

На правах рукописи

МАЛЕК АНАСТАСИЯ ВАЛЕРЬЕВНА

**ВОЗМОЖНОСТИ ПРИМЕНЕНИЯ НАНОВЕЗИКУЛЯРНЫХ
ТЕХНОЛОГИЙ В ОНКОЛОГИИ**

14.01.12 – Онкология

АВТОРЕФЕРАТ

на соискание ученой степени
доктора медицинских наук

Санкт-Петербург – 2021

Работа выполнена в федеральном государственном бюджетном учреждении «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии им. Н.Н. Петрова» Министерства здравоохранения Российской Федерации (директор – доктор медицинских наук, профессор Беляев Алексей Михайлович)

Научные консультанты:

Доктор медицинских наук, профессор

Берштейн Лев Михайлович

Доктор биологических наук, профессор

Красильников Михаил Александрович

Официальные оппоненты:

Боженко Владимир Константинович, доктор медицинских наук заведующий отделом молекулярной биологии и экспериментальной терапии опухолей Федерального государственного бюджетного учреждения «Российский научный центр рентгено-радиологии» Министерства Здравоохранения Российской Федерации, г. Москва

Гуляева Людмила Федоровна, доктор биологических наук, руководитель лаборатории молекулярных механизмов канцерогенеза Научно-исследовательского института молекулярной биологии и биофизики (НИИМББ) Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Федеральный исследовательский центр фундаментальной и трансляционной медицины» (ФИЦ ФТМ), г. Новосибирск

Юнусова Наталья Валерьевна, доктор медицинских наук, ведущий научный сотрудник лаборатории биохимии опухолей Научно-исследовательского института (НИИ) онкологии Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Томский национальный исследовательский медицинский центр Российской академии наук» (Томского НИМЦ), г. Томск

Ведущая организация: Институт химической биологии и фундаментальной медицины Сибирского отделения Российской академии наук (ИХБФМ СО РАН), г. Новосибирск

Защита состоится «23» декабря 2021 года в 13:00 часов на заседании диссертационного совета 21.1.032.01 (Д 001.017.01) на базе ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России (115478, г. Москва, Каширское шоссе, д.23).

С диссертацией можно ознакомиться в научной библиотеке ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России (115478, г. Москва Каширское шоссе, д.24) и на сайте www.ronc.ru

Автореферат разослан «.....»2021 года

Ученый секретарь

диссертационного совета

доктор медицинских наук, профессор

Кадагидзе Заира Григорьевна

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

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 нано-везикул (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 крови). Возможность контролируемой модификации состава циркулирующих ВНВ 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, так как она определяет возможность создания принципиально новых диагностических и лечебных подходов. Социальная значимость проблемы своевременной диагностики и эффективной терапии онкологических заболеваний определяет актуальность темы данного исследования.

Цель исследования

Оценка возможностей применения нановезикулярных технологий в онкологии, включая разработку и оптимизацию технологий выделения и анализа ВНВ, оценку диагностического потенциала ВНВ в составе биологических жидкостей, исследование перспектив применения терапевтических нановезикулярных технологий.

Задачи исследования

1. Разработать методы выделения ВНВ, применимые к решению клинических задач, в частности:
 - 1.1. Оптимизировать стандартный протокол выделения ВНВ из плазмы с помощью ультрацентрифугирования;
 - 1.2. Разработать упрощенный метод выделения ВНВ из мочи;
 - 1.3. Разработать метод выделения ВНВ из плазмы, оптимизированный под задачу последующего анализа экзосомальных микроРНК с помощью обратной транскрипции и полимеразной цепной реакции;
 - 1.4. Разработать метод выделения ВНВ из плазмы, оптимизированный под задачу последующего анализа поверхностных белковых маркеров с помощью проточной цитометрии.
2. Оценить диагностический потенциал методов анализа везикулярных микроРНК на примере нескольких нозологий и определить пути оптимизации используемых технологий, в частности:
 - 2.1. Разработать методику и оценить диагностическую значимость анализа микроРНК из тотальной популяции ВНВ плазмы для диагностики колоректальной карциномы (КРК);
 - 2.2. Разработать методику и оценить диагностическую значимость анализа микроРНК из ВНВ мочи для диагностики рака предстательной железы (РПЖ);
 - 2.3. Разработать методику и оценить диагностическую значимость анализа микроРНК из тотальной популяции ВНВ плазмы крови для дифференциальной диагностики узловых заболеваний щитовидной железы (УОЩЖ);
 - 2.4. Разработать методику и оценить перспективы клинического применения анализа микроРНК из тотальной популяции ВНВ плазмы крови с целью прогнозирования эффекта неоадьювантной терапии рака молочной железы (РМЖ);
 - 2.5. Оценить возможность и целесообразность выделения тканеспецифичной фракции ВНВ 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.
3. Исследовать патофизиологические эффекты и молекулярные механизмы взаимодействия нормального пула ВНВ плазмы крови и опухолевых клеток, в частности:
 - 3.1. Исследовать структуру (состав поверхности) ВНВ плазмы;
 - 3.2. Изучить в условиях эксперимента (*in vitro*, *in vivo*) биологические эффекты, которые оказывают ВНВ плазмы на опухолевые клетки;
 - 3.3. Определить компоненты структуры ВНВ плазмы, опосредующие их взаимодействие с опухолевыми клетками;

3.4. Определить внутриклеточные сигнальные пути, опосредующие реакцию опухолевых клеток на ВНВ плазмы крови.

4. Разработать и протестировать в экспериментальных условиях метод «нагрузки» ВНВ «терапевтическими» РНК (сиРНК/siRNA, микроРНК/miRNA), в частности:

4.1. Разработать технологию «упаковки» комплексов РНК и катионных полимеров в ВНВ;

4.2. Оценить показатели трансфекционной эффективности комплексов на основе ВНВ в условиях *in vitro*;

4.3. Оценить влияние природы (источника) ВНВ на свойства трансфекционных комплексов;

4.4. Оценить терапевтическую эффективность введения сиРНК, в составе комплекса на основе ВНВ *in vivo*.

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 пресноводных рыб зебрафиш (*Danio-rerio*) и бестимусные мыши (*Foxp1nu*). 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 ультра-центрифугирования в качестве «референсного» метода. Для качественного и количественного анализа ВНВ, выделенных новыми методами, использовались технологии лазерной корреляционной спектроскопии (ЛКС), нано-трекового анализа (НТА), атомной силовой микроскопии (АСМ), крио-электронной микроскопии (Крио-ЭМ), проточной цитометрии, вестерн- / дот- блоттинга. Эти же технологии применялись в рамках других частей исследования при необходимости анализа структуры / состава ВНВ.

В рамках исследований, посвященных анализу диагностического потенциала везикулярных микроРНК (Глава 3), были использованы образцы плазмы и мочи здоровых доноров (n. 127) и онкологических пациентов (n. 262), проходивших 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. Статистическая обработка полученных данных была сделана с помощью традиционных методов в составе программ Graph Pad Prizm 6, Sigma Plot 12.

В рамках исследования структуры и биологических функций ВНВ плазмы, результаты которого представлены в Главе 4, была проведена масс-спектрометрия образцов ВНВ, для выборочной 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 (визуализация клеток после инъекции в желточный мешок эмбрионов рыб данио-рерио). С целью анализа роли ФАК-зависимого сигнального пути в регуляции ответа опухолевых клеток на экзосомальную стимуляцию, была использована линия клеток MDA-MB-231, в которых экспрессия ФАК 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 – «Ехо(PEI/siRNA)». В состав комплекса входили полиэтиленимин, синтетические РНК и ВНВ, выделенные из культуральных сред. 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, НСТ-116, РС-3, Saos-2). Для анализа терапевтической эффективности комплексов, в состав которых входила молекула РНК, ингибирующая синтез анти-апоптотического белка (Survivin), была использована модель: ксенографтная подкожная опухоль (РС-3) у иммуно-дефицитных (бестимусных) мышей линии Foxn1nu.

Научная новизна

Разработаны новые методы выделения ВНВ (экзосом) из биологических жидкостей. Технологичность и низкая стоимость предложенных методов предполагает возможность их внедрения в клиническую практику. В частности, разработаны оригинальные протоколы выделения экзосом из плазмы с целью последующего анализа экзосомальных микроРНК методом ОТ-ПЦР (патент на изобретение №2741776) и анализа белков экзосомальной мембраны с помощью проточной цитометрии (патент на изобретение №2741638).

Проведена оценка диагностической значимости везикулярных микроРНК для ряда онкологических нозологий, включая рак предстательной железы и колоректальный рак, предложен метод дифференциальной диагностики узловых образований щитовидной железы и метод прогнозирования эффекта нео-адьювантной терапии рака молочной железы.

Проведен анализ белкового состава поверхности циркулирующих ВНВ и получены новые данные о стимулирующем влиянии везикул плазмы на опухолевые клетки. В частности, показана

значимая роль мажорных белков плазмы, которые абсорбируются на мембране циркулирующих везикул и могут опосредовать стимулирующее влияние везикул на циркулирующие опухолевые клетки.

Разработана новая технология «упаковки» терапевтических РНК в трансфекционные комплексы на основе ВНВ 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, представленных в четвертой и пятой главах диссертационной 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.
3. Впервые показано, что везикулярная 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. Впервые показано, что «упаковка» трансфекционных комплексов, образованных катионным полимером (полиэтиленимином, PEI) и РНК (siRNA) в ВНВ, увеличивает их стабильность в условиях *in vitro* / *in vivo* экспериментов.
5. Впервые описан феномен различия трансфекционной активности ВНВ, секретлируемых различными культурами опухолевых клеток. Например, ВНВ, 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 исследования и представленных во второй и третьей главе диссертации. 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.

Личный вклад

Исследования, результаты которых представлены в диссертации, были спланированы, организованы и, в большинстве случаев, самостоятельно проведены автором. Глава 1 содержит авторский анализ данных отечественной и зарубежной научной литературы по теме диссертации. В Главах 2 и 3 представлены результаты, полученные в рамках инициативных НИР, проведенных в научной лаборатории онкоэндокринологии НМИЦ онкологии им. Н.Н. Петрова Минздрава России за период 2015 – 2019 гг. (РК 114120870157; А18-118012390157-2; А18-118012390156-5) под руководством и при непосредственном участии автора диссертации. В Главе 4 представлены результаты исследований, проведенных автором на базе Национального исследовательского центра «Курчатовский институт» (г. Москва) и Университета имени Бар-Илана (г. Цфат, Израиль), где автором были выполнены все *in vitro* и *in vivo* эксперименты и проведен анализ полученных данных. В Главе 5 представлены результаты исследований, выполненных в рамках российско-немецкого научного проекта, поддержанного РФФИ (15-54-12380) и Немецким научно-исследовательским обществом (Deutsche Forschungsgemeinschaft, DFG). Автор диссертации являлась руководителем российской научной группы, которая выполняла часть исследования согласно плану проекта.

