака яичников [344], рака предстательной железы [345] и колоректальной карциномы [346]. В этих же работах была показана эффективность инактивации экспрессии Сурвивина данной молекулой сиРНК, поэтому на этапе *in vitro* экспериментов анализ экспрессии мРНК и белка мишени не проводился. Для контроля специфичности наблюдаемого эффекта, параллельно проводилась трансфекция комплексом, содержащим т.н. «scrambled» сиРНК – молекулу случайной последовательности с предположительно «нулевым» эффектом (siRNA-Scr: 5'-UUCUCCGAACGUGUCACGU-3', 5'-ACGUGACACGUUCGGAGAA-3'). Проводилось сравнение комплексов сиРНК с полимером (PEI/siRNA-Surv) в исходном виде и после «упаковки» в ВНВ: PEI/siRNA-Surv vs. Eхо(PEI/siRNA-Surv).

На рисунке 42 представлены результаты: сиРНК против сурвивина (siRNA-Surv) угнетает пролиферацию клеток двух линий: РС-3 и HCT116. При этом «упаковка» трансфекционных комплексов в экзосомы в разной степени, но всегда усиливает наблюдаемый эффект (в случае РС-3 – статистически значимо, в случае HCT116 – нет).

Полученные результаты подтвердили возможность оптимизации характеристик систем доставки (трансфекции) в клетки терапевтических молекул РНК с помощью ВНВ. Интересным наблюдением была разница эффекта «упаковки» комплексов PEI/siSurv в ВНВ наблюдаемая при использовании разных

клеточных линий. Это наблюдение указывало на возможность «особенностей» взаимодействия ВНВ и клеток разного тканевого происхождения.

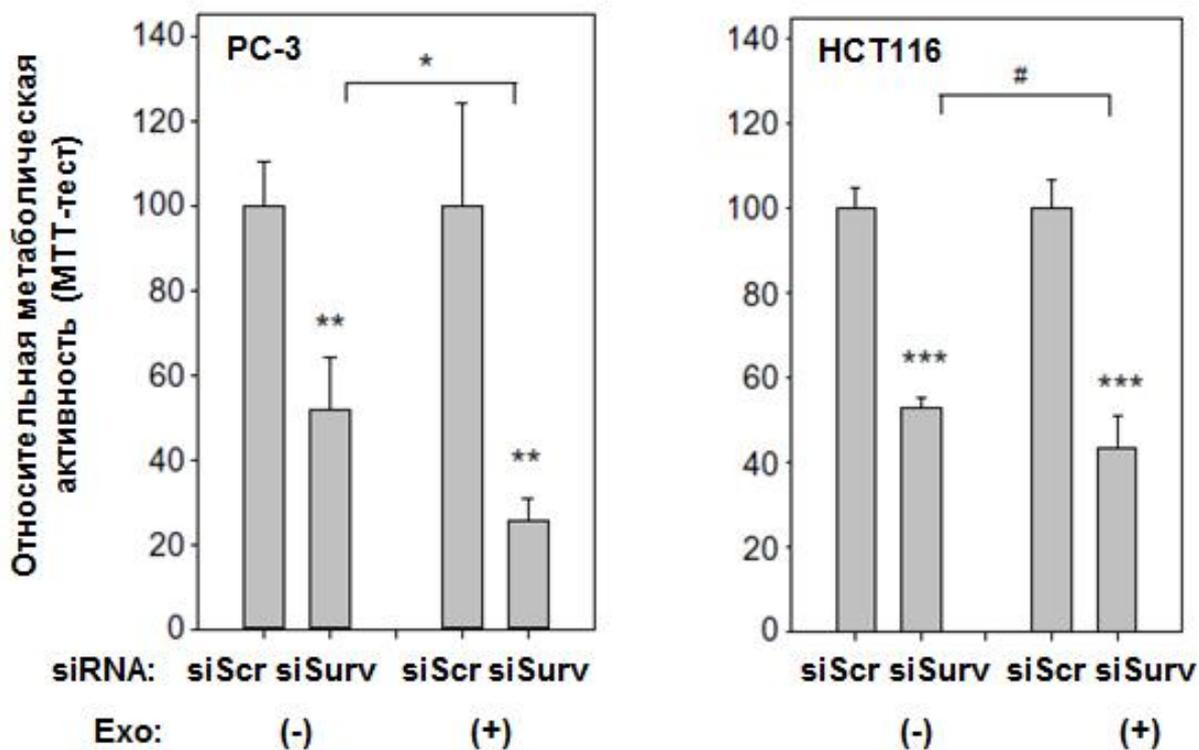


Рисунок 42 - Оценка биологического эффекта трансфекции терапевтических молекул: Для трансфекции были сформированы комплексы PEI/siScr (контроль) и PEI/siSurv, каждый из которых был либо «упакован» (Echo(+)), либо нет (Echo(-) в ВНВ, секретированные клетками HCT116.

Трансфекция проведена через час после формирования комплексов при 50% конфлюэнтности клеток. Метаболическая активность оценена через 48 часов, с помощью МТТ теста. Показатель абсорбции клеток, трансфецированных контрольным комплектом PEI/siScr принят за 100%. Проведено три эксперимента, в каждом случае измерения проводились в четырех повторах. Представлены усредненные данные \pm SD. Оценка статистической значимости различий проведена с помощью критерия Kruskal-Wallis. Отдельно оценена значимость разницы Echo(PEI/siSurv) vs. PEI/siSurv, которая отражает эффект «упаковки» комплексов в ВНВ.

5.4.3 Оценка влияния источника ВНВ на их трансфекционную активность

В рамках предполагаемого клинического применения, возможно использование различных источников экзосом для формирования трансфекционных комплексов, или так называемой «системы доставки». Так, оптимальным вариантом можно предполагать использования аутологичных везикул – экзосом, выделенных из биологических сред пациента. Теоретически, могут быть использованы различные жидкости: плазма, моча, асцитическая жидкость [349, 350]. Аутологичными будут также и везикулы, выделенные из культуральной среды после культивации первичной культуры клеток, полученных из материала (ткани опухоли, фибробластов) пациента. Альтернативным вариантом будет получение экзосом из клеток, стабильно культивируемых в условиях *in vitro*. В таком случае везикулы будут представлять собой аллогенный (клетки человека) или ксенографтный (клетки животных) материал. В качестве возможной технологии получения везикул можно упомянуть методику их выделения из растений. Такая возможность показана в ряде публикаций, но ее реализация в рамках решения клинических задач требует проведения дополнительных исследований [351, 352].

Очевидно, что использование аутологичных экзосом является предпочтительным, так как оно исключает возникновение каких-либо иммунологических осложнений. Но получение первичной культуры клеток и «наработка» экзосом в условиях *in vitro* представляет собой технически сложный и дорогостоящий процесс. Возможность выделения экзосом из плазмы или асцитической жидкости пациента тоже имеет объективные ограничения. Оптимальным вариантом «производства» везикул было бы получение их из сред после культивации стабильных линий человеческих клеток. При этом возникает логичный вопрос: «все ли экзосомы одинаково хороши»? В современной литературе не представлено исследований, которые бы отвечали на этот практический вопрос. Поэтому его решение стало задачей данной работы.

В эксперименте были использованы клетки четырех линий: рака яичников (Skov-3), рака предстательной железы (PC-3), колоректальной карциномы (HCT-116) и остеосаркомы (Saos-2) человека. Из культуральной среды после культивации этих клеток были выделены экзосомы стандартным способом (ультрацентрифугированием). Размер везикул был оценен с помощью ЛКС ($115 \text{ нм} \pm 14 \text{ нм}$) вне зависимости от клеток-продуцентов. Концентрация везикул была нормализована с помощью НТА и трансфекционные комплексы с PEI/siLuc3 (PEI/siLuc2 как контроль) приготовлены с помощью УЗ по ранее разработанному протоколу.

Для оценки эффективности трансфекции были использованы те же клеточные линии, стабильно экспрессирующие фермент люциферазу (Skov-3/Luc; PC-3/Luc; HCT-116/Luc; Saos-2/Luc). Клетки линии были Skov-3/Luc описаны ранее, другие клеточные линии были получены путем стабильной трансфекции плазмиды pCCLc-MNDU3-Luciferase-PGK-EGFP-WPRE (Addgene, Watertown MA, США). В параллельных экспериментах каждая линия была трансфецирована комплексами (PEI/siLuc3 и PEI/siLuc2) без экзосом и теми же комплексами, «упакованными» в экзосомы различного происхождения. Результаты были выражены как % от люциферазной активности клеток, трансфецированных аналогичными комплексами с контрольной молекулой (siLuc2) и показаны на рисунке 43. Представлены результаты четырех экспериментов, проведенных параллельно с четырьмя клеточными линиями (Skov-3, PC-3, HCT116, Saos-2), стабильно экспрессирующими фермент люциферазу. В каждом случае были приготовлены трансфекционные комплексы двух типов: содержащие активную молекулу siLuc3 и контрольные с siLuc2. С каждой из этих молекул было сформировано по пять типов комплексов: один – контрольный: PEI/siLuc, и четыре аналогичных, но «упакованных» в везикулы, полученные от разных клеточных культур: Skov-3, PC-3, HCT116, Saos-2. Каждый эксперимент был проведен в четырех повторах. Результаты выражены в % от исходной люциферазной активности (после трансфекции siLuc2) и представлены как средние значения \pm SD. Статистическая значимость различий в парах siLuc2 vs. siLuc3 (U-test Mann-

Withney) – $p > 0.001$; в ряду сравнения разных композиций комплекса PEI/siLuc3, показанных красным цветом (Kruskal — Wallis test) – $p > 0.05$.

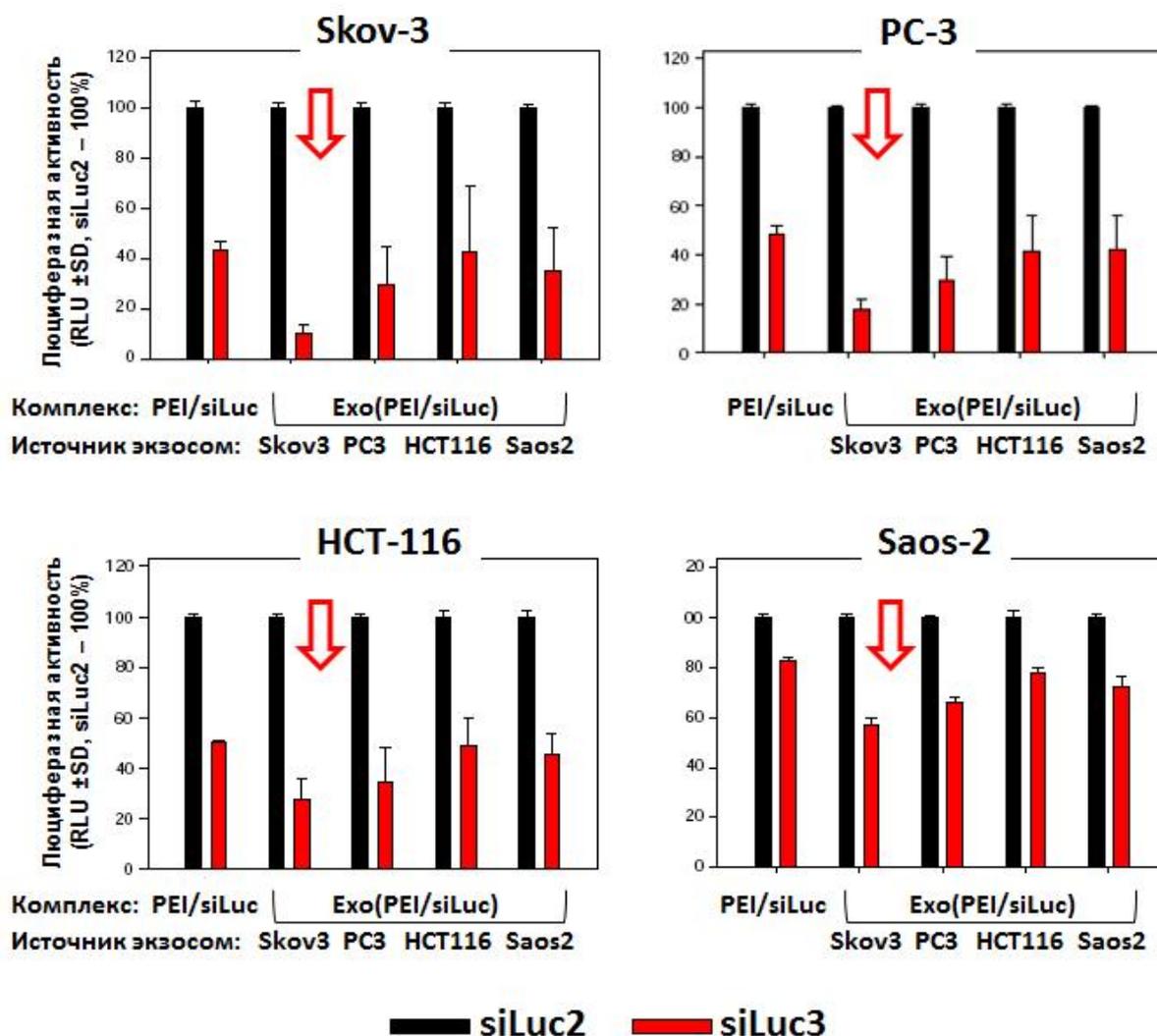


Рисунок 43 - Сравнительная оценка трансфекционной активности экзосом, секретируемых опухолевыми клетками разных линий

Наибольшей трансфекционной активностью обладали комплексы, сформированные экзосомами, которые были секретированы клетками рака яичников Skov-3. Причем этот феномен наблюдался при трансфекции любой из четырех линий, включенных в исследование. Таким образом, экзосомы клеток Skov-3 обладают максимальной трансфекционной активностью по отношению к любым клеткам. В литературе не было найдено подтверждений этому наблюдению. Можно предполагать, что экзосомы клеток Skov-3 обладают какими-то

специфическими компонентами поверхностной мембраны, которые обеспечивают оптимальные условия контакта с клеточной мембраной и трансфекции внутрь клетки. Безусловно, этот аспект имеет практическое значение и требует углубленного исследования. Представленные в данной работе результаты пока только указывают на «неодинаковость» экзосом, секретлируемых разными клетками. Этот феномен должен учитываться при выборе источника везикул для возможного клинического применения.

5.4.4 Анализ терапевтического эффекта комплекса Exo(PEI/siSurv)

Заключительным этапом исследования была оценка эффективности системы доставки терапевтической молекулы РНК с помощью трансфекционного комплекса «упакованного» в экзосомы. В качестве *in vivo* модели были использованы бестимусные мыши. После подкожной инъекции суспензии клеток РС-3, в течение 5 дней формировались плотные подкожные опухоли размером 200-300 мм³. После рандомизации животных по группам, была начата экспериментальная терапия.

Состав терапевтического «препарата» был определен на основе ранее проведенных экспериментов. Так как инактивация синтеза сурвивина приводила к существенному угнетению пролиферации клеток РС-3 *in vitro*, в качестве терапевтической молекулы была использована малая интерферирующая РНК siSurv. Молекула, не имеющая «мишеней» в организме мыши, siLuc3, была использована в качестве контроля. Комплексы PEI/siRNA были сформированы по ранее описанной технологии путем инкубации при комнатной температуре. Комплексы затем были «упакованы» в ВНВ, секретированные клетками Skov-3, так как именно эти экзосомы оказались наиболее трансфекционно активны согласно результатам предварительных экспериментов. Трансфекционные комплексы готовились непосредственно перед инъекцией. Внутривенные инъекции суспензии терапевтического комплекса проводились трижды: 1-ый, 7-й и 12-ый день после рандомизации. Размер опухоли измерялся дважды: на 7-й день и после завершения эксперимента (12-й день). После вскрытия животных, в образцах опухолевой ткани был оценен уровень экспрессии белка – «мишени» (Survivin).

На рисунке 44А отчетливо видно, что экспериментальная терапия приводила к угнетению роста ксенографтных трансплантатов, причем наблюдаемый эффект был статистически значимым.

