

УДК 616-006.6-07:57.088:577.213.3

А.В. Малек<sup>1,2</sup>, Р.Б. Самсонов<sup>1,2</sup>, А. Кьези<sup>2,3</sup>**ПЕРСПЕКТИВЫ РАЗРАБОТКИ МЕТОДОВ ДИАГНОСТИКИ  
И МОНИТОРИНГА ОНКОЛОГИЧЕСКИХ ЗАБОЛЕВАНИЙ****НА ОСНОВЕ АНАЛИЗА ЭКЗОСОМ, СЕКРЕТИРУЕМЫХ ОПУХОЛЕВЫМИ КЛЕТКАМИ**<sup>1</sup>ФГБУ «НИИ онкологии им. Н.Н. Петрова» Минздрава России, Санкт-Петербург<sup>2</sup>ООО «Онко-система», Санкт-Петербург<sup>3</sup>Exosomics Siena, Сиена, Италия**Контактная информация:**

Малек Анастасия Валерьевна, к.м.н., старший научный сотрудник лаборатории онкоэндокринологии

адрес: 194356 Санкт-Петербург, ул. Хошимина 11/1, 207; тел: +7(960)250-46-80

e-mail: [anastasia@malek.com](mailto:anastasia@malek.com)

Статья поступила 27.10.2015, принята к печати 27.11.2015.

**Резюме**

Экзосомы – это мембранные везикулы размером 80–130 нм, секретируемые практически клетками всех типов. Основной физиологической функцией экзосом считается перенос веществ и информации от клетки к клетке. Биохимический состав экзосом сохраняет черты сходства с клеткой-продуцентом и отражает этапы их эндосомального биогенеза, кроме того, в состав экзосом входят различные сигнальные и регуляторные молекулы, компоненты межклеточного матрикса и ферменты.

Неопластическая трансформация сопровождается активацией секреции экзосом, причем опухолевые экзосомы играют значимую роль в развитии заболевания. Среди наиболее значимых эффектов экзосом отмечается подавление противоопухолевого иммунитета, стимуляция инвазивного роста и метастазирования, развитие устойчивости к действию цитостатических препаратов.

Опухолевые экзосомы могут быть обнаружены во многих биологических жидкостях, включая кровь. Экзосомы биохимически стабильны, их состав определяет возможность проведения комплексного анализа. За последние несколько лет большим числом исследований доказана перспективность разработки методов диагностики онкологических заболеваний на основе анализа циркулирующих экзосом, хотя многие существенные и методологические вопросы остаются пока открытыми. В представленном обзоре коротко суммированы современные представления о биологии экзосом и обсуждены первостепенные методологические аспекты работы с экзосомами. Основное внимание уделено изложению и анализу результатов исследований с целью создания новых методов диагностики и мониторинга онкологических заболеваний на основе анализа экзосом и экзосомальных компонентов.

**Ключевые слова:** рак, диагностика, онкомаркер, экзосомы, микроРНК.A.V. Malek<sup>1,2</sup>, R.B. Samsonov<sup>1,2</sup>, A. Chiesi<sup>2,3</sup>**DEVELOPMENT OF CANCER DIAGNOSTICS  
AND MONITORING METHODS BASED****ON ANALYSIS OF TUMOR-DERIVED EXOSOMES**<sup>1</sup>NN Petrov Institute of Oncology, Sankt-Petersburg<sup>2</sup>Oncosystem Ltd, Moscow<sup>3</sup>Exosomics Siena, Siena, Italy**Abstract**

Exosomes are small (80 – 130 nm) membrane vesicles secreted by virtually all cell types. The main physiological function of exosomes is considered to transfer substance and information from cell to cell. The biochemical composition of exosomes retains similarities with the cell of origin and reflects their endosomal biogenesis; moreover exosomes contain various signaling and regulatory molecules, components of the extracellular matrix and enzymes.

Malignant transformation is associated with the activation of the exosomes secretion by cells. Cancer cell – derived exosomes are shown to play essential role in disease progression. The most significant effects of exosomes include suppression of anti-tumor immunity, stimulation of invasive growth and metastasis, the development of chemoresistance.

