

На правах рукописи

ТАМКОВИЧ СВЕТЛАНА НИКОЛАЕВНА

**ЦИРКУЛИРУЮЩИЕ
ДЕЗОКСИРИБОНУКЛЕОПРОТЕИНОВЫЕ КОМПЛЕКСЫ И
ЭКЗОСОМЫ В КРОВИ БОЛЬНЫХ РАКОМ МОЛОЧНОЙ
ЖЕЛЕЗЫ: ОСОБЕННОСТИ СОСТАВА, БИОЛОГИЧЕСКИЕ
ФУНКЦИИ И ДИАГНОСТИЧЕСКИЙ ПОТЕНЦИАЛ**

1.5.4 – биохимия



Автореферат
диссертации на соискание учёной степени
доктора биологических наук

Новосибирск – 2023

Работа выполнена в Федеральном государственном бюджетном учреждении науки Институте химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН

Научный консультант:

Ткачук Всеволод Арсеньевич, д.б.н., профессор, академик РАН
Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Московский государственный университет имени М.В.Ломоносова», декан Факультета фундаментальной медицины

Официальные оппоненты:

Зенкова Марина Аркадьевна, д.б.н., профессор, член-корреспондент РАН
Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, заведующая лабораторией биохимии нуклеиновых кислот

Кайгородова Евгения Викторовна, д.м.н., доцент
Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Сибирский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации, профессор кафедры биохимии и молекулярной биологии с курсом клинической лабораторной диагностики

Чевкина Елена Максимовна, д.б.н.
Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Научно-исследовательский институт канцерогенеза «НМИЦ онкологии им. Н.Н.Блохина» Минздрава России, заведующая лабораторией регуляции клеточных и вирусных онкогенов

Защита состоится **«**2023 г. в **00** часов на заседании диссертационного совета ИХБФМ.03.01 при Институте химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН по адресу: Новосибирск 630090, пр-т акад. Лаврентьева, 8.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Института химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН и на сайте www.niboch.nsc.ru

Автореферат разослан «__» _____ 2023 г.

Учёный секретарь диссертационного совета

к.х.н. Пестряков П. Е.

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность проблемы.

Поскольку биополимеры опухолевого происхождения могут попадать в различные биологические жидкости, минимально инвазивную процедуру выделения и анализа этих биополимеров для получения информации о клетках, в которых они возникли, все чаще называют «жидкостной биопсией». В настоящее время ведутся интенсивные исследования по разработке методов диагностики и прогноза злокачественных заболеваний, а также оценки эффективности противораковой терапии на основе анализа циркулирующих в крови внеклеточной опухолевой ДНК, некодирующих опухоле-ассоциированных РНК (днДНК, микроРНК, кольцевой РНК), опухолевых белков, а также биополимеров в составе внеклеточных везикул, в том числе экзосом.

Во внеклеточной ДНК (внДНК) выявляют характерные для опухолевых клеток точечные мутации, микросателлитную нестабильность, амплификации/делеции, а также эпигенетические изменения. Одним из наиболее серьезных препятствий для широкого внедрения в прикладную онкологию тестов на основе внДНК является неудовлетворительное соотношение сигнал/шум [Naik *et al.*, 2014]. Для повышения чувствительности и специфичности «жидкостной биопсии» необходимы знания о механизмах появления внДНК в кровотоке, ее циркуляции и выведении, в том числе форме циркуляции внДНК, ее первичной структуре и вкладе различных форм внДНК в общий пул.

На сегодняшний день известно, что внДНК крови находится преимущественно в виде нуклеопротеиновых комплексов (НПК), том числе в комплексах с гистонами, амилоидом P, белками крови и клеток, а также в составе апоптотических телец [Holdenrieder *et al.*, 2009; Liaw *et al.*, 2016; Thierry *et al.*, 2016]. Строение, свойства и биологическая активность НПК, особенности их циркуляции и белкового состава в настоящее время недостаточно изучены, однако ряд исследований указывают на то, что с их помощью функционально активные ДНК могут транспортироваться в другие клетки; такие НПК необходимы для нормального функционирования многоклеточных организмов, а также могут быть связаны с развитием ряда патологических процессов [Mouliere *et al.*, 2022]. Действительно, при развитии онкологических заболеваний происходит увеличение концентрации внДНК в крови [Bryzgunova *et al.*, 2021], однако причины, механизмы и последствия этого явления до сих пор неизвестны. Более того, циркулирующая в крови онкологических больных внДНК имеет те же особенности, что и ДНК в клетках опухоли [Tierno *et al.*, 2023], а от гидролиза эндогенными нуклеазами эту ДНК защищают белки, имеющие ДНК-связывающие мотивы, формируя с ней НПК [Tsoneva *et al.*, 2023]. Таким образом, исследование распределения опухоле-специфических ДНК в пуле коротких и длинных фрагментов внДНК и сравнительный анализ белков в составе НПК, циркулирующих в крови

здоровых женщин (ЗЖ) и больных раком молочной железы (РМЖ), позволит расширить фундаментальные знания о механизмах, которые приводят к их появлению во внешней среде, обеспечивают их циркуляцию в крови и, возможно, опосредуют молекулярные механизмы, приводящие к распространению опухоли. Более того, идентификация ДНК-связывающих мотивов в составе белков НПК позволит в дальнейшем разработать подходы выделения опухолевой вДНК, а информация о протеомном портрете циркулирующих в крови онкологических больных НПК заложит основу для создания новых методов диагностики онкологических заболеваний и, возможно, заложит базу для разработки технологии получения на основе элементов природных транспортных систем векторов для генотерапии.

Помимо вДНК в рост и распространение опухоли вовлечены экзосомы - мембранные везикулы, транспортирующие в крови биологически-активные молекулы от клеток-доноров к клеткам-реципиентам [Kok *et al.*, 2020]. Отличительной чертой экзосом от остальных малых везикул является наличие поверхностных маркеров-тетраспанинов CD9, CD63, CD81. Экзосомы секретируются всеми клетками организма, а их количество и состав существенно изменяется при развитии патологии [Huang *et al.*, 2022]. В работах последних пяти лет были получены убедительные доказательства, что эти малые везикулы (размером 30-150 нм) являются новыми медиаторами межклеточной коммуникации; в частности, экзосомы опухолевого происхождения стимулируют эпителиально-мезенхимальный переход (ЭМП) [Whiteside, 2017] и ангиогенез [Liang *et al.*, 2016], клеточную пролиферацию [Harada *et al.*, 2017], миграцию и инвазию [He *et al.*, 2015], вызывают иммуносупрессию [Filipazzi *et al.*, 2012]. Поскольку концентрация экзосом в биологических жидкостях значительно выше, чем опухолевых клеток (~10⁸ против 10), экзосомы являются перспективными источниками биомаркеров для развития метода «жидкостной биопсии» злокачественных новообразований, в том числе РМЖ [Kok *et al.*, 2020].

Несмотря на значительное сходство молекулярного портрета экзосом с родительскими клетками, эти малые везикулы остаются «темной лошадкой» благодаря специфическому сортированию различных биополимеров, в том числе РНК (микроРНК, днРНК, мРНК и др.) и белков (транскрипционные факторы, ферменты и др.) во время их биогенеза [Yanshina *et al.*, 2018]. Таким образом, несмотря на активные исследования, до сих пор нет ясности как о составе переносимых экзосомами сигнальных молекул, так и их роли в распространении опухоли. Принимая во внимание, что при циркуляции в крови экзосомы контактируют с форменными элементами крови и после взаимодействия с плазматической мембраной часть экзосом не подвергается немедленному слиянию/интернализации, а какое-то время остается на поверхности клетки в виде ассоциированных с клетками везикул [Mamaeva *et al.*, 2020], неясной остается биологическая роль и диагностическая ценность таких, ассоциированных с поверхностью клеток, экзосом.

Поскольку РМЖ является лидирующим онкологическим заболеванием среди женского населения по показателям заболеваемости и смертности и в России, и за рубежом [Sung *et al.*, 2021], актуальным является исследование особенностей циркуляции и оценка диагностической значимости внеклеточных дезоксирибонуклеопротеиновых комплексов и экзосом в крови первичных больных РМЖ.

Цель и задачи исследования.

Целью данной работы являлось исследование распределения и состава дезоксирибонуклеопротеиновых комплексов и экзосом в крови больных РМЖ, установление диагностической значимости их анализа.

В ходе исследования решались следующие *задачи*:

1. Оценить фрагментацию и природу концов внеклеточной ДНК плазмы и ДНК, ассоциированной с форменными элементами в крови условно здоровых женщин и больных РМЖ.

2. Оценить частоту встречаемости аберрантно-метирированной ДНК в составе короткой и длинной ДНК плазмы и ДНК, ассоциированной с форменными элементами в крови условно здоровых женщин и больных РМЖ.

3. Охарактеризовать нуклеиновую и белковую составляющие нативных дезоксирибонуклеопротеиновых комплексов, циркулирующих в крови условно здоровых и больных РМЖ женщин, идентифицировать в их составе белки и провести сравнительный биоинформатический анализ ДНК-связывающих белков и белков-«пассажиров».

4. Охарактеризовать суммарные экзосомы крови (включают экзосомы плазмы и экзосомы, ассоциированные с поверхностью форменных элементов крови) условно здоровых женщин и больных РМЖ, идентифицировать белки, входящие в их состав, и провести сравнительный биоинформатический анализ протеомов экзосом в норме и при РМЖ.

5. Провести сравнительный анализ уровней тетраспанин-ассоциированной шеддазы ADAM-10 и тетраспанин-неассоциированной 20S протеасомы в экзосомах плазмы и в экзосомах крови условно здоровых женщин и больных РМЖ.

6. Сопоставить влияние экзосом плазмы и экзосом крови на стимуляцию эпителиально-мезенхимального перехода, клеточную пролиферацию и миграцию, формирование капилляро-подобных структур в экспериментах *in vitro*.

7. Оценить частоты встречаемости известных опухоли-ассоциированных белков в составе нуклеопротеиновых комплексов и экзосом в крови условно здоровых женщин и больных РМЖ.

8. Сформировать панели маркеров для выявления РМЖ методом «жидкостной биопсии», основываясь на полученных данных о протеомах дезоксирибонуклеопротеиновых комплексов и экзосом крови.

Научная новизна полученных результатов. Настоящая работа представляет собой первое комплексное исследование циркулирующих

дезоксирибонуклеопротеиновых комплексов и суммарных экзосом (экзосом плазмы и экзосом, ассоциированных с поверхностью форменных элементов крови, далее – экзосом крови) в крови условно ЗЖ и больных РМЖ.

Впервые установлены ряд характерных особенностей фрагментации и строения концов вДНК плазмы и ДНК, ассоциированной с форменными элементами крови у больных РМЖ, что указывает на различные механизмы генерации вДНК в норме и при онкологическом заболевании. Сравнительная количественная оценка фрагментации и метилирования вДНК в норме и при РМЖ выявила перспективность использования ДНК, ассоциированной с поверхностью форменных элементов крови онкологических больных, для разработки метода «жидкостной биопсии».

Впервые получены и охарактеризованы нативные гистон-содержащие дезоксирибонуклеопротеиновые комплексы, циркулирующие в крови условно ЗЖ и больных РМЖ. Впервые методом MALDI-TOF масс-спектрометрии идентифицирован протеом НПК, и с помощью биоинформатического анализа выявлены различные биологические функции белков НПК крови условно ЗЖ и больных РМЖ. Среди белков НПК выявлены ДНК-связывающие белки и белки-«пассажиры» (не связывают ДНК), обладающие наибольшей диагностической значимостью. Впервые выявленные уникальные для белков НПК больных РМЖ ДНК-связывающие белки и идентифицированные в их составе ДНК-связывающие мотивы могут быть использованы для выделения опухолевой вДНК, что может повысить эффективность выявления новообразований методом «жидкостной биопсии».

Установлено, что экзосомы не являются основными транспортерами вДНК – доля ДНК в короне экзосом не превышает 0,025% от содержания вДНК в плазме крови. Впервые показано увеличение концентрации и изменение морфологии как экзосом плазмы, так и экзосом крови у больных РМЖ по сравнению с условно ЗЖ.

Впервые выявлены различия в уровнях ферментов экзосом плазмы и экзосом крови у больных РМЖ по сравнению с условно ЗЖ: повышение 20S протеасом и ADAM-10 в CD9+ субпопуляции свидетельствует о вовлечении в канцерогенез как тетраспанин-ассоциированных, так и тетраспанин-неассоциированных протеаз как в составе экзосом плазмы, так и экзосом, ассоциированных с форменными элементами крови.

Впервые методом MALDI-TOF масс-спектрометрии идентифицирован протеом экзосом крови условно ЗЖ и больных РМЖ и выявлена наибольшая диагностическая значимость экзосом крови по сравнению с экзосомами плазмы.

С помощью биоинформатического анализа установлено, что экзосомы крови по сравнению с экзосомами плазмы больных РМЖ обогащены белками, стимулирующими ЭМП, миграцию и инвазию, при этом протеом экзосом крови условно ЗЖ обогащен белками, ингибирующими эти процессы.

Впервые установлено, что экзосомы крови больных РМЖ индуцируют ЭМП, стимулируют формирование капилляро-подобных структур и увеличивают количество пролиферирующих и мигрирующих псевдонормальных клеток молочной железы. Выявлено разнонаправленное влияние экзосом крови условно ЗЖ на распространение опухоли: они подавляют формирование капилляро-подобных структур, при этом стимулируют ЭМП, увеличивают количество мигрирующих псевдонормальных клеток и количество митозов, а также длину пути клеток карциномы молочной железы.

Теоретическая и практическая значимость работы.

Значимость работы обусловлена полученным комплексом знаний о составе циркулирующих в крови НПК и экзосом, их роли в стимуляции роста и распространения опухоли и диагностическом потенциале маркеров в их составе. Фундаментальную значимость работы составляют результаты о представленности концов и профилю фрагментации вДНК плазмы и ДНК, ассоциированной с форменными элементами крови: в норме не менее 20% вДНК плазмы имеют апоптотическое происхождение, а присутствие вДНК свыше 1000 п.н. с повышенной представленностью 5'-выступающих концов в крови больных РМЖ свидетельствуют о том, что при развитии онкологического заболевания не менее трети вДНК высвобождается в кровь из некротических клеток. Данные об изменении представленности белков в составе НПК циркулирующих в крови онкологических больных являются уникальными и вносят значимый вклад в описание феномена вДНК. Информация об изменении концентрации и морфологии, а также протеома экзосом в крови онкологических больных расширяет фундаментальные знания об участии экзосом в канцерогенезе.

Впервые полученная информация о фрагментации и индексе метилирования вДНК плазмы и ДНК, ассоциированной с форменными элементами крови будет полезна для разработки диагностических ПЦР-систем для «жидкостной биопсии». Полученные данные о белках, участвующих в транспорте вДНК в составе НПК, и белках в составе экзосом, отвечающих за транспорт опухолевой РНК в кровотоке имеют принципиальное значение для понимания молекулярных механизмов процессов, обеспечивающих передачу генетической информации и сигналов между клетками. Полученная информация может быть использована для создания новых методов диагностики онкологических заболеваний и создания фундаментальных предпосылок для возможной оптимизации противораковой терапии.

Основные положения, выносимые на защиту.

1. У больных РМЖ степень фрагментации и концы внеклеточной ДНК плазмы и ДНК, ассоциированной с форменными элементами крови, отличаются от внеклеточной ДНК условно здоровых женщин, что свидетельствует о различных механизмах их генерации и доступности для нуклеаз.

2. По сравнению с внеклеточной ДНК плазмы, внеклеточная ДНК, ассоциированная с форменными элементами крови больных РМЖ, является более перспективным источником aberrантно-метилованных маркеров, на основе которой могут быть созданы тест-системы для выявления РМЖ.