Соответствие паспорту научной специальности

Диссертация соответствует паспорту специальности 14.01.12 – Онкология, пункт 2 (исследования по изучению этиологии и патогенеза злокачественных опухолей, основанные на достижениях ряда естественных наук (генетики, молекулярной биологии, морфологии, иммунологии, биохимии и др.).

Положения, выносимые на защиту

Методы выделения ВНВ (экзосом) из биологических жидкостей могут быть оптимизированы для решения определенных аналитических задач и использования в рутинной клинической практике.

Экзосомальные микроРНК представляют собой перспективные маркеры, на основе которых могут быть созданы тест-системы для первичной и дифференциальной диагностики онкологических заболеваний.

Нормальный пул ВНВ (экзосом) плазмы стимулирует адгезивную и миграционную активность опухолевых клеток и может играть патологическую роль в процессе метастатической диссеминации.

ВНВ (экзосомы) могут быть использованы для формирования системы доставки терапевтических молекул РНК (siRNA/microRNA). «Упаковка» трансфекционных комплексов на основе катионных полимеров в везикулярную мембрану оптимизирует функциональные характеристики последних.

Внедрение результатов исследования

По методологическим разработкам получены патенты на изобретение способов выделения экзосом из плазмы крови (№ 2741776, приоритет от 25.02.2020, № 2741638 приоритет от 11.03.2020).

Методы исследования ВНВ активно используются в работе научной лаборатории субклеточных технологий на базе ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Петрова» Минздрава России, на базе которого была проведена первая в стране научно-практическая конференция «Циркулирующие микровезикулы: практические аспекты исследований и клинические перспективы» в 2018 году. В рамках Петербургского международного онкологического форума в 2021 проведена образовательная сессия «Практика исследований внеклеточных нано-везикул: стандартные методы и новые технологии».

Апробация

Апробация диссертации состоялась на совместном заседании сотрудников научного отдела биологии опухолевого роста, научного отдела инновационных методов терапевтической онкологии и реабилитации, научного отдела канцерогенеза и онкогеронтологии и научного отдела иммунологии ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Петрова» Минздрава России 14 февраля 2020 года.

Публикации

По материалам диссертации опубликовано 12 статей в рецензируемых научных изданиях (ВАК). Отдельные аспекты исследования были представлены в виде тезисов или устных докладов на 24 российских и международных конференциях.

Объем и структура работы

Диссертация состоит из введения, пяти глав, заключения, списка сокращений и условных обозначений, списка литературы, включающего 353 источника, списка иллюстраций. Общий объем диссертации 266 страниц, включая 12 таблиц и 44 иллюстрации.

СОДЕРЖАНИЕ ДИССЕРТАЦИОННОЙ РАБОТЫ

Глава 1. Определение объекта исследования

Глава содержит детальный обзор литературы по теме диссертации. В главе описана история открытия внеклеточных нано-везикул (ВНВ), представлена систематика субклеточных нановезикулярных образований и тенденции ее изменения, описаны методы визуализации и анализа ВНВ, представлены результаты анализа современной научной литературы на тему общей биологии ВНВ и их участия в развитии онкологических заболеваний. На основе представленных данных, сформулирована цель и задачи исследования.

Глава 2. Разработка методов выделения ВНВ из биологических жидкостей

2.1. Стандартная технология выделения ВНВ

Стандартная технология выделения экзосом предполагает проведение нескольких раундов центрифугирования с постепенным повышением величины центробежного ускорения (xG). Последний этап этой процедуры – ультра-центрифугирование с рекомендованным ускорением выше 100.000 xG. Но детальные условия (протокол подготовки материала, параметры раундов центрифугирования, необходимость повторов) могут отличаться и должны быть оптимизированы под конкретное оборудование и экспериментальные задачи. В рамках работы было проведено тестирование различных режимов центрифугирования. Сравнительный анализ выделенных везикул был проведен методом ЛКС (предварительная оценка чистоты, распределения по размеру), НТА (количество, размер), проточной цитометрии (наличие поверхностных «экзосомальных» маркеров) и крио-ЭМ (морфология везикул), репрезентативный пример представлен на рисунке 1.

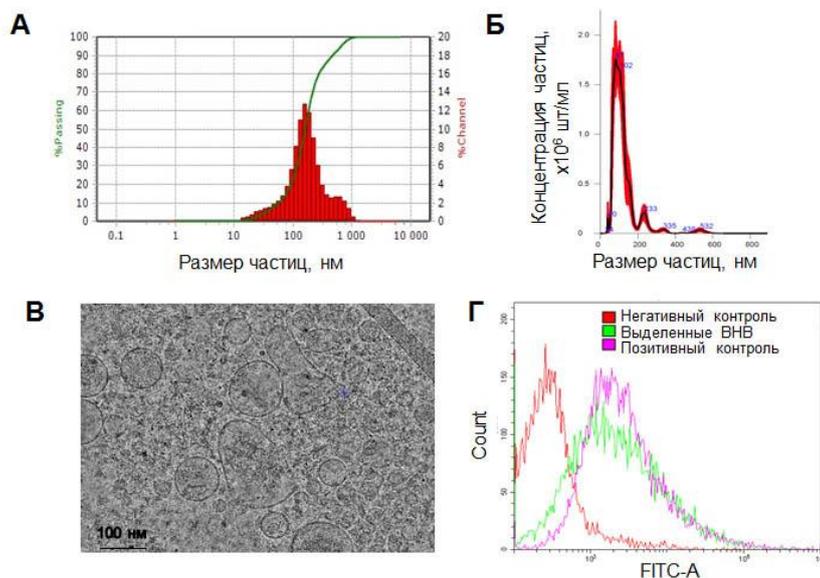


Рисунок 1 – Характеристика ВНВ, выделенных из плазмы методом ультра-центрифугирования. А) ЛКС; Б) АТН; В) Крио-ЭМ; Г) Проточная цитометрия

Так, оптимизированный протокол позволял выделять частицы везикулярной структуры с размером порядка 90 – 110 нм. Наличие в составе выделенных везикул классического «экзосомального» маркера тетраспанина CD63 было оценено с помощью проточной цитологии после неспецифической сорбции везикул на поверхности латексных частиц (4 μm) и инкубации с антителами с флуоресцентной меткой, FITC. В качестве позитивного контроля использован препарат ВНВ в составе набора ExoFACS/HansaBioMed. В соответствии с полученными данными (размер, морфология, концентрация, наличие «экзосомальных» маркеров в составе поверхностной мембраны) был выбран оптимальный протокол, который использовался в рамках последующих этапов работы в качестве «референсного» метода.

2.2. Выделение ВНВ из мочи

Анализ литературных данных позволил предположить, что поверхность мембраны ВНВ имеет структуру, сходную со структурой гликокаликса клетки. Лектины - гликопротеины растительного или животного происхождения, основные биологические функции которых основаны на связывании углеводных остатков на поверхности клеточных мембран. Таким образом, лектины имеют потенциал «склеивания» или агглютинации ВНВ, который определяется естественными характеристиками этого класса биологических молекул. В рамках исследования эта гипотеза была проверена сначала с использованием ВНВ, секретлируемых клетками *in vitro*, что позволило детально изучить процесс их агглютинации (Рисунок 2).

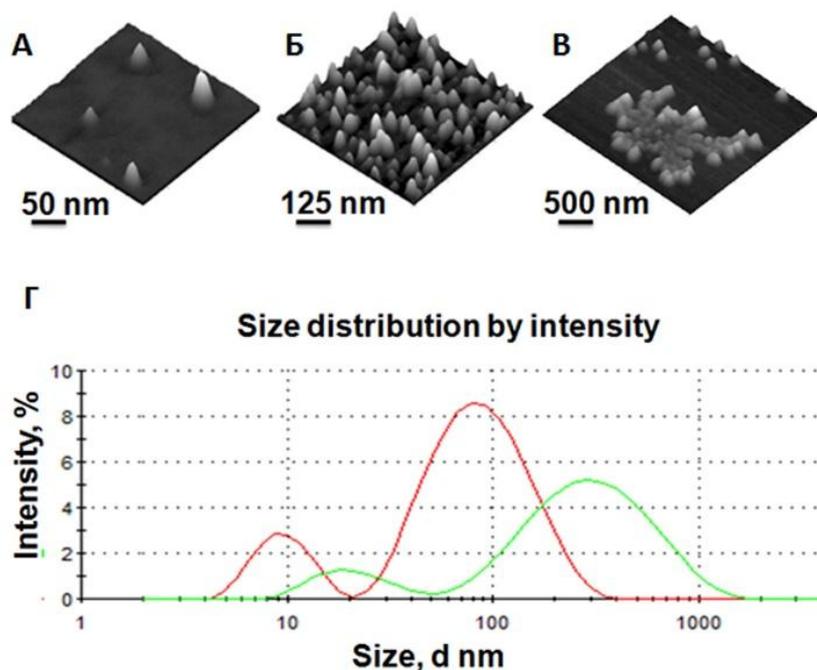


Рисунок 2 – Процесс агглютинации ВНВ в присутствии лектина (конканавалина А). А-В) Результат визуализации ВНВ с помощью АСМ; Г) Результаты анализа распределения ВНВ по размеру с помощью ЛКС

На рисунке 2 (А-В) представлен процесс агглютинации ВНВ при разном разрешении: до (А, Б) и после (В) инкубации с лектином. На рисунке 2Г представлены результаты анализа распределения ВНВ по размеру: красная линия – исходное состояние, зеленая – после инкубации с лектином. Полученные результаты подтвердили гипотезу об агглютинации ВНВ в присутствии лектинов, а сформированные комплексы ВНВ можно было осадить при щадящих режимах центрифугирования. Методика была оптимизирована для выделения ВНВ из мочи. Характеристики ВНВ (размер, наличие «экзосомальных» маркеров, профиль размера выделенной из везикул РНК), выделенных с помощью лектинов из мочи, позволили считать, что везикулярная популяция представлена преимущественно экзосомами, а метод достаточно прост и экономичен для последующего использования в рамках разработки диагностических технологий.

2.3. Выделение ВНВ из плазмы для последующего анализа везикулярных микроРНК методом ОТ-ПЦР (патент № 2741776)

Короткие регуляторные молекулы РНК (микроРНК) являются перспективными маркерами онкологических заболеваний. Клетки организма, включая клетки опухоли, секретируют микроРНК в составе белковых комплексов и в составе ВНВ. Последняя форма внеклеточных микроРНК особенно интересна. Предполагается, что везикулярные микроРНК наиболее стабильны в составе циркулирующей плазмы. Возможность выделения и последующего анализа ткане-специфичных популяций ВНВ определяет высокий диагностический потенциал методов анализа везикулярных микроРНК. Поэтому задача разработки технологии отделения ВНВ от белков плазмы, содержащих фракцию «не везикулярных» и диагностически менее информативных молекул микроРНК, является важной. На основе анализа соответствующей научной литературы и общих понятий о принципах выделения ВНВ из плазмы, было сделано предположение, что технология, основанная на феномене фазового разделения раствора двух полимеров, может обеспечить оптимальное решение поставленной задачи. Известно, что при определенном сочетании молекулярных масс и концентраций двух полимеров (декстрана и полиэтиленгликоля) их раствор формирует двухфазную систему. При этом везикулы концентрируются в фазе (р-ре) декстрана, а белки и белковые комплексы преимущественно «переходят» в фазу (р-р) полиэтиленгликоля. В рамках исследования разработан протокол формирования двухфазной полимерной системы (ПС) в плазме, проведен анализ ВНВ в составе нижней фазы (Рисунок 3).