Tumor-derived exosomes can be detected in biological fluids, including blood. Exosomes are biochemically stable, their complex composition determines the possibility of comprehensive analysis. Thus, circulating exosomes have emerged as a promising source of cancer diagnostics material as it was demonstrated by number of studies. Although many substantial and methodological questions still remain to be addressed. This review briefly summarizes the current

concepts of exosomes biology and discusses the main methodological aspects of exosomes research. Results of recent investigations aimed to develop new methods for cancer diagnosis and monitoring based on the analysis of exosomes and exosomal components are presented in great details.

**Key words:** oncology, cancer, onco-marker, exosomes, microRNA.

### Введение

По данным ВОЗ онкологические заболевания конкурируют с заболеваниями сердечно-сосудистой системы за лидирующую позицию в перечне основных причин смертности. Колебания, обусловленные климатическими, социальными или экономическими факторами, не влияют существенно на эту статистику. Важной и хорошо известной особенностью онкологических заболеваний является существенная разница между показателями смертности пациентов, диагноз которым был поставлен на начальной стадии развития опухоли (I–II) или на стадии метастатической диссеминации (III–IV). Современные возможности хирургии, лекарственной или лучевой терапии позволяют вполне успешно излечивать или существенно продлевать жизнь пациентам с начальными формами большинства онкологических заболеваний. К сожалению, показатели эффективности лечения распространенных форм ухудшаются медленно. С учетом этой особенности, снижение онкологической смертности может быть достигнуто не только и не столько путем оптимизации терапевтических подходов, сколько внедрением методов ранней диагностики. Поэтому поиск так называемых онкомаркеров, на основе анализа которых могут быть созданы новые методы лабораторной диагностики, является одним из приоритетных направлений фундаментальной онкологии.

Большинство онкомаркеров, используемых для скрининга, ранней диагностики или контроля лечения онкологических заболеваний – это тканеспецифичные протеины или гликопротеины, уровень которых в циркулирующей крови может повышаться при развитии опухоли соответствующей локализации. Так, например, ПСА) – это гликопротеин, секретируемый клетками эпителия канальцев предстательной железы. СА-19-9 – высокомолекулярный гликопротеин, вырабатываемый клетками эпителия различных отделов желудочно-кишечного тракта. РЭА – поверхностный гликопротеин, определяющий адгезивные характеристики клеток желудочно-кишечного тракта в ходе эмбрионального развития. Перечисление еще десятка хорошо известных примеров докажет отсутствие молекулярного маркера «специфичного» для опухолевой ткани как таковой. Большинство онкомаркеров характеризуются не опухоль-, а тканеспецифичностью, поэтому повышение их концентрации в циркулирующей крови чаще отражает повышение метаболической активности определенной ткани, а не факт ее малигнизации. В этом заключается основная и, к сожалению, принципиальная проблема разработки и внедрения в практику методов диагностики онкологических заболеваний на основе ана-

лиза онкомаркеров. Как известно, процесс малигнизации может сопровождаться потерей степени тканевой дифференцировки, но не наоборот. Опухолевая клетка обычно не «приобретает» новые биохимические признаки, чаще – «теряет» тканевые характеристики, а иногда – «возвращается» к синтезу белков, типичных для ранних этапов онтогенеза. Поэтому поиски «волшебной» молекулы, которая продуцировалась бы опухолевыми, всегда и только, клетками, имеют мало шансов на успех. Альтернативным решением этой проблемы может являться поиск комплексных мультимолекулярных образований, которые продуцируются клетками, циркулируют в крови, и сохраняют диагностически значимое сочетание биохимических характеристик. Один из наиболее перспективных вариантов – мембранные нано- или микро-везикулы, которые секретируются клетками практически всех типов и имеют в своем составе фрагмент клеточной мембраны, специфический набор мембранных и цитоплазматических белков, нуклеиновые кислоты, включая регуляторные, рибосомальные, транспортные, информационные РНК и фрагменты геномной ДНК. Важно, что столь комплексная по составу структура является биологически стабильной, во-первых, и может сочетать в себе признаки тканевого происхождения, измененного метаболизма, и, во-вторых, аномальной пролиферативной активности.

Различные типы микровезикул, включая так называемые экзосомы, секретируемые опухолевыми клетками, или опухолевые экзосомы (ОЭ) активно исследуются в течение последних 7–10 лет как пара- и эндокринные факторы, участвующие в локальном росте опухоли и в генерализации опухолевого процесса [84]. Несмотря на то, что далеко не все аспекты биогенеза и патологические функции ОЭ исследованы, их диагностический потенциал уже очевиден [81].