3. В составе циркулирующих в крови дезоксирибонуклеопротеиновых комплексов треть белков является ДНК-связывающими. При РМЖ изменяется состав как ДНК-связывающих белков, так и белков-«пассажира».

4. Экзосомы плазмы составляют менее половины экзосом крови и не являются основными транспортерами внеклеточной ДНК. У больных РМЖ возрастает концентрация и изменяется морфология как экзосом плазмы, так и экзосом крови. При РМЖ в составе экзосом повышается уровень протеаз: ADAM-10 на поверхности CD-9-положительных экзосом и 20S протеасомы.

5. При РМЖ изменяется состав экзосом: у онкологических больных экзосомы крови по сравнению с экзосомами плазмы обогащены белками, стимулирующими ЭМП, миграцию и инвазию, а у здоровых женщин – белками, ингибирующими эти процессы.

6. Экзосомы крови больных РМЖ стимулируют формирование капилляро-подобных структур, индуцируют ЭМП и увеличивают количество подвижных и пролиферирующих псевдо-нормальных эпителиоцитов, а также общую длину пути клеток карциномы молочной железы. Экзосомы крови здоровых женщин подавляют формирование капилляро-подобных структур и уменьшают длину пути псевдо-нормальных клеток по сравнению с экзосомами плазмы, при этом стимулируют ЭМП, увеличивают количество подвижных и пролиферирующих псевдо-нормальных, а также длину пути раковых клеток.

7. Белки дезоксирибонуклеопротеиновых комплексов и экзосом крови можно рассматривать как источник потенциальных маркеров для выявления РМЖ методом «жидкостной биопсии».

Апробация работы и публикации.

Основные результаты исследования отражены в 31 статье в рецензируемых журналах, индексируемых в базах данных Web of Science и Scopus (из них 6 – первой категории); получены 3 патента РФ на изобретение и 1 свидетельство о государственной регистрации базы данных. Основные результаты работы были представлены автором на международных и российских конференциях: «Петровские чтения» (Санкт-Петербург, Россия, 2006, 2007); «Актуальные вопросы экспериментальной и клинической онкологии» (Томск, Россия, 2006, 2009, 2013, 2015); EMBO Molecular medicine conference: «Common molecular mechanisms of mammary gland development and breast cancer progression» (Дублин, Ирландия, 2006); FEBS Advanced Lecture Course «Matrix Pathobiology, Signaling and Molecular Targets» (Патра, Греция, 2007); «Фундаментальные науки - медицине» (Новосибирск, Россия, 2008, 2013); The 12th Biennial Meeting International Gynecologic Cancer Society (Бангкок, Таиланд, 2008); ИМПАКТ Breast Cancer Conference (Брюссель, Бельгия, 2010);

CNAPS VII «Circulating Nucleic Acids in Plasma and Serum» (Мадрид, Испания, 2011); International conference on Postgenomic technology for biomedicine (Новосибирск, Россия, 20012); 37th ESMO Congress (Вена, Австрия, 2012); The First Meeting in the Frame of French-Siberian Centre of Research and Education «Nucleic Acid - Protein Interactions for Life Sciences» (Новосибирск, Россия, 20013); «Perspectives for development of molecular and cellular biology-4» (Ереван, Армения, 2013); VIII съезд онкологов и радиологов стран СНГ и Евразии (Казань, Россия, 2014); UK-Russia Workshop: Extracellular vesicles-mechanisms of biogenesis and roles in disease pathogenesis (Москва, Россия, 2015); EMBO Workshop «Cellular and molecular mechanism of tumour-microenvironment crosstalk» (Томск, Россия, 2015); VII Российский симпозиум «Белки и пептиды» (Новосибирск, Россия, 2015); Ежегодный конгресс POOM (Сочи, Россия, 2015); CNAPS IX “Circulating Nucleic Acids in Plasma and Serum” (Берлин, Германия, 2015); «Молекулярная онкология: итоги и перспективы» (Москва, Россия, 2015–2019, 2021, 2022); «Physics of cancer: interdisciplinary problems and clinical applications» (Томск, Россия, 2016, 2017); IX съезд онкологов и радиологов стран СНГ и Евразии (Минск, Белоруссия, 2016); «Химическая биология» (Новосибирск, Россия, 2016); V Съезд физиологов СНГ и V Съезд биохимиков России (Дагомыс, Россия, 2016); IX международный конгресс «Биотехнология: состояние и перспективы развития» (Москва, Россия, 2017, 2019); «Биотехнология – медицине будущего» (Новосибирск, Россия, 2017); III Национальный Конгресс по Регенеративной Медицине (Москва, Россия, 2017); Онкологический форум «Белые ночи» (Санкт-Петербург, Россия, 2019, 2020, 2022); «Опухолевые маркеры: молекулярно-генетические и клинические аспекты» (Горно-Алтайск, Россия, 2019, 2022); «Инновационные исследования в биологии и в медицине» (Сочи, Россия, 2020); «Генетические технологии в трансляционной биомедицине» (Томск, Россия, 2022).

Различные аспекты диссертационной работы явились основанием для планирования новых научных тем, продолжающих данное научное направление.

Личный вклад автора.

Работа выполнена преимущественно в Лаборатории молекулярной медицины ИХБФМ СО РАН (Новосибирск, Россия). Результаты исследований были получены лично автором, либо совместно с сотрудниками сторонних организаций, либо сотрудниками Лаборатории молекулярной медицины под непосредственным руководством автора преимущественно в рамках выполнения проектов РФФИ, РФФ, а также Интеграционного проекта СО РАН с Белоруссией, в которых автор являлся руководителем.

Идентификацию белков MALDI-TOF масс-спектрометрией автор провел совместно с к.б.н. О. С. Тутановым (ИХБФМ СО РАН) в Лаборатории протеомики и метаболомики института «Международный томографический центр» СО РАН (Новосибирск, Россия) под руководством проф. д.х.н. Ю. П. Центаловича. Криоэлектронную микроскопию автор провел совместно с к.х.н. Р. Камышлинским в Ресурсном центре зондовой и электронной микроскопии

НИЦ «Курчатовский институт» (Москва, Россия). Трековый анализ проведен автором совместно с к.б.н. Т. А. Штам в Лаборатории молекулярной биофизики и нейтронных исследований Петербургского института ядерной физики им. Б.П. Константинова ИЦ «Курчатовский институт» (Гатчина, Ленинградская обл., Россия). Оценка ангиогенной активности экзосом проведена автором совместно с к.б.н. А. Ю. Ефименко на кафедре Биохимии и молекулярной медицины Факультета фундаментальной медицины Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова (Москва, Россия).

Трансмиссионная электронная микроскопия экзосом была проведена к.б.н. А. Е. Григорьевой (ГМИ, ИХБФМ СО РАН). Двумерный электрофорез экзосомальных белков и анализ гелей был выполнен к.б.н. Ю. С. Бакакиной (Институт биофизики и клеточной инженерии НАН Беларуси, Минск, Белоруссия). Диагностика пациентов, включенных в исследование, проводилась сотрудниками Онкологического отделения №2 Новосибирского областного клинического онкологического диспансера (Новосибирск, Россия).

В совместных работах автору принадлежит ключевая роль в постановке задач, выборе методов исследования, разработке методик и гипотез, анализе литературных данных и интерпретации полученных результатов. Автор принимал непосредственное участие в планировании и организации проведения экспериментов, систематизации и обобщении экспериментальных данных, подготовке публикаций, а также представлении результатов исследования на научных конференциях и конгрессах.

Объем и структура диссертации.

Диссертация изложена на 332 страницах машинописного текста, состоит из введения, обзора литературы, материалов и методов исследования, результатов собственных исследований и их обсуждения, заключения, выводов, применение результатов и научных выводов, списка литературы и приложений. Работа иллюстрирована 61 рисунком и 32 таблицами. Библиографический указатель содержит 570 литературных источников.

СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Внеклеточные нуклеиновые кислоты циркулируют как в виде комплексов с биополимерами, так и в составе мембранных частиц/везикул, поэтому объектами исследования являлись дезоксирибонуклеопротеиновые комплексы и экзосомы крови условно ЗЖ и больных РМЖ. Дизайн исследования приведен на Рис. 1. Для исследования распределения, состава и биологических функций НПК и экзосом, а также установления диагностической значимости их анализа были получены образцы венозной крови условно ЗЖ (n = 190, 28-80 лет) и первичных больных РМЖ (n = 194, 27-74 года, табл. 1).

Образцы крови условно ЗЖ были получены из Медицинского научно-образовательного центра Института медицины и психологии им. В. Зельмана Новосибирского государственного университета (МНОЦ ИМПЗ НГУ, г. Новосибирск) и Центра новых медицинских технологий (г. Новосибирск).

Группа доноров была сформирована на основе анкетирования, а также клинического обследования. Из исследования были исключены женщины с нарушениями функционирования репродуктивной системы организма, наличием эндокринно-метаболических факторов, наличием генетических и экзогенных факторов, которые могут повлиять на интерпретацию полученных результатов. Группу первичных больных РМЖ составили пациентки Онкологического отделения № 2 (Отделение патологии молочной железы) Новосибирского областного клинического онкологического диспансера.

Таблица 1 – Клинико-морфологическая характеристика группы больных РМЖ, вовлеченных в исследование*

Клинико-морфологическая характеристика		РМЖ, n = абсолютное количество больных, (относительное, %)		
		Люминальный n = 165 (85%)	Трижды- негативный n = 29 (15%)	Общая группа рака, n = 194 (100%)
Размер первичной опухоли	T1	78 (47%)	7 (24%)	85 (44%)
	T2	87 (53%)	22 (76%)	109 (56%)
Распространенность на регионарные лимфоузлы	N0	114 (69%)	20 (69%)	134 (69%)
	N1	51 (31%)	9 (31%)	60 (31%)
Удаленные метастазы	M0	165 (100%)	29 (100%)	194 (100%)
Степень злокачественности	II	160 (97%)	25 (86%)	185 (95%)
	III	3 (2%)	4 (14%)	7 (4%)
	неизвестно	2 (1%)	0 (0%)	2 (1%)
Гистологический подтип		Инвазивная протоковая карцинома		194 (100%)

*TNM – международная классификация стадий рака 1997 г.: T – первичная опухоль; N – регионарные лимфатические узлы; M – отдаленные метастазы.

Работу проводили с соблюдением принципов добровольности и конфиденциальности в соответствии с Основами законодательства РФ об охране здоровья граждан. Работа одобрена этическими комитетами ИХБФМ СО РАН и ИМПЗ НГУ.

Поскольку в экспериментах были использованы только образцы, хранившиеся менее года, для каждого этапа исследований создавали новый банк образцов; информация о количестве условно ЗЖ и больных РМЖ, вовлеченных в отдельные эксперименты, отражена на рис. 1 и в таблицах, приведенных в соответствующих разделах Глав 3-5 диссертации. Кроме того, для некоторых экспериментов в связи с низкой концентрацией исследуемых объектов в крови требовалось объединение образцов.

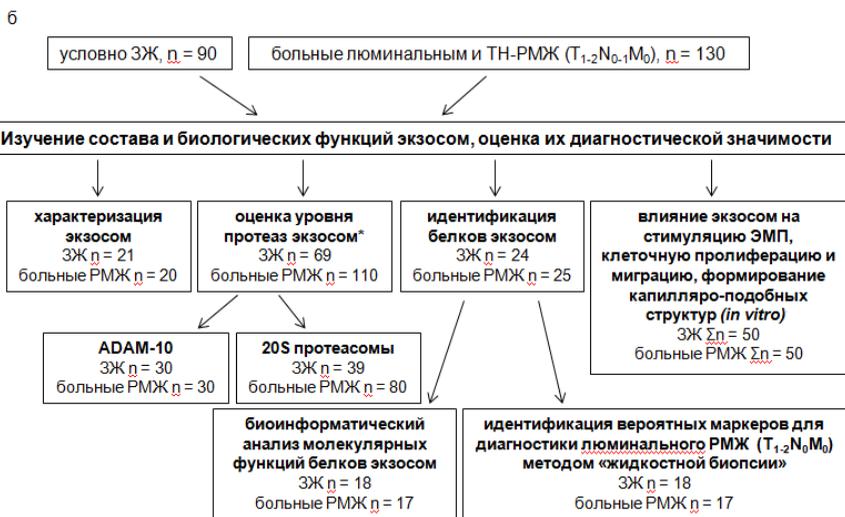
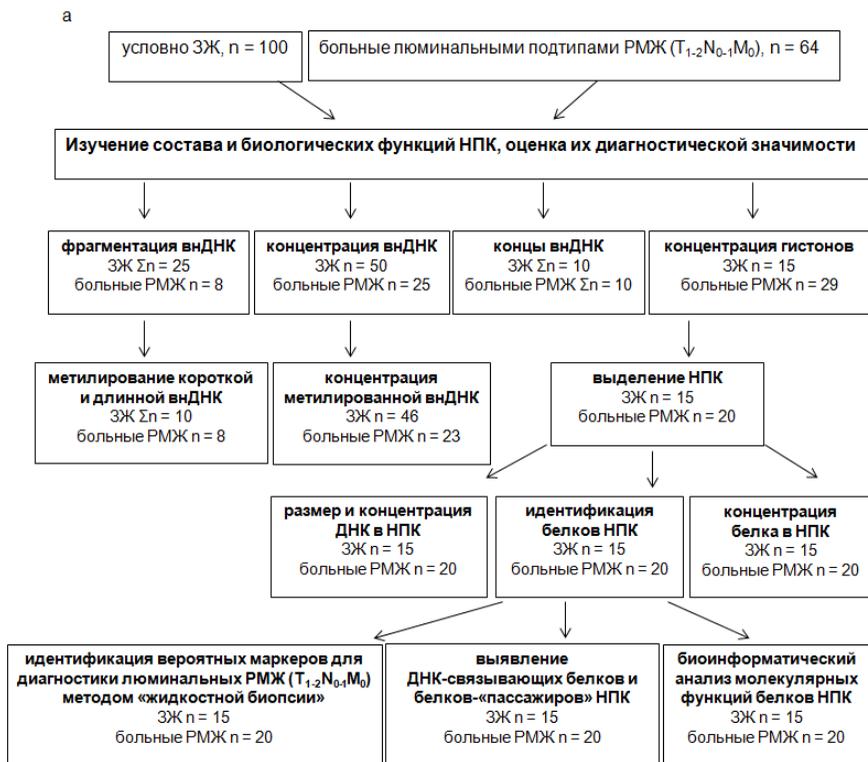


Рис. 1 – Дизайн исследования НПК (а) и экзосом (б), циркулирующих в крови условно ЗЖ и больных РМЖ. Знаком Σ отмечены пулированные образцы, знаком * отмечены образцы экзосом, в которых был оценен уровень экзосомальных протеаз, затем они были объединены и использованы в экспериментах *in vitro*.

В частности, сравнительный анализ концентрации и аберрантного метилирования внДНК, циркулирующей в плазме и ассоциированной с ФЭК больных РМЖ по сравнению с условно ЗЖ проведен на индивидуальных образцах, а исследование природы концов ДНК – на пулированных образцах. Аналогично, анализ фрагментации внДНК и оценка индекса метилирования коротких и длинных фрагментов проведены на пулированных образцах условно ЗЖ и индивидуальных образцах больных РМЖ (рис. 1а). Выделение нативных НПК с последующей характеристикой нуклеиновой и белковой составляющих проводили из индивидуальных образцов крови условно ЗЖ и больных РМЖ (рис. 1а). Характеризация, оценка уровня экзосомальных протеаз и идентификация белков экзосом плазмы и экзосом крови проведена на индивидуальных образцах условно ЗЖ и больных РМЖ, исследование влияния экзосом на ЭМП, клеточную пролиферацию и миграцию, а также формирование капилляро-подобных структур – на пулированных образцах (рис. 1б).