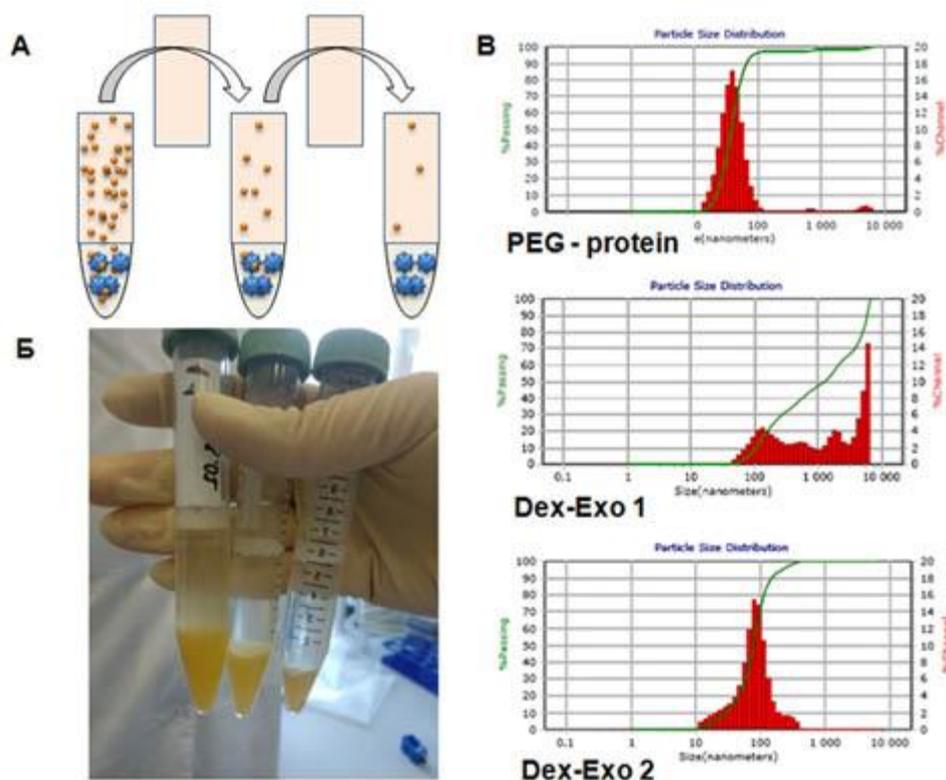


Рисунок 3 – Выделение ВНВ из плазмы с помощью двухфазной полимерной системы. А) Принцип метода; Б) Внешний вид пробирок в процессе выделения; В) Анализ распределения по размеру компонентов верхней фазы ПС, содержащей ПЭГ и белки плазмы (PEG-protein), и компонентов нижней фазы, содержащей декстран и ВНВ, после двух последующих разделений (Dex-Exo1, Dex-Exo2)

В рамках исследования был проведен детальный анализ выделенных ВНВ. С целью демонстрации успешности решения поставленной задачи, тотальная РНК была изолирована из препаратов ВНВ, полученных предложенным методом и тремя альтернативными (коммерческими наборами) из идентичного материала. Результаты ОТ-ПЦР анализа трех микроРНК, выраженные как значения C_t , свидетельствуют о высокой эффективности нового метода (Таблица 1).

Таблица 1 – Эффективность выделения везикулярной микроРНК с помощью ПС (C_t)

микроРНК	УЦ	ExoPrep HansaBioMed	SubX Capital Biosc	ExosomeIsoKit Invitrogen	ПС (Dex550/PEG20)
miR451	31.1	27.8	26.1	26.9	27.1
miR375	36.3	29.6	28.6	29.8	27.4
miR21	37.4	34.3	32.9	34.2	31.7

2.3. Выделение ВНВ из плазмы для последующего анализа поверхностных везикулярных белков методом проточной цитометрии (патент № 2741638)

Состав белковых маркеров на поверхности циркулирующих ВНВ отражает многие физиологические аспекты, включая тканевую принадлежность и состояние клеток, секретировавших везикулы. Оптимальным методом оценки белковых маркеров на поверхности ВНВ является проточная цитометрия. Но размер везикул сопоставим с порогом чувствительности большинства цитометров, поэтому для получения надежных результатов разработан ряд технологий, предполагающих фиксацию ВНВ к микрочастицам (1-10 мкм). Но существующие технологии требуют предварительного выделения ВНВ из плазмы, что определяет их высокую стоимость, трудоемкость анализа, и затрудняет применение в практике. В рамках исследования была разработана технология непосредственного выделения ВНВ из плазмы путем их фиксации к частицам диаметром 1 мкм. Для этого были использованы суперпарамагнитные частицы (СПМЧ), поверхность которых была модифицирована ДНК-аптамером (АптCD63): CA CCC CAC CTC GCT CCC GTG ACA СТА ATG СТА (Рисунок 4).

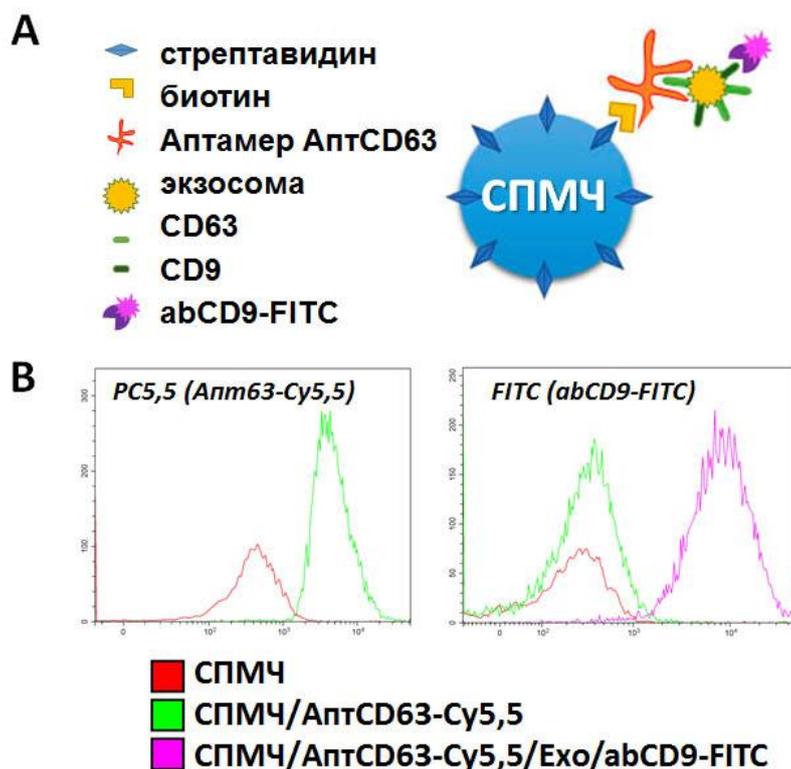


Рисунок 4 – Выделение ВНВ с помощью магнитных частиц и аптамеров А) Схематическое изображение комплекса; Б) Результат детекции маркера CD9 на поверхности экзосом в составе комплекса «СПМЧ/АптCD63/ВНВ» с помощью проточной цитометрии

Структура аптамера обеспечивала его высоко-аффинное взаимодействие с тетраспанином CD63 на поверхности ВНВ. Связь СПМЧ и аптамеров обеспечивалась через соединение биотин-стрептавидин (Рисунок 4). Комплекс «СПМЧ/АптCD63/ВНВ» формировался непосредственно в

плазме, характеристики СПМЧ и прочная связь ВНВ с их поверхностью обеспечивала возможность выделения, отмывки ВНВ, последующей инкубации с антителами к интересующим маркерам и анализа методом проточной цитометрии. На рисунке 4Г (первый график) представлен результат анализа эффективности фиксации ДНК-аптамера к СПМЧ, использован аптамер, меченный Су5.5. На втором графике представлен результат анализа СПМЧ после их инкубации с плазмой, отмывки от компонентов плазмы и инкубации с антителами к CD9, меченными FITC.

Глава 3. Диагностический потенциал анализа циркулирующих ВНВ

3.1. Диагностика колоректальной карциномы (КРК)

Колоректальная карцинома (КРК) занимает одну из лидирующих позиций в структуре онкологической смертности, что обосновывает актуальность разработки новых методов скрининга и ранней диагностики этой нозологии.

В исследовании был использован материал (плазма) пациентов с КРК (высокодифференцированная аденокарцинома, T₍₁₋₃₎,N₀,M₍₀₋₁₎) и пациентов с доброкачественными аденомами (суммарно, n = 110) и группы здоровых (n = 10). Дизайн исследования предполагал первый этап сравнения состава везикулярных микроРНК до или после операции, причем пациенты были распределены на 2 группы: пациенты, перенесшие радикальную операцию, и пациенты, перенесшие циторедуктивную операцию. Предполагалось, что сравнение таких групп позволит дифференцировать эффект удаления опухоли, продуцирующей ВНВ, и эффект самой операции на профиль везикулярных микроРНК. После определения потенциально «маркерных» молекул, вторым этапом проводилось сравнение относительной концентрации этих молекул в составе ВНВ, выделенных из плазмы здоровых доноров, пациентов с доброкачественными образованиями толстой кишки и пациентов с КРК. Такой анализ позволил подтвердить данные первого этапа работы и определить молекулы с так называемым «реципрокным» (разнонаправленным) характером КРК-ассоциированных изменений. В заключение, диагностический потенциал «реципрокной пары» молекул был оценен путем сравнения групп пациентов с КРК и здоровых доноров. В рамках работы ВНВ были выделены из всех образцов с помощью стандартного метода ультрацентрифугирования. Для оценки выделенных ВНВ были использованы методы ЛКС, НТА, крио-электронной микроскопии и проточной цитометрии после фиксации ВНВ к латексным частицам. Тотальная РНК была выделена из ВНВ с помощью спин-колонок по стандартной технологии. Анализ микроРНК был проведен с помощью реакции обратной транскрипции и последующей полимеразной цепной реакции (ОТ-ПЦР). Детали нормализации результатов ОТ-ПЦР и методов статистического анализа результатов представлены в диссертации. В ходе первого этапа анализа было выбрано 12 «потенциально маркерных» молекулы. Например, концентрация везикулярной фракции miR-23a, miR-29a, miR-181a снижалась, а концентрация miR-192, miR-223 повышалась

после операции. Затем была проведена оценка концентрации этих молекул в группах здоровых доноров, пациентов с доброкачественными аденомами и пациентов с КРК, что позволило показать статистически значимый характер КРК-ассоциированных изменений miR-181a и miR-223. Диагностический потенциал соотношения концентраций этих двух молекул был оценен в заключении с помощью материала независимой выборки пациентов с КРК и здоровых доноров (Рисунок 5).