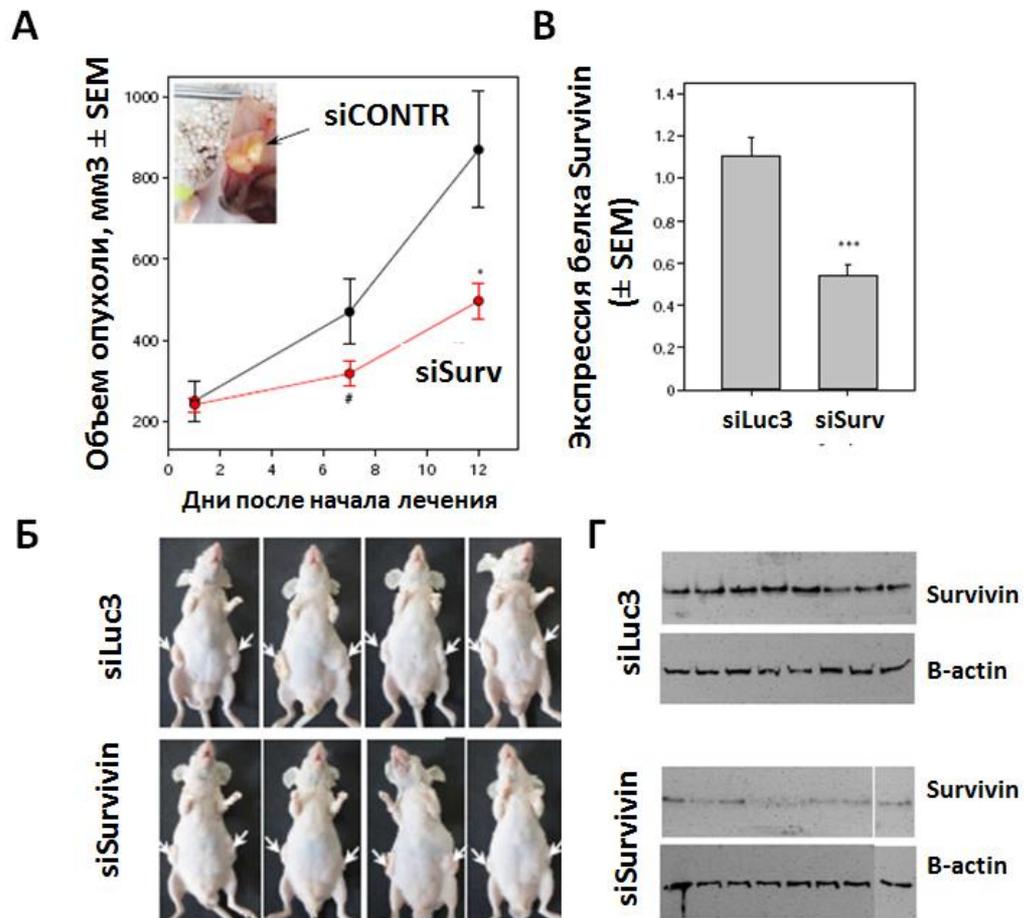


Рисунок 44 - Оценка терапевтической эффективности комплекса ECHO(PEI/siSurv): А). Диаграмма изменения размера опухоли, данные усредненные для двух групп по 20 животных; Б) Животные по окончании эксперимента, по 4 из каждой группы; В) Сравнительный уровень экспрессии белка сурвивина в ткани опухоли, данные нормализованы относительно уровня экспрессии бета-актина и усреднены для двух групп по 20 животных. Статистическая достоверность оценена с помощью теста Mann-Whitney; Г) Вестерн-блот анализ уровня экспрессии сурвивина.

Более детально различия в размере подкожных опухолей можно увидеть на рисунке 44Б, где представлены по 4 животных из каждой экспериментальной

группы. Далее (Рисунок 44В и 44Г) представлены результаты анализа эффективности угнетения экспрессии терапевтической «мишени» - анти-апоптотического белка сурвивина. Снижение экспрессии белка клетками опухоли наблюдается (в большей или меньшей степени) у всех животных группы, получившей инъекции комплекса Eho(PEI/siSurv). В контрольной группе экспрессия этого белка сопоставима с экспрессией бета-актина (Рисунок 44Г). Белковые лизаты были приготовлены из 8 образцов ткани опухоли животных, получавших Eho(PEI/siLuc3) комплекс (верхняя панель), и из 8 образцов ткани опухоли животных, получавших Eho(PEI/siSurv) комплекс (нижняя панель) с помощью RIPA буфера. После нормализации с помощью метода Бредфорда, по 20 мкг тотального белка в составе лизатов смешивали с 5х буфером для нанесения (Laemmli buffer), денатурировали (65°-5 мин) и вносили в гель. Электрофорез и перенос белков на мембрану проводили в стандартных условиях. Затем детектировали сурвивин (16 кДа) и бетаактин (42кДа) одновременно смесью первичных (EP2880Y/AbCam, sc-1616R), затем вторичным антителом НРС anti-rabbit 7074S/Cell Signaling). Выше (Рисунок 44В) представлены те же данные после нормализации (относительно бета-актина) и вычисления среднего значения для группы. Наблюдаемая разница существенна и статистически достоверна.

5.4 Выводы и перспективы клинического применения

В Главе 5 представлены результаты экспериментальной работы, целью которой было создание оригинальной системы доставки коротких терапевтических молекул РНК с помощью экзосом. В рамках исследования была разработана и протестирована *in vitro* и *in vivo* новая система доставки терапевтических молекул РНК. Инновационная технология формирования трансфекционного комплекса включает два этапа: (1) формирование комплекса РНК и катионного полимера (PEI/siRNA) в результате электростатического взаимодействия, этот комплекс обеспечивает «конденсацию» и «защиту» терапевтической молекулы РНК, и (2) «упаковка» комплекса PEI/siRNA в экзосомы в результате воздействия УЗ, что обеспечивает высокую трансфекционную активность и биосовместимость нового

комплекса Eхо(PEI/siRNA). На основе полученных результатов можно сделать следующие выводы:

1. С целью оптимизации биологических и фармакологических характеристик комплекс PEI/siRNA, образованный катионным полимером и РНК, может быть «упакован» в ВНВ с помощью ультразвукового воздействия [325, 353].
2. «Упаковка» комплекса PEI/miR в ВНВ повышает его трансфекционную активность и стабильность [353].
3. Экзосомы различного происхождения обладают разной трансфекционной активностью, что должно учитываться при выборе источника везикул для создания систем доставки лекарств [353].
4. Использование комплекса Eхо(PEI/siSurv) для инактивации анти-апоптотического белка сурвивина в *in vivo* модели РПЖ позволило добиться терапевтического эффекта [353].

В целом, результаты, представленные в Главе 5 диссертационной работы, указывают на перспективность и необходимость дальнейших исследований. Экзосомы могут быть использованы как своего рода «оболочка» для трансфекционного комплекса на основе полимера. Такая «оболочка» может оптимизировать трансфекционную активность, повышать стабильность и должна улучшать биосовместимость комплексов PEI/RNA. В рамках исследования был впервые описан факт «функциональной разности» экзосом, секретируемых разными клетками. Этот феномен требует дальнейшего изучения с целью идентификации молекулярных механизмов, обеспечивающих более высокую трансфекционную активность везикул.

Разработка «клинически применимых» систем доставки цитотоксических препаратов на основе экзосом и внедрение таких систем в практику требует еще решения задач прикладного характера. Так, необходимо определить оптимальный источник и метод получения экзосом, причем имеет важное значение возможность стандартизации и масштабирования этой технологии. В рамках диссертационной работы не была затронута проблема «таргетной» доставки лекарств с помощью ВНВ: требует детальной проработки вопрос о возможности «модифицировать»

экзосомальную мембрану с целью обеспечения «направленной» трансфекции. «Белым пятном» остается фармакокинетика и фармакодинамика экзосом, и зависимость этих показателей от «груза», «упакованного» в везикулы. Решение этих вопросов имеет большое значение, так как оно определит перспективы внедрения новой технологии в клиническую практику.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Нановезикулярные технологии в ближайшее время войдут в медицинскую практику. Эффективная разработка и внедрение этих технологий в практическую онкологию требуют правильной оценки перспектив использования. В представленном исследовании была сделана попытка такой оценки, проведенная на базе научной лаборатории в рамках крупного клинического центра, НМИЦ онкологии им. Н.Н. Петрова Минздрава России. Это позволило провести масштабное исследование в нескольких направлениях, по каждому из которых можно сделать выводы и обозначить направления дальнейших разработок. В каждой из четырех глав, содержащих экспериментальные данные (Глава 2, Глава 3, Глава 4 и Глава 5), представлены детальные выводы. В разделе заключение представлены возможные направления дальнейшей работы.

Важным этапом работы по внедрению нановезикулярных технологий в клиническую онкологию представляется валидация разработанных методов на большой коллекции клинического материала, разработка, коммерциализация и внедрение в практику тест-систем для диагностики и/или мониторинга онкологических заболеваний на основе анализа компонентов экзосом. Представленные в данном исследовании (Глава 2) результаты показали, что сложные и дорогостоящие технологии могут быть упрощены и оптимизированы для решения конкретных аналитических задач. В рамках представленной работы была поставлена и решена задача создания методов выделения нановезикул для последующего анализа их компонентов (микроРНК, поверхностных белков) с диагностической целью. Выделение интактных нановезикул с целью модификации их состава и последующего использования с лечебной целью представляется перспективной задачей дальнейших исследований.

Экзосомальные микроРНК представляют собой перспективные маркеры, на основе которых могут быть созданы тест-системы для первичной или дифференциальной диагностики онкологических заболеваний, для мониторинга или персонализации противоопухолевой терапии. В частности, в рамках данного исследования была проведена разработка и оценка диагностической значимости

тест-систем для диагностики ряда нозологий (Глава 3). Для дальнейшей оптимизации и внедрения в практику диагностических методик, основанных на анализе экзосом, работа должна быть сфокусирована на нескольких направлениях. Во-первых, разработка методов изоляции тканеспецифичных везикул является перспективным методом повышения специфичности анализа. Во-вторых, широкие профайлинговые исследования, в которых проводилось бы непосредственное сравнение клинических групп, требующих дифференциальной диагностики, необходимы для поиска потенциальных «маркерных» молекул микроРНК и так называемых «реципрокных пар» микроРНК. В-третьих, требуют оптимизации технология ОТ-ПЦР анализа и алгоритмы интерпретации получаемых результатов. Успешное решение перечисленных задач и сочетание этих решений в рамках диагностических тест-систем должно обеспечить высокие диагностические показатели последних.

Нормальный пул ВНВ (экзосом) плазмы стимулирует адгезивную и миграционную активность опухолевых клеток и может играть патологическую роль в процессе метастатической диссеминации. Полученные в рамках данного исследования (Глава 4) результаты впервые указали на патологическую роль, которую могут играть циркулирующие экзосомы плазмы в процессе метастатической диссеминации и прогрессия заболевания. Этот феномен требует углубленного изучения как в условиях *in vivo* экспериментов (с целью оценки комплексного характера и молекулярных механизмов экзосомальных эффектов), так и путем анализа экзосом из плазмы пациентов (с целью поиска корреляций между составом везикул и особенностями метастатического процесса). Более глубокое понимание механизмов и эффектов взаимодействия циркулирующих опухолевых клеток и нормального пула нановезикул плазмы послужит основой для разработки новых подходов к профилактике и лечению метастатического процесса. Например, модификация количественного или качественного состава циркулирующих экзосом в рамках экстракорпоральных процедур (филтрационного или гравитационного плазмофереза) уже развивается как метод профилактики метастазирования.

Как показали результаты данного исследования (Глава 5) ВНВ (экзосомы) могут быть использованы для формирования системы доставки терапевтических молекул РНК (siRNA/microRNA). «Упаковка» трансфекционных комплексов на основе катионных полимеров в экзосомы оптимизирует функциональные характеристики последних. Исследования в этой области ведутся десятками лабораторий. В рамках представленной работы была проведена оценка возможности использования экзосом для доставки терапевтических микроРНК (miRNA/siRNA). Потенциал применения экзосом в качестве системы доставки лекарственных препаратов этим не ограничивается, и, теоретически, вещества любой природы могут быть «упакованы» в экзосомы. Основной задачей, решение которой определяет на данный момент перспективы создания и внедрения в практику «экзосомальных» систем доставки, является поиск оптимального источника экзосом. Идеальным решением представляется использование аутологичных везикул, выделенных из биологических жидкостей (плазмы, асцитической жидкости, мочи) пациента, но такой подход имеет ряд существенных недостатков (ограниченный ресурс, сложность стандартизации и др.). Ведутся исследования по созданию «экзосомоподобных» искусственных везикул (synthetic exosome-mimics) или гибридных везикул, сочетающих аутологичные и синтетические компоненты. Исследования в этом направлении могут ускорить появление в клинической практике «экзосомальных» систем доставки противоопухолевых препаратов. Важное значение имеет также проблема адресности доставки, которая решается путем химической модификации поверхности везикул. В целом, результаты этих исследований имеют большой потенциал практического использования.

ВЫВОДЫ

1. Методы выделения ВНВ (экзосом) из биологических жидкостей, широко используемые в работе исследовательских лабораторий, могут быть оптимизированы для решения определенных аналитических задач и использования в рутинной онкологической практике. В представленной работе разработан ряд методов:

- Метод выделения экзосом мочи путем аглютинации лектинами.
- Метод выделения экзосом из плазмы для последующего ОТ-ПЦР анализа экзосомальной микроРНК (патент № 2741776).
- Метод выделения экзосом из плазмы для последующего анализа с помощью проточной цитометрии поверхностных экзосомальных белков (патент № 2741638).

2. Экзосомальные микроРНК представляют собой перспективные маркеры, на основе которых могут быть созданы тест-системы для первичной или дифференциальной диагностики онкологических заболеваний, для мониторинга или персонализации противоопухолевой терапии. Например,

- Тест-система для скрининга или первичной диагностики рака предстательной железы (РПЖ). По результатам проведенных исследований, потенциальными маркерами РПЖ представляются miR-574 (AUC 0,85), miR-141 (AUC 0,86), miR-21 (AUC 0,65).
- Тест-система для скрининга или первичной диагностики колоректальной карциномы (КРК). По результатам проведенных исследований, потенциальными маркерами КРК представляются miR-223, miR-181a. AUC при анализе соотношения концентраций двух молекул: 0,96.
- Тест-система для дифференциальной диагностики узловых образований щитовидной железы (УОЩЖ). Диагностический потенциал имеют miR-126, miR-145, miR-146a, miRNA-181a, miR-206, miR-21, miR221 and miR-223, miR-31.
- Тест-система для прогнозирования эффективности нео-адьювантной терапии рака молочной железы (РМЖ). Прогностический потенциал имеют miR-34a,

miR-451. AUC при анализе соотношения концентраций двух молекул в группах пациенток условно «чувствительных» и «резистентных» к НАХТ - 0,96.

3. Для повышения показателей диагностической значимости тестов на основе анализа экзосомальных микроРНК перспективными представляются два направления: разработка технологии изоляции из плазмы тканеспецифичной фракции экзосом и адаптация технологии «2-tail» ОТ-ПЦР анализа микроРНК.
4. Нормальный пул ВНВ (экзосом) плазмы стимулирует адгезивную и миграционную активность опухолевых клеток, может играть патологическую роль в процессе метастатической диссеминации и представлять собой потенциальную «мишень» для терапевтического воздействия.
5. Стимулирующий эффект экзосом плазмы опосредуется взаимодействием плазменных белков, «абсорбированных» на мембране везикул, рецепторов на мембране клеток РМЖ и ФАК-зависимым каскадом сигнальных молекул внутри клеток.
6. ВНВ (экзосомы) могут быть использованы для формирования системы доставки терапевтических молекул РНК (siRNA/microRNA). «Упаковка» трансфекционных комплексов на основе катионных полимеров в экзосомы оптимизирует функциональные характеристики последних.
7. Экзосомы различного происхождения (секретируемые разными клеточными линиями) обладают разной трансфекционной активностью, что может быть использовано для оптимизации технологии «доставки» терапевтических микроРНК с помощью экзосом.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ

АСМ	Атомно-силовая микроскопия
ВНВ	Внеклеточные нановезикулы
Крио-ЭМ	Крио-электронная микроскопия
КРК	Колоректальная карцинома
ЛКС	Лазерная корреляционная спектроскопия
МВТ	Мульти-везикулярное тельце
микроРНК (miRNA)	Короткая регуляторная молекул рибонуклеиновой кислоты
мРНК (mRNA)	Матричная (информационная) рибонуклеиновая кислота
НТА	Нано-трековый анализ
ОТ-ПЦР	Обратная транскрипция – полимеразная цепная реакция
ОЭ	Опухолевые экзосомы или экзосомы, секретируемые опухолевыми клетками
ПРЖ	Рак предстательной железы
РМЖ	Рак молочной железы
сиРНК (siRNA)	Малая интерферирующая РНК (синтетическая молекула, вызывающая эффект «РНК интерференции»)
СЭМ	Сканирующая электронная микроскопия
ТЭМ	Трансмиссионная электронная микроскопия
УОЦЖ	Узловые образования щитовидной железы

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Matoltsy, A.G. Membrane-Coating Granules of Keratinizing Epithelia / Matoltsy AG, Parakkal PF. // J Cell Biol. – 1965 – V. 24 – P. 297-307.
2. Wolf, P. The nature and significance of platelet products in human plasma / Wolf P // Br J Haematol. – 1967. – V. 13(3). – P. 269-288.
3. Anderson, H.C. Vesicles associated with calcification in the matrix of epiphyseal cartilage / Anderson HC // J Cell Biol. – 1969. – V. 41(1). – P. 59-72.
4. Harding, C. Receptor-mediated endocytosis of transferrin and recycling of the transferrin receptor in rat reticulocytes / Harding C, Heuser J, Stahl P // J Cell Biol. – 1983. – V. 97(2). – P. 329-339.
5. Johnstone, R.M. Vesicle formation during reticulocyte maturation. Association of plasma membrane activities with released vesicles (exosomes) / Johnstone RM, Adam M, Hammond JR, Orr L, Turbide C // J Biol Chem. – 1987. – V. 262(19). – P. 9412-9420.
6. Raposo, G. B lymphocytes secrete antigen-presenting vesicles / Raposo G, Nijman HW, Stoorvogel W, Liejendekker R, Harding CV, Melief CJ, Geuze HJ // J Exp Med. – 1996. – V. 183(3). – P. 1161-1172.
7. Ratajczak, J. Embryonic stem cell-derived microvesicles reprogram hematopoietic progenitors: evidence for horizontal transfer of mRNA and protein delivery / Ratajczak J, Miekus K, Kucia M, Zhang J, Reca R, Dvorak P, Ratajczak MZ // Leukemia. – 2006. – V. 20(5). – P. 847-856.
8. Valadi, H. Exosome-mediated transfer of mRNAs and microRNAs is a novel mechanism of genetic exchange between cells / Valadi H, Ekstrom K, Bossios A, Sjostrand M, Lee JJ, Lotvall JO // Nature cell biology. – 2007. – V. 9(6). – P. 654-659.
9. Bonifacino, J.S. Vesicular transport earns a Nobel / Bonifacino JS // Trends Cell Biol. – 2014. – V. 24(1). – P. 3-5.
10. Colombo, M. Biogenesis, secretion, and intercellular interactions of exosomes and other extracellular vesicles / Colombo M, Raposo G, Thery C // Annu Rev Cell Dev Biol. – 2014. – V. 30. – P. 255-289.