Образцы крови собирали венепункцией в антикоагуляционный раствор (К₃ЭДТА) и обрабатывали в течение ближайшего часа. После отделения плазмы, которая являлась источником внДНК и экзосом, для получения ассоциированных с ФЭК внДНК и экзосом проводили последовательную обработку форменных элементов фосфатным буфером, содержащим 5 мМ ЭДТА (PBS-EDTA элюат), затем 0,125% раствором трипсина (трипсиновый элюат) [Laktionov et al., 2004].

1. Дезоксирибонуклеопротеиновые комплексы крови ЗЖ и больных РМЖ

Строение, свойства и биологическая активность НПК, особенности их циркуляции и белкового состава в настоящее время недостаточно изучены, однако ряд исследований указывают на то, что с их помощью функционально активные ДНК могут транспортироваться в другие клетки, они необходимы для нормального функционирования многоклеточных организмов и могут быть связаны с развитием ряда патологических процессов. Действительно, при развитии онкологических заболеваний происходит не только увеличение концентрации внДНК в крови, но и внДНК имеет те же изменения, что и ДНК в клетках опухоли, а от гидролиза эндогенными нуклеазами эту ДНК защищают имеющие ДНК-связывающие мотивы белки, формируя НПК. Исследование распределения опухолеспецифических ДНК в составе коротких и длинных фрагментов внДНК в составе НПК, а также сравнительный анализ белков в составе НПК, циркулирующих в крови ЗЖ и больных РМЖ, позволит расширить фундаментальные знания о механизмах, которые приводят к появлению и обеспечивают циркуляцию в крови данных комплексов, а также оценить их диагностическую значимость.

1.1. Характеризация дезоксирибонуклеиновой составляющей циркулирующих в крови НПК

На источник происхождения внднк в циркуляции может пролить свет информация о строении ее концов и профиле фрагментации. Дизайн эксперимента по исследованию концов внднк крови приведен на рис. 2,

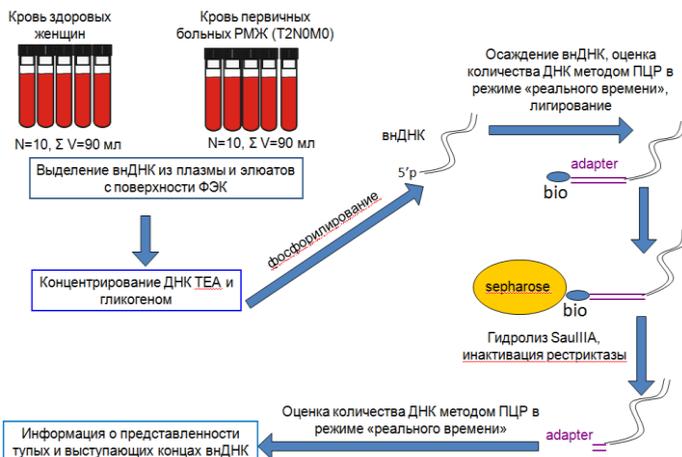


Рис. 2 – Дизайн эксперимента по исследованию концов внднк.

использованные олигонуклеотиды – в табл. 2.

Таблица 2 – Олигонуклеотиды, использованные в работе

Внднк плазмы и днк ассоциированная с фэк условно зж имеют гетерогенные концы (рис. 3а). Внднк плазмы больных люминальным А рмж (Т2N0M0, n = 10) содержит преимущественно выступающие на 3 нуклеотида 3'-концы и выступающие на 2 нуклеотида 5'-концы, а ассоциированная с фэк днк – только выступающие на 2 нуклеотида 5'-концы (рис. 3б).

Для анализа фрагментации внднк был использован капиллярный электрофорез. Дизайн эксперимента приведен на рис. 4. Поскольку в плазме крови зж концентрация внднк крайне низка, индивидуальные образцы крови объединены (n = 25). С помощью капиллярного электрофореза показано, что в плазме крови условно зж преобладают фрагменты днк размером ~ 180 п.н., ассоциированная с фэк днк представлена преимущественно длинными фрагментами (от 3765 до 14490 п.н. в PBS-EDTA, от 1522 до 14135 п.н. в трипсиновом элюатах).

В индивидуальных образцах плазмы больных люминальным А рмж (Т2N0M0, n = 8) преобладали длинные фрагменты днк, фрагменты ~ 171 и ~

Обозначение	Последовательность (5'-3')
-3 5' внднк	biotin-TACCATTTTGATCCAAACNNN-OH HO-GTTTGGATCAAAATGGTA-OH
-2 5' внднк	biotin-TACCATTTTGATCCAAACNN-OH HO-GTTTGGATCAAAATGGTA-OH
-1 5' внднк	biotin-TACCATTTTGATCCAAACN-OH HO-GTTTGGATCAAAATGGTA-OH
0 5' внднк	biotin-TACCATTTTGATCCAAACTTA-OH HO-TAAGTTTGGATCAAAATGGTA-OH
+1 5' внднк	biotin-TACCATTTTGATCCAAACTTA-OH HO-NTAAGTTTGGATCAAAATGGTA-OH
+2 5' внднк	biotin-TACCATTTTGATCCAAACTTA-OH HO-NNTAAGTTTGGATCAAAATGGTA-OH
+3 5' внднк	biotin-TACCATTTTGATCCAAACTTA-OH HO-NNNTAAGTTTGGATCAAAATGGTA-OH

180 п.н. представлены в меньшей степени. Короткие фрагменты ДНК являлись минорным компонентом в составе ассоциированной с ФЭК ДНК крови у ЗЖ и у больных РМЖ.

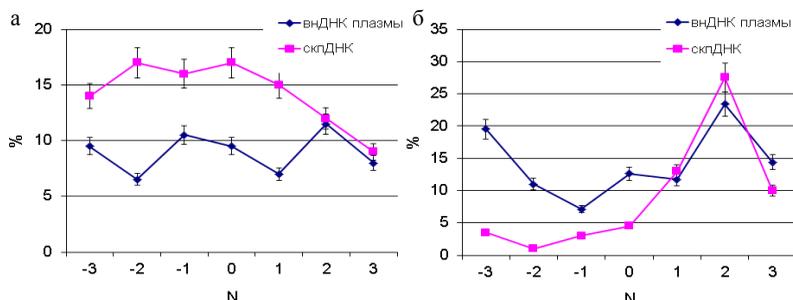


Рис. 3 – Представленность концов в составе внДНК крови условно ЗЖ (а) и больных РМЖ (б).

Для оценки доли индивидуальных фрагментов в общем пуле анализируемой ДНК, фрагменты внДНК от 100 до 1000 п.н. были выделены с помощью электроэлюции из ПААГ с

последующей оценкой доли коротких фрагментов в составе внДНК с использованием количественной ПЦР на LINE1-элемент. Эффективность выделения 3 мкг ДНК (100 – 1000 п.н.) составила 90%, ПЦР-продукта (194 п.н.) – 91% и 80% для 1 и 0,04 нг, соответственно. Показано, что доля коротких фрагментов в плазме крови ЗЖ составляет ~20% внДНК, у больных РМЖ ~2%. В составе ассоциированной с ФЭК ДНК короткие ДНК-фрагменты практически отсутствуют как в норме, так и при развитии онкологического заболевания (0,1–0,9%) (табл. 3).

Таблица 3 – Распределение коротких (100-1000 п.н.) и длинных фрагментов (более 1 т.п.н.) в составе внДНК крови условно ЗЖ и больных РМЖ, (%).

ДНК фрагменты	Условно ЗЖ			Больные РМЖ		
	Плазма	PBS-EDTA элюат	Трипсиновый элюат	Плазма	PBS-EDTA элюат	Трипсиновый элюат
100- 1000 п.н.	18,7	0,9	0,1	2,6±1,4	0,3±0,1	0,2±0,1
> 1000 п.н.	81,3	99,1	99,9	97,5±1,4	99,7±0,1	99,8±0,1

Полученные результаты о фрагментации внДНК в плазме крови ЗЖ согласуются с литературными данными [Holdenrieder *et al.*, 2012, Choy *et al.*,

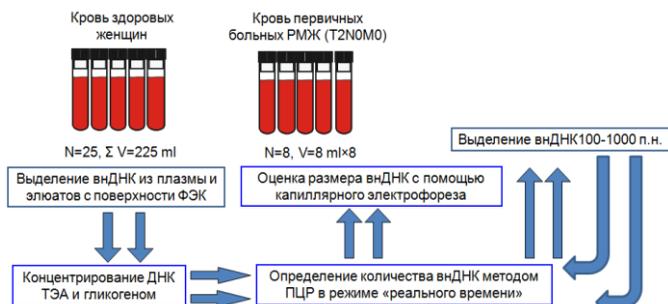


Рис. 4 – Дизайн эксперимента по оценке профиля фрагментации внДНК крови.

2022]. Длина фрагментов ассоциированных с ФЭК у условно ЗЖ и у больных РМЖ может объясняться устойчивостью ДНК к действию нуклеаз.

Данные о представленности концов и профилю фрагментации вДНК плазмы и ассоциированной с ФЭК ДНК указывают, что в норме не менее 20% вДНК плазмы имеют апоптотическое происхождение. Присутствие длинных фрагментов вДНК с повышенной представленностью 5'-выступающих концов в крови первичных больных РМЖ (T2N0M0) свидетельствуют о том, что при развитии онкологического заболевания не менее трети вДНК высвобождается в кровотоке из некротических клеток.

Поскольку метилированная ДНК более стабильна, чем неметилированная [Скворцова *и др.*, 2010] и легко связывается с клетками [Брызгунова *и др.*, 2010], была проведена оценка aberrантно метилированной вДНК в плазме и элюатах с поверхности ФЭК. В качестве мишени была выбрана промоторная область гена *RARβ2*, который кодирует ядерный рецептор ретиноидной кислоты и играет критическую роль во время эмбрионального развития, гомеостаза, роста и дифференцировки клеток.

Химическую конверсию короткой (100-1000 п.н.) вДНК и исходной вДНК из плазмы, PBS-EDTA и трипсинового элюатов проводили набором EZ DNA Methylation-Gold Kit (Zymo Research, США). Для оценки количества метилированных и неметилированных фрагментов последовательности *RARβ2* для калибровки использовали ПЦР-продукты гена *RARβ2* длиной 186 п.н. и 161 п.н., соответственно. Специфичная к метилированию ПЦР и независимая от метилирования ПЦР обладали чувствительностью 50 копий/образец, точностью 90%, эффективностью амплификации не ниже 75-80%. Как в норме, так и при патологии метилированные последовательности промоторной области гена *RARβ2* были выявлены только в составе длинных фрагментов вДНК, при этом индекс метилирования в крови условно ЗЖ не превысил 10%, а у больных люминальным А РМЖ (T2N0M0) достигал 61% (табл. 4).

Таблица 4 – Индекс метилирования* в составе вДНК крови условно ЗЖ и больных РМЖ, среднее ± SD**.

Фракция крови	ДНК	Условно ЗЖ (n=10)	Больные РМЖ (n=8)	p	*Индекс метилирования = 100%×(метилированный <i>RARβ2</i> /неметилированный <i>RARβ2</i>) ** Концентрация вДНК ниже чувствительности метода обозначена как 0.
Плазма	Суммарная ДНК 100-1000 п.н.	10±3 0	33±11 0	<0,05	
PBS-EDTA элюат	Суммарная ДНК 100-1000 п.н.	9±4 0	15±6 0		
Трипсиновый элюат	Суммарная ДНК 100-1000 п.н.	7±4 0	61±12 0	<0,05	

Таким образом, наиболее ценным источником опухолеспецифической ДНК для «жидкостной биопсии» являются длинные фрагменты вДНК, связанные с поверхностью ФЭК. Во-первых, ассоциация ДНК с ФЭК предотвращает влияние нуклеаз крови на данные ПЦР, а во-вторых, связанная с клетками ДНК обогащена метилированной ДНК, что подтверждается индексом метилирования *RARβ2*.

1.2. Характеризация протеиновой составляющей циркулирующих в крови НПК

Поскольку белковый состав НПК крови может определять не только время жизни внДНК в циркуляции, но и её биологические функции, был разработан подход для выделения нативных НПК крови, идентифицированы в их составе белки и с помощью биоинформатического анализа установлены ДНК-связывающие мотивы, а также молекулярные функции и биологические процессы, в которые вовлечены как ДНК-связывающие белки, так и белки-«пассажиры» НПК.

Поскольку до сих пор достоверно неизвестно какие белки, кроме гистонов, иммуноглобулинов и амилоида Р, участвуют в формировании циркулирующих в кровотоке НПК, и концентрация внДНК в сыворотке крови коррелирует с концентрацией нуклеосом, нативные НПК были выделены из крови условно ЗЖ (n=15, 30–65 лет) и больных люминальным РМЖ (n = 20, T1-2N0M0, 46–60 лет) при помощи аффинной хроматографии на сорбенте с иммобилизованными антителами против гистонов, с последующей идентификацией белков в их составе при помощи масс-спектрометрии (рис. 5).

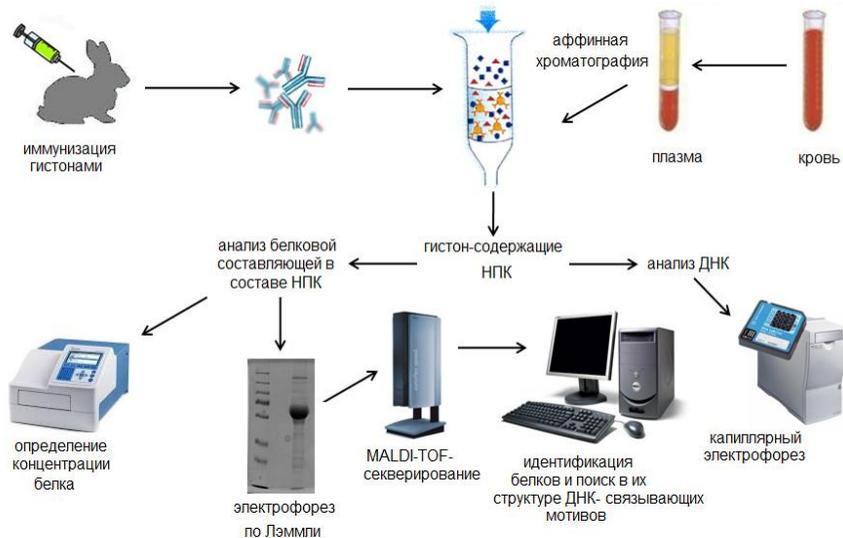
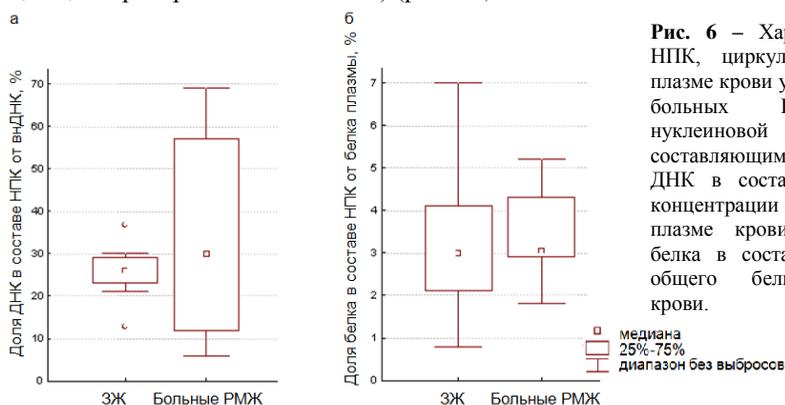


Рис. 5 – Дизайн эксперимента по исследованию белков в составе НПК крови.