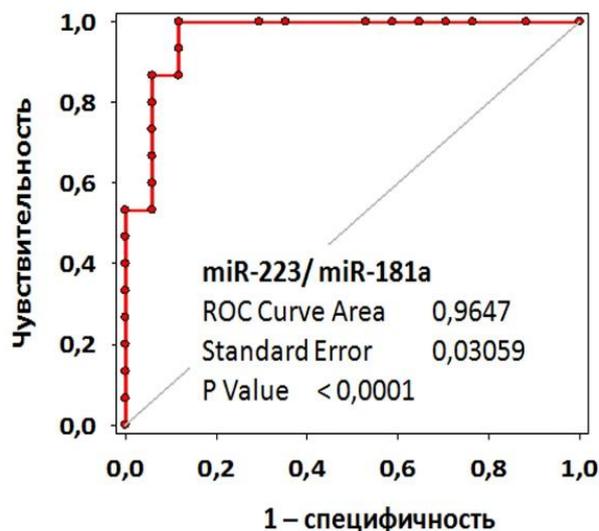


Рисунок 5 – Оценка диагностической ценности «реципрокной пары» - miR-223/miR-181a с помощью ROC-анализа. В исследовании был использован материал (плазма) от пациентов с гистологически верифицированным диагнозом КРК (n = 20) и здоровых доноров (n = 10)

По результатам ROC анализа, оценка соотношения концентраций этих молекул в ВНВ плазмы позволял дифференцировать пациентов с КРК и здоровых доноров с чувствительностью 93%; специфичностью 88% (AUC=0,96)

3.2. Диагностика рака предстательной железы

В связи с увеличением средней продолжительности жизни населения рак предстательной железы (РПЖ) стал значимой социальной проблемой. С начала 1980-ых в практику вводились методы скрининга РПЖ, основанные на оценке концентрации в плазме различных простат-специфических протеаз (PSA, hK2), их фракций и сочетаний (prostate health index, 4K score). Но популяционный эффект применения этих методов оценивается неоднозначно, поэтому задача разработки новых диагностических технологий сохраняет актуальность.

В работе был использован материал (моча) пациентов с гистологически верифицированным диагнозом РПЖ (n = 25) и здоровых доноров соответствующей возрастной группы (n = 25). Группа пациентов была относительно гомогенна по основным клиническим параметрам (уровень ПСА, стадия РПЖ, степень дифференцировки ткани опухоли по шкале

Глисона). Группа доноров включала мужчин без клинических проявлений РПЖ, без случаев заболевания у родственников, с уровнем ПСА менее 4 нг/мл.

Порция мочи (40 мл) собиралась утром. ВНВ были выделены путем агглютинации лектинами (Конканавалином А) согласно ранее разработанному протоколу. Характеристики выделенных везикул (размер, морфология, наличие поверхностных маркеров) были оценены традиционными методами. Выделенная везикулярная РНК была использована для оценки методом ОТ-ПЦР уровня концентрации 12 молекул микроРНК, имеющих отношение к развитию РПЖ по данным литературы. Согласно полученным результатам, miR-574-3p, miR-141-5p и miR-21-5p представлены в более высокой концентрации в моче мужчин с РПЖ по сравнению с контрольной группой (Рисунок 6). Однако, эта разница была статистически значима только для miR-574-3p и miR-141-5p (ANOVA $P < 0,01$), что соответствовало более высоким значениям AUC, полученных в ходе ROC анализа.

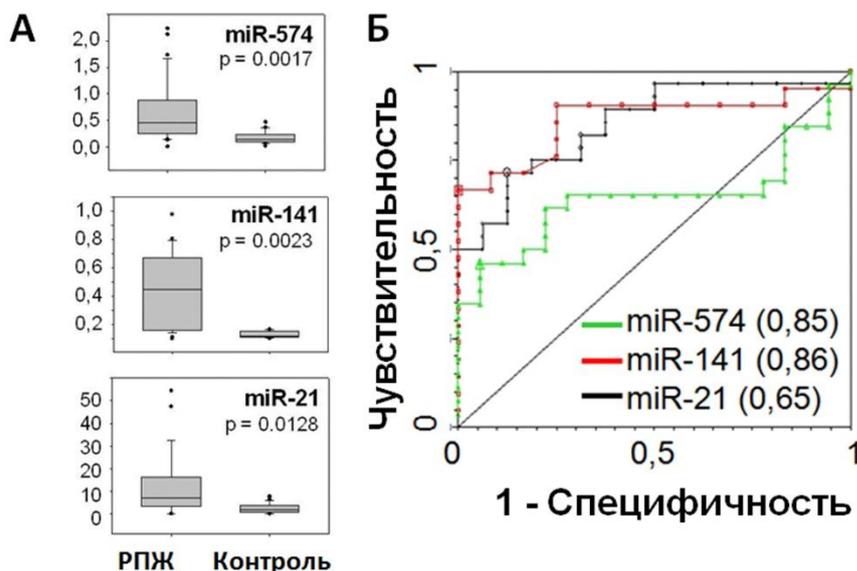


Рисунок 6 – Результаты анализа микроРНК из экзосом мочи А) Сравнительный анализ содержания микроРНК в экзосомах, выделенных из мочи пациентов с РПЖ и здоровых доноров. Статистический анализ проведен с помощью U-теста Mann-Whitney. Б) Оценка диагностической значимости анализа везикулярных форм микроРНК с помощью ROC анализа, на рисунке представлены значения AUC

3.3. Дифференциальная диагностика узловых образований щитовидной железы (УОЩЖ)

Узловые образования щитовидной железы являются частой патологией, которая в большинстве случаев протекает бессимптомно и является «находкой» при спиннинговых исследованиях щитовидной железы. Диагностический алгоритм, направленный на исключение злокачественной природы узла, предполагает проведение ультразвукового исследования и последующей тонкоигольной аспирационной биопсии (ТАБ) и цитологического исследования

полученного материала. По ряду объективных причин дифференциальная диагностика УОЩЖ не всегда позволяет уверенно исключить злокачественные новообразования, что зачастую объясняет проведение операций в случаях доброкачественных УОЩЖ. Эта ситуация определяет актуальность разработки дополнительных методов диагностики. В частности, показано в ряде исследований, что анализ микроРНК в материале ТАБ позволяет дифференцировать УОЩЖ различной природы. В рамках данного исследования стояла задача оценки возможности дифференциальной диагностики УОЩЖ на основе анализа везикулярных микроРНК.

Исследование было проведено в два этапа: широкий «профайлинг» и отбор потенциально «маркерных» молекул путем сравнения материала (ВНВ плазмы) пациентов с папиллярным раком щитовидной железы (РЩЖ) до и после тиреоидэктомии, и валидация полученных данных с использованием материала от пациентов с различными гистологическими вариантами УОЩЖ. ВНВ были выделены из плазмы стандартным методом ультрацентрифугирования; для оценки характеристик ВНВ были использованы атомно-силовая микроскопия, НТА и вестерн-блоттинг. Тотальная РНК была выделена из препаратов ВНВ стандартной технологией, анализ микроРНК проведен методом ОТ-ПЦР. Методы нормализации и анализа результатов представлены в тексте диссертации.

По данным сравнения концентрации 84 молекул микроРНК в ВНВ плазмы пациентов (n=10) с папиллярным РЩЖ до и после тиреоидэктомии было выбрано 9 микроРНК, детектируемый уровень содержания которых в экзосомах снижался после операции. Затем была проведена валидация диагностической значимости выбранных потенциально «маркерных» молекул путем анализа их концентрации в ВНВ плазмы пациентов с разным клиническим статусом заболевания и здоровых доноров. 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_{1-x}M_{1-x} (n=12) и группа здоровых доноров (n=13). По результатам исследования были описаны характерные «комбинации» молекул в составе везикулярной фракции циркулирующих микроРНК. Например, диагностически информативные комбинации относительных концентраций трех молекул (miR-181a, miR-21, miR-146a) могут иметь потенциал клинического применения в рамках дифференциальной диагностики фолликулярных УОЩЖ (Рисунок 7).

Полученные результаты указывают на наличие характерных изменений состава везикулярных микроРНК при развитии отдельных вариантов УОЩЖ, но примененные в рамках исследования технологии пока не обеспечивают необходимый уровень информативности анализа. Возможным методом оптимизации технологии будет выделение thyroid-специфичной популяции ВНВ, так как состав микроРНК этой везикулярной фракции должен точнее отражать изменения профиля микроРНК, которые происходят в клетках узла или всей железы.

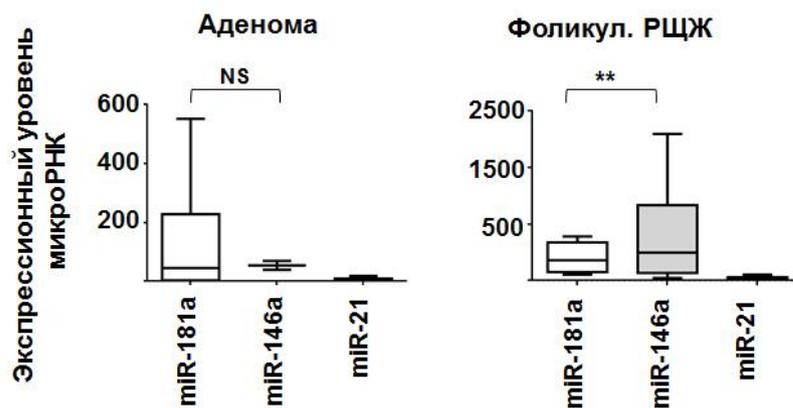


Рисунок 7 – Пример диагностически информативной комбинации микроРНК: miR-181a, miR-146a, miR-21. Статистическая значимость оценена с помощью критерия Kruskal–Wallis, $p < 0.005$ **

3.4. Прогноз эффекта неоадьювантной терапии рака молочной железы (РМЖ)

Неоадьювантная (предоперационная) химиотерапия (НХТ) является одним из основных этапов комплексного лечения операбельного или условно операбельного рака молочной железы (РМЖ). НХТ делает возможным проведение операций в случаях ранее неоперабельных форм местно-распространенного РМЖ, в большинстве случаев НХТ позволяют уменьшить размеры опухоли и оптимизировать объем оперативного вмешательства. 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. Но, очевидно, эти характеристики недостаточны для надежного прогнозирования эффекта НХТ. Поэтому разработка вспомогательных методов прогнозирования эффекта НХТ является актуальной задачей. Так, в рамках данной работы стояла задача оценки прогностического потенциала везикулярных микроРНК у пациентов с РМЖ.