11. Bobrie, A. Diverse subpopulations of vesicles secreted by different intracellular mechanisms are present in exosome preparations obtained by differential ultracentrifugation / Bobrie A, Colombo M, Krumeich S, Raposo G, Thery C // *J Extracell Vesicles*. – 2012. – V. 1. - doi: 10.3402/jev.v1i0.18397.
12. Zabeo, D. Exosomes purified from a single cell type have diverse morphology / Zabeo D, Cyjetkovic A, Lasser C, Schorb M, Lotvall J, Hoog JL // *J Extracell Vesicles*. – 2017. – V. 6(1). – P. e1329476.
13. Yang, M. High-purified isolation and proteomic analysis of urinary exosomes from healthy persons / Yang M, Zhi X, Liu Y, Li T, Alfranca G, Xia F, Li C, Song J, Cui D // *Nano Biomed Eng*. – 2017. – V. 9(3). – P. 221-227.
14. Wu, Y. Exosomes: improved methods to characterize their morphology, RNA content, and surface protein biomarkers / Wu Y, Deng W, Klinke DJ // *Analyst* – 2015. – V. 140(19). – P. 6631-6642.
15. Issman, L. Cryogenic transmission electron microscopy nanostructural study of shed microparticles / Issman L, Brenner B, Talmon Y, Aharon A // *PLoS One*. – 2013. – V. 8(12). – P. e83680.
16. Cheng, J. Salivary Exosomes as Nanocarriers for Cancer Biomarker Delivery / Cheng J, Nonaka T, Wong DTW // *Materials (Basel)*. – 2019. – V. 12(4) -- doi: 10.3390/ma12040654.
17. Ilescu, F.S. Microfluidic Technology for Clinical Applications of Exosomes / Ilescu FS, Vrtacnik D, Neuzil P, Ilescu C // *Micromachines (Basel)*. – 2019. – V. 10(6). -- doi: 10.3390/mi10060392.
18. Rojalin, T. Nanoplasmonic Approaches for Sensitive Detection and Molecular Characterization of Extracellular Vesicles / Rojalin T, Phong B, Koster HJ, Carney RP // *Front Chem*. – 2019. – V. 7. – P. 279.
19. Thery, C. Exosomes: composition, biogenesis and function / Thery C, Zitvogel L, Amigorena S // *Nat Rev Immunol*. – 2002. – V. 2(8). – P. 569-579.
20. Theos, A.C. A luminal domain-dependent pathway for sorting to intraluminal vesicles of multivesicular endosomes involved in organelle morphogenesis / Theos

- AC, Truschel ST, Tenza D, Hurbain I, Harper DC, Berson JF, Thomas PC, Raposo G, Marks MS // *Dev Cell*. – 2006. – V. 10(3). – P. 343-354.
21. Hendrix, A. Exosome signaling in mammary gland development and cancer / Hendrix A, Hume AN // *Int J Dev Biol*. – 2011. – V. 55(7-9). – P. 879-887.
22. Ostrowski, M. Rab27a and Rab27b control different steps of the exosome secretion pathway / Ostrowski M, Carmo NB, Krumeich S, Fanget I, Raposo G, Savina A, Moita CF, Schauer K, Hume AN, Freitas RP. // *Nat Cell Biol*. – 2010. – V. 12(1). – P. 19-30.
23. Parolini, I. Microenvironmental pH is a key factor for exosome traffic in tumor cells / Parolini I, Federici C, Raggi C, Lugini L, Palleschi S, De Milito A, Coscia C, Iessi E, Logozzi M, Molinari A // *J Biol Chem*. – 2009. – V. 284(49). – P. 34211-34222.
24. Clayton, A. Induction of heat shock proteins in B-cell exosomes / Clayton A, Turkes A, Navabi H, Mason MD, Tabi Z // *J Cell Sci*. – 2005. – V. 118(16). – P. 3631-3638.
25. Savina, A. Exosome release is regulated by a calcium-dependent mechanism in K562 cells / Savina A, Furlan M, Vidal M, Colombo MI // *J Biol Chem*. – 2003. – V. 278(22). – P. 20083-20090.
26. Koumangoye, R.B. Detachment of breast tumor cells induces rapid secretion of exosomes which subsequently mediate cellular adhesion and spreading / Koumangoye RB, Sakwe AM, Goodwin JS, Patel T, Ochieng J // *PLoS One*. – 2011. – V. 6(9). – P. e24234.
27. Kowal, J. Biogenesis and secretion of exosomes / Kowal J, Tkach M, Thery C // *Curr Opin Cell Biol*. – 2014. – V. 29. – P. 116-125.
28. Mathieu, M. Specificities of secretion and uptake of exosomes and other extracellular vesicles for cell-to-cell communication / Mathieu M, Martin-Jaular L, Lavie G, Thery C // *Nat Cell Biol*. – 2019. – V. 21(1). – P. 9-17.
29. Pan, B.T. Fate of the transferrin receptor during maturation of sheep reticulocytes in vitro: selective externalization of the receptor / Pan BT, Johnstone RM // *Cell*. – 1983. – V. 33(3). – P. 967-978.
30. Thery, C. Membrane vesicles as conveyors of immune responses / Thery C, Ostrowski M, Segura E // *Nat Rev Immunol*. – 2009. – V. 9(8). – P. 581-593.

31. Chaput, N. Exosomes: immune properties and potential clinical implementations / Chaput N, Thery C // *Semin Immunopathol.* 2011. – V. 33(5). – P. 419-440.
32. Tkach, M. Communication by Extracellular Vesicles: Where We Are and Where We Need to Go / Tkach M, Thery C // *Cell.* – 2016. – V. 164(6). – P. 1226-1232.
33. De Toro, J. Emerging roles of exosomes in normal and pathological conditions: new insights for diagnosis and therapeutic applications / De Toro J, Herschlik L, Waldner C, Mongini C // *Frontiers in immunology.* – 2015. – V. 6. – P. 203.
34. Джагаров, Д.Э. Экзосомы - бутылочная почта организма / Джагаров ДЭ // *Химия и жизнь - XXI век.* – 2013. – Т. 6. – С. 6-9.
35. Tkach, M. Why the need and how to approach the functional diversity of extracellular vesicles / Tkach M, Kowal J, Thery C // *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.* – 2018. – V. 373. – P. 1737.
36. Shtam, T. Functional properties of circulating exosomes mediated by surface-attached plasma proteins. Shtam T, Naryzhny S, Kopylov A, Petrenko E, Samsonov R, Kamyshinsky R, Zabrodskaia Y, Nikitin D, Sorokin M, Buzdin A, Malek A. // *J Hematol.* – 2018. – V. 7(4). – P. 149-153.
37. Stefanius, K. Human pancreatic cancer cell exosomes, but not human normal cell exosomes, act as an initiator in cell transformation / Stefanius K, Servage K, de Souza Santos M, Gray HF, Toombs JE, Chimalapati S, Kim MS, Malladi VS, Brekken R, Orth K // *Elife.* – 2019. – V. 28(8). – doi: 10.7554/eLife.40226.
38. Abd Elmageed, Z.Y. Neoplastic reprogramming of patient-derived adipose stem cells by prostate cancer cell-associated exosomes / Abd Elmageed ZY, Yang Y, Thomas R, Ranjan M, Mondal D, Moroz K, Fang Z, Rezk BM, Moparty K, Sikka SC // *Stem Cells.* – 2014. – V. 32(4). – P. 983-997.
39. Park, J.E. Hypoxic tumor cell modulates its microenvironment to enhance angiogenic and metastatic potential by secretion of proteins and exosomes / Park JE, Tan HS, Datta A, Lai RC, Zhang H, Meng W, Lim SK, Sze SK // *Mol Cell Proteomics.* – 2010. – V. 9(6). – P. 1085-1099.
40. King, H.W. Hypoxic enhancement of exosome release by breast cancer cells / King HW, Michael MZ, Gleadle JM // *BMC Cancer.* – 2012. – V. 12. – P. 421.

41. Marleau, A.M. Exosome removal as a therapeutic adjuvant in cancer / Marleau AM, Chen CS, Joyce JA, Tullis RH // *Journal of translational medicine*. – 2012. – V. 10. – P. 134.
42. Семина, С.Е. Межклеточные взаимодействия и развитие гормональной резистентности клеток рака молочной железы / Семина СЕ, Багров ДВ, Красильников МА // *Успехи молекулярной онкологии*. – 2015. – Т. 2(2). – С. 50-55.
43. Shi, J. Exosomes from breast cancer cells stimulate proliferation and inhibit apoptosis of CD133+ cancer cells in vitro / Shi J, Ren Y, Zhen L, Qiu X // *Molecular medicine reports*. – 2015. – V. 11(1). – P. 405-409.
44. Yang, L. Bladder cancer cell-derived exosomes inhibit tumor cell apoptosis and induce cell proliferation in vitro / Yang L, Wu XH, Wang D, Luo CL, Chen LX // *Molecular medicine reports*. – 2013. – V. 8(4). – P. 1272-1278.
45. Sevenich, L. Pericellular proteolysis in cancer / Sevenich L, Joyce JA // *Genes & development*. – 2014. – V. 28(21). – P. 2331-2347.
46. Webber, J.P. Differentiation of tumour-promoting stromal myofibroblasts by cancer exosomes / Webber JP, Spary LK, Sanders AJ, Chowdhury R, Jiang WG, Steadman R, Wymant J, Jones AT, Kynaston H, Mason MD // *Oncogene*. – 2015. – V. 34(3). – P. 290-302.
47. Chowdhury, R. Cancer exosomes trigger mesenchymal stem cell differentiation into pro-angiogenic and pro-invasive myofibroblasts / Chowdhury R, Webber JP, Gurney M, Mason MD, Tabi Z, Clayton A // *Oncotarget*. – 2015. -- V. 6(2). – P. 715-731.
48. Rana, S. Activation-induced internalization differs for the tetraspanins CD9 and Tspan8: Impact on tumor cell motility / Rana S, Claas C, Kretz CC, Nazarenko I, Zoeller M // *The international journal of biochemistry & cell biology*. – 2011. – V. 43(1). – P. 106-119.
49. Hoshino, D. Exosome secretion is enhanced by invadopodia and drives invasive behavior / Hoshino D, Kirkbride KC, Costello K, Clark ES, Sinha S, Grega-Larson N, Tyska MJ, Weaver AM // *Cell reports*. – 2013. – V. 5(5). – P. 1159-1168.

50. Whiteside, T.L. Immune modulation of T-cell and NK (natural killer) cell activities by TEXs (tumour-derived exosomes) / Whiteside TL // Biochemical Society transactions. – 2013. – V. 41(1). – P. 245-251.
51. Geddings, J.E. Tissue Factor-positive Tumor Microvesicles Activate Platelets and Enhance Thrombosis in Mice / Geddings JE, Hisada Y, Boulaftali Y, Getz TM, Whelihan M, Fuentes R, Dee R, Cooley BC, Key NS, Wolberg AS // J Thromb Haemost. – 2016. – V.14(1). – P. 153-66.
52. Geddings, J.E. Tumor-derived tissue factor-positive microparticles and venous thrombosis in cancer patients / Geddings JE, Mackman N // Blood. – 2013. – V. 122(11). – P. 1873-1880.
53. Peinado, H. Melanoma exosomes educate bone marrow progenitor cells toward a pro-metastatic phenotype through MET / Peinado H, Aleckovic M, Lavotshkin S, Matei I, Costa-Silva B, Moreno-Bueno G, Hergueta-Redondo M, Williams C, Garcia-Santos G, Ghajar C // Nature medicine. – 2012. – V.18(6). – P. 883-891.
54. Rana, S. Exosomal tumor microRNA modulates premetastatic organ cells / Rana S, Malinowska K, Zoller M // Neoplasia. – 2013. – V. 15(3). – P. 281-295.
55. Costa-Silva, B. Pancreatic cancer exosomes initiate pre-metastatic niche formation in the liver / Costa-Silva B, Aiello NM, Ocean AJ, Singh S, Zhang H, Thakur BK, Becker A, Hoshino A, Mark MT, Molina H // Nat Cell Biol. – 2015. – V. 17(6). – P. 816-826.
56. Al-Nedawi, K. Endothelial expression of autocrine VEGF upon the uptake of tumor-derived microvesicles containing oncogenic EGFR / Al-Nedawi K, Meehan B, Kerbel RS, Allison AC, Rak J // Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. – 2009. – V. 106(10). – P. 3794-3799.
57. Nazarenko, I. Cell surface tetraspanin Tspan8 contributes to molecular pathways of exosome-induced endothelial cell activation / Nazarenko I, Rana S, Baumann A, McAlear J, Hellwig A, Trendelenburg M, Lochnit G, Preissner KT, Zoller M // Cancer research. – 2010. – V. 70(4). – P. 1668-1678.
58. Battke, C. Tumour exosomes inhibit binding of tumour-reactive antibodies to tumour cells and reduce ADCC / Battke C, Ruiss R, Welsch U, Wimberger P, Lang S, Jochum

- S, Zeidler R // *Cancer immunology, immunotherapy*. – 2011. – V. 60(5). – P. 639-648.
59. Huber, V. Human colorectal cancer cells induce T-cell death through release of proapoptotic microvesicles: role in immune escape / Huber V, Fais S, Iero M, Lugini L, Canese P, Squarcina P, Zaccheddu A, Colone M, Arancia G, Gentile M // *Gastroenterology*. – 2005. – V. 128(7). – P. 1796-1804.
60. Ye, S.B. Tumor-derived exosomes promote tumor progression and T-cell dysfunction through the regulation of enriched exosomal microRNAs in human nasopharyngeal carcinoma / Ye SB, Li ZL, Luo DH, Huang BJ, Chen YS, Zhang XS, Cui J, Zeng YX, Li J // *Oncotarget*. – 2014. – V. 5(14). – P. 5439-5452.
61. Ding, G. Pancreatic cancer-derived exosomes transfer miRNAs to dendritic cells and inhibit RFXAP expression via miR-212-3p / Ding G, Zhou L, Qian Y, Fu M, Chen J, Chen J, Xiang J, Wu Z, Jiang G, Cao L // *Oncotarget*. – 2015. – V. 6(30). – P. 29877-29888.
62. Chen, W.X. Exosomes from docetaxel-resistant breast cancer cells alter chemosensitivity by delivering microRNAs / Chen WX, Cai YQ, Lv MM, Chen L, Zhong SL, Ma TF, Zhao JH, Tang JH // *Tumour Biol*. – 2014. – V. 35(10). – P. 9649-9659.
63. Challagundla, K.B. Exosome-mediated transfer of microRNAs within the tumor microenvironment and neuroblastoma resistance to chemotherapy / Challagundla KB, Wise PM, Neviani P, Chava H, Murtadha M, Xu T, Kennedy R, Ivan C, Zhang X, Vannini I // *Journal of the National Cancer Institute*. – 2015. – V. 107(7). -- doi: 10.1093/jnci/djv135.
64. Wei, Y. Exosomal miR-221/222 enhances tamoxifen resistance in recipient ER-positive breast cancer cells / Wei Y, Lai X, Yu S, Chen S, Ma Y, Zhang Y, Li H, Zhu X, Yao L, Zhang J // *Breast cancer research and treatment*. – 2014. – V. 147(2). – P. 423-431.
65. Safaei, R. Abnormal lysosomal trafficking and enhanced exosomal export of cisplatin in drug-resistant human ovarian carcinoma cells / Safaei R, Larson BJ, Cheng TC,

- Gibson MA, Otani S, Naerdemann W, Howell SB // *Molecular cancer therapeutics*. – 2005. – V. 4(10). – P.1595-1604.
66. Corcoran, C. Docetaxel-resistance in prostate cancer: evaluating associated phenotypic changes and potential for resistance transfer via exosomes / Corcoran C, Rani S, O'Brien K, O'Neill A, Prencipe M, Sheikh R, Webb G, McDermott R, Watson W, Crown J // *PloS one*. – 2012. – V. 7(12). – P. e50999.
67. Ochieng, J. Anchorage-independent growth of breast carcinoma cells is mediated by serum exosomes / Ochieng J, Pratap S, Khatua AK, Sakwe AM // *Exp Cell Res*. – 2009. – V. 315(11). – P. 1875-1888.
68. Almendros, I. Tumor Cell Malignant Properties Are Enhanced by Circulating Exosomes in Sleep Apnea / Almendros I, Khalyfa A, Trzepizur W, Gileles-Hillel A, Huang L, Akbarpour M, Andrade J, Farre R, Gozal D // *Chest*. – 2016. – V. 150(5). – P. 1030-1041.
69. Khalyfa, A. Circulating exosomes potentiate tumor malignant properties in a mouse model of chronic sleep fragmentation / Khalyfa A, Almendros I, Gileles-Hillel A, Akbarpour M, Trzepizur W, Mokhlesi B, Huang L, Andrade J, Farre R, Gozal D // *Oncotarget*. – 2016. – V. 7(34). – P. 54676-54690.
70. Shtam, T. Plasma exosomes stimulate breast cancer metastasis through surface interactions and activation of FAK signaling / Shtam T, Naryzhny S, Samsonov R, Karasik D, Mizgirev I, Kopylov A, Petrenko E, Zabrodskaya Y, Kamyshinsky R, Nikitin D, Malek A // *Breast Cancer Res Treat*. – 2019. – V. 174(1). – P. 129-141.
71. Малек, А.В. Перспективы разработки методов диагностики и мониторинга онкологических заболеваний на основе анализа экзосом, секретлируемых опухолевыми клетками / Малек АВ, Самсонов РБ, Къези А // *Российский Биотерапевтический Журнал*. – 2015. – Т. 14(4). – С. 9-18.
72. Малек, А.В. Система экзосомальных межклеточных коммуникаций и ее роль в процессе метастатической диссеминации / Малек АВ, Берштейн ЛМ, Филатов МВ, Беляев АМ // *Вопросы онкологии*. – 2014. – Т. 60(4). – С. 430-437.
73. Malek, A. Drug delivery approaches for ovarian cancer therapy / Malek A. // *Methods Mol Biol*. – 2013. – V. 1049. – P. 437-442.