Суммарный препарат гистонов человека получен методом кислотной экстракции; при помощи пятенного ИФА и электрофореза по Лэммли подтверждено в его составе наличие гистонов H1, H2A, H2B и H3. Данный препарат был использован для наработки кроличьих поликлональных антител против гистонов и синтеза аффинного сорбента для последующего выделения анти-гистоновых антител. Аффинно-очищенные кроличьи антитела против гистонов человека были иммобилизованы на активированную бромцианом сепарозу CL-4B и выделены нативные гистон-содержащие НПК.

Для характеристики ДНК в составе аффинно-очищенных НПК, ДНК выделяли из препаратов НПК и из плазмы крови при помощи коммерческого набора «BPD-100» (БиоСилика, Россия). С помощью капиллярного электрофореза был определен размер ДНК, а с помощью ПЦР на LINE-1 элемент – ее концентрация. Доля ДНК в составе НПК от общей вДНК в плазме крови в норме и при РМЖ достоверно не отличалась (медиана составила 26% и 30%, соответственно, $p = 0,655$, U-критерий Манна-Уитни) (рис. 6а). Концентрация белка в препаратах нативных НПК из плазмы крови условно ЗЖ и больных РМЖ определена с помощью набора «NanoOrange Protein Quantitation kit» (Molecular Probes, USA). Показано, что доля белка в составе НПК от общего содержания белка в плазме крови в норме и при РМЖ достоверно не отличалась (медиана составила 3% и 3,05%, соответственно, $p = 0,521$, U-критерий Манна-Уитни) (рис. 6б).



Белки в составе циркулирующих в крови НПК идентифицировали методом MALDI-TOF масс-спектрометрии после разделения в ПААГ и трипсинолиза белков в индивидуальных фрагментах геля. Каждый образец НПК наносили на гель в пяти повторах; заданный score 56 и наличие не менее трех пептидов из последовательности белка позволили с высокой достоверностью ($p < 0,05$) идентифицировать 177 и 169 белков в НПК крови условно ЗЖ и больных РМЖ, соответственно. Доля универсальных белков НПК (встречались как в норме, так и при онкологическом заболевании) составила 12% (38 белков), из них 12 белков (HOXC5, GPR22, PAGE3, JUND, TRAM1L1, MYL12A, EFCAB9, U2AF1, IDE, SPATA3, CREM, B3GALTL) встречались в 76% случаев.

Для характеристики белков, идентифицированных в циркулирующих НПК крови, был проведен биоинформационный анализ с помощью БД InterPro и InterProScan версий 5.15-58 и 5.15-54, что позволило идентифицировать категории IPR и GO для белков НПК крови условно ЗЖ и больных РМЖ.

Анализ белков в категории GO «Клеточные компоненты» показал, что среди универсальных категорий мембранные белки составляют почти половину всех

идентифицированных белков, что косвенно указывает на возможность связывания циркулирующих вДНК в клеточной поверхности, и вероятно является необходимым условием для проникновения в клетку и влияния на ее биологические процессы (рис. 7).

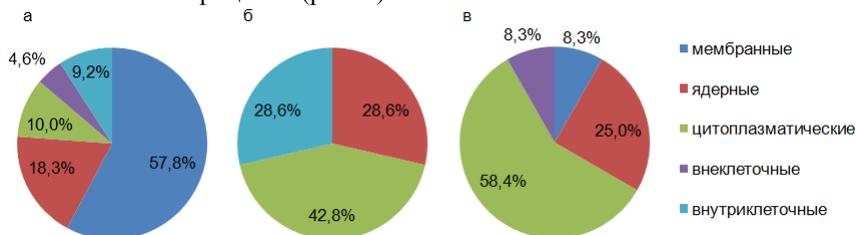


Рис. 7 – GO-анализ белков НПК по клеточным компонентам: универсальные белки (а), уникальные белки условно ЗЖ (б), уникальные белки больных РМЖ (в).

Доля внеклеточных универсальных белков в составе НПК составляет менее 5%, что также косвенно указывает, что в циркуляцию попадают уже сформированные НПК. Показано, что уникальные белки НПК условно ЗЖ отличаются от уникальных белков НПК больных РМЖ наличием внутриклеточных белков и отсутствием мембранных и внеклеточных белков.

Анализ белков в составе НПК плазмы крови ЗЖ и больных РМЖ в категории GO «Молекулярные функции» позволил установить, что среди универсальных категорий наиболее представлены нуклеиновые кислоты/нуклеотид-связывающие белки (рис. 8).

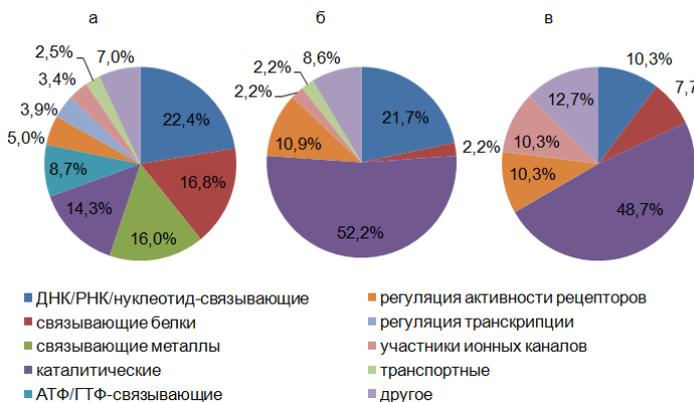


Рис. 8 – GO-анализ белков НПК по молекулярным функциям: универсальные белки (а), уникальные белки условно ЗЖ (б), уникальные белки больных РМЖ (в).

Среди уникальных белков НПК крови условно ЗЖ и больных РМЖ наиболее представлены каталитически-активные белки, а также белки, связывающие нуклеиновые кислоты и регулирующие активность рецепторов. Кроме того, при онкопатологии в НПК возрастает доля белков-участников ионных каналов и белков, связывающих белки (рис. 8).

Анализ белков в составе НПК плазмы крови условно ЗЖ и больных РМЖ в категории GO «Биологический процесс» позволил установить, что среди универсальных категорий наиболее представлены белки, вовлеченные в передачу сигналов, транспорт и регуляцию транскрипции, а также осуществляющие каталитические реакции. Анализ уникальных белков в составе НПК показал, что у онкологических больных по сравнению с условно ЗЖ наиболее представлены в составе НПК транспортные белки и белки, участвующие в передаче сигналов (рис. 9).



Рис. 9 – GO-анализ белков НПК по биологическим процессам: универсальные белки условно ЗЖ (а), уникальные белки больных РМЖ (в).

Для выявления белков, связывающих ДНК и нуклеотиды, в составе НПК, идентифицированные белки анализировали с использованием QuickGO по GO “связывание нуклеиновых кислот” (0003676) и “связывание нуклеотидов” (0000166). Установлено, что со связыванием нуклеиновых кислот и нуклеотидов (НК-связывающие) ассоциированы 113 белков (37%), из них 15 являются универсальными (39% от всех универсальных белков НПК). В составе уникальных белков НПК крови условно ЗЖ доля НК-связывающих белков составила 40%, в составе уникальных белков НПК крови больных РМЖ – 33%.

Для идентификации ДНК-связывающих доменов в выявленных НК-связывающих белках в составе НПК крови, полученные протеомы исследовали с помощью веб-платформы Interpro и БД Interpro (<https://www.ebi.ac.uk/interpro/>), PROSITE, Pfam (<http://pfamxfam.org/>), SMART (<http://smarteml-heidelberg.de/>) и CDD (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/cdd.shtml>). В результате выявлено 38 типов ДНК-связывающих мотивов, наиболее представленными среди которых являются цинковые пальцы (C2H2, CCCH, PHD, C4, CXXC и RING типов), домены Гомеобокса, KRAB, петля-поворот-петля и лейциновые застёжки.

Сравнительный анализ функционального обогащения, проведенный с помощью FunRich показал, что в крови больных РМЖ в составе НПК

повышена представленность ДНК-связывающих белков, вовлеченных в процессы регуляции метаболизма нуклеотидов, нуклеозидов и нуклеиновых кислот (43% при раке и 34% в норме) и снижена представленность ДНК-связывающих белков, вовлеченных в процессы межклеточной коммуникации и передачи сигналов (по 17% в норме и 25% и 27%, соответственно при РМЖ) (рис. 10).

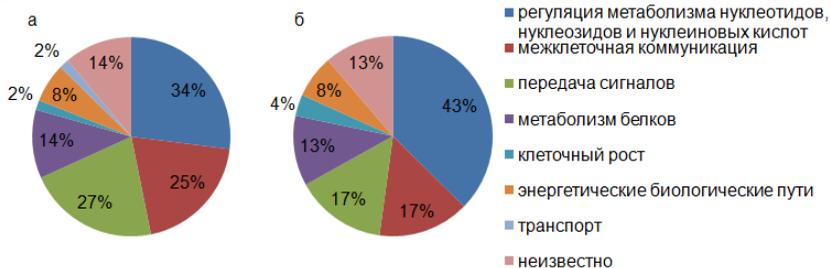


Рис. 10 – Сравнительный анализ функционального обогащения ДНК-связывающих белков НПК крови условно ЗЖ (а) и больных РМЖ (б) по биологическим процессам.

Помимо ДНК-связывающих белков в состав НПК входят белки, не осуществляющие непосредственное связывание ДНК (белки-«пассажиры»). Анализ белков-«пассажиры» не менее важен как для понимания процессов формирования и строения НПК, так и их функций и особенностей циркуляции. Среди белков-«пассажиры» НПК крови в норме и при РМЖ сопоставимо представлены белки, регулирующие межклеточную коммуникацию (20% и 22%, соответственно) и передачу сигналов (23% и 24%, соответственно); представленность белков-«пассажиры» у условно ЗЖ, опосредующих энергетические пути была в три раза выше, чем у онкологических больных (16% и 5%, соответственно), а белков, вовлеченных в процессы транспорта – ниже (7% и 12%, соответственно) (рис. 11).



Рис. 11 – Сравнительный анализ функционального обогащения белков-«пассажиры» НПК крови условно ЗЖ (а) и больных РМЖ (б) по биологическим процессам.

Таким образом, в процессы регуляции метаболизма нуклеиновых кислот вовлечены преимущественно ДНК-связывающие белки, а в процессы межклеточной коммуникации и передачи сигнала – белки-«пассажиры». По-видимому, белки-«пассажиры» связываются с НПК через ДНК-связывающие

белки и играют значимую роль в транспорте и защите вДНК от действия нуклеаз, узнавании НПК иммунной системой, их интернализации и клиренсе.

Дальнейшее детальное изучение белков НПК крови может позволить как использовать данные о циркулирующих ДНК-связывающих белках в рамках диагностических методов для обогащения опухолевой вДНК, так и улучшить мультимаркерные подходы за счёт использования панелей маркеров данной ДНК и циркулирующих в комплексах с ней белков.

1.3. Опухолевые протеомные маркеры в составе НПК крови больных РМЖ

С помощью БД dbDEPC (<https://www.scbio.org/dbdepc3/index.php>) в составе уникальных белков НПК крови больных РМЖ выявлено 44 белка (34 %) дифференциально экспрессируемых при ряде злокачественных новообразований, из них 14 (11%) – при РМЖ. Однако анализ встречаемости гиперэкспрессированных при РМЖ в тканях белков в составе индивидуальных образцов НПК крови больных РМЖ выявил их крайне низкую диагностическую значимость.

Комбинация белков SPG7, ADRB1, SMCO4, PHF1, PSMG1 в составе НПК позволяет дифференцировать первичных больных люминальным РМЖ (T1-2N0M0) от условно ЗЖ с чувствительностью 100% и специфичностью 80% (AUC 0,900, 95% доверительный интервал 0,751 до 0,975, рис. 12). Поскольку из пяти потенциально диагностически-значимых белков только PHF1 является ДНК-связывающим белком, вероятно, что именно белки-“пассажиры” обуславливают формирование и структуру НПК, их транспорт и последующую передачу сигналов клеткам-реципиентам.

В дальнейшем выявленные уникальные ДНК-связывающие мотивы опухоле-специфических белков могут быть использованы для обогащения опухолевой вДНК, что повысит эффективность диагностики онкологических заболеваний на основе вДНК.

Выявленные перспективные протеомные маркеры РМЖ (SPG7, ADRB1, SMCO4, PHF1, PSMG1) НПК необходимо в дальнейшем верифицировать на обширных группах пациентов. В комбинации с анализом последовательностей опухолевой вДНК данные опухоли-ассоциированные белки

НПК могут служить потенциальными мишенями для разработки методов ранней неинвазивной диагностики злокачественных новообразований.

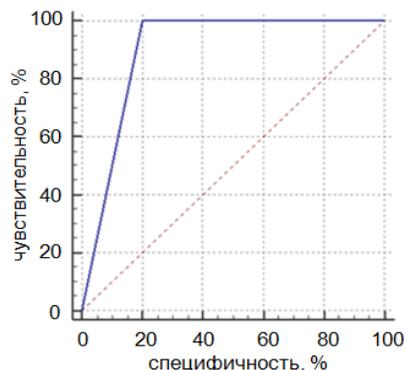


Рис. 12 – ROC-кривая для определения белков SPG7, ADRB1, SMCO4, PHF1, PSMG1 в НПК плазмы крови. Синяя линия – аппроксимированная кривая ROC.

2. Сравнительный анализ экзосом крови условно ЗЖ и больших РМЖ

Экзосомы транспортируются с током крови по всему организму и частично отражают состав родительских клеток. В настоящее время отсутствует информация о составе и биологических функциях недавно обнаруженных экзосом, ассоциированных с ФЭК. Сравнительный анализ состава и биологической активности экзосом плазмы и экзосом крови онкологических больных позволит не только расширить фундаментальные знания о распределении экзосом между плазмой и ФЭК, но и заложит базу для создания новых вариантов диагностики злокачественных заболеваний, позволит создать фундаментальные предпосылки для возможной оптимизации противоопухолевой терапии.

2.1. Характеризация экзосом из плазмы и экзосом крови

Поскольку циркулирующие в крови экзосомы несут на своей поверхности специфические рецепторы для адресной доставки биологически-активных молекул к клеткам-мишеням, можно предположить, что эти везикулы также способны взаимодействовать с плазматическими мембранами ФЭК, при этом часть экзосом не подвергается немедленному слиянию с мембраной и может какое-то время оставаться на поверхности клетки в виде ассоциированных с клетками везикул [Mamaeva *et al.*, 2020].

Для выяснения роли экзосом, ассоциированных с ФЭК, в развитии РМЖ и оценки их диагностического потенциала, экзосомы выделяли из плазмы и из крови (препараты включали в себя экзосомы из плазмы, из PBS-EDTA элюата и из трипсинового элюата, полученные как описано ранее [Laktionov *et al.*, 2004]) условно ЗЖ (n = 21) и первичных больших РМЖ (T1-2N0-1M0, n = 20, из них люминальный подтип n = 15 и трижды-негативный подтип – 5) путем комбинации ультрафильтрации через фильтры диаметром пор 100 нм и последовательного ультрацентрифугирования при 100 000 g в течение 1,5 ч при 4°C. Для подтверждения экзосомальной природы выделенных везикул из плазмы и из крови была проведена трансмиссионная (ТЭМ) и криоэлектронная (крио-ЭМ) микроскопия, размер и концентрацию везикул оценивали трековым анализом, наличие поверхностных тетраспанинов – проточной цитометрией.

С помощью ТЭМ было показано, что препараты везикул не содержали частиц более 100 нм, а форма и размер этих везикул соответствуют характеристикам экзосом, выделенных из других биологических жидкостей [Yunusova *et al.*, 2019; Grigor'eva *et al.*, 2016]. В полученных препаратах основная часть везикул как из плазмы, так и из крови условно ЗЖ и больших РМЖ имела размеры 40-100 нм, содержание везикул с поврежденной мембраной во всех препаратах не превышало 10%, доля везикул менее 30 нм составила не более 15% (рис. 13).