В исследование были включены пациентки с РМЖ ($n = 47$). Средний возраст пациенток, включенных в исследование, составил 54,5 года (± 7 лет). Перед началом НХТ всем пациенткам был проведен стандартный комплекс диагностических исследований, включая ультразвуковое исследование (УЗИ) молочных желез (с измерением размеров опухолевого узла), трепан-биопсию и иммуно-гистохимический (ИГХ) анализ экспрессии рецепторов стероидных гормонов, рецептора HER2 в материале биоптатов. С учетом клинического статуса, стадии (IIA (T2N0M0) и IIB (T2N1M0, T3N0M0) и данных ИГХ (тройной негативный фенотип) всем пациенткам было рекомендовано проведение таксан-содержащей нео-адьювантной химиотерапии. 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 8А).

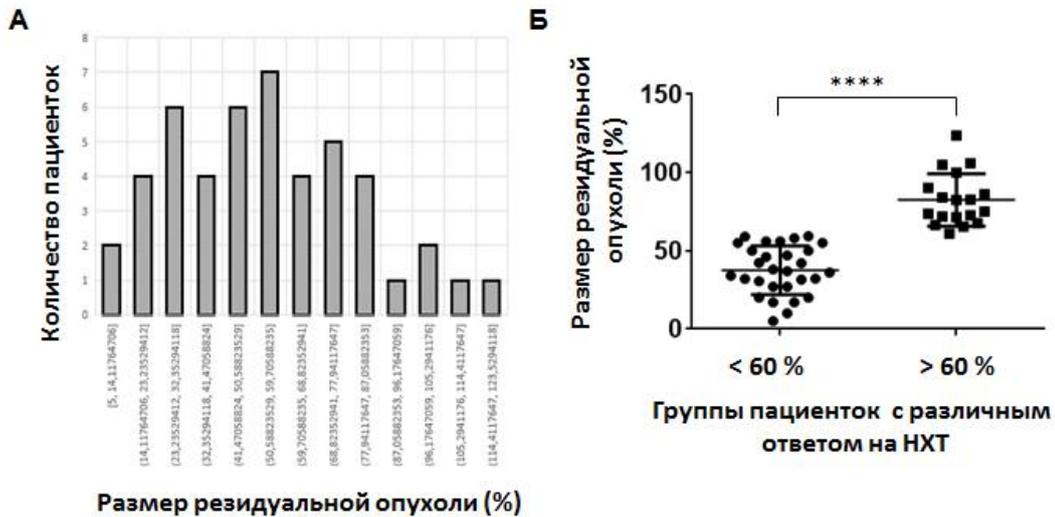


Рисунок 8 – Выборка пациенток с РМЖ. А) Распределение по размеру резидуальной опухоли после 6 циклов НХТ; Б) Распределение по группам сравнения. Статистическая значимость разницы эффекта НХТ между группами определена с помощью критерия Mann-Whitney, $p < 0.00005$ ****

Полученные данные позволили предполагать, что используемая в работе выборка является вполне репрезентативной и отражает ситуацию в целом. 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. Разница между группами сравнения оказалась статистически значимой (Рисунок 8Б).

Образцы плазмы были получены до начала терапии, ВНВ были выделены стандартным методом ультрацентрифугирования, распределения ВНВ по размеру было оценено методом ЛКС, морфология ВНВ была визуализирована с помощью крио-электронной микроскопии, экспрессия маркера CD63 на мембране везикул была оценена методом проточной цитометрии. В совокупности результаты исследований позволяли утверждать, что полученная везикулярная популяция содержит везикулы экзосомального происхождения. Тотальная РНК из везикул была выделена стандартным методом. Анализ 15 молекул микроРНК, выбранных на основе данных литературы, был проведен методом ОТ-ПЦР. Статистически значимая разница значений относительной концентрации между сравниваемыми группами была показана для пяти молекул: концентрация miR-34a была повышена, а концентрация miR-126, miR-106, miR-342, miR-451 была понижена в группе пациенток с условно «резистентными» опухолями. При этом расчет

соотношения концентраций одной из четырех возможных пар молекул с «реципрокным» характером изменений, показал высокий прогностический потенциал этого параметра (Рисунок 9).

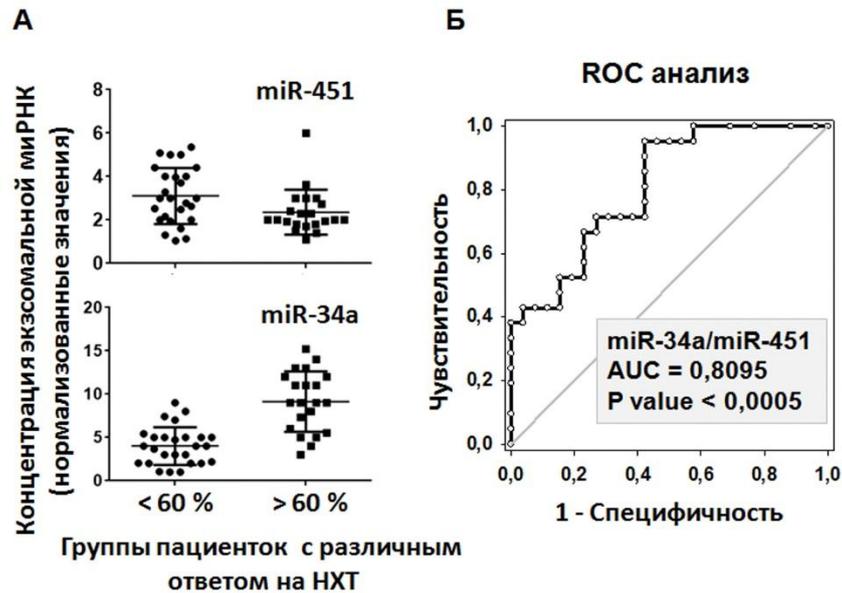


Рисунок 9 – Анализ концентрации экзосомальной фракции циркулирующих микроРНК (miR-34a, miR-451) в плазме пациенток с РМЖ в двух группах с разным ответом на НХТ. А) Уровень относительной концентрации исследуемых молекул (miR-34a, miR-451), в двух группах пациенток с различным эффектом НХТ. Представлены 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

В целом, полученные результаты указывают на перспективность разработки методов прогноза эффекта НХТ на основе анализа везикулярных микроРНК. Повышение прогностического потенциала предложенной технологии может быть обеспечено выделением татта-специфической фракции ВНВ, более широким «профайлингом» везикулярных микроРНК и более аккуратным выбором маркерных молекул.

Глава 4. Исследование роли ВНВ плазмы в процессе метастатической диссеминации

4.1. Анализ компонентов поверхности ВНВ плазмы

Циркуляция опухолевых клеток с потоком крови является важным этапом процесса гематогенной диссеминации. Способность клеток опухоли сохранять жизнеспособность в плазме, контактировать со стенкой сосудов, проникать в окружающие сосуды ткани и делиться в новых условиях определяет динамику метастатической стадии заболевания. На этом этапе циркулирующие опухолевые клетки неминуемо контактируют с ВНВ плазмы. На основе

экспериментальных данных, представленных в научной литературе, можно предполагать, что ВНВ плазмы могут оказывать стимулирующее влияние на клетки опухоли, но механизм и патофизиологический эффект этого влияния изучены слабо. Так, задачей данного этапа работы было исследование взаимодействия ВНВ плазмы и клеток опухоли на примере клеток рака молочной железы (РМЖ).

ВНВ были выделены из плазмы здоровых доноров (женщин) методом ультрацентрифугирования. Оценка основных характеристик ВНВ была проведена с помощью традиционных подходов: ЛКС, сканирующей атомно-силовой микроскопии, крио-электронной микроскопии, проточной цитометрии. С целью отделения от ВНВ компонентов плазмы, которые могут адсорбироваться на поверхностной мембране и влиять на функциональные характеристики последних, была проведена инкубация ВНВ в р-ре протеолитического фермента (трипсина). Белковый состав нативных и «трипсинизированных» везикул был исследован методом масс-спектрометрии. В таблице 2 представлены результаты по нескольким протеинам, подтверждающие предположение о наличии «короны» плазменных белков, адсорбированных на поверхности циркулирующих везикул.

Таблица 2 - Выборочные данные масс-спектрометрии

Название	Название полное	UniProt ID	Представленность в образце экзосом (emPAI)*	
			Трипсин (-)	Трипсин (+)
ECM1	Extracellular matrix protein 1, Iso1	Q16610	0.17	0.02
FGA	Fibrinogen alpha chain, Iso 1	P02671	0.87	0.04
VTN	Vitronectin, Iso 1	P04004	0.51	0.12
FN1	Fibronectin, Iso1	P02751	1.31	0.19
TPM4	Tropomyosin alpha-4 chain	P67936	1.18	0.4

4.2. Эффект воздействия ВНВ плазмы и клеток РМЖ

Задачей следующих экспериментов работы была оценка эффекта, который оказывают ВНВ плазмы на клетки РМЖ в условиях *in vitro* и *in vivo*. Для этого две линии клеток MCF7 и MDA-MB-231 культивировались в обычных условиях и на «неадгезивной» поверхности, среда содержала стандартное количество эмбриональной телячьей сыворотки, из которой были заранее удалены ВНВ. В параллельных экспериментах в культуральную среду были добавлены или не добавлены ВНВ, выделенные из плазмы доноров. Репрезентативный пример эффекта ВНВ представлен на рисунке 10, где видно, что ВНВ стимулируют адгезивное взаимодействие клеток и формирование конгломератов.

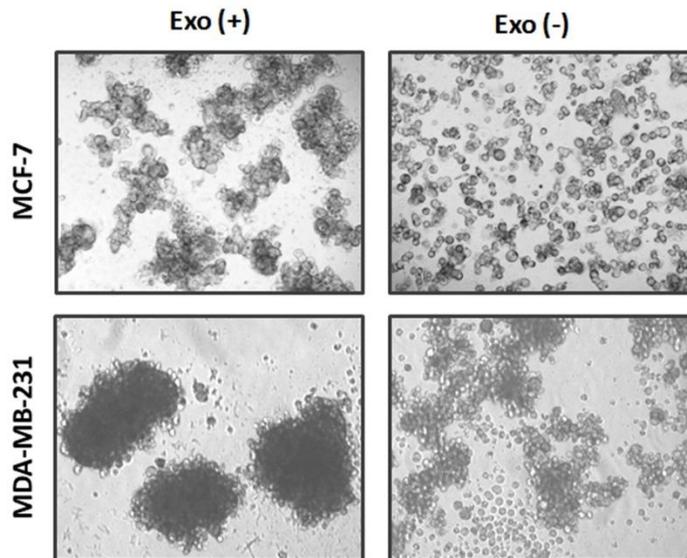


Рисунок 10 – Эффект воздействия ВНВ из донорской плазмы на адгезивные характеристики клеток РМЖ *in vitro*: Клетки РМЖ (MDA-MB-231, MCF-7) культивировались в условиях не-адгезивного роста (HolyNEMA-coated plastic). Представлен эффект присутствия донорских ВНВ в течение 3 часов

Для оценки функционального эффекта взаимодействия ВНВ и клеток РМЖ были использованы эмбрионы данио-рерио (zebrafish). Клетки линии MDA-MB-231, экспрессирующие флуоресцентный протеин, в состоянии суспензии инкубировались с ВНВ, выделенными из донорской плазмы, и инъецировались в желточный мешок эмбрионов рыб. Наличие, пролиферация и локализация клеток РМЖ в теле эмбриона оценивалась через 48 часов с помощью флуоресцентной микроскопии. Репрезентативные результаты представлены на рисунке 11. В присутствии ВНВ опухолевые клетки были способны мигрировать из желточного мешка в различные части эмбрионов, в контрольном эксперименте, в отсутствие ВНВ / Eхо(-), клетки визуализировались только в месте инъекции.