Целью данного обзора стали систематизация современных представлений об ОЭ и анализ перспектив их использования в качестве онкомаркеров. В обзоре дано описание современных представлений о биогенезе экзосом и роли ОЭ в процессе прогрессии онкологических заболеваний. Коротко рассмотрены практические вопросы выделения и анализа экзосом. В заключение описаны результаты современных исследований, направленных на разработку диагностических методов на основе количественного и качественного анализа экзосом.

### Биология

#### субклеточных мембранных везикул

#### Биогенез

#### мембранных везикул различного типа

Клетки практически всех типов, включая опухолевые, продуцируют различного рода и раз-

мера мембранные везикулярные образования, которые могут быть обнаружены в межклеточном пространстве и в физиологических жидкостях. На основе отличий размеров и биогенеза принято различать несколько вариантов микровезикул [10]. Так, апоптотические тельца образуются в результате «отделения» фрагментов клетки в ходе процесса программированной гибели, или апоптоза, и имеют размер 1000–5000 нм. Образование апоптотических телец опосредует процесс фагоцитоза фрагментов гибнущих клеток тканевыми макрофагами. Микровезикулы меньшего размера, 200–1000 нм, могут образовываться в результате «отпочковывания» фрагментов клеточной цитоплазмы, окруженной поверхностной мембраной. Обратный процесс – инвагинация клеточной мембраны – может приводить к образованию эндосом, биогенез которых приводит либо к формированию лизосом и энзиматическому лизису содержимого, либо к формированию так называемых мультивезикулярных телец (MBT, англ. MVB) [63]. В последних образуются одинаковые по размеру и содержанию интралюминальные везикулы (ИЛВ, англ. ILV). При слиянии мультивезикулярного тельца с поверхностной мембраной эти везикулы высвобождаются во внеклеточное пространство. Везикулы, которые образуются в ходе такого энергозависимого и регулируемого процесса, имеют размер 80–130 нм и называются экзосомами. Кроме специфического механизма формирования экзосомы отличаются от микровезикул других типов физическими и биохимическими особенностями. Так, в частности, при седиментации везикул в градиенте сахарозы экзосомы определяются в диапазоне плотности 1,10–1,21 г/мл [49]. Результатом специфического эндосомального биогенеза является обогащение экзосом мембранными белками – тетраспанинами (CD9, CD63, CD81, CD83, CD53) [7] и компонентами так называемого эндосомального сортирующего комплекса, ответственного за транспорт, ESCRT – ALIX, TSG101 [20]. Эти молекулы используют как экзосомальные маркеры в процессе выделения и анализа экзосом из биологических жидкостей, хотя эти маркеры не являются абсолютными и экзосомы разного происхождения могут иметь различный профиль экспрессии маркерных молекул.

На практике, физическое разделение и исследование мембранных везикул размером до 200 нм методологически далеко не тривиально. Поэтому многие утверждения относительно биохимического состава и биологических функций экзосом и эктосом малых размеров до сих пор имеют дискуссионный характер [19]. Этот факт подчеркивает возможность сопоставления и сравнительного анализа лишь результатов исследований, проведенных аналогичными методами и подтвержденных объективными данными аппаратной визуализации.

#### **Биологические функции экзосом**

Феномен выделения живыми клетками мембранных везикул впервые описан в 1983 г. параллельно двумя группами американских биологов.

Эти работы были сфокусированы на физиологии ретикулоцитов и процессе рециркуляции трансферина [32; 55]. Более десяти лет спустя также показано, что экзосомы участвуют в процессе антиген-презентации и регуляции работы иммунной системы [62]. За несколько десятков лет, прошедших с момента публикации этих работ, представления о структуре, биогенезе, биологических функциях экзосом существенно расширились. В настоящее время экзосомы принято считать одним из основных механизмов межклеточного взаимодействия, своего рода системой коммуникаций клеток и тканей многоклеточного организма, дополняющей функции нервной и эндокринной систем. Получены данные, указывающие на важную роль экзосом в ряде физиологических процессов, включая эмбриональное развитие, иммунные реакции, процесс регенерации тканей. Особый интерес представляет участие экзосом в развитии различных хронических патологий, включая аутоиммунные заболевания и нейродегенеративные процессы, заболевания сердечно-сосудистой системы и инфекционные процессы [2; 23]. Несмотря на экспоненциальный рост количества научных публикаций по данной теме за последние 10–15 лет, современное представление о биологии экзосом еще носит описательный характер.