При оценке распределения везикул различного строения и размеров с помощью крио-ЭМ были проанализированы 100 изображений везикул из плазмы и 116 изображений везикул из крови условно ЗЖ (рис. 14 а,б); 121

изображение везикул из плазмы и 117 изображений везикул из крови больных РМЖ (рис. 14 в,г).

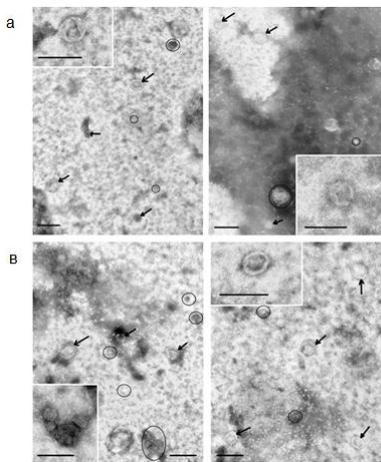


Рис. 13 – Препараты экзосом, выделенные из (а) плазмы условно ЗЖ, (б) плазмы больных РМЖ, (в) экзосом крови условно ЗЖ, (г) экзосом крови больных РМЖ. Овалом выделены «не-везикулы», стрелками обозначены экзосомы, на врезках – экзосомы. Длина масштабной линии соответствует 100 нм. ТЭМ, негативное контрастирование фосфорновольфрамовой кислотой. ТЭМ проведена к.б.н. Григорьевой А.Е. (группа микроскопических исследований ИХБФМ СО РАН, Новосибирск, Россия).

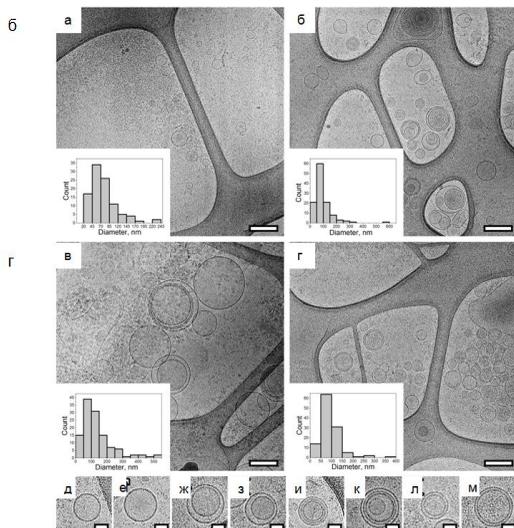


Рис. 14 – Представленность экзосом с различной морфологией. Крио-ЭМ-изображения экзосом, выделенных из объединенных образцов плазмы условно ЗЖ (а), крови условно ЗЖ (б), плазмы больных РМЖ (в), крови больных РМЖ (г), одианных везикул (д, е), двойных везикул (ж, з), многослойных везикул (и, к), двухмембранных везикул (и-м), везикул с электронно-плотным содержимым (ж, м). Масштабные линейки составляют 500 нм для микрофотографий (а-г) и 100 нм для микрофотографий (д-м). Кристо-ЭМ проведена к.х.н. Р. Камышлинским (Ресурсный центр зондовой и электронной микроскопии НИЦ «Курчатовский институт», Москва, Россия).

Более 90% внеклеточных везикул имели липидный бислой/мембрану. Одианные везикулы были преимущественно представлены в плазме условно ЗЖ, а в препаратах из крови ЗЖ их содержание уменьшалось (с 91% до 37%), при этом увеличивалась доля двойных везикул (с 3 до 20%) и двухмембранных везикул (с 0 до 22%). Морфология выделенных везикул из плазмы и из крови больных РМЖ были сопоставимы с преобладанием одиночных везикул (81 и 70%, соответственно). Таким образом, в плазме условно ЗЖ и плазме и крови больных РМЖ преобладают одиночные экзосомы, а их доля в крови ЗЖ снижена почти в 2,5 раза. Поскольку экзосомы крови содержат две фракции (экзосомы плазмы и экзосомы, ассоциированные с поверхностью ФЭК), выявленное явление свидетельствует о преобладании на поверхности ФЭК экзосом различной морфологии. Это позволяет предположить, что существуют субпопуляции экзосом с различными специфическими функциями, а ФЭК

выступают в качестве их переносчиков, а при злокачественном новообразовании происходит перераспределение этих субпопуляций.

При помощи трекового анализа было показано, что как в норме, так и при РМЖ около половины экзосом крови ассоциированы с поверхностью ФЭК. При люминальном РМЖ концентрация экзосом достоверно повышается как в плазме, так и в крови больных по сравнению с условно ЗЖ ($p < 0,05$) (табл. 5).

Таблица 5 – Концентрация и распределение по размерам экзосом из плазмы и из крови условно ЗЖ и больных РМЖ. Данные по трековому анализу частиц

Источник экзосом		Медиана концентрации экзосом (везикул/мл крови) $\times 10^9$	Медиана размера везикул, нм
Условно ЗЖ	плазма	7,9	116
	кровь	18,4	115
Больные люминальным РМЖ	плазма	31,9	106
	кровь	57,4	108

По убыванию интенсивности медианы флуоресценции (MFI) как в плазме, так и в крови условно ЗЖ и больных РМЖ идентифицированы следующие субпопуляции везикул: $CD9+/CD24+ > CD9+/CD81+ > CD9+/CD63+$, т.е. субпопуляция $CD9+/CD24+$ экзосомо-подобных везикул преобладала как в плазме, так и в препаратах крови и в норме, и при РМЖ. При РМЖ не выявлено достоверных различий по MFI между проанализированными популяциями везикул плазмы и везикул крови.

В совокупности полученные данные показывают, что выделенные из плазмы и из крови внеклеточные везикулы обладают всеми свойствами экзосом (морфология, размер, наличие поверхностных тетраспанинов). Увеличение концентрации и изменение морфологии ассоциированных с ФЭК экзосом уже на начальных стадиях заболевания косвенно указывает на значимость везикул данного типа в развитии РМЖ.

2.2. Тетраспанин-ассоциированные и тетраспанин-неассоциированные протеазы в составе экзосом крови условно ЗЖ и больных РМЖ

Известно, что мажорные тетраспанины ($CD9$, $CD63$, $CD81$) экзосом вовлечены не только во взаимодействие везикул с клетками, но и взаимодействуют с различными белками, формируя функциональные тетраспаниновые комплексы, которые включают в себя в том числе протеазы. Среди тетраспанин-ассоциированных экзосомальных протеаз ADAM-10 осуществляет эктодоменный шеддинг различных субстратов, в том числе рецепторов факторов роста, рецепторов адгезии и кадгеринов, что в результате индуцирует подвижность клеток и увеличивает метастатический потенциал опухолевых клеток [Leech *et al.*, 2018].

Поскольку на поверхности экзосом плазмы и экзосом крови наиболее представлены $CD9$ и $CD24$, уровень ADAM-10 был оценен в $CD9+$ и $CD24+$ экзосомах условно ЗЖ ($n = 30$) и первичных больных РМЖ (T1-2N0-1M0, $n =$

30, из них люминальный подтип $n = 25$ и трижды-негативный подтип – 5) методом проточной цитофлуорометрии. Показано, что уровень поверхностной формы ADAM-10 возрастает в субпопуляции CD9+ экзосом, выделенных как из плазмы, так и из крови больных люминальным РМЖ по сравнению с условно ЗЖ (в 1,8 и 1,3 раза, соответственно, $p < 0,05$) (табл. 6). Отсутствие достоверных изменений уровня шеддазы в составе CD24-позитивных экзосом плазмы и экзосом крови в норме и при РМЖ может объясняться тем, что включение зрелой формы ADAM-10 в экзосомы и ее протеолитическая активность регулируются тетраспанинами CD9, CD81, CD82 [Arduise *et al.*, 2008].

Таблица 6 – Оценка представленности ADAM-10 на поверхности CD 9+ и CD 24+ экзосом в крови условно ЗЖ и больных РМЖ

Источник экзосом		CD9+	CD24+	
Условно ЗЖ		плазма	844±99	884±124
		кровь	804±79	920±91
Больные РМЖ	люминальный подтип	плазма	1531±162*	926±94
		кровь	1026±100*	1103±99
	трижды-негативный подтип	плазма	962±88	908±109
		кровь	862±69	969±106

*значимые отклонения по сравнению с нормой. В таблице представлен уровень MFI ± SEM.

Увеличение уровня ADAM-10 на поверхности экзосом при РМЖ по-видимому снижает возможность их связывания с ФЭК, что в свою очередь позволяет экзосомам выполнять роль посредников в обеспечении межклеточной коммуникации, влияя на развитие как первичного новообразования, так и отдаленных метастазов.

Существенный вклад в опухолевую прогрессию вносят также неассоциированные с тетраспанинами протеазы, в частности 20S протеасомы, обладающие трипсиноподобной, химотрипсиноподобной и каспазоподобной активностью [Mofers *et al.*, 2017]. Протеасомы участвуют в регуляции пролиферации, апоптоза, миграции клеток, транскрипции генов и иммунного ответа, разрушая или активируя белки - компоненты сигнальных путей, факторы транскрипции и другие функционально значимые молекулы [Shashova *et al.*, 2017]. С помощью вестерн-блоттинга выявлено увеличение уровня 20S протеасомы в экзосомах плазмы и экзосомах крови первичных больных РМЖ (T1-2N0-1M0, $n = 80$, из них люминальный подтип $n = 61$ и трижды-негативный подтип – 19) по сравнению с условно ЗЖ ($n = 39$) (в 1,6 и 2,8 раза, соответственно, $p < 0,05$, (табл. 7, рис. 16а). Более того, уровень

Таблица 7 – Уровень 20S протеасомы ($\alpha + \beta$) в составе экзосом плазмы и крови условно ЗЖ и больных РМЖ

Источник экзосом		Медиана и диапазон [25;75%], отн. ед.
Условно ЗЖ	плазма	1,00 [0,90; 1,12]
	кровь	1,15 [0,95; 1,22]
Больные РМЖ	плазма	1,59 [1,22; 1,61]*
	кровь	2,28 [1,95; 2,61]*

*значимые различия между ЗЖ и больными РМЖ, $p < 0,05$.

20S протеасом в экзосомах крови онкологических больных ассоциирован с молекулярным подтипом РМЖ: уровень протеазы значимо выше при трижды негативном подтипе, чем при менее агрессивных люминальных подтипах (табл. 8, рис. 16б).

Таблица 8 – Уровень 20S протеасомы ($\alpha+\beta$) в составе экзосом плазмы больных РМЖ с различными подтипами

Источник экзосом		Медиана и диапазон [25;75%], отн. ед.
Условно ЗЖ		1,00 [0,90; 1,12]
Больные РМЖ	Люминальный РМЖ	1,57 [1,22; 1,73]*
	ТН-РМЖ	1,94 [1,58; 2,67]**

* статистически значимые различия между условно ЗЖ и онкологическими больными, $p < 0,05$. ** статистически значимые различия между люминальным РМЖ и ТН-РМЖ, $p < 0,05$.

Убиквитин-протеасомная система позволяет быстро удалять эстрогеновый рецептор для поддержания надлежащего уровня данного белка в ответ на гормональную стимуляцию [Tecalco-Cruz *et al.*, 2017]. Полученные результаты позволяют предположить, что именно содержимое экзосом, а не количество везикул играет основную роль в развитии резистентности к противоопухолевой терапии [Sannino *et al.*, 2017].

Таким образом, протеазный груз экзосом различаются в крови условно ЗЖ и онкологических больных. Различный уровень тетраспанин-ассоциированных и тетраспанин-неассоциированных протеаз в субпопуляциях экзосом при разных подтипах РМЖ свидетельствует о различных механизмах сортировки биологически активных молекул в везикулы и на значимую роль везикул, ассоциированных с ФЭК, в развитии рака.

2.3. Протеомный портрет экзосом крови условно ЗЖ и больных РМЖ

Для выявления уникальных для опухолевых везикул белков проведен сравнительный анализ протеома экзосом плазмы и экзосом крови условно ЗЖ и больных РМЖ. С помощью MALDI-TOF масс-спектрометрии с высокой достоверностью ($p < 0,05$) в образцах экзосом крови условно ЗЖ ($n = 18$) и первичных больных люминальным РМЖ (T1-2N0M0, $n = 17$)



Рис. 16 – Уровень 20S протеасом в экзосомах плазмы и экзосомах крови условно ЗЖ и больных РМЖ. Вестерн-блоттинг с использованием антител против α и β -субъ-единиц протеасомы 20S. CD9 использован в качестве внутреннего контроля. Экзосомы плазмы и экзосомы крови условно ЗЖ и больных РМЖ (а); экзосомы больных люминальным РМЖ и с ТН-РМЖ (б).

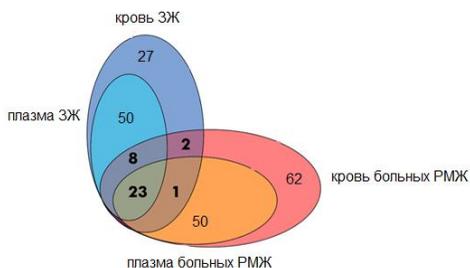


Рис. 17 – Диаграмма Венна-Эйлера идентифицированных белков в экзосомах крови условно ЗЖ и больных РМЖ.

идентифицированы 111 и 146 белков, соответственно. Доля универсальных белков составила 15%, доля уникальных белков экзосом крови условно ЗЖ и больных РМЖ – 27% и 49% (рис. 17).

Показано, что 105 (80%) идентифицированных белков экзосом плазмы уже обнаруживали в составе внеклеточных везикул, и они аннотированы в БД Vesiclepedia (www.microvesicles.org) и 71 (54%) – в БД ExoCarta (www.exocarta.org). Анализ функционального обогащения по наиболее представленным генным онтологиям экзосомальных белков экзосом проведен с помощью ПО FunRich (рис. 18).

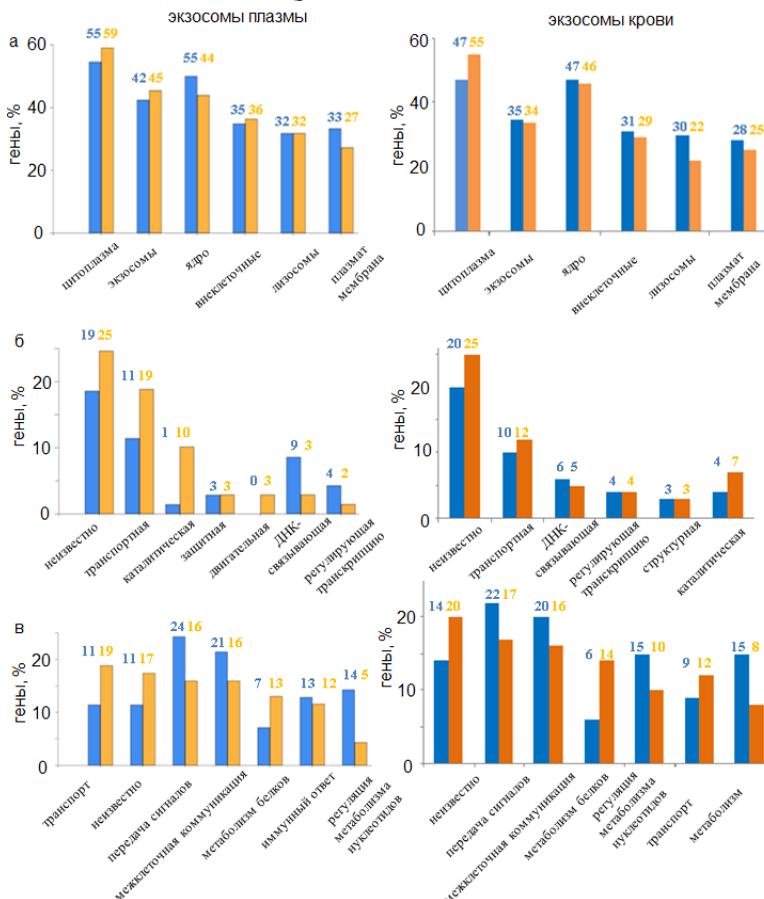


Рис. 18 – GO-анализ белков экзосом плазмы и экзосом крови условно ЗЖ (голубой цвет) и больных РМЖ (оранжевый цвет) по клеточным компонентам (а), молекулярным функциям (б) и биологическим процессам (в).