74. Lotvall, J. Minimal experimental requirements for definition of extracellular vesicles and their functions: a position statement from the International Society for Extracellular Vesicles. Lotvall J, Hill AF, Hochberg F, Buzas EI, Di Vizio D, Gardiner C, Gho YS, Kurochkin IV, Mathivanan S, Quesenberry P et al. // *J Extracell Vesicles*. – 2014. – V. 3. – P. 26913.
75. Thery, C. Minimal information for studies of extracellular vesicles 2018 (MISEV2018): a position statement of the International Society for Extracellular Vesicles and update of the MISEV2014 guidelines / Thery C, Witwer KW, Aikawa E, Alcaraz MJ, Anderson JD, Andriantsitohaina R, Antoniou A, Arab T, Archer F, Atkin-Smith GK et al // *J Extracell Vesicles*. – 2018, -- V.7(1). – P. 1535750.
76. Thery, C. Isolation and characterization of exosomes from cell culture supernatants and biological fluids / Thery C, Amigorena S, Raposo G, Clayton A // *Curr Protoc Cell Biol*. – 2006. – V. 3(3). – P. 22.
77. Taylor, D.D. Methods of isolating extracellular vesicles impact down-stream analyses of their cargoes / Taylor DD, Shah S // *Methods*. – 2015. – V. 87. – P. 3-10.
78. Taylor, D.D. Exosome isolation for proteomic analyses and RNA profiling. Taylor DD, Zacharias W, Gercel-Taylor C // *Methods Mol Biol*. – 2011 – V. 728. – P. 235-246.
79. Colombet, J. Virioplankton 'pegylation': use of PEG (polyethylene glycol) to concentrate and purify viruses in pelagic ecosystems / Colombet J, Robin A, Lavie L, Bettarel Y, Cauchie HM, Sime-Ngando T // *J Microbiol Methods*. – 2007. – V. 71(3). – P. 212-219.
80. Samsonov, R. Lectin-induced agglutination method of urinary exosomes isolation followed by mi-RNA analysis: Application for prostate cancer diagnostic / Samsonov R, Shtam T, Burdakov V, Glotov A, Tsyrlina E, Berstein L, Nosov A, Evtushenko V, Filatov M, Malek A // *Prostate*. – 2016. – V. 76(1). – P. 68-79.
81. Deregibus, M.C. Charge-based precipitation of extracellular vesicles / Deregibus MC, Figliolini F, D'Antico S, Manzini PM, Pasquino C, De Lena M, Tetta C, Brizzi MF, Camussi G // *Int J Mol Med*. – 2016. – V. 38(5). – P. 1359-1366.

82. Brownlee, Z. A novel "salting-out" procedure for the isolation of tumor-derived exosomes / Brownlee Z, Lynn KD, Thorpe PE, Schroit AJ // *J Immunol Methods*. – 2014. – V. 407. – P. 120-126.
83. Shtam, T.A. Isolation of extracellular micro-vesicles from cell culture medium: comparative evaluation of methods / Shtam TA, Samsonov RA, Volnitskiy AV, Kamyshinsky RA, Verlov NA, Kniazeva MS, Korobkina EA, Orehov AS, Vasiliev AL, Konevega AL, Malek AV // *Biomed Khim*. – 2018. – V. 64(1). – P. 23-30.
84. Gardiner, C. Techniques used for the isolation and characterization of extracellular vesicles: results of a worldwide survey / Gardiner C, Di Vizio D, Sahoo S, Thery C, Witwer KW, Wauben M, Hill AF // *Journal of extracellular vesicles*. – 2016. – V. 5. – P. 32945.
85. Witwer, K.W. Standardization of sample collection, isolation and analysis methods in extracellular vesicle research / Witwer KW, Buzas EI, Bemis LT, Bora A, Lasser C, Lotvall J, Nolte-'t Hoen EN, Piper MG, Sivaraman S, Skog J et al // *J Extracell Vesicles*. – 2013. – V.2. – doi: 10.3402/jev.v2i0.20360.
86. Raj, D.A. A multiplex quantitative proteomics strategy for protein biomarker studies in urinary exosomes / Raj DA, Fiume I, Capasso G, Pocsfalvi G // *Kidney Int*. – 2012. – V. 81(12). – P. 1263-1272.
87. Hogan, M.C. Characterization of PKD protein-positive exosome-like vesicles / Hogan MC, Manganelli L, Woollard JR, Masyuk AI, Masyuk TV, Tammachote R, Huang BQ, Leontovich AA, Beito TG, Madden BJ // *J Am Soc Nephrol*. 2009. – V. 20(2). – P. 278-288.
88. Tauro, B.J. Comparison of ultracentrifugation, density gradient separation, and immunoaffinity capture methods for isolating human colon cancer cell line LIM1863-derived exosomes / Tauro BJ, Greening DW, Mathias RA, Ji H, Mathivanan S, Scott AM, Simpson RJ // *Methods*. – 2012. – V. 56(2). – P. 293-304.
89. Merchant, M.L. Microfiltration isolation of human urinary exosomes for characterization by MS / Merchant ML, Powell DW, Wilkey DW, Cummins TD, Deegens JK, Rood IM, McAfee KJ, Fleischer C, Klein E, Klein JB // *Proteomics Clin Appl*. – 2010. – V. 4(1). – P. 84-96.

90. Cheruvanky, A. Rapid isolation of urinary exosomal biomarkers using a nanomembrane ultrafiltration concentrator / Cheruvanky A, Zhou H, Pisitkun T, Kopp JB, Knepper MA, Yuen PS, Star RA // *Am J Physiol Renal Physiol.* – 2007 – V. 292(5). – P. 1657-1661.
91. Xu, R. Extracellular vesicle isolation and characterization: toward clinical application / Xu R, Greening DW, Zhu HJ, Takahashi N, Simpson RJ // *J Clin Invest.* – 2016. – V. 126(4). – P. 1152-1162.
92. Campoy, I. Exosome-like vesicles in uterine aspirates: a comparison of ultracentrifugation-based isolation protocols / Campoy I, Lanau L, Altadill T, Sequeiros T, Cabrera S, Cubo-Abert M, Perez-Benavente A, Garcia A, Borros S, Santamaria A. // *J Transl Med.* – 2016. – V. 14(1). – P. 180.
93. Musante, L. Use and isolation of urinary exosomes as biomarkers for diabetic nephropathy / Musante L, Tataruch DE, Holthofer H // *Front Endocrinol (Lausanne).* – 2014. – V. 5. – P. 149.
94. Musante, L. A simplified method to recover urinary vesicles for clinical applications, and sample banking / Musante L, Tataruch D, Gu D, Benito-Martin A, Calzaferri G, Aherne S, Holthofer H // *Sci Rep.* – 2014. – V. 4. – P. 7532.
95. Gunter, K.K. A method of resuspending small vesicles separated from suspension by protamine aggregation and centrifugation / Gunter KK, Gunter TE, Jarkowski A, Rosier RN // *Anal Biochem.* – 1982. – V. 120(1). – P. 113-124.
96. Gallart-Palau, X. Enrichment of extracellular vesicles from tissues of the central nervous system by PROSPR / Gallart-Palau X, Serra A, Sze SK // *Mol Neurodegener.* – 2016. – V. 11(1). – P. 41.
97. Gallart-Palau, X. Extracellular vesicles are rapidly purified from human plasma by Protein Organic Solvent Precipitation (PROSPR) / Gallart-Palau X, Serra A, Wong AS, Sandin S, Lai MK, Chen CP, Kon OL, Sze SK // *Sci Rep.* – 2015. – V. 5. – P. 14664.
98. Kim, J. Isolation of High-Purity Extracellular Vesicles by Extracting Proteins Using Aqueous Two-Phase System / Kim J, Shin H, Kim J, Kim J, Park J // *PLoS One.* – 2015. – V. 10(6). – P. e0129760.

99. Shin, H. Aqueous two-phase system to isolate extracellular vesicles from urine for prostate cancer diagnosis / Shin H, Park YH, Kim YG, Lee JY, Park J // *PLoS One*. – 2018. – V. 13(3). – P. e0194818.
100. Yamamoto, M. Application of high-mannose-type glycan-specific lectin from *Oscillatoria Agardhii* for affinity isolation of tumor-derived extracellular vesicles / Yamamoto M, Harada Y, Suzuki T, Fukushige T, Yamakuchi M, Kanekura T, Dohmae N, Hori K, Maruyama I // *Anal Biochem*. – 2019. – V. 580. – P. 21-29.
101. Muller, L. Isolation of biologically-active exosomes from human plasma / Muller L, Hong CS, Stolz DB, Watkins SC, Whiteside TL // *J Immunol Methods*. – 2014. – V. 411. – P. 55-65.
102. Balaj, L. Heparin affinity purification of extracellular vesicles / Balaj L, Atai NA, Chen W, Mu D, Tannous BA, Breakefield XO, Skog J, Maguire CA // *Sci Rep*. – 2015. – V. 5. – P. 10266.
103. Shih, C.L. Development of a magnetic bead-based method for the collection of circulating extracellular vesicles / Shih CL, Chong KY, Hsu SC, Chien HJ, Ma CT, Chang JW, Yu CJ, Chiou CC // *N Biotechnol*. – 2016. – V. 33(1). – P. 116-122.
104. Sole, C. MiR-29c in urinary exosomes as predictor of early renal fibrosis in lupus nephritis / Sole C, Cortes-Hernandez J, Felip ML, Vidal M, Ordi-Ros J // *Nephrol Dial Transplant*. – 2015. – V. 30(9). – P. 1488-1496.
105. Kong, Q. Urinary Exosome miR-424 and miR-218 as Biomarkers for Type 1 Diabetes in Children / Kong Q, Guo X, Guo Z, Su T // *Clin Lab*. – 2019. – V. 65(6). – doi: 10.7754/Clin.Lab.2018.180921.
106. Lekchnov, E.A. Searching for the Novel Specific Predictors of Prostate Cancer in Urine: The Analysis of 84 miRNA Expression / Lekchnov EA, Amelina EV, Bryzgunova OE, Zaporozhchenko IA, Konoshenko MY, Yarmoschuk SV, Murashov IS, Pashkovskaya OA, Gorizkii AM, Zheravin AA // *Int J Mol Sci*. – 2018. – V. 19(12). -- doi: 10.3390/ijms19124088.
107. Zavesky, L. Supernatant versus exosomal urinary microRNAs. Two fractions with different outcomes in gynaecological cancers / Zavesky L, Jandakova E, Turyna R,

- Langmeierova L, Weinberger V, Minar L // *Neoplasma*. – 2016. – V. 63(1). – P. 121-132.
108. Kanchi Ravi, R. A modified precipitation method to isolate urinary exosomes / Kanchi Ravi R, Khosroheidari M, DiStefano JK // *J Vis Exp*. – 2015. – V. 95. – P. 51158.
109. Huang, S. Isolation and quantification of human urinary exosomes by hydrophobic interaction chromatography on a polyester capillary-channeled polymer fiber stationary phase / Huang S, Wang L, Bruce TF, Marcus RK // *Anal Bioanal Chem*. – 2019. – V. 411(25). – P. 6591-6601.
110. Vall-Palomar, M. Establishment of urinary exosome-like vesicles isolation protocol for FHHNC patients and evaluation of different exosomal RNA extraction methods / Vall-Palomar M, Arevalo J, Ariceta G, Meseguer A // *J Transl Med*. – 2018. – V. 16(1). – P. 278.
111. Gheinani, A.H. Improved isolation strategies to increase the yield and purity of human urinary exosomes for biomarker discovery / Gheinani AH, Vogeli M, Baumgartner U, Vassella E, Draeger A, Burkhard FC, Monastyrskaya K // *Sci Rep*. – 2018. – V. 8(1). – P. 3945.
112. Shimoda, A. Glycan profiling analysis using evanescent-field fluorescence-assisted lectin array: Importance of sugar recognition for cellular uptake of exosomes from mesenchymal stem cells / Shimoda A, Tahara Y, Sawada SI, Sasaki Y, Akiyoshi K // *Biochem Biophys Res Commun*. – 2017. – V. 491(3). – P. 701-707.
113. Brett, S.I. Immunoaffinity based methods are superior to kits for purification of prostate derived extracellular vesicles from plasma samples / Brett SI, Lucien F, Guo C, Williams KC, Kim Y, Durfee PN, Brinker CJ, Chin JI, Yang J, Leong HS // *Prostate*. -- 2017. – V. 77(13). – P. 1335-1343.
114. Moutsiopoulou, A. Molecular Aptamer Beacons and Their Applications in Sensing, Imaging, and Diagnostics / Moutsiopoulou A, Broyles D, Dikici E, Daunert S, Deo SK // *Small*. – 2019. – V. 1. -- doi.org/10.1002/sml.201902248

115. Yu, X. An aptamer-based new method for competitive fluorescence detection of exosomes / Yu X, He L, Pentok M, Yang H, Yang Y, Li Z, He N, Deng Y, Li S, Liu T // *Nanoscale*. – 2019. – V. 11(33). – P. 15589-15595.
116. Tetta, C. Extracellular vesicles as an emerging mechanism of cell-to-cell communication / Tetta C, Ghigo E, Silengo L, Deregibus MC, Camussi G // *Endocrine*. – 2013. – V. 44(1). – P. 11-19.
117. Abels, E.R. Introduction to Extracellular Vesicles: Biogenesis, RNA Cargo Selection, Content, Release, and Uptake / Abels ER, Breakefield XO // *Cell Mol Neurobiol*. – 2016. – V. 36(3). – P. 301-312.
118. Fernando, M.R. New evidence that a large proportion of human blood plasma cell-free DNA is localized in exosomes / Fernando MR, Jiang C, Krzyzanowski GD, Ryan WL // *PLoS One*. – 2017. – V. 12(8). – P. e0183915.
119. Fernando, M.R. The biology of extracellular vesicles with focus on platelet microparticles and their role in cancer development and progression / Fernando MR, Jiang C, Krzyzanowski GD, Ryan WL // *Tumour Biol*. – 2016. – V. 37(11). – P. 14391-14401.
120. Szczepanski, M.J. Blast-derived microvesicles in sera from patients with acute myeloid leukemia suppress natural killer cell function via membrane-associated transforming growth factor-beta1 / Szczepanski MJ, Szajnik M, Welsh A, Whiteside TL, Boyiadzis M // *Haematologica*. – 2011. – V. 96(9) – P. 1302-1309.
121. Hong, C.S. Plasma exosomes as markers of therapeutic response in patients with acute myeloid leukemia. / Hong CS, Muller L, Whiteside TL, Boyiadzis M // *Frontiers in immunology* – 2014. – V. 5 – P. 160.
122. Muller, L. Exosomes isolated from plasma of glioma patients enrolled in a vaccination trial reflect antitumor immune activity and might predict survival. / Muller L, Muller-Haegle S, Mitsuhashi M, Gooding W, Okada H, Whiteside TL // *Oncoimmunology*. – 2015. – V. 4(6) – P. e1008347.
123. Whiteside, T.L. The potential of tumor-derived exosomes for noninvasive cancer monitoring. / Whiteside T.L. // *Expert Rev Mol Diagn*. – 2015. – V. 15(10) – P. 1293-1310.

124. Welton, J.L. Proteomics analysis of bladder cancer exosomes. / Welton J.L., Khanna S, Giles P.J., Brennan P, Brewis I.A., Staffurth J, Mason M.D., Clayton A // *Mol Cell Proteomics*. – 2010. – V.9(6) – P. 1324-1338.
125. Yao, Y. Proteomic analysis of exosomes derived from human lymphoma cells. / Yao Y, Wei W, Sun J, Chen L, Deng X, Ma L, Hao S // *Eur J Med Res* – 2015. – V. 20 – P. 8.
126. Greening, D.W. Secreted primary human malignant mesothelioma exosome signature reflects oncogenic cargo. / Greening D.W., Ji H, Chen M, Robinson BW, Dick IM, Creaney J, Simpson RJ // *Sci Rep*. – 2016. – V. 6. – P. 32643.
127. Lu, L. Exosomes: potential for early detection in pancreatic cancer. / Lu L, Risch HA // *Future Oncol*. – 2016. – V. 12(8) – P. 1081-1090.
128. Vykoukal, J. Plasma-derived extracellular vesicle proteins as a source of biomarkers for lung adenocarcinoma. / Vykoukal J, Sun N, Aguilar-Bonavides C, Katayama H, Tanaka I, Fahrman JF, Capello M, Fujimoto J, Aguilar M, Wistuba, II et al // *Oncotarget*. – 2017. – V. 8(56). – P. 95466-95480.
129. Brady, J.V. A Preliminary Proteomic Investigation of Circulating Exosomes and Discovery of Biomarkers Associated with the Progression of Osteosarcoma in a Clinical Model of Spontaneous Disease. / Brady J.V., Troyer RM, Ramsey SA, Leeper H, Yang L, Maier CS, Goodall CP, Ruby CE, Albarqi HAM, Taratula O et al // *Transl Oncol*. – 2018. – V. 11(5). – P. 1137-1146.
130. Luo, D. Proteomics study of serum exosomes from papillary thyroid cancer patients. / Luo D., Zhan S, Xia W, Huang L, Ge W, Wang T // *Endocr Relat Cancer*. – 2018. – V. 25(10) – P. 879-891.
131. Shao, H. Protein typing of circulating microvesicles allows real-time monitoring of glioblastoma therapy. / Shao H., Chung J, Balaj L, Charest A, Bigner DD, Carter BS, Hochberg FH, Breakefield XO, Weissleder R, Lee H. // *Nature medicine*. – 2012. – V. 18(12) – P. 1835-1840.
132. Graner, M.W. Proteomic and immunologic analyses of brain tumor exosomes. / Graner M.W., Alzate O, Dechkovskaia AM, Keene JD, Sampson JH, Mitchell DA, Bigner DD // *FASEB J*. – 2009. – V. 23(5). – P. 1541-1557.