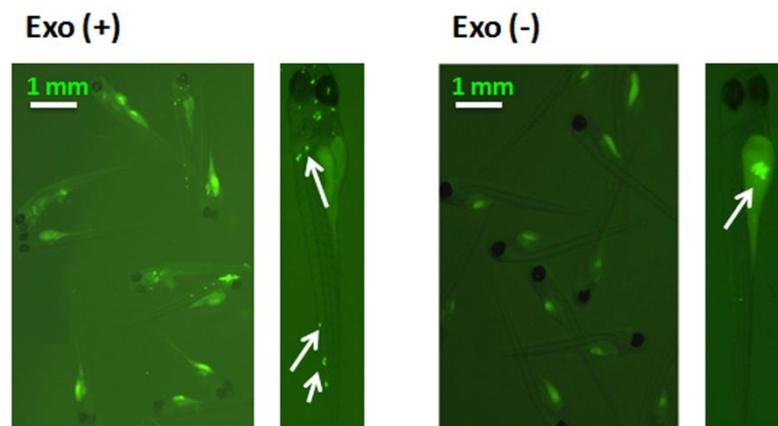


Рисунок 11 – Эффект воздействия ВНВ из донорской плазмы на распределение клеток РМЖ (MDA-MB-231) из места инъекции (желточный мешок) в толще тела эмбриона zebra-fish

4.3. Оценка роли «короны» поверхностных белков ВНВ

Следующие эксперименты были спланированы и проведены с целью количественной оценки влияния ВНВ на адгезивные и миграционные характеристики клеток РМЖ и с целью определения роли белков, адсорбированных на мембране ВНВ. Были использованы *in vitro* модели, которые симулируют условия миграции опухолевых клеток по плоскости (2D) или в толще ткани (3D). ВНВ, нативные и «трипсинизированные», были добавлены в культуральную среду в концентрации $1-2 \times 10^{11}$ везикул / мл. Результаты представлены на рисунке 12.

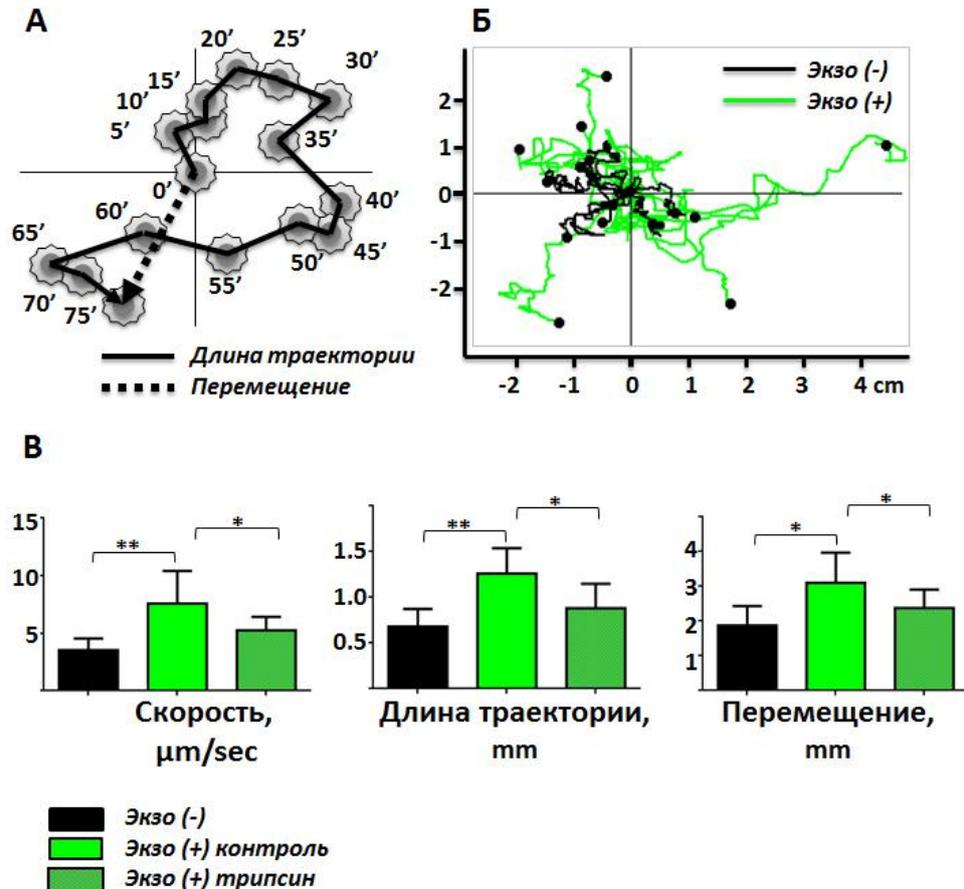


Рисунок 12 – Оценка миграции клеток РМЖ (MDA-MB-231) по поверхности пластика, и влияния ВНВ плазмы на активность миграции: А) Пример траектории перемещения одной клетки в течение 60 минут. Б) Траектории движения 16 клеток в условиях отсутствия ВНВ (черные линии) и в присутствии ВНВ (зеленые линии). Точки старта совмещены. В) Количественная оценка различных параметров движения клеток: скорость, длина траектории, перемещение. Данные усреднены для 8 экспериментов (клеток), статистическая достоверность определена для парных групп с помощью критерия Mann-Whitney: $p < 0.05$ *, $p < 0.005$ **

Так, присутствие ВНВ плазмы в культуральной среде клетки «двигались» по поверхности пластика активнее, чем в контрольном эксперименте. Предварительная «трипсинизация» везикул снижала их стимулирующий потенциал. Аналогичные данные были получены в условиях эксперимента, моделирующего движение клеток в трехмерном пространстве с помощью камеры,

разделенной проницаемой для клеток мембраной и слоем геля (trans-well chamber). Полученные результаты подтвердили предположение о способности ВНВ плазмы стимулировать адгезионную активность и подвижность опухолевых клеток, причем эта способность отчасти определяется структурой поверхности везикул.

4.4. Исследование механизмов реализации стимулирующего эффекта ВНВ

Анализ известных биологических функций белков, которые «удалялись» с поверхности экзосом после инкубации с трипсином, и литературных данных о возможных регуляторных эффектах этих молекул выявил интересные закономерности. Например, многие из этих молекул могут выполнять роль лигандов ряда рецепторов на поверхности клеток. В большинстве случаев такое взаимодействие опосредуется интегринами и приводит к активации внутриклеточных сигнальных путей, в состав которых входит киназа фокальных контактов (ФАК, focal adhesion kinase). Принципиальная схема механизма «трансляции» стимулирующего эффекта ВНВ представлена на рисунке 13.

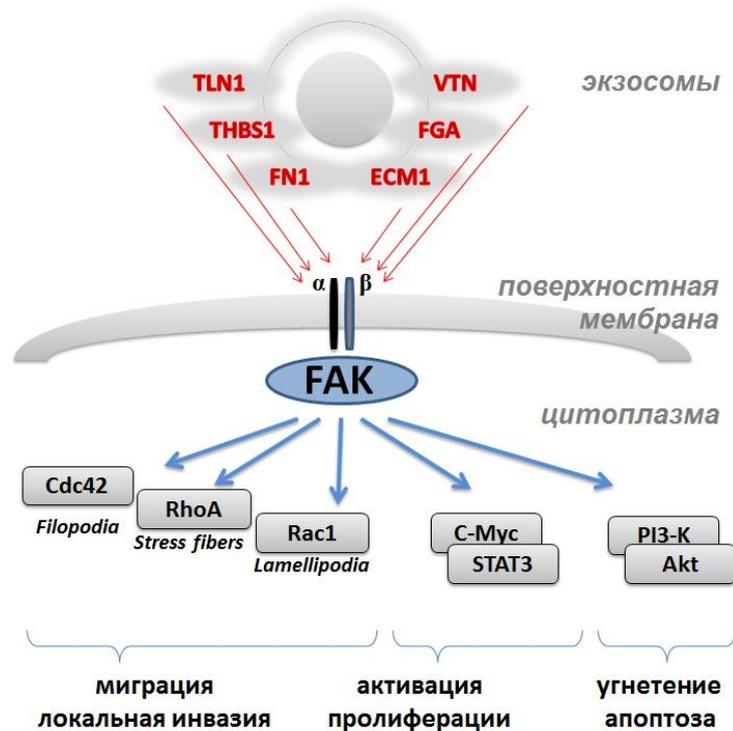


Рисунок 13 – Активация ФАК-зависимых внутриклеточных сигнальных каскадов плазменными белками на поверхности ВНВ (схема)

Для оценки возможной роли ФАК в реакции опухолевых клеток на контактное взаимодействие с ВНВ плазмы, были использованы клетки линии MDA-MB-231, в которых экспрессия (и функциональная активность) этой киназы была стабильно угнетена. Результаты представлены на рисунке 14.