Показано, что составе экзосом плазмы и экзосом крови в норме и при РМЖ белки представлены сопоставимо: преобладают ядерные, цитоплазматические и экзосомальные белки. В составе экзосом плазмы больных РМЖ по

сравнению с условно ЗЖ возрастает доля транспортных и вовлеченных в катализ белков, и снижается доля ДНК-связывающих белков и белков, регулирующих транскрипцию. Большинство белков экзосом плазмы и крови условно ЗЖ и больных РМЖ вовлечены в межклеточную коммуникацию и передачу сигналов; в экзосомах крови онкологических больных чаще обнаруживаются белки, вовлеченные в белковый метаболизм и транспорт. Поскольку большинство ГО представлено в белках экзосом как в норме, так и при РМЖ, вероятно эти белки необходимы для формирования, секреции и интернализации везикул. В то же время, поскольку доля ряда функций и процессов изменяется при сравнении белков экзосом крови ЗЖ и экзосом крови больных РМЖ (транспортные и каталитические функции, процессы передачи сигнала, метаболизма белков, межклеточной коммуникации), можно предположить изменение сортировки белков при развитии патологии.

Для подтверждения гипотезы о том, что экзосомы крови по сравнению с экзосомами плазмы больных РМЖ обогащены белками-участниками процессов, потенциально приводящих к росту и распространению опухоли, на следующем этапе был проведен анализ литературы и аннотаций QuickGO и выделены в составе экзосом белки, принимающие активное участие в ЭМП, клеточной пролиферации, миграции и инвазии, ангиогенезе и регуляции иммунного ответа.

Показано, что в регуляцию ЭМП вовлечено 7 (9%) белков в составе экзосом плазмы и 41 (37%) – в составе экзосом крови условно ЗЖ. В крови больных РМЖ белки экзосом крови менее вовлечены в регуляцию ЭМП: 9 (12%) и 31 (21%), соответственно, при этом доля белков, ответственных за негативную регуляцию ЭМП, была в два раза выше в составе экзосом условно ЗЖ по сравнению с онкологическими больными (6% против 3%).

В регуляцию клеточной пролиферации вовлечены 19 (17%) белков экзосом крови условно ЗЖ, из них только 5 (6%) белков экзосом плазмы, у больных РМЖ – 6 (4%) и 1 (0,7%) экзосомальных белков, соответственно. Как и в случае ЭМП, доля белков, ответственных за негативную регуляцию клеточной пролиферации, была в два раза выше в составе экзосом условно ЗЖ по сравнению с онкологическими больными (6% против 3%).

В регуляцию клеточной инвазии в составе экзосом плазмы условно ЗЖ и больных РМЖ вовлечено сопоставимое количество белков: 16 (14%) и 14 (10%), а в экзосомах крови – 51 (46%) и 33 (23%) белков в норме и при онкологии, соответственно. В составе экзосом крови больных РМЖ доля белков-ингибиторов данного процесса была в три раза ниже, чем в экзосомах крови условно ЗЖ (5% против 1,4%).

В регуляцию клеточной подвижности вовлечены 25 (23%) белков экзосом крови условно ЗЖ, из них 9 (8%) – в составе экзосом плазмы, у больных РМЖ – 21 (14%) и 9 (6%), соответственно, при этом при онкологии в составе экзосом отсутствовали белки, ингибирующие клеточную подвижность.

В стимуляцию ангиогенеза вовлечено значительно меньше белков экзосом – 10 (9%) у условно ЗЖ и 5 (3%) у больных РМЖ, а ингибирующие ангиогенез белки выявлены всего по одному в каждом случае.

В регуляцию иммунного ответа вовлечено одинаковое количество белков: в норме 30 (27%) белков, из них 7 (6%) в составе экзосом плазмы; при онкологии – 30 (21%) и 8 (5%) белков, соответственно. При этом с негативной регуляцией данного процесса связано по 3 белка в составе экзосом крови в норме и при РМЖ.

Таким образом, половина идентифицированных белков экзосом участвует в ЭМП, клеточной пролиферации, инвазии, клеточной миграции, развитии сосудистой системы и иммунном ответе. Протеомные профили экзосом крови условно ЗЖ обогащены белками, ингибирующими ЭМП, клеточную пролиферацию, миграцию и инвазию. Таким образом, анализ протеомного состава экзосом крови значительно дополняет информацию об их биогенезе и функциональной роли в канцерогенезе.

2.4. Опухолевые маркеры в составе экзосом крови больных РМЖ

В литературе широко представлены данные по поиску протеомных опухолевых маркеров в составе экзосом плазмы [Wu *et al.*, 2019, Cufaro *et al.*, 2019], обсуждаются достоинства использования белков экзосом плазмы по сравнению с белками плазмы [Boukouris *et al.*, 2015], при этом данные об ассоциированных с клеточной поверхностью экзосомах немногочисленны [Мамаева *et al.*, 2020]. Использование экзосом крови, без разделения на подфракции (экзосомы плазмы, экзосомы, ассоциированные с поверхностью форменных элементов крови) позволяет сократить время и трудозатраты при пробоподготовке образца перед анализом, а также увеличить количество анализируемого материала, что является крайне важным аспектом для дальнейшего введения разработок в практику.

С помощью БД dbDEPC 3.0 показано, что в экзосомах крови по сравнению с экзосомами плазмы больных РМЖ чаще выявляются опухолеассоциированные белки (86 и 49 белков, соответственно), в том числе белки, ассоциированные с развитием РМЖ (51 и 38 белков, соответственно). Гипер- и гипоекспрессированные белки, ассоциированные с развитием РМЖ, сопоставимо представлены в составе экзосом крови (39% и 43%, соответственно), в экзосомах плазмы преобладают гипоекспрессированные белки (47% по сравнению с 29% гиперэкспрессированных белков).

Комбинация белков APPBP2, KRT1, KRT6B, SERPINA1 и SOCS3 в составе экзосом крови позволяет дифференцировать больных РМЖ от условно ЗЖ с чувствительностью 71% и специфичностью 100% (AUC = 0,853, 95% доверительный интервал 0,692-0,949, рис. 19); использование экзосом плазмы позволяет дифференцировать норму и онкологию с чувствительностью 29% и специфичностью 100%.

Таким образом, протеомный анализ экзосом крови больных РМЖ выявляет большее количество онкомаркеров по сравнению с анализом экзосом плазмы. Выявленные потенциальные белковые онкомаркеры требуют дальнейшей валидации. Возможно практическое использование полученных знаний для разработки методов малоинвазивной диагностики опухолей на доклинических стадиях, прогнозирования течения болезни и создания фундаментальных предпосылок для возможной оптимизации противораковой терапии.

3. Роль экзосом крови в развитии солидных опухолей

Для подтверждения гипотезы о различной функциональной роли экзосом плазмы и экзосом, ассоциированных с ФЭК в стимуляции роста опухоли было исследовано влияние экзосом плазмы и экзосом крови условно ЗЖ и больных РМЖ на ключевые этапы опухолевой прогрессии: ЭМП, пролиферацию опухолевых клеток, миграцию клеток и стимуляцию ангиогенеза, а также оценена возможность транспорта ДНК в составе экзосом.

3.1. Транспорт ДНК в составе экзосом

ВнДНК устойчива к действию нуклеаз за счет образования комплексов с белками и другими биомолекулами, а также связывания этих комплексов с поверхностью ФЭК. Некоторые патологические состояния, включая рак и аутоиммунные заболевания, характеризуются повышенными концентрациями внДНК, а также повышенными уровнями экзосом в плазме крови. Несмотря на свой небольшой размер, экзосомы имеют большую площадь поверхности, а их мембрана в значительной степени отражает мембрану родительских клеток; таким образом, по аналогии с ДНК, связанной с клеточной поверхностью, они способны транспортировать ДНК, по крайней мере, на своей поверхности. Принимая во внимание содержание экзосом в крови (около 10^7 – 10^8 везикул/мл), была выдвинута гипотеза о значимой роли этого типа везикул в транспорте ДНК, защите ДНК от нуклеаз плазмы и адресной доставке внДНК в клетки-реципиенты.

С помощью ПЦР на LINE-1 элемент выявлено увеличение концентрации внДНК в плазме первичных больных люминальным РМЖ (T1-2N0M0, n = 7) по сравнению с условно ЗЖ (n = 7) (медиана 46 по сравнению с 4 нг/мл, p = 0,0026, U-критерий Манна-Уитни) (рис. 20а). Медиана концентрации ДНК в экзосомах плазмы больных РМЖ составила около 2 пг/мл крови (ДНК выявлена в 71% образцов в диапазоне 0–7 пг/мл), а в экзосомах плазмы ЗЖ –

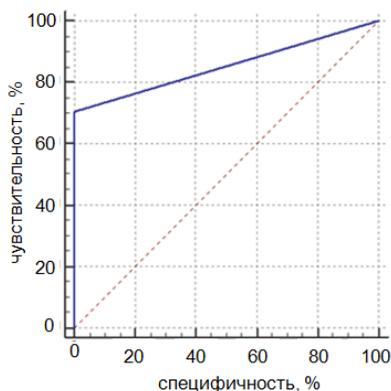
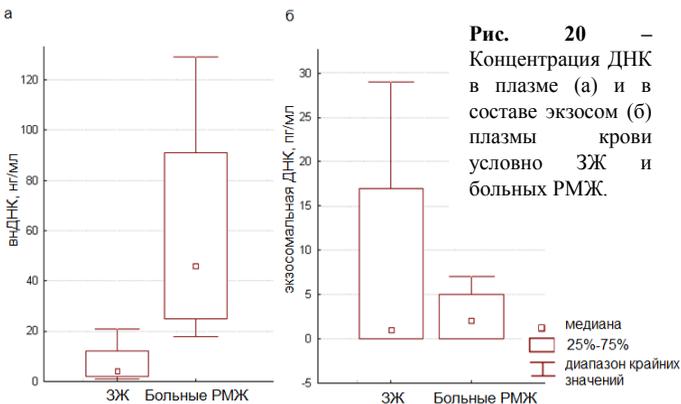


Рис. 19 – ROC-кривая для определения белков APPBP2, KRT1, KRT6B, SERPINA1, SOCS3 в экзосомах крови. Синяя линия – аппроксимированная кривая ROC.

около 1 пг/мл крови (ДНК выявлена в 57% образцов в диапазоне 0–29 пг/мл) (рис. 20б), что согласуется с литературными данными. Таким образом, одна экзосома содержит $1,4 \times 10^{-8}$ пг ДНК в плазме условно ЗЖ, в плазме больных РМЖ – $1,1 \times 10^{-8}$ пг ДНК, а доля экзосомальной ДНК не превышает 0,025% в плазме ЗЖ и 0,004% от вДНК плазмы больных РМЖ. Таким образом, экзосомы не являются основными транспортерами вДНК в крови.

С использованием биоинформатических подходов после идентификации с помощью MALDI-TOF масс-спектрометрии были идентифицированы 16 экзосомальных ДНК-связывающих белков, а в них – ДНК-связывающие домены. Помимо связывания вДНК с ДНК-связывающими белками мембраны экзосом, вДНК может присоединяться к экзосомам за счет связывания гистонов в НПК с гистон-связывающими белками экзосомальной короны. Таким образом, вДНК преимущественно связывается с наружной мембраной экзосом за счет ассоциации с ДНК-связывающими белками.



3.2. Влияние экзосом на формирование капилляро-подобных структур

Клинические исследования динамики опухолевой прогрессии больных РМЖ подтвердили, что одним из важнейших факторов, определяющих патогенез данного заболевания, является способность опухоли индуцировать ангиогенез. Ангиогенез контролируется множеством ростовых факторов и сигнальных молекул, которые могут транспортироваться в составе экзосом [Qiu *et al.*, 2018, 2019]; более того, в ответ на клеточную гипоксию, которая характерна для опухолевой ткани, изменяется содержимое экзосом, и такие везикулы стимулируют неоангиогенез [Park *et al.*, 2010].

Сравнительная оценка ангиогенной активности экзосом плазмы и экзосом крови условно ЗЖ (объединенные образцы, n = 50) и больных люминальным РМЖ (объединенные образцы, T1-2N0-1M0, n = 50) была проведена с помощью методики образования капилляро-подобных структур клетками HUVES на Матригеле, обедненным ростовыми факторами. Показано, что более обширная сеть формируется в присутствии экзосом из плазмы и крови больных РМЖ по сравнению с отрицательным контролем (p = 0,003 для обоих случаев), при этом экзосомы плазмы обладали более выраженным эффектом по сравнению с экзосомами крови больных РМЖ (p = 0,021), и экзосомами из

плазмы условно ЗЖ ($p = 0,044$). Инкубация HUVES с экзосомами крови условно ЗЖ снижала способность к образованию капилляро-подобных структур по сравнению с отрицательным контролем ($p = 0,002$), экзосомами из плазмы ЗЖ ($p = 0,017$) и экзосомами крови больных РМЖ ($p = 0,001$) (рис. 21).

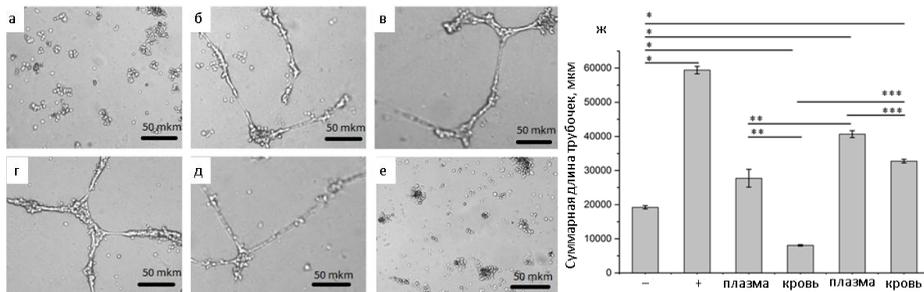


Рис. 21 – Эффект экзосом из плазмы и крови на формирование капилляро-подобных структур клетками HUVES. А-е, Фотографии, демонстрирующие формирование капилляро-подобных структур клетками HUVES, обработанные PBS (негативный контроль) (а), экзосомами из плазмы (б) и крови (в) больных РМЖ, 10% ЭТГ (положительный контроль) (г), экзосомами из плазмы (д) и крови (е) условно ЗЖ. Шкала соответствует 250 μm . Ж. Количественный анализ формирования капилляро-подобных структур. Значения общей длины (среднее \pm SEM, * $p < 0,05$ по сравнению с отрицательным контролем, ** $p < 0,05$ по сравнению с экзосомами из плазмы условно ЗЖ, *** $p < 0,05$ по сравнению с экзосомами крови больных РМЖ).

Таким образом, ангиогенный потенциал экзосом плазмы и экзосом крови больных РМЖ, является сопоставимым, что дополняет представление о природе ангиогенеза в опухолевой ткани при РМЖ. Экзосомы плазмы условно ЗЖ обладают меньше стимулируют формирование капилляро-подобных структур по сравнению с экзосомами плазмы больных РМЖ. Сравнительно малая суммарная длина образованных капилляро-подобных структур после добавления к HUVES экзосом крови условно ЗЖ (меньше в 2,5 раза по сравнению с отрицательным контролем и в 4 раза по сравнению эффектом от экзосом плазмы ЗЖ) указывает на ингибирующую активность экзосом, ассоциированных с ФЭК. В тоже время экзосомы крови больных РМЖ не дают аналогичного эффекта, что вероятно способствует более активному росту и ветвлению сосудистого русла внутри опухолевой ткани.