133. Mizutani, K. Isolation of prostate cancer-related exosomes. / Mizutani K., Terazawa R, Kameyama K, Kato T, Horie K, Tsuchiya T, Seike K, Ehara H, Fujita Y, Kawakami K et al // *Anticancer Res.* – 2014. – V. 34(7). – P. 3419-3423.
134. Khan, S. Early diagnostic value of survivin and its alternative splice variants in breast cancer. / Khan S., Bennit HF, Turay D, Perez M, Mirshahidi S, Yuan Y, Wall NR // *BMC cancer.* – 2014. – V. 14. – P. 176.
135. Li, J. Claudin-containing exosomes in the peripheral circulation of women with ovarian cancer. / Li J., Sherman-Baust CA, Tsai-Turton M, Bristow RE, Roden RB, Morin PJ // *BMC Cancer.* – 2009. – V. 9 – P. 244.
136. Jakobsen, K.R. Exosomal proteins as potential diagnostic markers in advanced non-small cell lung carcinoma. / Jakobsen KR, Paulsen BS, Baek R, Varming K, Sorensen BS, Jorgensen MM // *Journal of extracellular vesicles.* – 2015. – V. 4. – P. 26659.
137. Klibi, J. Blood diffusion and Th1-suppressive effects of galectin-9-containing exosomes released by Epstein-Barr virus-infected nasopharyngeal carcinoma cells. / Klibi J., Niki T, Riedel A, Pioche-Durieu C, Souquere S, Rubinstein E, Le Moulec S, Guigay J, Hirashima M, Guemira F et al // *Blood.* – 2009. – V. 113(9). – P. 1957-1966.
138. Houali, K. A new diagnostic marker for secreted Epstein-Barr virus encoded LMP1 and BARF1 oncoproteins in the serum and saliva of patients with nasopharyngeal carcinoma. / Houali K., Wang X, Shimizu Y, Djennaoui D, Nicholls J, Fiorini S, Bouguermouh A, Ooka T // *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research.* – 2007. – V. 13(17) – P. 4993-5000.
139. Bergmann, C. Tumor-derived microvesicles in sera of patients with head and neck cancer and their role in tumor progression. / Bergmann C., Strauss L, Wieckowski E, Czystowska M, Albers A, Wang Y, Zeidler R, Lang S, Whiteside TL // *Head & neck.* – 2009. – V. 31(3) – P. 371-380.
140. Principe, S. In-depth proteomic analyses of exosomes isolated from expressed prostatic secretions in urine. / Principe S., Jones EE, Kim Y, Sinha A, Nyalwidhe JO,

- Brooks J, Semmes OJ, Troyer DA, Lance RS, Kislinger T // *Proteomics*. – 2013. – V. 13(10-11) – P. 1667-1671.
141. Raimondo, F. Differential protein profiling of renal cell carcinoma urinary exosomes. / Raimondo F., Morosi L, Corbetta S, Chinello C, Brambilla P, Della Mina P, Villa A, Albo G, Battaglia C, Bosari S et al // *Mol Biosyst*. – 2013. – V. 9(6). – P. 1220-1233.
142. Li, Y. Proteomic identification of exosomal LRG1: a potential urinary biomarker for detecting NSCLC. / Li Y., Zhang Y, Qiu F, Qiu Z // *Electrophoresis*. – 2011. – V. 32(15) – P. 1976-1983.
143. Тамкович, С.Н Протеомный анализ циркулирующих экзосом крови в норме и при злокачественных образованиях молочной железы. / Тамкович С.Н., Бакакина ЮС, Тутанов ОС, Сомов АК, Кирюшина НА, Дубовская ЛВ, Волоотовский ИД, Лактионов ПП // *Биоорганическая химия* – 2017. – V. 43(2) – P. 146-156.
144. Zhao, Z. A microfluidic ExoSearch chip for multiplexed exosome detection towards blood-based ovarian cancer diagnosis. / Zhao Z., Yang Y, Zeng Y, He M. // *Lab Chip*. – 2016. – V. 16(3) – P. 489-496.
145. Zhang, P. Multiplexed immunophenotyping of circulating exosomes on nano-engineered ExoProfile chip towards early diagnosis of cancer. / Zhang P., Zhou X, Zeng Y. // *Chem Sci*. – 2019. – V. 10(21) – P. 5495-5504.
146. Информационный ресурс компании «Exosomes Diagnostics» в сети интернет: <http://www.exosomedx.com/>
147. Информационный ресурс компании «Exosomics Siena» в сети интернет: <http://www.exosomics.eu/>.
148. Информационный ресурс компании «CARIS Life science» в сети интернет: <http://www.carislifesciences.com/>.
149. Информационный ресурс компании «Exosome Science» в сети интернет: <http://www.exosomesciences.com/>.

150. Schwarzenbach, H. The clinical relevance of circulating, exosomal miRNAs as biomarkers for cancer. / Schwarzenbach H. // *Expert Rev Mol Diagn.* – 2015. – V. 15(9). – P. 1159-1169.
151. Sato-Kuwabara, Y. The fusion of two worlds: non-coding RNAs and extracellular vesicles-diagnostic and therapeutic implications (Review). / Sato-Kuwabara Y., Melo SA, Soares FA, Calin GA // *International journal of oncology.* – 2015. – V. 46(1). – P. 17-27.
152. Jenjaroenpun, P. Characterization of RNA in exosomes secreted by human breast cancer cell lines using next-generation sequencing. / Jenjaroenpun P., Kremenska Y, Nair VM, Kremenskoy M, Joseph B, Kurochkin IV // *PeerJ.* – 2013. – V. 1. – P. e201.
153. Moshhammer, M.I. Exosomal microRNA transfer varies with specific microRNAs functional in colorectal cancer and cellular differentiation. / Moshhammer M.I., Kalipciyan M, Bartsch R, Steger GG, Sedivy R, Mader RM // *International journal of clinical pharmacology and therapeutics.* – 2014. – V. 52(1). – P. 87-88.
154. Rodriguez, M. Exosomes enriched in stemness/metastatic-related mRNAs promote oncogenic potential in breast cancer. / Rodriguez M, Silva J, Herrera A, Herrera M, Pena C, Martin P, Gil-Calderon B, Larriba MJ, Coronado MJ, Soldevilla B et al // *Oncotarget.* – 2015. – V. 6(38). – P. 40575-87.
155. Ogata-Kawata, H. Circulating exosomal microRNAs as biomarkers of colon cancer. / Ogata-Kawata H., Izumiya M, Kurioka D, Honma Y, Yamada Y, Furuta K, Gunji T, Ohta H, Okamoto H, Sonoda H et al // *PLoS One.* – 2014. – V. 9(4). – P. e92921.
156. Cazzoli, R. MicroRNAs derived from circulating exosomes as noninvasive biomarkers for screening and diagnosing lung cancer. / Cazzoli R., Buttitta F, Di Nicola M, Malatesta S, Marchetti A, Rom WN, Pass HI. // *J Thorac Oncol.* – 2013. – V. 8(9). – P. 1156-1162.
157. Гусаченко, О.Н. Нуклеиновые кислоты экзосом: маркеры заболеваний и молекулы межклеточной коммуникации: обзор. / Гусаченко О.Н., Зенкова МА, Власов ВВ // *Биохимия.* – 2013. – Т. 78(1). – С. 5-13.

158. Castellanos-Rizaldos, E. Exosome-based detection of activating and resistance EGFR mutations from plasma of non-small cell lung cancer patients. / Castellanos-Rizaldos E., Zhang X, Tadigotla VR, Grimm DG, Karlovich C, Raez LE, Skog JK // *Oncotarget*. – 2019. – V. 10(30). – P. 2911-2920.
159. Lazaro-Ibanez, E. Different gDNA content in the subpopulations of prostate cancer extracellular vesicles: apoptotic bodies, microvesicles, and exosomes. / Lazaro-Ibanez E., Sanz-Garcia A, Visakorpi T, Escobedo-Lucea C, Siljander P, Ayuso-Sacido A, Yliperttula M // *Prostate*. – 2014. – V. 74(14). – P. 1379-1390.
160. Chatterjee, N. MicroRNAs in Cancer: challenges and opportunities in early detection, disease monitoring, and therapeutic agents. / Chatterjee N., Rana S, Espinosa-Diez C, Anand S // *Curr Pathobiol Rep*. – 2017. – V. 5(1). – P. 35-42.
161. Zhou, J. Tumor-derived exosomes in colorectal cancer progression and their clinical applications. / Zhou J., Li XL, Chen ZR, Chng WJ // *Oncotarget*. – 2017. – V. 8(59). – P.100781-100790.
162. Tovar-Camargo, O.A. Exosomal microRNA Biomarkers: Emerging Frontiers in Colorectal and Other Human Cancers. / Tovar-Camargo O.A., Toden S, Goel A // *Expert Rev Mol Diagn*. – 2016. – V. 16(5). – P. 553-567.
163. Filella, X. Prostate Cancer Detection and Prognosis: From Prostate Specific Antigen (PSA) to Exosomal Biomarkers. / Filella X., Fojl // *Int J Mol Sci*. – 2016. – V. 17(11). – P. E1784.
164. Najminejad, H. Emerging roles of exosomal miRNAs in breast cancer drug resistance. / Najminejad H., Kalantar SM, Abdollahpour-Alitappeh M, Karimi MH, Seifalian AM, Gholipourmalekabadi M, Sheikhha MH // *IUBMB Life*. – 2019. -- doi: 10.1002/iub.2116
165. Schwarzenbach, H. MicroRNA Shuttle from Cell-To-Cell by Exosomes and Its Impact in Cancer. / Schwarzenbach H., Gahan PB // *Noncoding RNA*. – 2019. – V. 5(1). – P. E28.
166. Meng, Y. Exosomes: A Promising Avenue for the Diagnosis of Breast Cancer. / Meng Y., Sun J, Wang X, Hu T, Ma Y, Kong C, Piao H, Yu T, Zhang G // *Technol Cancer Res Treat*. – 2019. – V. 18. – P. 1533033818821421.

167. Hu, W. Functional miRNAs in breast cancer drug resistance. / Hu W., Tan C, He Y, Zhang G, Xu Y, Tang J. // *Onco Targets Ther.* – 2018. – V. 11 – P. 1529-1541.
168. Hosseini, M. Exosome-Encapsulated microRNAs as Potential Circulating Biomarkers in Colon Cancer. / Hosseini M., Khatamianfar S, Hassanian SM, Nedaeinia R, Shafiee M, Maftouh M, Ghayour-Mobarhan M, ShahidSales S, Avan A. // *Current pharmaceutical design.* – 2017. – V. 23(11). – P. 1705-1709.
169. Wang, J. Circulating exosomal miR-125a-3p as a novel biomarker for early-stage colon cancer. / Wang J., Yan F, Zhao Q, Zhan F, Wang R, Wang L, Zhang Y, Huang X // *Sci Rep.* – 2017. – V. 7(1). – P. 4150.
170. Yan, S. Downregulation of circulating exosomal miR-638 predicts poor prognosis in colon cancer patients. / Yan S., Dang G, Zhang X, Jin C, Qin L, Wang Y, Shi M, Huang H, Duan Q. // *Oncotarget.* – 2017. – V. 8(42) – P. 72220-72226.
171. Samsonov, R. Plasma exosomal miR-21 and miR-181a differentiates follicular from papillary thyroid cancer. / Samsonov R., Burdakov V, Shtam T, Radzhabovsmall a CZ, Vasilyev D, Tsyrlina E, Titov S, Ivanov M, Berstein L, Filatov M et al. // *Tumour Biol.* – 2016. – V. 37(9). – P. 12011-12021.
172. Архангельская, П.А. Оценка экспрессии 4 микроРНК в цитологических препаратах в качестве дополнительного метода диагностики рака шейки матки. / Архангельская П.А., Самсонов РБ, Штам ТА, Князева МС, Иванов МК, Титов СЕ, Колесников НН, Бахидзе ЕВ, Берлев ИВ, Михетько АА et al. // *Опухоли женской репродуктивной системы.* – 2017. – Т. 13(13). – С. 63-72.
173. Latham, G.J. Normalization of microRNA quantitative RT-PCR data in reduced scale experimental designs. / Latham G.J. // *Methods in molecular biology.* – 2010. – V. 667. – P. 19-31.
174. Lee, J. Detection of exosome miRNAs using molecular beacons for diagnosing prostate cancer. / Lee J., Kwon MH, Kim JA, Rhee WJ. // *Artif Cells Nanomed Biotechnol.* – 2018. – V. 46(sup3)1. – P. S52-S63.
175. Bhagirath, D. MicroRNA-1246 Is an Exosomal Biomarker for Aggressive Prostate Cancer. / Bhagirath D., Yang TL, Bucay N, Sekhon K, Majid S, Shahryari V, Dahiya R, Tanaka Y, Saini S. // *Cancer Res.* – 2018. – V. 78(7). – P. 1833-1844.

176. Wani, S. Urinary-exosomal miR-2909: A novel pathognomonic trait of prostate cancer severity. / Wani S, Kaul D, Mavuduru RS, Kakkar N, Bhatia AJ // *Biotechnol.* – 2017. – V. 259. – P. 135-139.
177. Valentino, A. Exosomal microRNAs in liquid biopsies: future biomarkers for prostate cancer. / Valentino A., Reclusa P, Sirera R, Giallombardo M, Camps C, Pauwels P, Crispi S, Rolfo C. // *Clin Transl Oncol.* – 2017. – V.19(6) – P. 651-657.
178. Yaman Agaoglu, F. Investigation of miR-21, miR-141, and miR-221 in blood circulation of patients with prostate cancer. / Yaman Agaoglu F., Kovancilar M, Dizdar Y, Darendeliler E, Holdenrieder S, Dalay N, Gezer U. // *Tumour biology : the journal of the International Society for Oncodevelopmental Biology and Medicine.* – 2011. – V. 32(3) – P. 583-588.
179. Zhang, H.L. Serum miRNA-21: elevated levels in patients with metastatic hormone-refractory prostate cancer and potential predictive factor for the efficacy of docetaxel-based chemotherapy. / Zhang H.L., Yang LF, Zhu Y, Yao XD, Zhang SL, Dai B, Zhu YP, Shen YJ, Shi GH, Ye DW. // *The Prostate.* – 2011. – V. 71(3). – P. 326-331.
180. Shen, J. Dysregulation of circulating microRNAs and prediction of aggressive prostate cancer. / Shen J., Hruby GW, McKiernan JM, Gurvich I, Lipsky MJ, Benson MC, Santella R.M. // *The Prostate.* – 2012. – V. 72(13). – P. 1469-1477.
181. Bryant, R.J. Changes in circulating microRNA levels associated with prostate cancer. / Bryant R.J., Pawlowski T, Catto JW, Marsden G, Vessella RL, Rhee B, Kuslich C, Visakorpi T, Hamdy FC. // *Br J Cancer.* – 2012. – V. 106(4). – P. 768-774.
182. Selth, L.A. Discovery of circulating microRNAs associated with human prostate cancer using a mouse model of disease. / Selth L.A., Townley S, Gillis JL, Ochnik AM, Murti K, Macfarlane RJ, Chi KN, Marshall VR, Tilley WD, Butler LM. // *Int J Cancer.* – 2012. – V. 131(3). – P. 652-661.
183. Larne, O. miQ--a novel microRNA based diagnostic and prognostic tool for prostate cancer. / Larne O., Martens-Uzunova E, Hagman Z, Edsjo A, Lippolis G, den Berg MS, Bjartell A, Jenster G, Ceder Y. // *International journal of cancer Journal international du cancer.* – 2013. – V. 132(12). – P. 2867-2875.