Пока недостаточно полно исследованы общие принципы работы системы экзосомальных межклеточных коммуникаций, включая динамику и регуляцию секреции экзосом клетками, механизмы внутриклеточной «сортировки» молекул в составе экзосом, вероятность «таргетного» транспорта содержимого экзосом от клетки к клетке.

В целом определение биологической функции эндокринной системы как «системы регуляции деятельности внутренних органов посредством гормонов, выделяемых эндокринными клетками в межклеточное пространство» может быть преобразовано для определения, отчасти эмпирического, биологической функции экзосом с двумя существенными поправками. В отличие от гормонов экзосомы, во-первых, выделяются практически всеми клетками; во-вторых, являются мультимолекулярными образованиями.

#### **Методологические аспекты работы с экзосомами**

##### **Методы выделения экзосом из биологических жидкостей**

Детальное рассмотрение методов выделения экзосом представляется важным, так как до настоящего момента нет однозначно правильного и всегда приемлемого способа получения и очистки экзосом из биологических жидкостей. В основе существующих методов лежат особенности физической (плотность, размер) или биохимической (специфические поверхностные белки или углеводы) структуры экзосом. Но стоит заметить, что для экзосом характерно уникальное сочетание этих признаков, в то время как каждое отдельно взятое качество может не быть достаточно строгим крите-

рием. Так, например, размер экзосом сопоставим с таковым вирусных частиц, а поверхностные белки могут присутствовать на поверхности клеток или фрагментов клеточных мембран. Представленные ниже методы имеют определенные плюсы и минусы. Выбор метода определяют в каждом случае задачи исследования [68; 86]. В целом можно заметить, что чем более «чистую» фракцию экзосом нужно выделить, тем на меньший выход продукта стоит рассчитывать.

Классическим способом выделения экзосом из биологических жидкостей или культуральных сред является *ультрацентрифугирование в градиенте плотности сахарозы* [75] или так называемое *дифференциальное центрифугирование* [4].

Этот метод предполагает поэтапное удаление путем осаждения клеточных элементов, клеточного детрита, крупных везикул и финальное осаждение оставшихся экзосом с помощью ультрацентрифугирования при значениях  $G$  (ускорение)  $>120\,000$ - $140\,000$ .

В классическом протоколе выделения экзосом кровь собирают в контейнеры, содержащие ЭДТА для предотвращения тромбообразования. После удаления форменных элементов плазму разбавляют PBS (1 : 1) и центрифугируют несколько раз с возрастающей центробежной силой для последовательного удаления клеток и клеточного детрита. Затем осаждают экзосомы. Для последующего анализа экзосом рекомендуется промыть осадок фосфатно-солевым буфером и переосадить в режиме ультрацентрифугирования [75].

Основными недостатками этого метода являются трудоемкость и низкий выход (который объясняется вынужденными потерями на каждом этапе дифференциального центрифугирования). В качестве альтернативного, а чаще – дополнительного метода – используют ультрафильтрацию [16]. Но этот подход предполагает контаминацию получаемого препарата субклеточными структурами и белковыми комплексами аналогичного или меньшего размера.

В дополнение к методам механического разделения частиц разной относительной плотности и размера предложены менее трудоемкие подходы, основанные на специфическом связывании молекул на поверхности экзосом [25; 68; 85]. При этом антитела к белкам на поверхности экзосом могут быть фиксированы на поверхности латексных частиц, матрикса спин-колонок или лунок иммунологических планшетов, что определяет возможность выбора оптимальной методики. Методы иммуноаффинной изоляции экзосом реализованы рядом коммерческих компаний (ThermoFisher Scientific, (США), HansaBioMed (Эстония), System Biosciences (США)) в виде наборов для быстрого и гарантированного выделения экзосом из различных биологических жидкостей (плазмы, сыворотки, мочи). Кроме относительной дороговизны, при использовании подобных наборов нужно учитывать тот факт, что в основе их эффективности лежит предположение о том, что «таргетные» белки (CD63,