3.3 Стимуляция экзосомами крови клеточной подвижности

Влияние экзосом из плазмы и из крови условно ЗЖ (объединенные образцы, $n = 50$) и больных люминальным РМЖ (объединенные образцы, T1-2N0-1M0, $n = 50$) на миграцию клеток было протестировано в MCF10A (линия псевдонормальных эпителиоцитов молочной железы) и клетках РМЖ SKBR-3.

Клетки MCF10A были почти неподвижны в условиях отсутствия сыворотки и эпидермального фактора роста (EFG) (отрицательный контроль). Добавление к клеткам сыворотки лошади и / или EGF (положительный контроль) значительно стимулировало их подвижность: достоверно возросло количество мигрирующих клеток ($p = 0,006$, рис. 22a) и миграционный путь ($p < 0,001$, рис.

22б). Добавление экзосом крови условно ЗЖ или экзосом из плазмы и экзосом крови больных РМЖ приводило к значительному увеличению числа подвижных клеток по сравнению с отрицательным контролем ($p = 0,037$, $p = 0,025$ и $p = 0,025$, соответственно) (рис. 22а), при этом общая длина пути клеток MCF10A уменьшается после добавления экзосом крови ЗЖ по сравнению с добавлением экзосом плазмы ($p = 0,022$).

В присутствии 10% ЭТС без экзосом (положительный контроль) наблюдалось много подвижных клеток карциномы молочной железы SKBR3. Удаление ЭТС (отрицательный контроль) привело к значительному ослаблению клеточной миграции ($p < 0,001$), что позволяет предположить, что ЭТС оказывает наибольшее влияние на подвижность клеток SKBR3 (рис. 22в). Добавление экзосом из плазмы ЗЖ и больных РМЖ к клеткам увеличивало количество подвижных опухолевых клеток в 3,6 и 3,3 раза ($p = 0,037$ и $p = 0,011$, соответственно), эффекты добавления экзосом крови условно ЗЖ и больных РМЖ были менее выраженными (рис. 22в).

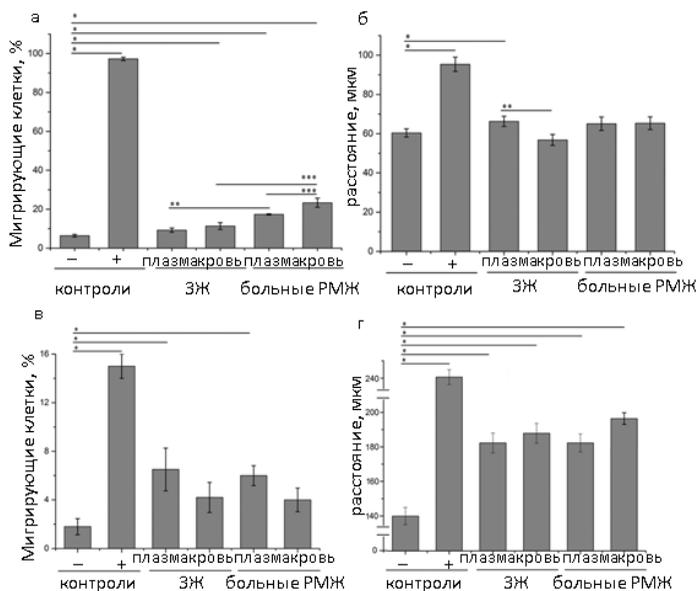


Рис. 22 – Влияние экзосом из плазмы и экзосом крови на миграцию клеток MCF10A и SKBR3. Результаты трех независимых экспериментов представлены как среднее \pm SEM, * - $p < 0,05$ по сравнению с отрицательным контролем, ** - $p < 0,05$ по сравнению с экзосомами плазмы ЗЖ, *** - $p < 0,05$ по сравнению с экзосомами крови больных РМЖ, а) доля подвижных клеток MCF10A, б) миграционный путь клеток MCF10A в течение 15 ч., в) доля подвижных клеток SKBR3, в миграционный путь клеток SKBR3 в течение 15 ч.

Подвижные клетки SKBR3 также наблюдались в плотной культуре и внутри групп, которые активно двигались без дополнительных обработок. На миграцию подвижных клеток существенное влияние оказывало добавление ЭТС или экзосом по сравнению с отрицательным контролем ($p < 0,001$ при добавлении ЭТС и экзосом больных РМЖ; $p < 0,001$ для экзосом плазмы ЗЖ; $p = 0,001$ для экзосом крови ЗЖ) (рис. 22г).

3.4. Влияние экзосом крови на интенсивность клеточной пролиферации

В случае клеток MCF10A, где пролиферация была высокочувствительна к присутствию ЭТС

Таблица 9 – Митотическая активность*

Клеточная линия	Образцы	Среднее ±SEM	p
MCF10A	Отрицательный контроль	3,65±0,25	0,0055
	Положительный контроль	20,75±1,25	
	Экзосомы плазмы условно ЗЖ	4,40±0,80	0,0163
	Экзосомы крови условно ЗЖ	7,30±0,40	
	Экзосомы плазмы больных РМЖ	4,25±0,55	
SKBR3	Отрицательный контроль	31,40±6,21	
	Положительный контроль	24,10±5,87	
	Экзосомы плазмы условно ЗЖ	30,30±2,20	0,0162
	Экзосомы крови условно ЗЖ	22,60±6,53	
	Экзосомы плазмы больных РМЖ	27,20±5,17	
	Экзосомы крови больных РМЖ	24,50±3,23	

*процент событий митоза в течение 15 часов наблюдения.

и/или факторов роста (p = 0,006), добавление экзосом крови как условно ЗЖ (объединенные образцы, n = 50), так и люминальным РМЖ (объединенные образцы, T1-2N0-1M0, n = 50) привело к достоверному увеличению числа

митотических событий (p = 0,016 для обоих случаев) (табл. 9). В случае клеток SKBR3, которые эффективно пролиферируют без сыворотки, добавление экзосом из любых источников не влияло на пролиферацию (табл. 9).

3.5. Морфология адгезионных соединений клеток после обработки экзосомами

Для оценки влияния экзосом крови на способность клеток образовывать адгезионные соединения, с помощью иммуофлуоресцентного окрашивания в клетках MCF10A и SKBR3 была проанализирована экспрессия ключевых белков межклеточных контактов – E-кадгерина и β-катенина.

Было показано, что эпителиальные клетки MCF10A образуют небольшие островки на поверхности стекла в отсутствие сыворотки и EGF (отрицательный контроль) и демонстрируют хорошо выраженные адгезионные соединения на основе E-кадгерина и β-катенина, которые организованы в виде адгезионных поясов вдоль границ между клетками (рис. 23а). Добавление сыворотки и EGF (положительный контроль) приводило к значительному изменению морфологии адгезионных соединений. Окрашивание E-кадгерина на границах между клетками становилось более диффузным, а края клеток перекрывались (рис. 23а). Добавление к клеткам экзосом плазмы или экзосом крови условно ЗЖ (объединенные образцы, n = 50) или больных люминальным РМЖ (объединенные образцы, T1-2N0-1M0, n = 50) приводило к значительному разрушению адгезионных соединений на основе E-кадгерина. Оставались видимыми только остаточные адгезионные структуры, и они были представлены случайно распределенными точками или небольшими радиальными структурами (рис. 23а). В клетках, обработанных экзосомами, адгезионные структуры на основе β-катенина были лучше выражены, чем на

основе Е-кадгерина, и представляли собой нерегулярные радиальные структуры в областях перекрытия соседних клеток. Нарушение адгезионных структур связано с появлением небольших зазоров между клетками (рис. 23а).

Аналогичное исследование было проведено на клетках SKBR3. Обнаружено, что эти клетки не образуют адгезионных соединений на основе Е-кадгерина как при наличии, так и в отсутствии экзосом (рис. 23б), даже когда они контактируют в группах или островках. Для выявления клеточных адгезий в контактирующих клетках было использовано окрашивание на β -катенин. В отрицательном контроле эти спайки представлены короткими касательными линиями, радиальными спайками или каплеобразными

спайками на перекрывающихся краях клеток (рис. 23б). Добавление сыворотки к клеткам SKBR3

приводило к увеличению клеточного разделения, и даже контактирование клеток не способствовало адгезии на основе β -катенина. Добавление экзосом условно ЗЖ и больных РМЖ к клеткам SKBR3 существенно не изменило количество и морфологию клеточных адгезий на основе β -катенина.

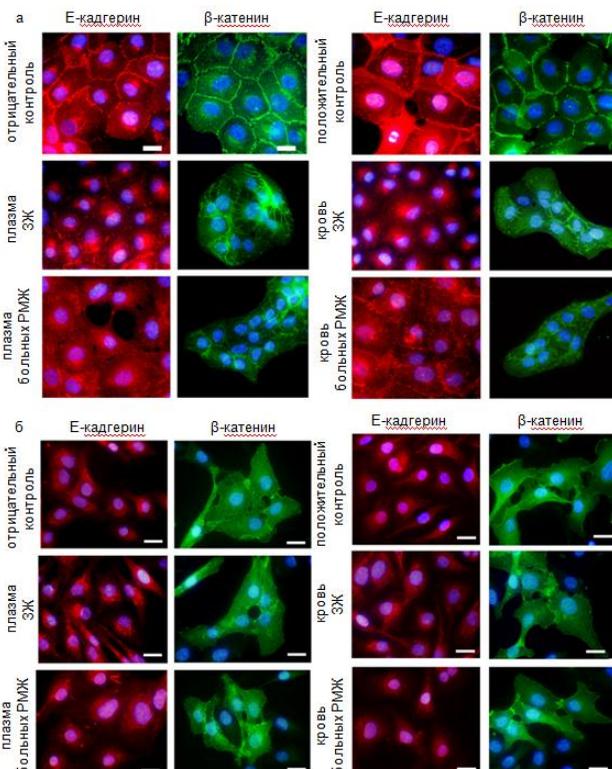


Рис. 23 – Влияние экзосом на морфологию межклеточной адгезии клеток путем иммунофлуоресцентного окрашивания Е-кадгерина (красный цвет) и β -катенина (зеленый цвет). Ядра клеток окрашены DAPI. Условия эксперимента описаны рядом с картинками. Бар составляет 20 мкм. а, клетки MCF10A; б, клетки SKBR-3.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Применение современных подходов к изучению нуклеиновых кислот и белков, включающих молекулярно-биологические, химические и физические методы исследований, а также биоинформатические подходы к обработке данных, дало возможность впервые описать состав циркулирующих в крови НПК и экзосом и наметить перспективные протеомные маркеры для диагностики РМЖ методом «жидкостной биопсии». Предсказанные

биоинформатическими подходами эффекты экзосом крови условно ЗЖ и больных РМЖ подтверждены в экспериментах *in vitro*. Полученные в работе данные о строении концов, фрагментации и индексе метилирования ДНК плазмы и ДНК, ассоциированной с форменными элементами крови, существенно расширяют знания о циркулирующей внДНК при онкологии, а также могут быть полезны для разработки диагностических ПЦР-систем для «жидкостной биопсии». Полученные данные о белках, участвующих в транспорте внДНК в составе НПК, и белках в составе экзосом, отвечающих за транспорт опухоле-ассоциированных нуклеиновых кислот в кровотоке имеют принципиальное значение для понимания молекулярных механизмов процессов, обеспечивающих передачу генетической информации и сигналов между клетками. Полученная информация может быть использована для создания новых методов диагностики онкологических заболеваний и создания фундаментальных предпосылок для возможной оптимизации противораковой терапии.

ВЫВОДЫ

Данная работа представляет собой первое комплексное исследование циркулирующих в крови здоровых доноров и онкологических больных дезоксирибонуклеопротеиновых комплексов и суммарных экзосом (экзосом плазмы и экзосом, ассоциированных с поверхностью формных элементов крови, далее – экзосом крови), в результате которого впервые описан состав циркулирующих в крови дезоксирибонуклеопротеиновых комплексов и экзосом, намечены перспективные протеомные маркеры для «жидкостной биопсии» рака молочной железы и установлены эффекты, оказываемые экзосомами крови на пролиферацию и миграцию опухолевых клеток, стимуляцию формирования капилляро-подобных структур.

1. Анализ внеклеточной ДНК, выделенной из крови условно здоровых женщин и больных РМЖ, позволил выявить ряд существенных различий:

- в крови условно здоровых женщин концы внеклеточной ДНК гетерогенны – обнаружены молекулы с 5'-выступающими, 3'-выступающими и тупыми концами; у больных РМЖ внеклеточная ДНК плазмы содержит преимущественно выступающие 3'-концы и 5'-концы, а ДНК, ассоциированная с форменными элементами – только 5'-концы;

- в плазме крови условно здоровых женщин в составе внеклеточной ДНК доля коротких фрагментов (100-1000 п.н.) составляет ~ 20%, у больных РМЖ ~ 2%. В составе ДНК, ассоциированной с форменными элементами, как в норме, так и при РМЖ преобладают фрагменты более 1000 п.н. (более 99%);

- аберрантно метилированные последовательности промоторной области гена *RARβ2* выявлены только во фрагментах внеклеточной ДНК размером более 1000 п.н., наибольший индекс метилирования выявлен в ДНК, ассоциированной с форменными элементами крови больных РМЖ (61%). У больных РМЖ концентрация данного маркера выше в ассоциированной с

форменными элементами ДНК по сравнению с ДНК плазмы (медиана 381 против 72 пг/мл, $p < 0,01$, соответственно).

2. Детальный анализ дезоксирибонуклеопротеиновых комплексов (НПК), циркулирующих в крови условно здоровых женщин и больных РМЖ, проведенный с использованием MALDI-TOF масс-спектрометрии и биоинформатических подходов, выявил следующие существенные различия их белкового состава:

- в составе НПК крови условно здоровых женщин и больных РМЖ идентифицированы 177 и 169 белков, соответственно, из них 38 белков – универсальные. При наличии злокачественного новообразования в составе циркулирующих в крови НПК возрастает доля транспортных белков, белков ионных каналов и белков, участвующих в передаче сигналов;

- белки, обнаруженные в составе НПК, условно можно разделить на белки, связывающие нуклеиновые кислоты, и белки-«пассажиры». На долю белков, связывающих нуклеиновые кислоты, приходится 37% всех белков НПК, в них выявлено 38 типов ДНК-связывающих мотивов. При РМЖ в составе ДНК-связывающих белков возрастает доля белков, регулирующих метаболизм нуклеиновых кислот и снижается доля белков, вовлеченных в процессы межклеточной коммуникации и передачи сигналов, а в составе белков-«пассажиров» – возрастает доля транспортных белков и снижается доля белков энергетических биологических путей.

3. Сравнительный анализ экзосом плазмы и экзосом крови выявил значительные отличия в морфологии и в уровне ферментов у условно здоровых женщин и у больных РМЖ:

- у больных РМЖ увеличивается концентрация как экзосом плазмы, так и экзосом крови, а также изменяется соотношение везикул различной морфологии;

- у больных РМЖ повышается уровень тетраспанин-ассоциированной шеддазы ADAM-10 на поверхности CD-9-положительных экзосом и тетраспанин-неассоциированной 20S протеасомы в составе экзосом плазмы и экзосом крови;

4. Детальный анализ экзосом крови условно здоровых женщин и больных РМЖ, проведенный с использованием MALDI-TOF масс-спектрометрии и биоинформатических подходов, выявил следующие существенные различия их белкового состава:

- в составе экзосом крови условно здоровых женщин и больных РМЖ идентифицированы 111 и 146 белков соответственно, из них 34 белка – универсальные. При наличии РМЖ в составе экзосом плазмы и экзосом крови возрастает доля транспортных и каталитических белков, а также вовлеченных в метаболизм белков, при этом снижается доля белков, участвующих в

межклеточной коммуникации и передаче сигнала, ДНК-связывающих белков и белков, регулирующих метаболизм нуклеотидов;

- экзосомы крови по сравнению с экзосомами плазмы больных РМЖ обогащены белками, стимулирующими ЭМП, миграцию и инвазию, при этом протеом экзосом крови условно здоровых женщин обогащен белками, ингибирующими эти процессы.