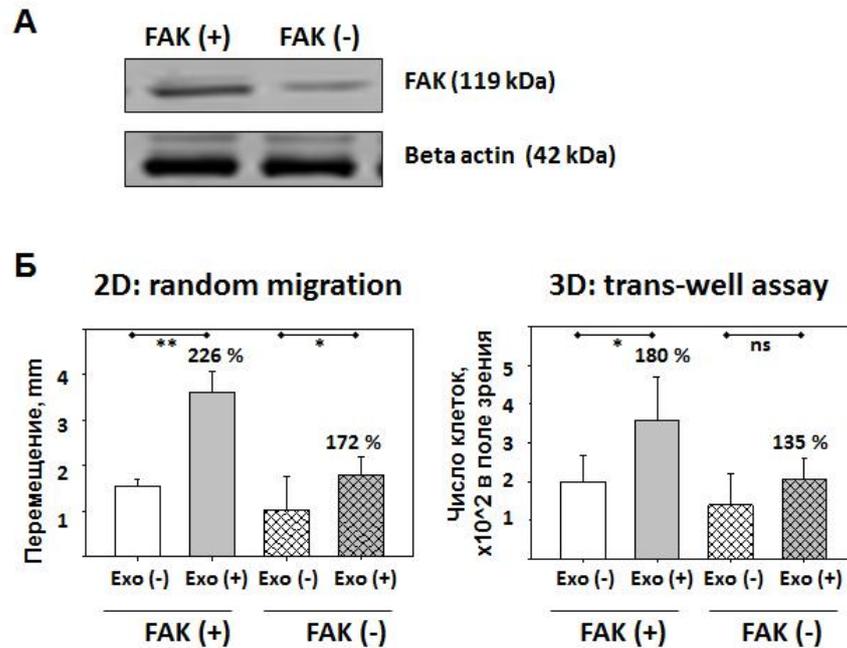


Рисунок 14 – Оценка роли киназы FAK в «трансляции» стимулирующего эффекта ВНВ в культуре клеток РМЖ (MDA-MB-231): А) Оценка эффективности инактивации экспрессии FAK выполнена методом Вестерн-блоттинга, оценка экспрессии бета-актина выполнена в качестве контроля равной «загрузки» белковых лизатов в гель; Б) Анализ миграционного поведения клеток на плоскости (2D) и в пространстве (3D). В случае движения клеток на плоскости (2D) – представлены результаты усреднения данных 16 экспериментов, в случае движения клеток в трехмерном пространстве (3D) – усреднены результаты подсчета клеток, «прошедших сквозь» матригель в 12 полях зрения. Оценка статистической значимости наблюдаемых различий проведена для парных экспериментов методом Mann-Whitney, $p < 0.05$ *, $p < 0.005$ **

Угнетение активности FAK снижало способность клеток «отвечать» на стимулирующее влияние ВНВ. Как представлено на рисунке 14Б, появления в среде ВНВ повышало способность клеток с сохранной функцией FAK перемещаться по пластику на 226%, а клетки с подавленной экспрессией FAK «ускорялись» только на 172%. Аналогичный эффект наблюдался в условиях 3D эксперимента. Интересно отметить, что у клеток MDA-MB-231/FAK(-) снижалась, но не пропадала способность реагировать на ВНВ. Это может отражать эффект остаточной активности FAK-каскада или наличие дополнительных, FAK-независимых, путей «трансляции» стимулирующего влияния ВНВ.

В целом, представленные результаты указывают на значимую роль, которую играют ВНВ плазмы в процессе метастатической диссеминации. Исследование было сфокусировано не на «опухолевых» везикулах, т.е. на везикулах, секретируемых опухолевыми клетками; а именно на тотальной популяции ВНВ плазмы, т.е. на везикулах, которые секретируются вероятно всеми клетками организма. Разработка методов оценки, алгоритмов анализа и технологий

контролируемой коррекции состава этой везикулярной популяции может быть основой для нового подхода к профилактике или терапии процесса метастатической диссеминации. Теоретически, удаление ВНВ 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

4.1. Формирование и анализ трансфекционных комплексов на основе ВНВ

Предполагается, что одна из основных биологических функций ВНВ – это межклеточная коммуникация и перенос различных структурных или сигнальных молекул. ВНВ являются естественной системой межклеточного транспорта. Это дает основания предполагать, что нановезикулы естественным образом «выигрывают» у любых искусственных систем доставки лекарственных препаратов по показателям биосовместимости и эффективности и определяет огромный научный интерес к проблеме создания новой «drug delivery system» на основе аутологичных, гетерологичных или искусственных ВНВ.

В рамках исследования была разработана оригинальная концепция формирования трансфекционного комплекса с «ядром», которое состояло из негативно заряженных молекул терапевтической РНК (small interfering RNA, siRNA) и позитивно заряженных молекул полиэтиленimina, а «оболочкой» комплекса была мембрана ВНВ. Электростатическое взаимодействие компонентов «ядра» обеспечивало конденсацию (уплотнение) РНК, а мембрана ВНВ должна была обеспечивать стабильность и биосовместимость комплекса. Принципиальная схема трансфекционного комплекса представлена на рисунке 15.

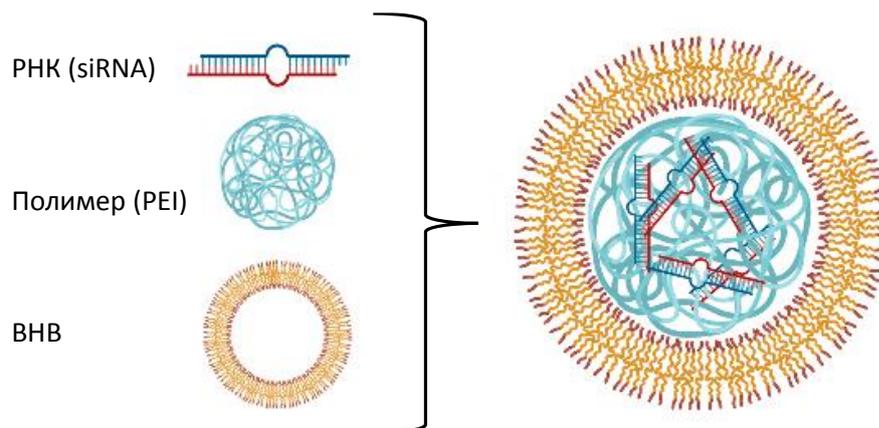


Рисунок 15 – Схематическое изображения трансфекционного комплекса

В реальной клинической практике ВНВ плазмы пациента могут рассматриваться как наиболее вероятный источник везикул для создания «персонализированной» системы доставки. С учетом необходимости стандартизации материала в исследовательской практике целесообразно использование везикул, секретлируемых клетками *in vitro*. С учетом скорости пролиферации и активности секреции ВНВ, линии клеток различных опухолей человека

представляются оптимальным источником везикул в рамках экспериментальной работы. ВНВ были выделены из среды после культивации клеток колоректального рака НСТ116 методом ультра-центрифугирования. Комплексы полиэтиленимина (ПЭИ) / Polyethylenimine (PEI) 25кДа и синтетических малых интерферирующих молекул сиРНК / siRNA были приготовлены по стандартному протоколу непосредственно перед использованием. В рамках исследования были оптимизированы условия формирования трансфекционных комплексов, включая концентрации компонентов, процедура поэтапного взаимодействия компонентов, инкубации полимеров, было протестировано несколько методов «упаковки» комплекса полимеров в ВНВ. Оптимальные результаты получены при использовании ультразвука (УЗ). Оценку эффективности образования комплексов проводили путем измерения размера и ζ - потенциала, или разности потенциалов дисперсионной среды и неподвижного слоя жидкости, окружающей нано-частицу или нано-везикулу. Последний параметр отражает стабильность нано-объектов. В таблице 3 представлены результаты измерений компонентов комплексов и комплексов, сформированных после воздействия УЗ.

Таблица 3 - Физические характеристики комплексов, образованных полиэтиленимином, РНК и ВНВ

	ВНВ	Комплекс, PEI/miR	Комплекс, ВНВ (PEI/miR) после воздействия УЗ
ζ - потенциал, mV	-16.08 ± 5.08	25.77 ± 2.21	8.54 ± 2.76
Размер, nm	111.8 ± 15.5	110.2 ± 3.7	180.6 ± 10.7

Согласно данным таблицы 3, средний размер комплекса из трех компонентов больше, чем средний размер комплекса полимеров и средний размер везикул до процедуры сонификации, что свидетельствует о формировании новой структуры, при этом механизм наблюдаемого «увеличения» ВНВ еще требует объяснения. По данным анализа ζ - потенциала, полученный комплекс имел промежуточные характеристики, что указывает на тот факт, что «упаковка» комплекса полимеров (ПЭИ и РНК) в ВНВ изменила его стабильность.

Для оценки функциональной (трансфекционной) эффективности комплексов, состоящих из полимера, РНК и ВНВ, была использована синтетическая молекула РНК, комплиментарная мРНК и, соответственно, инактивирующая синтез белка люциферазы (siLuc3). В качестве контроля специфичности эффекта была использована синтетическая молекула (идентичная по длине и CG-составу), но случайной последовательностью (siLuc2). В случае эффективной трансфекции, клетки должны были терять люциферазную активность (способность синтезировать фермент люциферазу, который катализирует билюминисцентную реакцию). В качестве примера, на рисунке 16 представлены результаты эксперимента.

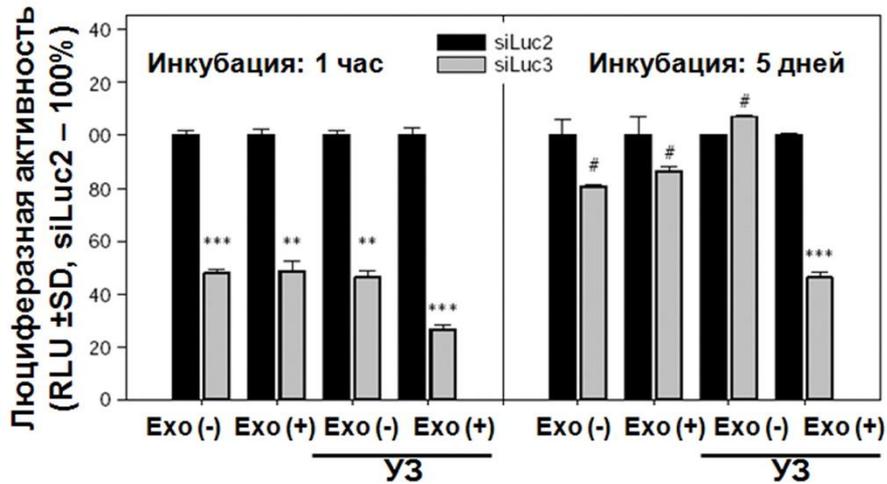


Рисунок 16 – Оценка эффективности трансфекционного комплекса ВНВ(ПЭИ/siLuc3): В состав комплексов входили молекулы siLuc2 (негативный контроль) или siLuc3 (активная молекула – ингибитор люциферазы). Комплексы формировались с / без ВНВ, выделенных из среды клеток КРК. Статистическая значимость наблюдаемой разницы оценивалась в парных экспериментах (Luc3 vs. Luc2) методом Mann-Whitney $p < 0.05$ *, $p < 0.005$ **, $p < 0.0005$ ***

Согласно полученным результатам, «упаковка» полимерного комплекса в ВНВ незначительно повышала его трансфекционную активность. Но особенно важный результат был получен после сравнительного анализа комплексов через 5 дней после их формирования: везикулярная оболочка обеспечивала стабильность комплекса в течение длительного хранения.

4.2. Анализ функциональных характеристик комплекса в условиях *in vitro* эксперимента

Следующим этапом исследования был анализ биологического эффекта трансфекции опухолевых клеток терапевтическими молекулами сиРНК (siRNA) в составе комплекса «упакованного» в ВНВ. В этой работе использовались стабильные клеточные РПЖ (РС-3) и КРК (НСТ116). 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, РПЖ и КРК. В ранее опубликованных исследованиях была показана эффективность инактивации экспрессии Сурвивина данной молекулой сиРНК, поэтому на этапе *in vitro* экспериментов анализ экспрессии мРНК и белка мишени не проводился. Эффект оценивался по изменению пролиферативной активности клеток (MTT test). 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 эффективности комплексов РНК с полимером в исходном виде и после «упаковки» в ВНВ (Рисунок 17).