CD81, CD9) секретируются на поверхности «всех и только» экзосом, что не совсем верно. Существуют также методы так называемой преципитации или агглютинации экзосом с помощью полиаффинных полимеров [38] или белков растительного происхождения [66]. Они взаимодействуют с поверхностью многих экзосом и приводят к образованию мультивезикулярных конгломератов, которые осаждаются при щадящих режимах центрифугирования. Низкая специфичность такого взаимодействия приводит к копреципитации экзосом и различных молекулярных комплексов. В некоторых ситуациях это допустимо и позволяет использование указанных относительно простых и дешевых методов без ущерба для получаемого результата. Так, например, выделение экзосом из мочи для последующего анализа экзосомальной микроРНК может быть проведено путем агглютинации экзосом лектинами, т.к. примесь не экзосомальных протеинов (преимущественно, белка Тамма-Хорсфалла) не влияет на конечный результат [66].

При выделении экзосом из биологических жидкостей с целью количественного или качественного анализа необходимо учитывать две возможности – неконтролируемой агглютинации везикул или их образования *de novo*. Так, например, процесс тромбообразования сопровождается выбросом экзосом из тромбоцитов, что объясняет разницу между количеством и качеством экзосом плазмы и сыворотки [15].

Поэтому одной из основных задач на пути разработки диагностических тестов на основе анализа циркулирующих экзосом является стандартизация методов их выделения.

#### **Методы визуализации и анализа экзосом**

Несмотря на наноразмерность, экзосомы могут быть визуализированы методами флуоресцентно-световой, сканирующей или трансмиссионной электронной микроскопии. Эти методы позволяют анализировать биологические или структурные особенности единичных экзосом и применяются в исследовательских целях.

Использование *методов микроскопии для диагностики* маловероятно, по крайней мере, в обозримом будущем.

Более отчетливые перспективы диагностического применения могут иметь *методы количественного анализа экзосом*, которые позволяют в той или иной степени оценить размер, поверхностный заряд, количество, а иногда и качество везикул в составе исследуемого образца. Так, наиболее широкое применение имеют методы

1. методы проточной цитометрии (flow cytometry),
2. методы динамического светорассеяния,
3. анализ траекторий наночастиц.

Все три метода основаны на обработке частиц монохромным поляризованным (лазерным) излучением и анализе отраженного излучения. В первом случае анализируется отраженное излучение последовательно от каждой частицы, пересе-

кающей луч лазера в направленном потоке жидкости исследуемого образца. Во втором и третьем – излучение, отраженное от частиц в состоянии случайного движения, вызванного некомпенсированными толчками молекул растворителя (т.н. броуновское движение). Основным недостатком *метода проточной цитометрии* является тот факт, что нижняя граница детектируемых частиц для большинства современных цитометров определяется как 200 нм.

Такие приборы предполагают возможность калибровки с тем, чтобы игнорировать сигналы от частиц больших размеров и несколько увеличить чувствительности анализа частиц малых размеров. Более надежным решением проблемы является использования частиц, «декорированных» антителами к белкам поверхности экзосом, которые связывают экзосомы, и флуоресцентно-меченых вторичных антител, которые опосредуют количественную оценку связанных экзосом.

Такой подход позволяет произвести измерения в надежном диапазоне чувствительности прибора, но непосредственные результаты анализа требуют аккуратной интерпретации. При анализе броуновского движения наночастиц в жидкости (DLS, NTA) из характеристик отраженного света рассчитывается коэффициент диффузии частиц, который, в свою очередь, определяется размерами частицы, точнее – гидродинамическим радиусом. Методом динамического светорассеяния можно оценить характеристики излучения, отраженного множеством частиц в растворе, и оценить соотношение частиц разных размеров [40]. При этом отсутствие возможности непосредственной оценки характеристик отдельных частиц существенно снижает информативность методики.

Относительно недавно разработанный *метод анализа траекторий наночастиц* предполагает детекцию отраженного излучения с помощью ультрамикроскопа и анализ характеристик движения каждой отдельной частицы.

Этот метод позволяет оценить размеры частиц, концентрацию частиц разных размеров и интенсивность рассеяния света индивидуальной частицей, что может отражать ее химическую структуру или свойства поверхности [87]. Результаты анализа траекторий наночастиц могут быть показаны разными способами, что позволяет удобное использование и интерпретацию.