5. Показано, что экзосомы не являются основными транспортерами ДНК – доля ДНК в короне экзосом не превышает 0,03% от содержания внеклеточной ДНК в плазме крови. Впервые установлено, что экзосомы крови больных РМЖ *in vitro* стимулируют формирование капилляро-подобных структур, индуцируют ЭМП и увеличивают количество подвижных и пролиферирующих псевдо-нормальных клеток молочной железы MCF10A, а также общую длину пути раковых клеток SKBR3. Выявлено разнонаправленное влияние экзосом крови условно здоровых женщин: они подавляют формирование капилляро-подобных структур и уменьшают длину пути клеток MCF10A по сравнению с экзосомами плазмы, при этом стимулируют ЭМП, увеличивают количество подвижных и пролиферирующих MCF10A, а также длину пути клеток SKBR3.

6. Белки в составе НПК и экзосом крови могут быть использованы для выявления РМЖ методом «жидкостной биопсии», позволяя дифференцировать группы первичных больных РМЖ (T₁₋₂N₀₋₁M₀) от условно здоровых женщин:

- комбинация пяти белков в составе экзосом крови (APPBP2, KRT1, KRT6B, SERPINA1, SOCS3) – с чувствительностью 71% и специфичностью 100% (AUC 0,853);

- комбинация пяти белков в составе НПК (SPG7, ADRB1, SMCO4, PHF1, PSMG1) – с чувствительностью 100% и специфичностью 80% (AUC 0,900).

ПРИМЕНЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ И НАУЧНЫХ ВЫВОДОВ

1. Результаты исследования, вошедшие в диссертацию, могут быть использованы при разработке тест-систем для диагностики онкологических заболеваний методом «жидкостной биопсии», в том числе РМЖ:

- использование ДНК, ассоциированной с форменными элементами крови, для которой характерны длина более 1000 п.н. и более высокий индекс метилирования, позволит улучшить аналитические характеристики ПЦР-систем, основанных на анализе специфичных к метилированию промоторных областей генов-супрессоров опухоли;

- использование выявленных уникальных для онкологических больных ДНК-связывающих мотивов белков позволит создать методы обогащения/выделения вДНК опухолевого происхождения.

2. При выполнении диссертационной работы выявлено, что экзосомы плазмы составляют менее половины экзосом крови. У больных РМЖ экзосомы крови по сравнению с экзосомами плазмы обогащены белками, стимулирующими эпителиально-мезенхимальный переход, миграцию и инвазию клеток. Для повышения эффективности выявления опухолеассоциированных белков разработан способ получения экзосом крови (патент РФ №2556825 от 18 июня 2015 г. «Способ получения экзосом из крови»).

3. Обнаруженные при выполнении диссертационной работы панели протеомных маркеров в составе дезоксирибонуклеопротеиновых комплексов и экзосом крови могут быть использованы в качестве дополнительного критерия дифференцирования условно здоровых женщин и больных РМЖ (патент РФ №2571507 от 24 ноября 2015 г. «Способ диагностики и мониторинга онкологических заболеваний с использованием экзосом крови»).

ОСНОВНЫЕ РЕЗУЛЬТАТЫ ДИССЕРТАЦИИ ИЗЛОЖЕНЫ В СЛЕДУЮЩИХ РАБОТАХ:

Обзоры

1. Тамкович С.Н., Власов В.В., Лактионов П.П. Циркулирующие дезоксирибонуклеиновые кислоты крови и их использование в медицинской диагностике // Молекулярная биология. – 2008. – Т. 42. – С. 12-23. DOI: 10.1134/S0026893308010020.

2. Тамкович С.Н., Войццкий В.Е., Лактионов П.П. Современные методы диагностики рака молочной железы // Биомедицинская химия. – 2014. – Т. 60(2). – С. 141-160. DOI: 10.18097/PBMC20146002141.

3. Тамкович С.Н., Тутанов О.С., Лактионов П.П. Экзосомы: механизмы возникновения, состав, транспорт, биологическая активность, использование в диагностике // Биологические мембраны. – 2016. – Т. 33(3). – С. 163-175. DOI: 10.1134/S1990747816020112.

4. Юнусова Н.В., Тамкович С.Н., Кондакова И.В. Экзосомы в различных биологических жидкостях: состав и функции // Молекулярная медицина. – 2017. – Т. 15. – С. 14-22.

5. Юнусова Н.В., Тугутова Е.А., Тамкович С.Н., Кондакова И.В. Роль тетраспанинов и протеаз экзосом в опухолевой прогрессии // Биомедицинская химия. – 2018. – Т. 64(2). – С. 123-133. DOI:10.1134/S1990750818030095.

6. Tamkovich S.N., Laktionov P.P. Cell-surface-bound circulating DNA in the blood: biology and clinical application // IUBMB Life. – 2019. – V. 71(9). – P. 1201-1210. DOI: 10.1002/iub.2070.

7. Tutanov O., Tamkovich S. The influence of proteins on fate and biological role of circulating DNA // Int. J. Mol. Sci. – 2022. – V. 23(13). – P. 7224. DOI: 10.3390/ijms23137224.

8. Shefer A., Yalovaya A., Tamkovich S. Exosomes in breast cancer: involvement in tumor dissemination and prospects for liquid biopsy // Int. J. Mol. Sci. – 2022. – V. 23(16). – P. 8845. DOI: 10.3390/ijms23168845.

Статьи:

9. Тамкович С.Н., Челобанов Б.П., Дужак Т.Г. Метод выделения циркулирующих в крови нуклеопротеиновых комплексов // Известия академии наук. Сер. хим. – 2015. – Т.6. – С. 1458-1463. DOI 10.1007/s11172-015-1032-1.

10. Тамкович С.Н., Сердюков Д.С., Тутанов О.С., Дужак Т.Г., Лактионов П.П. Идентификация белков в составе циркулирующих в крови нуклеопротеиновых комплексов // Биоорганическая химия. – 2015. – Т. 41(6). – С. 686-695. DOI 10.1134/S1068162015060163.

11. Tamkovich S., Bryzgunova O. Protease activity and cell-free DNA in blood of healthy donors and breast cancer patients // J. Immunoassay Immunochemistry. – 2016. – V. 37(2). – P. 141-53. DOI: 10.1080/15321819.2015.1069745.

12. Tamkovich S.N., Tutanov O.S., Serdukov D.S., Belenikin M.S., Shlikht A.G., Kirushina N.A., Duzhak T.G., Voytsitskiy V.E., Tsentalovich Y.P., Tkachuk V.A., Laktionov P.P. Protein content of circulating nucleoprotein complexes // Adv. Exp. Med. Biol. – 2016. – V. 924. – P. 133-136. DOI: 10.1007/978-3-319-42044-8_26.

13. Tamkovich S.N., Kirushina N.A., Voytsitskiy V.E., Tkachuk V.A., Laktionov P.P. Features of circulating DNA fragmentation in blood of healthy females and breast cancer patients // Adv. Exp. Med. Biol. – 2016. – V. 924. – P. 47-51. DOI 10.1007/978-3-319-42044-8_10.

14. Тамкович С.Н., Бакакина Ю.С., Тутанов О.С., Сомов А.К., Кирюшина Н.А., Дубовская Л.В., Волотовский И.Д., Лактионов П.П. Протеомный анализ циркулирующих экзосом крови в норме и при злокачественных новообразованиях молочной железы // Биоорганическая химия. – 2017. – Т. 43(2). – С. 146-156. DOI: 10.1134/S1068162017020157.

15. Григорьева А.Е., Дырхеева Н.С., Брызгунова О.Е., Тамкович С.Н., Челобанов Б.П., Рябчикова Е.И. Контаминация препаратов экзосом, выделенных из биологических жидкостей // Биомедицинская химия. – 2017. – Т. 63(1). – С. 91-96. DOI: 10.18097/PBMC20176301091.

16. Тамкович С.Н., Юнусова Н.В., Стахеева М.Н., Сомов А.К., Фролова А.Е., Кирюшина Н.А., Афанасьев С.Г., Григорьева А. Е., Лактионов П.П., Кондакова И.В. Выделение и характеристика экзосом плазмы крови больных раком молочной железы и колоректальным раком // Биомедицинская химия. – 2017. – Т. 63(2). – С. 165-169. DOI:10.1134/S1990750817030106.

17. Yunusova N.V., Tamkovich S.N., Stakheeva M.N., Grigor'eva A.A., Somov A.K., Tugutova E.A., Kolomiets L.A., Molchanov S.V., Afanas'ev S.G., Kakurina G.V., Choyznzonov E.L., Kondakova I.V. The characterization of exosomes from biological fluids of patients with different types of cancer // AIP Conf. Proc. – 2017. – V. 1882. – P. 020080-1 - 020080-4. DOI: 10.1063/1.5001659.

18. Tamkovich S.N., Somov A.K., Karpukhina K.V., Grigor'eva A.E., Yunusova N.V., Stakheeva M.N., Voytsitskiy V.E., Kondakova I.V., Laktionov P.P. Isolation and characterization of exosomes from blood of patients with mastopathy and breast cancer // AIP Conf. Proc. – 2017. – V. 1882. – P. 020075-1 - 020075-5. DOI: 10.1063/1.5001654.
19. Тамкович С.Н., Юнусова Н.В., Сомов А.К., Афанасьев С.Г., Какурина Г.В., Кологова Е.С., Тугутова Е.А., Кондакова И.В.. Сравнительный субпопуляционный анализ экзосом плазмы крови больных злокачественными новообразованиями // Биомедицинская химия. – 2018. – Т. 64(1). – С. 110-114. DOI:10.1134/S1990750818020130.
20. Tamkovich S.N., Yunusova N.V., Tugutova E.A., Somov A.K., Proskura K.V., Kolomiets L.A., Stakheeva M., Grigor'eva A.E., Laktionov P.P., Kondakova I.V. Protease cargo in circulating exosomes of breast cancer and ovarian cancer patients // Asian Pac. J. Cancer Prev. – 2019. – V. 20(1). – P. 255-262. DOI: 10.31557/APJCP.2019.20.1.255.
21. Tamkovich S., Tutanov O., Efimenko A., Grigor'eva A., Ryabchikova E., Kirushina N., Vlassov V., Tkachuk V., Laktionov P. Blood circulating exosomes contain distinguishable fractions of free and cell-surface-associated vesicles // Curr. Mol. Med. – 2019. – V. 19(4). – P. 273-285. DOI: 10.2174/1566524019666190314120532.
22. Сомов А.К., Юнусова Н.В., Штам Т.А., Проскура К.В., Замбалова Е.А., Лактионов П.П., Тамкович С.Н. ADAM-10 на поверхности экзосом крови больных раком молочной железы: новые механизмы опухолевой диссеминации // Вопросы онкологии. – 2019. – Т.65(5). – С. 678-683.
23. Tutanov O., Orlova E., Proskura K., Grigor'eva A., Yunusova N., Tsentalovich Y., Alexandrova A., Tamkovich S. Proteomic analysis of blood exosomes from healthy females and breast cancer patients reveals an association between different exosomal bioactivity on non-tumorigenic epithelial cell and breast cancer cell migration *in vitro* // Biomolecules. – 2020. – V. 10. – P. 495. DOI:10.3390/biom10040495.
24. Тутанов О.С., Бакакина Ю.С., Проскура К.В., Григорьева А.Е., Сяхович В.Э., Беляев С.А., Рябчикова Е.И., Центалович Ю.П., Лактионов П.П., Тамкович С.Н. Поиск протеомных маркеров рака молочной железы в составе суммарных экзосом крови // Сибирский онкологический журнал. – 2020. – V. 19(2). – P. 49–61. DOI: 10.21294/1814-4861-2020-19-2-49-61.
25. Konoshenko M., Sagaradze G., Orlova E., Shtam T., Proskura K., Kamyshinsky R., Yunusova N., Alexandrova A., Efimenko A., Tamkovich S. Total blood exosomes in breast cancer: potential role in crucial steps of tumorigenesis // Int. J. Mol. Sci. – 2020. – V. 21(19). – P. 7341. DOI:10.3390/ijms21197341.
26. Tutanov O., Proskura K., Kamyshinsky R., Shtam T., Tsentalovich Y., Tamkovich S. Protein profiling of plasma and total blood exosomes in breast cancer:

a potential role in tumor progression, diagnosis, and prognosis // Front. Oncol. – 2020. – V. 10. – P. 580891. DOI: 10.3389/fonc.2020.580891.

27. Tutanov O.S., Proskura K.V., Grigor'eva A.E., Tsentalovich Yu.P., Tamkovich S.N. Identification of tumor dissemination facilitating proteins in exosomes associated with blood cells of breast cancer patients // Russ. J. Bioorg. Chem. – 2020. – V. 46(6). – P. 1018–1033. DOI: 10.1134/S1068162020060357.

28. Yunusova N., Kolegova E., Sereda E., Kolomiets L., Villert A., Patysheva M., Rekada I., Grigor'eva A., Tarabanovskaya N., Kondakova I., Tamkovich S. Plasma exosomes of patients with breast and ovarian tumors contain an inactive 20S proteasome // Molecules. – 2021. – V. 26(22). – P. 6965. DOI:10.3390/molecules26226965.

29. Tutanov O., Shtam T., Grigor'eva A., Tupikin A., Tsentalovich Y., Tamkovich S. Blood plasma exosomes contain circulating DNA in their crown // Diagnostics (Basel). – 2022. – V. 12(4) – P. 854. DOI: 10.3390/diagnostics12040854.

30. Tamkovich S., Tupikin A., Kozyakov A., Laktionov P. Size and methylation index of cell-free and cell-surface-bound DNA in blood of breast cancer patients in the context of liquid biopsy // Int. J. Mol. Sci. – 2022. – V. 23. – P. 8919. DOI:10.3390/ijms23168919.

31. Tutanov O., Shefer A., Tsentalovich Y., Tamkovich S. Comparative analysis of molecular functions and biological role of proteins from cell-free DNA-protein complexes circulating in plasma of healthy females and breast cancer patients // Int. J. Mol. Sci. – 2023. – V. 24(8). – P. 7279. DOI:10.3390/ijms24087279.

Патенты и свидетельство о регистрации:

32. Лактионов П.П., Тамкович С.Н., Рыкова Е.Ю., Власов В.В. Способ выделения нуклеиновых кислот // Патент РФ № 2272072 от 20 марта 2006 г.

33. Тамкович С.Н., Лактионов П.П., Тутанов О.С., Рябчикова Е.И., Григорьева А.Е., Власов В.В. Способ получения экзосом из крови // Патент РФ 2556825 от 18 июня 2015 г.

34. Тамкович С.Н., Лактионов П.П., Тутанов О.С., Власов В.В. Способ диагностики и мониторинга онкологических заболеваний с использованием экзосом крови // Патент РФ 2571507 от 24 ноября 2015 г.

35. Тамкович С.Н., Милейко В.А., Попов А.В., Власов В.В., Лактионов П.П. База данных учета биологических образцов и описания клинико-патологических характеристик пациентов с новообразованиями молочной железы. Свидетельство о государственной регистрации базы данных № 2012621042 от 5 октября 2012 г.

Работа выполнена при поддержке Интеграционного проекта СО РАН с Белоруссией (2015-2017 гг.), РФФИ 12-04-31365 и 18-415-540012, и РНФ 22-25-00130.