184. Валдина, Е.А. Заболевания щитовидной железы Издание третье, переработанное и дополненное. / Валдина Е.А. – Санкт-Петербург: ПИТЕР, 2013.
185. Dean, D.S. Epidemiology of thyroid nodules. / Dean D.S., Gharib H. // Best practice & research Clinical endocrinology & metabolism. – 2008. – V. 22(6). – P. 901-911.
186. Luster, M. Differentiated thyroid cancer-personalized therapies to prevent overtreatment. / Luster M., Weber T, Verburg F.A. // Nature reviews Endocrinology. – 2014. – V. 10(9). – P. 563-574.
187. Kovatch, K.J. Thyroid cancer surgery guidelines in an era of de-escalation. / Kovatch K.J., Hoban CW, Shuman AG // Eur J Surg Oncol. – 2018. – V. 44(3). – P. 297-306.
188. Stevens, C. Pediatric thyroid fine-needle aspiration cytology: a meta-analysis. / Stevens C., Lee JK, Sadatsafavi M, Blair G.K. // J Pediatr Surg. – 2009. – V. 44(11). – P. 2184-2191.
189. Cibas, E.S. The 2017 Bethesda System for Reporting Thyroid Cytopathology. / Cibas E.S., Ali S.Z. // Thyroid. – 2017. – V. 27(11). – P. 1341-1346.
190. Kato, M.A. Molecular markers in thyroid cancer diagnostics. / Kato M.A., Fahey T.J., 3rd. // The Surgical clinics of North America. – 2009. – V. 89(5) – P. 1139-1155.
191. Sciacchitano, S. Comparative analysis of diagnostic performance, feasibility and cost of different test-methods for thyroid nodules with indeterminate cytology. / Sciacchitano S., Lavra L, Olivieri A, Magi F, De Francesco GP, Bellotti C, Salehi LB, Trovato M, Drago C, Bartolazzi A // Oncotarget. – 2017. – V. 8(30) – P. 49421-49442.
192. Ferracin, M. Absolute quantification of cell-free microRNAs in cancer patients. / Ferracin M., Lupini L, Salamon I, Saccenti E, Zanzi MV, Rocchi A, Da Ros L, Zagatti B, Musa G, Bassi C et al. // Oncotarget. – 2015. – V. 6(16). – P. 14545-14555.
193. Chevillet, J.R. Quantitative and stoichiometric analysis of the microRNA content of exosomes. / Chevillet J.R., Kang Q, Ruf IK, Briggs HA, Vojtech LN, Hughes SM, Cheng HH, Arroyo JD, Meredith EK, Gallichotte EN et al. // Proceedings of the

- National Academy of Sciences of the United States of America. – 2014. – V. 111(41) – P. 14888-14893.
194. Cha, D.J. KRAS-dependent sorting of miRNA to exosomes. / Cha D.J., Franklin JL, Dou Y, Liu Q, Higginbotham JN, Demory Beckler M, Weaver AM, Vickers K, Prasad N, Levy S et al. // *Elife*. – 2015. – V. 4. – P. e07197.
195. Semiglazov, V.F. Neoadjuvant (Preoperative) Therapy in Breast Cancer. / Semiglazov VF, Semiglazov VV // Croatia: INTECH. – 2012.
196. Семиглазов, В.Ф. Лечение рака молочной железы. Клинико-биологическое обоснование. / Семиглазов В.Ф., Семиглазов В.В. -- Москва: СИМК, 2017.
197. Quinlan, C. Patient-Friendly Summary of the ACR Appropriateness Criteria: Monitoring Response to Neoadjuvant Systemic Therapy for Breast Cancer. / Quinlan C., Uyeda J.W. // *Journal of the American College of Radiology JACR*. – 2018. – V. 15(7). – P. e11.
198. De Iuliis, F. Are pharmacogenomic biomarkers an effective tool to predict taxane toxicity and outcome in breast cancer patients? / De Iuliis .F, Salerno G, Taglieri L, Scarpa S // *Cancer chemotherapy and pharmacology*. – 2015. – V. 76(4). – P. 679-690.
199. Стенина, М.Б. Практические рекомендации по лекарственному лечению инвазивного рака молочной железы. / Стенина М.Б., Жукова ЛГ, Королева ИА, Пароконная АА, Семиглазова ТЮ, Тюляндин СА // *Злокачественные опухоли: Практические рекомендации RUSSCO*. – 2017. Т. 7. -- С. 105–134.
200. Ma, J. MicroRNA and drug resistance. / Ma J., Dong C, Ji C // *Cancer Gene Ther*. – 2010. – V. 17(8). – P. 523-531.
201. Raza, U. MicroRNAs: master regulators of drug resistance, stemness, and metastasis / Raza U, Zhang JD, Sahin O // *J Mol Med (Berl)*. – 2014. – V. 92(4). – P. 321-336.
202. Zhang, Y. MiRNA-192-5p impacts the sensitivity of breast cancer cells to doxorubicin via targeting peptidylprolyl isomerase / A. Zhang Y, He Y, Lu LL, Zhou ZY, Wan NB, Li GP, He X, Deng HW // *Kaohsiung J Med Sci*. – 2019. – V. 35(1). – P. 17-23.

203. Zhang, L. MiR-155-3p acts as a tumor suppressor and reverses paclitaxel resistance via negative regulation of MYD88 in human breast cancer / Zhang L, Chen T, Yan L, Xu H, Wang Y, Li Y, Wang H, Chen S, Wang W, Chen C // *Gene*. – 2019. – V. 700. – P. 85-95.
204. Liu, C. MiR-124 reversed the doxorubicin resistance of breast cancer stem cells through STAT3/HIF-1 signaling pathways / Liu C, Xing H, Guo C, Yang Z, Wang Y, Wang Y // *Cell Cycle*. – 2019. – V. 18(18). – P. 2215-2227.
205. Yi, D. MiR-381 overcomes cisplatin resistance in breast cancer by targeting MDR1. Yi D, Xu L, Wang R, Lu X, Sang J // *Cell Biol Int*. – 2019. – V. 43(1). – P. 12-21.
206. Uhr, K. MicroRNAs as possible indicators of drug sensitivity in breast cancer cell lines / Uhr K, Prager-van der Smissen WJC, Heine AAJ, Ozturk B, van Jaarsveld MTM, Boersma AWM, Jager A, Wiemer EAC, Smid M, Foekens JA // *PLoS One*. – 2019. – V. 14(5). – P. e0216400.
207. Xu J, Li W, Zhong S, Li X, Chen Z, Hu Q, Tang J, Zhao J: [Extraction and identification of exosomes from drug-resistant breast cancer cells and their potential role in cell-to-cell drug-resistance transfer]. *Zhonghua Zhong Liu Za Zhi* 2014, 36(3):165-170.
208. Chen, W.X. Exosomes from drug-resistant breast cancer cells transmit chemoresistance by a horizontal transfer of microRNAs / Chen WX, Liu XM, Lv MM, Chen L, Zhao JH, Zhong SL, Ji MH, Hu Q, Luo Z, Wu JZ // *PLoS One*. -- 2014. – V. 9(4) – P. e95240.
209. Semina, S.E. Exosome-Mediated Transfer of Cancer Cell Resistance to Antiestrogen Drugs / Semina SE, Scherbakov AM, Vnukova AA, Bagrov DV, Evtushenko EG, Safronova VM, Golovina DA, Lyubchenko LN, Gudkova MV, Krasil'nikov MA // *Molecules*. – 2018. – V. 23(4). – P. doi: 10.3390/molecules23040829.
210. Semina, S.E. Horizontal Transfer of Tamoxifen Resistance in MCF-7 Cell Derivates Proteome Study. / Semina SE, Scherbakov AM, Kovalev SV, Shevchenko VE, Krasil'nikov MA // *Cancer Invest*. – 2017. – V. 35(8). -- P. 506-518.

211. Rodriguez-Martinez, A. Exosomal miRNA profile as complementary tool in the diagnostic and prediction of treatment response in localized breast cancer under neoadjuvant chemotherapy / Rodriguez-Martinez A, de Miguel-Perez D, Ortega FG, Garcia-Puche JL, Robles-Fernandez I, Exposito J, Martorell-Marugan J, Carmona-Saez P, Garrido-Navas MDC, Rolfo C // *Breast Cancer Res.* – 2019. – V. 21(1). – P. 21.
212. Al-Khanbashi, M. Tissue and Serum miRNA Profile in Locally Advanced Breast Cancer (LABC) in Response to Neo-Adjuvant Chemotherapy (NAC) Treatment / Al-Khanbashi M, Caramuta S, Alajmi AM, Al-Haddabi I, Al-Riyami M, Lui WO, Al-Moundhri MS // *PloS one.* – 2016. – V. 11(4). – P. e0152032.
213. Ye, P. Differential microRNA expression profiles in tamoxifen-resistant human breast cancer cell lines induced by two methods / Ye P, Fang C, Zeng H, Shi Y, Pan Z, An N, He K, Zhang L, Long X // *Oncol Lett.* -- 2018. – V. 15(3). – P. 3532-3539.
214. Wang, W. Involvement of miR-451 in resistance to paclitaxel by regulating YWHAZ in breast cancer / Wang W, Zhang L, Wang Y, Ding Y, Chen T, Wang Y, Wang H, Li Y, Duan K, Chen S // *Cell death & disease.* – 2017. – V. 8(10). – P. e3071.
215. Gao, J. MiR-26a inhibits proliferation and migration of breast cancer through repression of MCL-1 / Gao J, Li L, Wu M, Liu M, Xie X, Guo J, Tang H, Xie X // *PloS one.* – 2013. – V. 8(6). – P. e65138.
216. Egeland, N.G. The Role of MicroRNAs as Predictors of Response to Tamoxifen Treatment in Breast Cancer Patients / Egeland NG, Lunde S, Jonsdottir K, Lende TH, Cronin-Fenton D, Gilje B, Janssen EA, Soiland H // *International journal of molecular sciences.* – 2015. – V. 16(10). – P. 24243-24275.
217. Drago-Ferrante, R. Suppressive role exerted by microRNA-29b-1-5p in triple negative breast cancer through SPIN1 regulation / Drago-Ferrante R, Pentimalli F, Carlisi D, De Blasio A, Saliba C, Baldacchino S, Degaetano J, Debono J, Caruana-Dingli G, Grech G // *Oncotarget.* – 2017. – V. 8(17). – P. 28939-28958.
218. Chen, X. The role of miRNAs in drug resistance and prognosis of breast cancer formalin-fixed paraffin-embedded tissues / Chen X, Lu P, Wang DD, Yang SJ, Wu Y, Shen HY, Zhong SL, Zhao JH, Tang JH // *Gene.* – 2016. – V. 595(2). – P. 221-226.

219. Sun, G. Her-2 expression regulated by downregulation of miR-9 and which affects chemotherapeutic effect in breast cancer / Sun G, Sun L, Liu Y, Xing H, Wang K // *Cancer gene therapy*. – 2017. – V. 24(5). – P. 194-202.
220. Kastl, L. MiRNA-34a is associated with docetaxel resistance in human breast cancer cells / Kastl L, Brown I, Schofield AC // *Breast cancer research and treatment*. – 2012. – V. 131(2). – P. 445-454.
221. Hu, Y. MiR-106b~25 cluster regulates multidrug resistance in an ABC transporter-independent manner via downregulation of EP300 / Hu Y, Li K, Asaduzzaman M, Cuella R, Shi H, Raguz S, Coombes RC, Zhou Y, Yague E // *Oncology reports*. – 2016. – V. 35(2). – P. 1170-1178.
222. Yao, Y.S. MiR-141 confers docetaxel chemoresistance of breast cancer cells via regulation of EIF4E expression / Yao YS, Qiu WS, Yao RY, Zhang Q, Zhuang LK, Zhou F, Sun LB, Yue L // *Oncology reports*. – 2015. – V. 33(5). – P. 2504-2512.
223. Phuong, N.T. Induction of methionine adenosyltransferase 2A in tamoxifen-resistant breast cancer cells / Phuong NT, Kim SK, Im JH, Yang JW, Choi MC, Lim SC, Lee KY, Kim YM, Yoon JH, Kang KW // *Oncotarget*. – 2016. – V. 7(12). – P. 13902-13916.
224. Gasparini, P. MicroRNA expression profiling identifies a four microRNA signature as a novel diagnostic and prognostic biomarker in triple negative breast cancers / Gasparini P, Cascione L, Fassan M, Lovat F, Guler G, Balci S, Irkkan C, Morrison C, Croce CM, Shapiro CL // *Oncotarget*. – 2014. – V. 5(5). – P. 1174-1184.
225. Wang, Y. Transforming growth factor-beta regulates the sphere-initiating stem cell-like feature in breast cancer through miRNA-181 and ATM / Wang Y, Yu Y, Tsuyada A, Ren X, Wu X, Stubblefield K, Rankin-Gee EK, Wang SE // *Oncogene*. – 2011. – V. 30(12). – P. 1470-1480.
226. Fischer, K.R. Epithelial-to-mesenchymal transition is not required for lung metastasis but contributes to chemoresistance / Fischer KR, Durrans A, Lee S, Sheng J, Li F, Wong ST, Choi H, El Rayes T, Ryu S, Troeger J // *Nature*. – 2015. – V. 527(7579). – P. 472-476.

227. Yu, X. MiR-214 increases the sensitivity of breast cancer cells to tamoxifen and fulvestrant through inhibition of autophagy / Yu X, Luo A, Liu Y, Wang S, Li Y, Shi W, Liu Z, Qu X // *Molecular cancer*. -- 2015. – V. 14. – P. 208.
228. Архангельская, П.А. Оценка экспрессии 4 микроРНК в цитологических препаратах в качестве дополнительного метода диагностики рака шейки матки / Архангельская ПА, Самсонов РБ, Штам ТА, Князева МС, Иванов МК, Титов СЕ, Колесников НН, Бахидзе ЕВ, Берлев ИВ, Михетько АА, Малек АВ // *Опухоли женской репродуктивной системы*. – 2017. – Т. 13(3). – С. 63-72.
229. Самсонов, Р.Б. Диагностическое значение экзосомальных микроРНК при колоректальном раке / Самсонов РБ, Тарасов МА, Бурдаков ВС, Штам ТА, Гуляев АМ, Ткаченко ОБ, Рыбаков ЕГ, Филатов МВ, Айгнер А, Малек АВ // *Колопроктология*. – 2018. – Т. 2(64). – С. 25-31.
230. Liu, T. Functional prostate-specific membrane antigen is enriched in exosomes from prostate cancer cells / Liu T, Mendes DE, Berkman CE // *Int J Oncol*. – 2014. – V. 44(3). – P. 918-922.
231. Jin, D. Exo APP: Exosome-Oriented, Aptamer Nanoprobe-Enabled Surface Proteins Profiling and Detection / Jin D, Yang F, Zhang Y, Liu L, Zhou Y, Wang F, Zhang GJ // *Anal Chem*. – 2018. – V. 90(24). – P. 14402-14411.
232. Li, P. Ultrasensitive and Reversible Nanoplatfrom of Urinary Exosomes for Prostate Cancer Diagnosis / Li P, Yu X, Han W, Kong Y, Bao W, Zhang J, Zhang W, Gu Y // *ACS Sens*. – 2019. – V. 4(5). – P. 1433-1441.
233. Padda, R.S. Nanoscale flow cytometry to distinguish subpopulations of prostate extracellular vesicles in patient plasma / Padda RS, Deng FK, Brett SI, Biggs CN, Durfee PN, Brinker CJ, Williams KC, Leong HS // *Prostate*. – 2019. – V. 79(6). – P. 592-603.
234. Huang, X. Exosomal miR-1290 and miR-375 as prognostic markers in castration-resistant prostate cancer / Huang X, Yuan T, Liang M, Du M, Xia S, Dittmar R, Wang D, See W, Costello BA, Quevedo F // *Eur Urol*. – 2015. – V. 67(1). – P. 33-41.
235. Kachakova, D. Combinations of serum prostate-specific antigen and plasma expression levels of let-7c, miR-30c, miR-141, and miR-375 as potential better

- diagnostic biomarkers for prostate cancer / Kachakova D, Mitkova A, Popov E, Popov I, Vlahova A, Dikov T, Christova S, Mitev V, Slavov C, Kaneva R // *DNA Cell Biol.* -- 2015. – V. 34(3). – P. 189-200.
236. Gao, Y. Analysis of circulating miRNAs 21 and 375 as potential biomarkers for early diagnosis of prostate cancer / Gao Y, Guo Y, Wang Z, Dai Z, Xu Y, Zhang W, Liu Z, Li S // *Neoplasma.* – 2016. – V. 63(4). – P. 623-628.
237. Porzycki, P. Combination of three miRNA (miR-141, miR-21, and miR-375) as potential diagnostic tool for prostate cancer recognition / Porzycki P, Ciszkowicz E, Semik M, Tyrka M // *Int Urol Nephrol.* – 2018. – V. 50(9). – P. 1619-1626.
238. Chen, D.Q. HDAC3-mediated silencing of miR-451 decreases chemosensitivity of patients with metastatic castration-resistant prostate cancer by targeting NEDD9 / Yu C, Zhang XF, Liu ZF, Wang R, Jiang M, Chen H, Yan F, Tao M, Chen LB // *Ther Adv Med Oncol.* – 2018. – V. 10. – doi: 10.1177/1758835918783132.
239. Panigrahi, G.K. Exosomal microRNA profiling to identify hypoxia-related biomarkers in prostate cancer / Panigrahi GK, Ramteke A, Birks D, Abouzeid Ali HE, Venkataraman S, Agarwal C, Vibhakar R, Miller LD, Agarwal R, Abd Elmageed ZY // *Oncotarget.* – 2018. – V. 9(17). – P. 13894-13910.
240. Blondal, T. Assessing sample and miRNA profile quality in serum and plasma or other biofluids / Blondal T, Jensby Nielsen S, Baker A, Andreasen D, Mouritzen P, Wrang Teilum M, Dahlsveen IK // *Methods.* – 2013. – V. 59(1). – P. 1-6.
241. Danese, E. Reference miRNAs for colorectal cancer: analysis and verification of current data / Danese E, Minicozzi AM, Benati M, Paviati E, Lima-Oliveira G, Gusella M, Pasini F, Salvagno GL, Montagnana M, Lippi G // *Sci Rep.* -- 2017. – V. 7(1). – P. 8413.
242. Schmittgen, T.D. Analyzing real-time PCR data by the comparative C(T) method / Schmittgen TD, Livak KJ // *Nat Protoc.* – 2008. – V. 3(6). – P. 1101-1108.
243. Fabbri, M. MicroRNAs / Fabbri M, Croce CM, Calin GA // *Cancer journal.* – 2008. – V. 14(1). – P. 1-6.