Более детальный анализ *биохимического состава экзосом* предполагает их дезинтеграцию и получение результатов, «усредненных» для популяции. Так, профайлинг белков или нуклеиновых кислот в составе экзосом может быть проведен с помощью *масс-спектрометрии* или *методами секвенирования нового поколения*, соответственно. Принципы этих методов не предполагают никаких особенностей при анализе экзосом и не рассматриваются в рамках этого обзора. Анализ отдельных молекул в составе экзосом может быть проведен традиционными методами молекулярной биологии (Вестерн-блоттинг, ОТ-ПЦР).

### ***Роль экзосом, секретлируемых опухолевыми клетками, в развитии и прогрессии заболевания***

Неопластическая трансформация сопровождается изменением (чаще – увеличением) количества и биохимического состава экзосом, секретлируемых клеткой во внеклеточное пространство. Предполагается, что гипоксия и метаболический стресс являются основными «триггерами» активации продукции экзосом опухолевыми клетками [42; 56]. ОЭ участвуют в прогрессии заболевания; ряд патологических эффектов ОЭ представлен в табл. 1.

В частности, экзосомы, секретлируемые клетками первичной опухоли, переносят сигнальные молекулы в клетки окружающей стромы (фибробласты, эндотелиоциты, тканевые макрофаги) и в соседние опухолевые клетки. Таким образом, осуществляется локальная паракринная координация процесса роста опухоли и ее инвазии в окружающие ткани (табл. 1).

В ряде исследований показано, что ОЭ активно взаимодействуют с различными клетками иммунной системы и в большинстве случаев угнетают их активность (табл. 1). Разнородность данных, представленных в современной печати, вероятно, отражает комплексность функций иммунной системы и разнообразие эффектов, которые ОЭ могут оказывать на различные аспекты ее функциональной активности. Кроме того, не всегда есть возможность получить и сопоставить релевантные клинические данные описательного характера и результаты экспериментальных исследований, поэтому, не все наблюдаемые эффекты имеют удовлетворительные объяснения. В целом, экзосомы, выделенные из плазмы онкологических пациентов, часто содержат больше различных медиаторов иммуносупрессии (FasL, PD-L1, TRAIL, IL-10, TGF- $\beta$ 1) по сравнению с экзосомами, выделенными из плазмы здоровых доноров. Выделенные из плазмы пациентов экзосомы угнетают активность различных иммунокомпетентных клеток в системах *in vitro* (табл. 1).

Все эти наблюдения определили возможность разработки методики стимуляции противоопухолевого иммунитета онкологических пациентов путем тотального удаления экзосом плазмы [48]. Понятно, что такая процедура имеет симптоматический характер и временный эффект, но она свидетельствует в пользу ряда предположений:

1. ОЭ составляют значимую часть популяции экзосом, циркулирующих в крови пациентов с онкологическими заболеваниями.
2. В целом циркулирующие в крови пациентов экзосомы оказывают угнетающий эффект на противоопухолевый иммунитет.
3. Даже неспецифическое изменение количества/состава популяции циркулирующих экзосом может оказывать иммуномодулирующий эффект и применяться в качестве адъювантной иммунотерапии.

Таблица 1

Роль ОЭ в процессе прогрессии опухолевого заболевания

Патологический эффект экзосом, секретируемых клетками опухоли	Ссылка
<b>а. Стимуляция локального роста и инвазии</b>	
Аутокринная стимуляция пролиферации и угнетение апоптотической активности	[72; 82]
Стимуляция секреторной и инвазивной активности, опосредующих локальный рост опухоли	[70]
Стимуляция локального неоангиогенеза	[18; 77]
Аутокринная стимуляция миграторной активности	[34; 60]
Воздействие на активность иммунных клеток перитуморальной соединительной ткани	[80]
Горизонтальный перенос канцерогенных регуляторных факторов (данные <i>in vitro</i> )	[5]
<b>б. Стимуляция процесса метастатической диссеминации</b>	
Стимуляция адгезивной активности циркулирующих опухолевых клеток	[44]
Активация коагуляции, образования тромбов и фиксации циркулирующих опухолевых клеток	[29; 30]
Стимуляция формирования костных метастазов путем изменения экспрессионного профиля клеток и морфологии костного мозга	[57]
Стимуляция формирования метастазов в лимфатических узлах и легких путем изменения генной экспрессии клеток и морфологии соответствующих тканей	[61]
Стимуляция формирования метастазов в печени	[22]
Стимуляция неоангиогенеза в очагах метастатической диссеминации	[6; 53]
<b>с. Регуляция функциональной активности иммунной системы</b>	
Угнетение гуморальной (антительной) противоопухолевой реакции	[8]
Стимуляция апоптоза Т-лимфоцитов, регулирующих противоопухолевую реакцию	[36; 83]
Угнетение активности дендритных клеток и формирование иммунотолерантности.	[24]
<b>д. Формирование лекарственной резистентности</b>	
Горизонтальная передача экзосомальных мРНК, которые опосредуют формирование устойчивости к цитостатикам (доцетаксел) и гормональной терапии	[14; 13; 78]
Непосредственное участие в процессе «выведения» молекул цитостатических препаратов из клеток, снижение чувствительности к химиотерапии	[65]
Горизонтальный транспорт молекул, участвующих в «выведении» молекул цитостатических препаратов из клеток	[21]