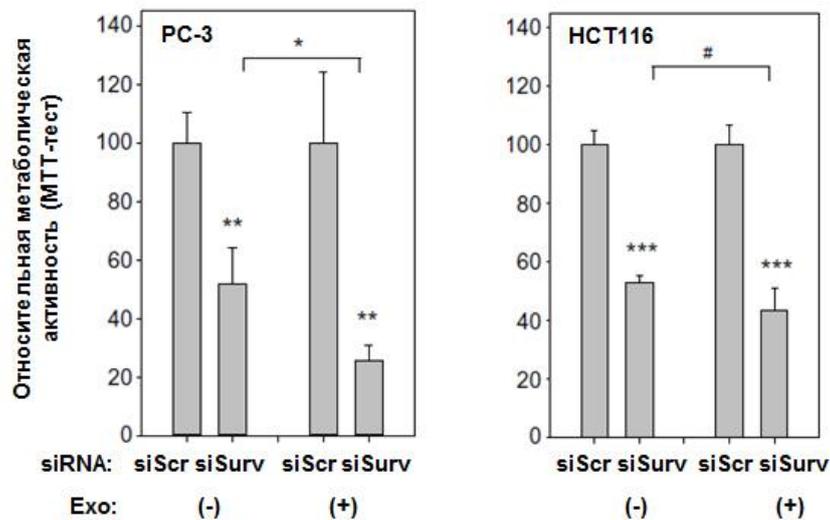


Рисунок 17 – Оценка биологического эффекта трансфекции терапевтических молекул. Для трансфекции были сформированы комплексы PEI/siScr (контроль) и PEI/siSurv, каждый из которых был либо «упакован» (Exo(+)), либо нет (Exo(-) в ВНВ, секретированные клетками HCT116. Статистическая значимость наблюдаемой разницы оценивалась в парных экспериментах методом Mann-Whitney $p < 0.05$ *, $p < 0.005$ **, $p < 0.0005$ ***

Так, молекула siRNA-Surv угнетала пролиферацию клеток двух линий: PC-3 и HCT116. При этом «упаковка» трансфекционных комплексов в ВНВ в разной степени, но всегда усиливала наблюдаемый эффект (в случае PC-3 – статистически значимо, в случае HCT116 – нет).

4.2. Анализ функциональных характеристик комплекса в условиях *in vivo* эксперимента

Заключительным этапом исследования была оценка эффективности системы доставки терапевтической молекулы РНК с помощью трансфекционного комплекса «упакованного» в ВНВ. В качестве *in vivo* модели были использованы бестимусные мыши. После подкожной инъекции суспензии клеток PC-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 угнетение синтеза сурвивина приводило к существенному угнетению пролиферации клеток PC-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. Полимерные комплексы были сформированы по ранее описанной технологии. Комплексы затем были «упакованы» в ВНВ, секретированные

клетками Skov-3, так как именно эти везикулы оказались наиболее трансфекционно активны согласно результатам предварительных экспериментов. Трансфекционные комплексы готовились непосредственно перед инъекцией. Внутривенные инъекции суспензии терапевтического комплекса проводились трижды: на 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 18А отчетливо видно, что экспериментальная терапия приводила к угнетению роста ксенографтных трансплантатов, причем наблюдаемый эффект был статистически значимым.

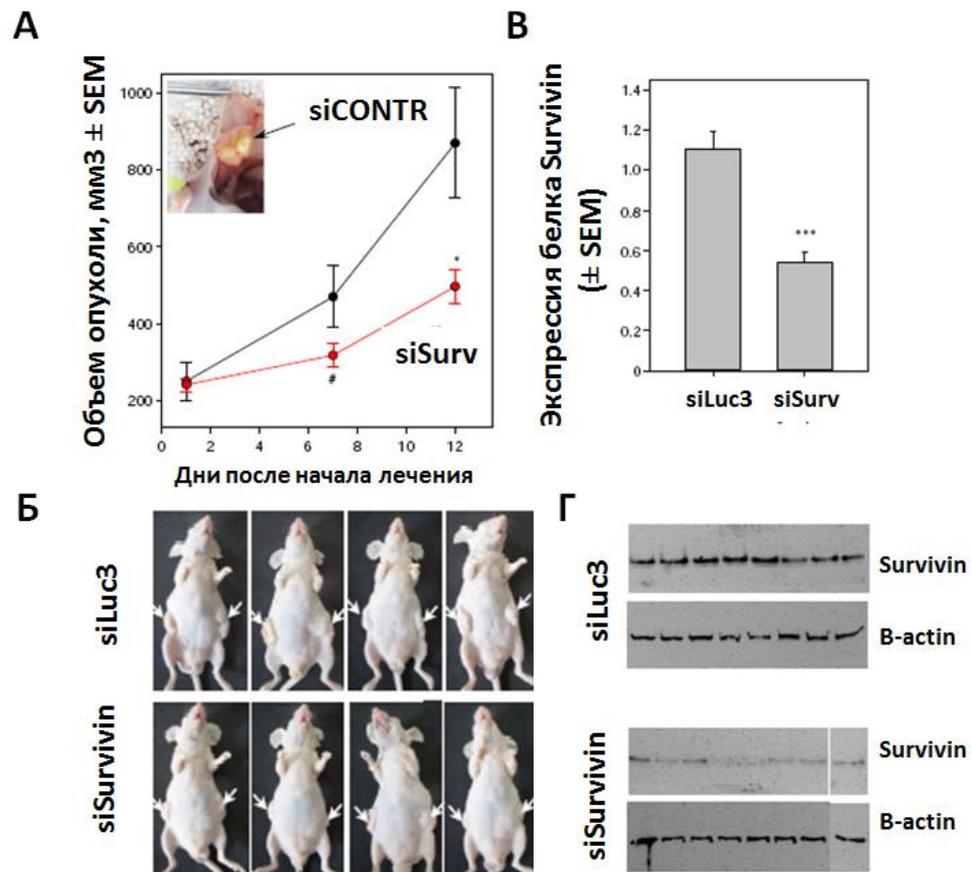


Рисунок 18 – Оценка терапевтической эффективности комплекса VNB(PEI/siSurv): А). Диаграмма изменения размера опухоли, данные усредненные для двух групп по 20 животных; Б) Животные по окончании эксперимента, по 4 из каждой группы; В) Сравнительный уровень экспрессии белка сурвивина в ткани опухоли, данные нормализованы относительно уровня экспрессии бета-актина и усреднены для двух групп по 20 животных. Статистическая достоверность оценена с помощью теста Mann-Whitney $p < 0.0005$ ***; Г) Вестерн-блот анализ уровня экспрессии сурвивина, оценка экспрессии бета-актина выполнена в качестве контроля равной «загрузки» белковых лизатов в гель

Более детально различия в размере подкожных опухолей можно увидеть на рисунке 18Б, где представлено по 4 животных из каждой экспериментальной группы. Далее (Рисунок 18В и 18Г) 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 18Г). Белковые лизаты были приготовлены из образцов ткани опухоли животных, получавших Eho(PEI/siLuc3) комплекс (верхняя панель), и из образцов ткани опухоли животных, получавших Eho(PEI/siSurv) комплекс (нижняя панель) с помощью RIPA буфера. После нормализации концентрации белков с помощью метода Бредфорда, по 20 мкг тотального белка в составе лизатов смешивали с 5x 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 бета-актин (42кДа) одновременно смесью первичных (EP2880Y/AbCam, sc-1616R), затем вторичным антителом НРС anti-rabbit 7074S/Cell Signaling). Выше (Рисунок 18В) представлены те же данные после нормализации (относительно бета-актина) и вычисления среднего значения для группы. Наблюдаемая разница существенна и статистически достоверна.

Все представленные результаты были получены с использованием ВНВ, секретированных опухолевыми клетками в условиях *in vitro*. Можно предполагать, что физические характеристики этих везикул идентичны, или очень близки, везикулам, секретлируемым другими клетками человеческого организма и/или в других условиях. Это допущение позволяет разрабатывать универсальные технологии создания трансфекционных комплексов и исследовать их физические характеристики. Безусловно, перенос таких технологий в клиническую практику потребует использования другого материала (например, ВНВ из плазмы пациентов) и разработки дополнительных методов его получения, хранения, стандартизации.

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.

- 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. ВНВ (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 РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. 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. and Aigner A. // *Toxicol. Appl. Pharmacol* – 2009. – V. 236(1). – P. 97-108.

2. Самсонов, Р.Б. Выделение и анализ экзосомальной микро-рнк из мочи: новый метод диагностики рака предстательной железы. / 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. // *Экспериментальная и клиническая урология*. – 2015. – Т. 4. – С. 28-32.

3. 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. and Malek A. // *Prostate* – 2016. – V. 76(1). – P. 68-79.

4. Samsonov, R. Plasma exosomal miR-21 and miR-181a differentiates follicular from papillary thyroid cancer. / 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. // *Tumor Biol.* – 2016. – V. 37(9). – P. 12011-21.

5. Самсонов, Р.Б. Стимуляция метастатической активности клеток рака молочной железы экзосомами плазмы. / 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. // *Российский Биотерапевтический Журнал*. – 2016. – Т. 15(2). – С. 6-16.

6. Самсонов, Р.Б. Метод дифференциальной диагностики узловых заболеваний щитовидной железы: анализ комбинации микроРНК (миРНК-21, -181А и -146А). / 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. // Опухоли головы и шеи. – 2017. – Т. 2 (7). – С. 16-24.

7. Самсонов, Р.Б. Диагностическое значение экзосомальных микроРНК при колоректальном раке. / 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. // Колопроктология. – 2018. – Т. 2(64). – С. 25-31.

8. Коваленко, И.М. Экзосомальные микро-рнк – потенциальный предиктивный маркер эффекта неоадьювантной терапии рака молочной железы Вопросы онкологии. / 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. // Вопросы онкологии. – 2018. – Т. 64(6). – С. 758-767.

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

10. 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., Zabrodskaya Y., Nikitin D., Sorokin M., Buzdin A., Malek A. // J Hematol – 2018. – V. 7(4). – P. 149-153.

11. 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., Buzdin A., Malek A. // Breast Cancer Res Treat – 2019. – V. 174(1). – P. 129-141.

12. 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.

ТЕЗИСЫ И УСТНЫЕ ДОКЛАДЫ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ, ПРЕДСТАВЛЕННЫЕ НА РОССИЙСКИХ И МЕЖДУНАРОДНЫХ КОНФЕРЕНЦИЯХ

- 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 неoadъювантной полихимиотерапии рака молочной железы на основе анализа экзосомальных микроРНК // III-ий 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 корреляционной спектроскопии 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 // 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 Выделение специфических популяций экзосом с помощью аптамеров. // V-ый 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