244. O'Brien, J. Overview of MicroRNA Biogenesis, Mechanisms of Actions, and Circulation / O'Brien J, Hayder H, Zayed Y, Peng C // *Front Endocrinol (Lausanne)*. – 2018. – V. 9. – P. 402.
245. Paranjape, T. MicroRNAs: tools for cancer diagnostics / Paranjape T, Slack FJ, Weidhaas JB // *Gut*. – 2009. – V. 58(11). – P. 1546-1554.
246. Cui, M. Circulating MicroRNAs in Cancer: Potential and Challenge / Cui M, Wang H, Yao X, Zhang D, Xie Y, Cui R, Zhang X // *Front Genet*. – 2019. – V. 10. – P. 626.
247. Liu, Q. The Role of Exosomal MicroRNAs in the Tumor Microenvironment of Breast Cancer / Liu Q, Peng F, Chen J // *Int J Mol Sci*. – 2019. – V. 20(16). -- doi: 10.3390/ijms20163884.
248. Anfossi, S. MicroRNAs, Regulatory Messengers Inside and Outside Cancer Cells / Anfossi S, Fu X, Nagvekar R, Calin GA // *Adv Exp Med Biol*. – 2018. – V. 1056. – P. 87-108.
249. Benes, V. Expression profiling of microRNA using real-time quantitative PCR, how to use it and what is available / Benes V, Castoldi M // *Methods*. – 2010. – P. 50(4). – P. 244-249.
250. Ranade, A.R. Methods for microRNA microarray profiling / Ranade AR, Weiss GJ // *Methods in molecular biology*. – 2011. – V. 700. – P. 145-152.
251. Liu, J. Next generation sequencing for profiling expression of miRNAs: technical progress and applications in drug development / Liu J, Jennings SF, Tong W, Hong H // *Journal of biomedical science and engineering*. – 2011. – V. 4(10). – P. 666-676.
252. Deng, R. Isothermal Amplification for MicroRNA Detection: From the Test Tube to the Cell / Deng R, Zhang K, Li J // *Accounts of chemical research*. – 2017. – V. 50(4). – P. 1059-1068.
253. Jin, J. Sensitive and specific miRNA detection method using SplintR Ligase / Jin J, Vaud S, Zhelkovsky AM, Posfai J, McReynolds LA // *Nucleic acids research*. – 2016. – V. 44(13). – P. e116.
254. Ma, F. Sensitive Quantification of MicroRNAs by Isothermal Helicase-Dependent Amplification / Ma F, Liu M, Tang B, Zhang CY // *Analytical chemistry*. – 2017. – V. 89(11). – P. 6182-6187.

255. Ibberson, D. RNA degradation compromises the reliability of microRNA expression profiling / Ibberson D, Benes V, Muckenthaler MU, Castoldi M // *BMC Biotechnol.* – 2009. – V. 9. – P. 102.
256. Tong, L. Improved RT-PCR Assay to Quantitate the Pri-, Pre-, and Mature microRNAs with Higher Efficiency and Accuracy / Tong L, Xue H, Xiong L, Xiao J, Zhou Y // *Molecular biotechnology.* – 2015. – V. 57(10). – P. 939-946.
257. Chen, C. Real-time quantification of microRNAs by stem-loop RT-PCR / Chen C, Ridzon DA, Broomer AJ, Zhou Z, Lee DH, Nguyen JT, Barbisin M, Xu NL, Mahuvakar VR, Andersen MR // *Nucleic acids research.* – 2005. – V. 33(20). – P. e179.
258. Varkonyi-Gasic E, Hellens RP: Quantitative stem-loop RT-PCR for detection of microRNAs. *Methods in molecular biology* 2011, 744:145-157.
259. Balcells I, Cirera S, Busk PK: Specific and sensitive quantitative RT-PCR of miRNAs with DNA primers. *BMC biotechnology* 2011, 11:70.
260. Benes, V. Identification of cytokine-induced modulation of microRNA expression and secretion as measured by a novel microRNA specific qPCR assay / Benes V, Collier P, Kordes C, Stolte J, Rausch T, Muckenthaler MU, Haussinger D, Castoldi M // *Sci Rep.* – 2015. – V. 5. – P. 11590.
261. Androvic, P. Two-tailed RT-qPCR: a novel method for highly accurate miRNA quantification / Androvic P, Valihrach L, Elling J, Sjoback R, Kubista M // *Nucleic acids research.* – 2017. – V. 45(15). – P. e144.
262. Коробкина, Е.А. Сравнительный анализ методов детекции микро-рнк с помощью обратной транскрипции и количественной полимеразной цепной реакции (ОТ-ПЦР) / Коробкина ЕА, Князева МС, Киль ЮВ, Титов СЕ, Малек АВ // *Клиническая и лабораторная диагностика.* – 2018. – Т. 63(11). – С. 722-728.
263. Самсонов, Р.Б. Выделение и анализа экзосомальных микро-РНК из мочи: новый метод диагностики рака предстательной железы / Самсонов РБ, Штам ТА, Бурдаков ВС, Глотов АС, Цырлина ЕВ, Носов АК, Евтушенко ВИ, Филатов МВ, Малек АВ // *Экспериментальная и клиническая урология.* – 2015. – Т. 4. – С. 28-32.

264. Самсонов, Р.Б. Оценка диагностической роли микроРНК в составе экзосом циркулирующей крови при раке щитовидной железы / Самсонов РБ, Бурдаков ВС, Ракитина РА, Нажмудинов РА, Васильев ДА, Раджабова ЗА, Филатов МВ, Малек АВ // Опухоли головы и шеи. – 2015. – Т. 3. – С. 45-49.
265. Самсонов, Р.Б. Метод дифференциальной диагностики узловых заболеваний щитовидной железы: анализ комбинации микроРНК (миРНК-21, -181а, -146а) / Самсонов РБ, Бурдаков ВС, Штам ТА, Раджабова ЗА, Чебуркин ЮВ, Васильев ДА, Цырлина ЕВ, Титов СЕ, Иванов МК, Филатов МВ, Малек АВ // Опухоли головы и шеи. – 2017. – Т. 2. – С. 16-24.
266. Коваленко, И.М. Экзосомальные микро-РНК - потенциальный предиктивный маркер эффекта неoadьювантной терапии рака молочной железы / Коваленко ИМ, Самсонов РБ, Штам ТА, Цырлина ЕВ, Камышинский РА, Семиглазова ТЮ, Дашян ГА, Берштейн ЛМ, Семиглазов ВФ, Малек АВ // Вопросы онкологии. – 2018. – Т. 64(6). – С.758-767.
267. Jin, J. Placental exosomes: A proxy to understand pregnancy complications / Jin J, Menon R // Am J Reprod Immunol. – 2018. – V. 79(5). – P. e12788.
268. Herrera-Van Oostdam, A.S. Placental exosomes viewed from an 'omics' perspective: implications for gestational diabetes biomarkers identification / Herrera-Van Oostdam AS, Salgado-Bustamante M, Lopez JA, Herrera-Van Oostdam DA, Lopez-Hernandez Y // Biomark Med. – 2019. – V. 13(8). – P. 675-684.
269. Trovato, E. Extracellular Vesicles: Delivery Vehicles of Myokines / Trovato E, Di Felice V, Barone R // Front Physiol. – 2019. – V.10. – P. 522.
270. Nie, Y. Skeletal muscle-derived exosomes regulate endothelial cell functions via reactive oxygen species-activated nuclear factor-kappaB signaling / Nie Y, Sato Y, Garner RT, Kargl C, Wang C, Kuang S, Gilpin CJ, Gavin TP // Exp Physiol. – 2019. – V.104(8). – P. 1262-1273.
271. Fleshner, M. Exosomes, DAMPs and miRNA: Features of Stress Physiology and Immune Homeostasis / Fleshner M, Crane CR // Trends Immunol. – 2017. – V. 38(10). – P. 768-776.

272. Cao, Q. Exosomal long noncoding RNAs in aging and age-related diseases / Cao Q, Guo Z, Yan Y, Wu J, Song C // *IUBMB Life*. – 2019. -- doi: 10.1002/iub.2141.
273. Fulzele, S. Muscle-derived miR-34a increases with age in circulating extracellular vesicles and induces senescence of bone marrow stem cells / Fulzele S, Mendhe B, Khayrullin A, Johnson M, Kaiser H, Liu Y, Isales CM, Hamrick MW // *Aging (Albany NY)*. – 2019. – V. 11(6). – P. 1791-1803.
274. Carandini, T. Microvesicles: What is the Role in Multiple Sclerosis? / Carandini T, Colombo F, Finardi A, Casella G, Garzetti L, Verderio C, Furlan R // *Front Neurol*. – 2015. – V. 6. – P. 111.
275. Harris, V.K. Biomarkers of therapeutic response in multiple sclerosis: current status / Harris VK, Sadiq SA // *Mol Diagn Ther*. – 2014. – V. 18(6). – P. 605-617.
276. Goetzl, E.J. Altered cargo proteins of human plasma endothelial cell-derived exosomes in atherosclerotic cerebrovascular disease / Goetzl EJ, Schwartz JB, Mustapic M, Lobach IV, Daneman R, Abner EL, Jicha GA // *FASEB J*. – 2017. – V. 31(8). – P. 3689-3694.
277. Castano, C. Exosomes and diabetes / Castano C, Novials A, Parrizas M // *Diabetes Metab Res Rev*. – 2019. – V. 35(3). – P. e3107.
278. Kanninen, K. M. Exosomes as new diagnostic tools in CNS diseases / Kanninen KM, Bister N, Koistinaho J, Malm T // *Biochim Biophys Acta*. – 2016. – V. 1862(3). – P. 403-410.
279. Wolfers, J. Tumor-derived exosomes are a source of shared tumor rejection antigens for CTL cross-priming / Wolfers J, Lozier A, Raposo G, Regnault A, They C, Masurier C, Flament C, Pouzieux S, Faure F, Tursz T // *Nature medicine*. – 2001. – V. 7(3). – P. 297-303.
280. Liu, C. Murine mammary carcinoma exosomes promote tumor growth by suppression of NK cell function / Liu C, Yu S, Zinn K, Wang J, Zhang L, Jia Y, Kappes JC, Barnes S, Kimberly RP, Grizzle WE // *Journal of immunology*. – 2006. – V. 176(3). – P. 1375-1385.
281. Xiang, X. Induction of myeloid-derived suppressor cells by tumor exosomes / Xiang X, Poliakov A, Liu C, Liu Y, Deng ZB, Wang J, Cheng Z, Shah SV, Wang GJ,

- Zhang L // International journal of cancer Journal international du cancer. – 2009. – V. 124(11). – P. 2621-2633.
282. Abusamra, A.J. Tumor exosomes expressing Fas ligand mediate CD8+ T-cell apoptosis / Abusamra AJ, Zhong Z, Zheng X, Li M, Ichim TE, Chin JL, Min WP // Blood cells, molecules & diseases. – 2005. – V. 35(2). – P. 169-173.
283. Kim, J.W. Fas ligand-positive membranous vesicles isolated from sera of patients with oral cancer induce apoptosis of activated T lymphocytes / Kim JW, Wieckowski E, Taylor DD, Reichert TE, Watkins S, Whiteside TL // Clinical cancer research: an official journal of the American Association for Cancer Research. – 2005. – V. 11(3). – P. 1010-1020.
284. Yu, S. Tumor exosomes inhibit differentiation of bone marrow dendritic cells / Yu S, Liu C, Su K, Wang J, Liu Y, Zhang L, Li C, Cong Y, Kimberly R, Grizzle WE // Journal of immunology. – 2007. – V. 178(11). – P. 6867-6875.
285. Iero, M. Tumour-released exosomes and their implications in cancer immunity / Iero M, Valenti R, Huber V, Filipazzi P, Parmiani G, Fais S, Rivoltini L // Cell death and differentiation. – 2008. – V. 15(1). – P. 80-88.
286. Zhang, L. The 786-0 renal cancer cell-derived exosomes promote angiogenesis by downregulating the expression of hepatocyte cell adhesion molecule / Zhang L, Wu X, Luo C, Chen X, Yang L, Tao J, Shi J // Molecular medicine reports. – 2013. – V. 8(1). – P. 272-276.
287. Kucharzewska, P. Exosomes reflect the hypoxic status of glioma cells and mediate hypoxia-dependent activation of vascular cells during tumor development / Kucharzewska P, Christianson HC, Welch JE, Svensson KJ, Fredlund E, Ringner M, Morgelin M, Bourseau-Guilmain E, Bengzon J, Belting M // Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. – 2013. – V. 110(18). – P. 7312-7317.
288. Webber, J.P. Differentiation of tumour-promoting stromal myofibroblasts by cancer exosomes / Webber JP, Spary LK, Sanders AJ, Chowdhury R, Jiang WG, Steadman R, Wymant J, Jones AT, Kynaston H, Mason MD // Oncogene. – 2015. – V. 34(3). – P. 290-302.

289. Webber, J. Cancer exosomes trigger fibroblast to myofibroblast differentiation / Webber J, Steadman R, Mason MD, Tabi Z, Clayton A // *Cancer research*. – 2010. – V. 70(23). – P. 9621-9630.
290. Swami, M. Cancer: exosomes from the stroma / Swami M // *Nature Medicine*. -- 2013. – V. 19. – P. 142.
291. Nieman, K.M. Adipose tissue and adipocytes support tumorigenesis and metastasis / Nieman KM, Romero IL, Van Houten B, Lengyel E // *Biochim Biophys Acta*. – 2013. – V. 1831(10). – P. 1533-41.
292. Nieman, K.M. Adipocytes promote ovarian cancer metastasis and provide energy for rapid tumor growth / Nieman KM, Kenny HA, Penicka CV, Ladanyi A, Buell-Gutbrod R, Zillhardt MR, Romero IL, Carey MS, Mills GB, Hotamisligil GS // *Nat Med*. – 2011. – V. 17(11). – P. 1498-1503.
293. Hood, J.L. Exosomes released by melanoma cells prepare sentinel lymph nodes for tumor metastasis / Hood JL, San RS, Wickline SA // *Cancer research*. – 2011. – V. 71(11). – P. 3792-3801.
294. Mu, W. Host matrix modulation by tumor exosomes promotes motility and invasiveness / Mu W, Rana S, Zoller M // *Neoplasia*. – 2013. – V. 15(8). – P. 875-887.
295. Ji, H. Proteome profiling of exosomes derived from human primary and metastatic colorectal cancer cells reveal differential expression of key metastatic factors and signal transduction components / Ji H, Greening DW, Barnes TW, Lim JW, Tauro BJ, Rai A, Xu R, Adda C, Mathivanan S, Zhao W // *Proteomics*. – 2013. – V. 13(10-11). – P. 1672-1686.
296. Escrevente, C. Interaction and uptake of exosomes by ovarian cancer cells / Escrevente C, Keller S, Altevogt P, Costa J // *BMC cancer*. – 2011. – V. 11. – P. 108.
297. Samsonov, R.B. Extraction and analysis of the exosomal micro-RNA from the urine: new method of the prostate cancer diagnostics / Samsonov RB, Shtam TA, Burdakov VS, Glotov AS, Tsyrlina EV, Nosov AK, Evtushenko VI, Filatov MV, Malek AV // *Experimental and Clinical Urology*. – 2015. – V. 4. – P. 28-32.
298. Shtam, T. Functional properties of circulating exosomes mediated by surface-attached plasma proteins / Shtam T, Naryzhny S, Kopylov A, Petrenko E, Samsonov

- R, Kamyshinsky R, Zabrodsкая Y, Nikitin D, Sorokin M, Buzdin A, Malek A. // *J Hematology*. – 2018. – V. 7(4). – P. 149-152.
299. Huang, da W. Systematic and integrative analysis of large gene lists using DAVID bioinformatics resources / Huang da W, Sherman BT, Lempicki RA // *Nature protocols*. – 2009. – V. 4(1). – P. 44-57.
300. Huang, da W. Bioinformatics enrichment tools: paths toward the comprehensive functional analysis of large gene lists / Huang da W, Sherman BT, Lempicki RA // *Nucleic acids research*. – 2009. – V. 37(1). – P. 1-13.
301. Nakaya, A. KEGG OC: a large-scale automatic construction of taxonomy-based ortholog clusters / Nakaya A, Katayama T, Itoh M, Hiranuka K, Kawashima S, Moriya Y, Okuda S, Tanaka M, Tokimatsu T, Yamanishi Y // *Nucleic acids research*. – 2013. – V. 41. – P. 353-357.
302. Schaefer, C.F. PID: the Pathway Interaction Database / Schaefer CF, Anthony K, Krupa S, Buchoff J, Day M, Hannay T, Buetow KH // *Nucleic acids research*. – 2009. – V. 37. – P. 674-679.
303. Croft, D. The Reactome pathway knowledgebase / Croft D, Mundo AF, Haw R, Milacic M, Weiser J, Wu G, Caudy M, Garapati P, Gillespie M, Kamdar MR // *Nucleic acids research*. – 2014. – V. 42. – P. 472-477.
304. Malek, A. A sensitive polymerase chain reaction-based method for detection and quantification of metastasis in human xenograft mouse models / Malek A, Catapano CV, Czubyko F, Aigner A // *Clin Exp Metastasis*. – 2010. – V. 27(4). – P. 261-271.
305. White, R.M. Transparent adult zebrafish as a tool for in vivo transplantation analysis / White RM, Sessa A, Burke C, Bowman T, LeBlanc J, Ceol C, Bourque C, Dovey M, Goessling W, Burns CE // *Cell stem cell*. – 2008. – V. 2(2). – P. 183-189.
306. Purushothaman, A. Fibronectin on the Surface of Myeloma Cell-derived Exosomes Mediates Exosome-Cell Interactions / Purushothaman A, Bandari SK, Liu J, Mobley JA, Brown EE, Sanderson RD // *J Biol Chem*. – 2016. – V. 291(4). – P. 1652-1663.
307. Gan, L. Extracellular matrix protein 1 promotes cell metastasis and glucose metabolism by inducing integrin beta4/FAK/SOX2/HIF-1alpha signaling pathway in

- gastric cancer / Gan L, Meng J, Xu M, Liu M, Qi Y, Tan C, Wang Y, Zhang P, Weng W, Sheng W // *Oncogene*. – 2018. – V. 37(6). – P. 744-755.
308. Huynh, K.C. Impact of shear stress on Src and focal adhesion kinase phosphorylation in fibrinogen-adherent platelets / Huynh KC, Gyenes M, Nguyen TH, Vo TV, Stoldt VR // *Blood coagulation & fibrinolysis: an international journal in haemostasis and thrombosis*. – 2017. – V. 28(4). – P. 279-285.
309. Yakovlev, S. Polymerisation of fibrin alphaC-domains promotes endothelial cell migration and proliferation / Yakovlev S, Mikhailenko I, Tsurupa G, Belkin AM, Medved L // *Thrombosis and haemostasis*. – 2014. – V. 112(6). – P. 1244-1251.
310. Min, S.K. A vitronectin-derived peptide reverses ovariectomy-induced bone loss via regulation of osteoblast and osteoclast differentiation / Min SK, Kang HK, Jung SY, Jang DH, Min BM // *Cell death and differentiation*. – 2018. – V. 25(2). – P. 268-281.
311. Li, C.L. Fibronectin induces epithelial-mesenchymal transition in human breast cancer MCF-7 cells via activation of calpain / Li CL, Yang D, Cao X, Wang F, Hong DY, Wang J, Shen XC, Chen Y // *Oncology letters*. – 2017. – V. 13(5). – P. 3889-3895.
312. Ra, S.H. Keratoacanthoma and squamous cell carcinoma are distinct from a molecular perspective / Ra SH, Su A, Li X, Zhou J, Cochran AJ, Kulkarni RP, Binder SW // *Modern pathology: an official journal of the United States and Canadian Academy of Pathology*. – 2015. – V. 28(6). – P. 799-806.
313. Schaller, M.D. Cellular functions of FAK kinases: insight into molecular mechanisms and novel functions / Schaller MD // *Journal of cell science*. – 2010. – V. 123(7). – P. 1007-1013.
314. Sulzmaier, F.J. FAK in cancer: mechanistic findings and clinical applications / Sulzmaier FJ, Jean C, Schlaepfer DD // *Nature reviews Cancer*. – 2014. – V. 14(9). – P. 598-610.
315. Luo, M. Focal adhesion kinase: a prominent determinant in breast cancer initiation, progression and metastasis / Luo M, Guan JL // *Cancer letters*. – 2010. – V. 289(2). – P. 127-139.