Таблица 2

Белковые молекулы, выделенные из экзосом плазмы или мочи пациентов с различными онкологическими заболеваниями

Нозологическая форма заболевания	Протеин в составе экзосом	Ссылка
<b>Плазма / сыворотка</b>		
Глиобластома	EGFRVIII mut	[31; 71]
Рак предстательной железы	PTEN	[50]
Рак молочной железы	Survivin	[41]
Рак яичников	Claudin-4, TFG-β	[45; 73]
Меланома	TYRP2, VLA-4, HSP70, Caveolin, CD63, Met (phosphorylated)	[47; 57]
Немелкоклеточный рак легких	EGFR, CEA	[37]
Рак носоглотки	Galectin-9	[43]
	LMP-1	[35]
Плоскоклеточные опухоли головы и шеи	FasL	[9]
Рак поджелудочной железы	KRAS	[22]
Рак толстой кишки	CEA	[37]
<b>Моча</b>		
Рак предстательной железы	PSMA	[58]
Рак почки	MMP-9, Carbonic anhydrase	[59]
Рак мочевого пузыря	α6-integrin, MUC-1	[79]
Немелкоклеточный рак легких	LRG-1	[46]

Кроме иммуносупрессии, ОЭ стимулируют метастатический процесс. Так, например, в ряде экспериментальных исследований было показано, что экзосомы, секретируемые клетками опухоли, «доходят» до тканей – т.н. «мишеней» метастатической диссеминации.

Поглощение опухолевых экзосом клетками анатомически отдаленных тканей приводит к высвобождению ряда регуляторных молекул, изменению профиля экспрессии клеток и морфологии тканей, что облегчает процесс последующей метастатической диссеминации (табл. 1, б).

В различных *in vivo* системах такой феномен был продемонстрирован в ходе диссеминации экспериментальной опухоли в лимфоузлы, легкие, печень и костный мозг (*ibid.*).

Как показано рядом авторов, ОЭ участвуют в процессе адаптации опухоли к проводимой терапии и развитию феномена лекарственной резистентности. В большинстве случаев, такие наблюдения сделаны в ходе экспериментов *in vitro* (табл. 1). Так, например, клетки рака молочной железы MCF-7 после длительной культивации в среде, содержащей тамоксифен<sup>1</sup>, приобретают относительную резистентность к этому препарату. Причем такие резистентные клетки секретируют в среду экзосомы, которые «передают» качество резистентности клеткам, исходно чувствительным к антипролиферативному эффекту тамоксифена [3]. Понимание молекулярных механизмов этого феномена могло бы облегчить поиск аналогичного эффекта в контексте развития резистентности к гормональной терапии пациенток с ER<sup>+</sup> РМЖ и, возможно, лечь в основу разработки методов диагностики или прогнозирования такого состояния на основе анализа циркулирующих экзосом.