316. Genna, A. FAK family kinases: The Yin and Yang of cancer cell invasiveness / Genna A, Gil-Henn H // *Mol Cell Oncol.* – 2018. – V. 5(4). – P. e1449584.
317. Самсонов, Р.Б. Стимуляция метастатической активности клеток рака молочной железы экзосомами плазмы / Самсонов РБ, Коваленко ИМ, Васильев ДА, Цырлина ЕВ, Дашян ГА, Шохат-Карвальо Х, Карасик Д, Берштейн ЛМ, Лютынский ВВ, Малек АВ // *Российский биотерапевтический журнал.* – 2016. – V. 15(2). – P. 6-15.
318. Stranford, D.M. Delivery of Biomolecules via Extracellular Vesicles: A Budding Therapeutic Strategy / Stranford DM, Leonard JN // *Adv Genet.* – 2017. – V. 98. – P. 155-175.
319. Karunaratne, D.N. Natural Carriers for siRNA Delivery / Karunaratne DN, Jafari M, Ranatunga RJ, Siriwardhana A // *Curr Pharm Des.* – 2015. – V. 21(31). – P. 4529-4540.
320. Kumar, L. Exosomes: Natural Carriers for siRNA Delivery / Kumar L, Verma S, Vaidya B, Gupta V // *Curr Pharm Des.* – 2015. – V. 21(31). – P. 4556-4565.
321. Borel, F. Design of AAV Vectors for Delivery of RNAi / Borel F, Mueller C // *Methods Mol Biol.* – 2019. – V. 1950. – P. 3-18.
322. Xue, H.Y. Lipid-Based Nanocarriers for RNA Delivery / Xue HY, Guo P, Wen WC, Wong HL // *Curr Pharm Des.* – 2015. – V. 21(22). – P. 3140-3147.
323. Malek, A. PEG grafting of polyethylenimine (PEI) exerts different effects on DNA transfection and siRNA-induced gene targeting efficacy / Malek A, Czubayko F, Aigner A // *J Drug Target.* – 2008. – V. 16(2). – P. 124-139.
324. Gunther, M. Polyethylenimines for RNAi-mediated gene targeting in vivo and siRNA delivery to the lung / Gunther M, Lipka J, Malek A, Gutsch D, Kreyling W, Aigner A // *Eur J Pharm Biopharm.* – 2011. – V. 77(3). – P. 438-449.
325. Malek, A. In vivo pharmacokinetics, tissue distribution and underlying mechanisms of various PEI(-PEG)/siRNA complexes / Malek A, Merkel O, Fink L, Czubayko F, Kissel T, Aigner A // *Toxicol Appl Pharmacol.* – 2009. – V. 236(1). – P. 97-108.

326. Aigner, A. Delivery systems for the direct application of siRNAs to induce RNA interference (RNAi) in vivo / Aigner A // *J Biomed Biotechnol.* – 2006. – V. 2006(4). – P. 71659.
327. Herrera-Carrillo, E. Improving miRNA Delivery by Optimizing miRNA Expression Cassettes in Diverse Virus Vectors / Herrera-Carrillo E, Liu YP, Berkhout B // *Hum Gene Ther Methods.* – 2017. – V. 28(4). – P. 177-190.
328. Hobel, S. Polyethylenimines for siRNA and miRNA delivery in vivo / Hobel S, Aigner A // *Wiley Interdiscip Rev Nanomed Nanobiotechnol.* – 2013. – V. 5(5). – P. 484-501.
329. Wang, H. Nanostructured lipid carriers for MicroRNA delivery in tumor gene therapy / Wang H, Liu S, Jia L, Chu F, Zhou Y, He Z, Guo M, Chen C, Xu L // *Cancer Cell Int.* – 2018. – V. 18. – P. 101.
330. Yan, Y. Nanosized functional miRNA liposomes and application in the treatment of TNBC by silencing Slug gene / Yan Y, Li XQ, Duan JL, Bao CJ, Cui YN, Su ZB, Xu JR, Luo Q, Chen M, Xie Y // *Int J Nanomedicine.* – 2019. – V. 14. – P. 3645-3667.
331. Beg, M.S. Phase I study of MRX34, a liposomal miR-34a mimic, administered twice weekly in patients with advanced solid tumors / Beg MS, Brenner AJ, Sachdev J, Borad M, Kang YK, Stoudemire J, Smith S, Bader AG, Kim S, Hong DS // *Invest New Drugs.* – 2017. – V. 35(2). – P. 180-188.
332. Sherif, A.Y. Engineering of exosomes: Steps towards green production of drug delivery systems / Sherif AY, Harisa GI, Alanazi FK, Youssof AME // *Curr Drug Targets.* – 2019. -- doi: 10.2174/1389450120666190715104100.
333. Schafer, J. Liposome-polyethylenimine complexes for enhanced DNA and siRNA delivery / Schafer J, Hobel S, Bakowsky U, Aigner A // *Biomaterials.* – 2010. – V. 31(26). – P. 6892-6900.
334. Ewe, A. Liposome-polyethylenimine complexes (DPPC-PEI lipopolyplexes) for therapeutic siRNA delivery in vivo / Ewe A, Panchal O, Pinnapireddy SR, Bakowsky U, Przybylski S, Temme A, Aigner A // *Nanomedicine.* – 2017. – V. 13(1). – P. 209-218.

335. Alvarez-Erviti, L. Delivery of siRNA to the mouse brain by systemic injection of targeted exosomes / Alvarez-Erviti L, Seow Y, Yin H, Betts C, Lakhali S, Wood MJ // *Nat Biotechnol.* – 2011. – V. 29(4). – P. 341-345.
336. Wahlgren, J. Plasma exosomes can deliver exogenous short interfering RNA to monocytes and lymphocytes / Wahlgren J, De LKT, Brisslert M, Vaziri Sani F, Telemo E, Sunnerhagen P, Valadi H // *Nucleic Acids Res.* – 2012. – V. 40(17). – P. e130.
337. Shtam, T.A. Exosomes are natural carriers of exogenous siRNA to human cells in vitro / Shtam TA, Kovalev RA, Varfolomeeva EY, Makarov EM, Kil YV, Filatov MV // *Cell Commun Signal.* – 2013. – V. 11. – P. 88.
338. Banizs, A.B. In vitro evaluation of endothelial exosomes as carriers for small interfering ribonucleic acid delivery / Banizs AB, Huang T, Dryden K, Berr SS, Stone JR, Nakamoto RK, Shi W, He J // *Int J Nanomedicine.* – 2014. – V. 9. – P. 4223-4230.
339. Zhang, Y. Microvesicle-mediated delivery of transforming growth factor beta1 siRNA for the suppression of tumor growth in mice / Zhang Y, Li L, Yu J, Zhu D, Zhang Y, Li X, Gu H, Zhang CY, Zen K // *Biomaterials.* – 2014. – V. 35(14). – P. 4390-4400.
340. Ohno, S. Exosome-Mediated Targeted Delivery of miRNAs / Ohno S, Kuroda M // *Methods Mol Biol.* – 2016. – V. 1448. – P. 261-270.
341. Fonsato, V. Human liver stem cell-derived microvesicles inhibit hepatoma growth in SCID mice by delivering antitumor microRNAs / Fonsato V, Collino F, Herrera MB, Cavallari C, Deregibus MC, Cisterna B, Bruno S, Romagnoli R, Salizzoni M, Tetta C // *Stem Cells.* – 2012. – V. 30(9). – P. 1985-1998.
342. Werth, S. A low molecular weight fraction of polyethylenimine (PEI) displays increased transfection efficiency of DNA and siRNA in fresh or lyophilized complexes / Werth S, Urban-Klein B, Dai L, Hobel S, Grzelinski M, Bakowsky U, Czubyko F, Aigner A // *J Control Release.* – 2006. – V. 112(2). – P. 257-270.
343. Hobel, S. Polyethylenimine/small interfering RNA-mediated knockdown of vascular endothelial growth factor in vivo exerts anti-tumor effects synergistically

- with Bevacizumab / Hobel S, Koburger I, John M, Czubyko F, Hadwiger P, Vornlocher HP, Aigner A // *J Gene Med.* – 2010. – V.12(3). – P. 287-300.
344. Kar, R. Survivin siRNA increases sensitivity of primary cultures of ovarian cancer cells to paclitaxel / Kar R, Palanichamy JK, Banerjee A, Chattopadhyay P, Jain SK, Singh N // *Clin Transl Oncol.* – 2015. – V. 17(9). – P. 737-742.
345. Wang, T. Alpha3 Integrin Mediates Radioresistance of Prostate Cancer Cells through Regulation of Survivin / Wang T, Huang J, Vue M, Alavian MR, Goel HL, Altieri DC, Languino LR, FitzGerald TJ // *Mol Cancer Res.* – 2019. – V. 17(2). – P. 398-408.
346. Cai, M. Induction of apoptosis of human colon cancer cells by siRNA recombinant expression vector targeting survivin gene / Cai M, Wang G, Tao K, Cai C // *J Huazhong Univ Sci Technolog Med Sci.* – 2009. – V. 29(1). – P. 45-49.
347. Piepoli, A. Mirna expression profiles identify drivers in colorectal and pancreatic cancers / Piepoli A, Tavano F, Copetti M, Mazza T, Palumbo O, Panza A, di Mola FF, Paziienza V, Mazzoccoli G, Biscaglia G // *PLoS One.* – 2012. – V. 7(3). – P. e33663.
348. Cooks, T. Mutant p53 cancers reprogram macrophages to tumor supporting macrophages via exosomal miR-1246 / Cooks T, Pateras IS, Jenkins LM, Patel KM, Robles AI, Morris J, Forsheo T, Appella E, Gorgoulis VG, Harris CC // *Nat Commun.* – 2018. – V. 9(1). – P. 771.
349. Sharma, S. Tumor-derived exosomes in ovarian cancer - liquid biopsies for early detection and real-time monitoring of cancer progression / Sharma S, Zuniga F, Rice GE, Perrin LC, Hooper JD, Salomon C // *Oncotarget.* – 2017. – V. 8(61). – P. 104687-104703.
350. Sharma, S. Methods to Enrich Exosomes from Conditioned Media and Biological Fluids / Sharma S, Scholz-Romero K, Rice GE, Salomon C // *Methods Mol Biol.* – 2018. – V. 1710. – P. 103-115.
351. Sahin, F. In Vitro Wound Healing Activity of Wheat-Derived Nanovesicles / Sahin F, Kocak P, Gunes MY, Ozkan I, Yildirim E, Kala EY // *Appl Biochem Biotechnol.* – 2019. – V. 188(2). – P. 381-394.

352. Akuma, P. Naturally occurring exosome vesicles as potential delivery vehicle for bioactive compounds / Akuma P, Okagu OD, Udenigwe CC // *Front Sustain Food Syst.* – 2019. – V. 3(23). -- doi.org/10.3389/fsufs.2019.00023
353. Zhupanyn, P. Extracellular vesicle (ECV)-modified polyethylenimine (PEI) complexes for efficient siRNA delivery in vitro and in vivo / Zhupanyn P, Ewe A, Büch T, Malek A, Rademacher P, Muller C, Reinert A, Jaumes Y, Aigner A // *Journal of Controlled Release* – 2020. – V. 319. – P. 63-76.

СПИСОК ИЛЛЮСТРАЦИЙ

Глава	Рисунок	Название рисунка
1.1.	1	Везикулярный состав плазмы.
1.2.	2	Методы визуализации ВНВ (экзосом).
1.2.	3	Методы анализа физических характеристик ВНВ (экзосом).
1.3.	4	Биогенез экзосом (схема).
1.5.	5	Патологические эффекты опухолевых экзосом (схема)
2.1.	6	Результаты оценки практики работы с ВМВ 196 исследователей из 30 стран, проведенной Международным обществом по изучению внеклеточных везикул, The International Society for Extracellular Vesicles
2.3.1.	7	Характеристика экзосом, выделенных из плазмы методом ультра-центрифугирования.
2.3.2.	8	Характеристика экзосом, выделенных из культуральной среды путем агглютинации лектином.
2.3.2.	9	Характеристика экзосом, выделенных из культуральной среды и мочи методом агглютинации лектином.
2.3.3.	10	Выделения экзосом с помощью модифицированного метода двух-фазного разделения
2.3.4.	11	Выделение экзосом с помощью магнитных частиц и аптамеров
3.4.1.	12	Дизайн исследования (схема)
3.4.1.	13	Физико-химические характеристики везикул, выделенных из плазмы
3.4.1.	14	Сравнение данных по экспрессии 84 микроРНК в образце пациента N до и после операции
3.4.1.	15	Анализ экспрессии miR-93, miR-181a и miR-223 на независимых группах

- 3.4.1. 16 Оценка диагностической ценности «реципрокной микроРНК пары» - miR-223/miR-181a с помощью ROC-анализа
- 3.4.2. 17 Физико-химическая характеристика везикул, выделенных из мочи
- 3.4.2. 18 Результаты анализа микроРНК из экзосом мочи
- 3.4.3. 19 Дизайн исследования (схема)
- 3.4.3. 20 Физико-химические характеристики везикул, выделенных из плазмы
- 3.4.3. 21 Содержание микроРНК в экзосомах плазмы пациентов с папиллярным РЦЖ
- 3.4.3. 22 Анализ экспрессии микроРНК в ткани папиллярного РЦЖ нормальной ЦЖ
- 3.4.3. 23 Анализ концентрации микроРНК в экзосомах плазмы пациентов с различными УОЗЦ
- 3.4.3. 24 Пример диагностически информативной комбинации микроРНК: miR-181a, miR-146a, miR-21
- 3.4.4. 25 Выборка пациентов и распределение по группам сравнения
- 3.4.4. 26 Физико-химические характеристики везикул, выделенных из плазмы
- 3.4.4. 27 Анализ концентрации экзосомальной фракции циркулирующих микроРНК (miR-34a, miR-451) в плазме пациенток с РМЖ в двух группах с разным ответом на НХТ
- 3.4.5.1. 28 Детекция ПСМА(+) экзосом в плазме здоровых мужчин и женщин
- 3.4.5.1. 29 Выделение ПСМА(+) везикул и анализ экзосомальных микроРНК
- 3.4.5.1. 30 Анализ концентрации молекулы miR-451 в ПСМА(+) экзосомах здоровых доноров и пациентов с РПЖ

- 3.4.5.2. 31 Схематическое изображение различных методов ОТ-ПЦР для анализа микроРНК
- 3.4.5.2. 32 Результаты сравнительного анализа ОТ-ПЦР систем для детекции miR-451
- 4.4.1. 33 Характеристика экзосом, выделенных из плазмы
- 4.4.1. 34 Изменение структуры поверхности экзосом после обработки трипсином
- 4.4.2. 35 Эффект воздействия экзосом плазмы на адгезивные характеристики клеток РМЖ *in vitro*
- 4.4.2. 36 Эффект воздействия экзосом плазмы на распределения клеток РМЖ из места инъекции (желточный мешок) в толще тела эмбриона данио-рерио
- 4.4.3. 37 Оценка миграции клеток РМЖ по поверхности пластика и влияния экзосом плазмы на активность миграции
- 4.4.3. 38 Оценка миграции клеток РМЖ в 3-мерном пространстве и влияния экзосом плазмы на активность миграции
- 4.4.4. 39 Активация FAK-зависимых сигнальных каскадов плазменными белками на поверхности экзосом (схема)
- 4.4.4. 40 Оценка роли киназы FAK в трансляции стимулирующего эффекта экзосом
- 5.4.1. 41 Оценка эффективности трансфекционного комплекса E_{co}(PEI/miR). Пояснения в тексте
- 5.4.2. 42 Оценка биологического эффекта трансфекции терапевтических молекул
- 5.4.3. 43 Сравнительная оценка трансфекционной активности экзосом, секретлируемых опухолевыми клетками разных линий
- 5.4.4. 44 Оценка терапевтической эффективности комплекса E_{co}(PEI/siSurv)