#### **Диагностический потенциал опухолевых экзосом**

##### **Общее количество**

##### **циркулирующих экзосом**

В контексте анализа диагностической значимости ОЭ, существенное значение имеет тот факт, что популяция циркулирующих экзосом весьма разнородна и динамична. Так, эндотелиоциты, клетки крови и тромбоциты активно секретируют экзосомы. Рядом исследований показано, что уровень (концентрация) экзосом в циркулирующей плазме выше у пациентов с онкологическими заболеваниями по сравнению со здоровыми донорами [57; 74]. С учетом сложности определения нормального, так называемого «референсного» значения, подобный тест может найти клиническое применение в процессе или после лечения пациентов с онкологическими заболеваниями с целью ранней диагностики рецидива. Оценка колебаний уровня экзосомальной фракции протеинов плазмы в динамике у одного пациента может иметь как диагностическое, так и прогностическое значение. Например, у пациентов с ОМЛ, проходивших курс стандартной химиотерапии, снижение уровня циркулирующих экзосом коррелировало с эффектом терапии, т.е. снижением со снижением доли бластных форм в биоптате костного мозга. Более того, у пациентов, находящихся в состоянии стабильной ремиссии, уровень циркулирующих экзосом был сопоставим с показателями здоровых доноров [33]. В другом исследовании уровень экзосом плазмы определялся у пациентов с рецидивом злокачественной глиомы проходивших курс иммунотерапии (аутологичными дендритными клетками [52]). Так,

<sup>1</sup>конкурентный ингибитор периферических рецепторов эстрогена

исследуемый показатель, определенный до начала терапии, статистически достоверно коррелировал со степенью злокачественности опухоли. У многих, хотя не у всех, пациентов отмечалось снижение уровня экзосом в плазме после начала терапии и его корреляция с клиническим и иммунологическим ответом [52].

#### **Диагностическое значение экзосомальных протеинов**

Диагностическое значение изолированной фракции циркулирующих опухолевых экзосом было бы, конечно, существенно выше, чем оценка тотального количества, подверженного влиянию различных причин помимо опухолевого процесса. Проблема заключается в отсутствии надежных методов анализа или физического выделения экзосом опухолевого происхождения. Одним из подходов к решению этой проблемы представляется исследование «чистой фракции» экзосом, секретируемых культурами опухолевых клеток *in vitro*, определение «маркерных» протеинов или их сочетаний, и использование этих «маркеров» для анализа образцов экзосом, полученных из плазмы. Такой метод является более чувствительным по сравнению с банальной оценкой уровня молекулярных онкомаркеров, так как в анализе не учитываются свободно циркулирующие молекулы, а лишь протеины – компоненты экзосом. В табл. 2 представлен ряд белковых молекул, выделенных из экзосом плазмы или мочи пациентов с различными онкологическими заболеваниями. Все эти молекулы имеют известное отношение к развитию и прогрессии онкологических заболеваний, поэтому их количественная оценка в общей популяции экзосом может отражать наличие и относительное количество ОЭ.

#### **Диагностическое значение экзосомальных РНК**

В 2007 г. впервые показаны наличие нуклеиновых кислот в составе экзосом и возможность их переноса с помощью экзосом из клетки в клетку [76]. С тех пор опубликованы сотни новых исследований, а ряд компаний работает над созданием диагностических тестов на основе анализа экзосомальных РНК [11; 26–28]. Особый интерес фокусируется на экзосомальных микроРНК<sup>2</sup> [67; 69]. Интерес определяется несколькими факторами.

Во-первых, молекула миРНК представляет собой мощный регуляторный фактор, перенос которого с помощью экзосом из клетки-продуцента в клетку-реципиент может оказать существенное влияние на биологию последней. Например, было показано, что молекулярными эффекторами морфологических изменений, которые индуцируют ОЭ в тканях-мишенях метастатической диссеминации, являются именно миРНК [61].

Во-вторых, число известных миРНК существ-

<sup>2</sup>миРНК – микроРНК – короткие одноцепочечные РНК, регулирующие экспрессию генов на посттранскрипционном уровне

венно меньше, чем число известных мРНК (информационных РНК), что упрощает анализ и увеличивает возможность определения диагностически значимых комбинаций этих молекул.

Важной особенностью экзосомальных микроРНК является существенное отличие их состава от состава внутриклеточной цитоплазматической микроРНК. Этот феномен был показан для клеток РМЖ [39] и КРР [51] в условиях культивации *in vitro*. Есть основания предполагать аналогичную ситуацию *in vivo*: профиль микроРНК клеток опухоли не обязательно «отражается» в изменениях профиля микроРНК циркулирующих экзосом, индуцируемых этой опухолью. С одной стороны, это отчасти осложняет верификацию «опухолевого» происхождения экзосом плазмы, которое можно было бы прояснить путем простого сравнения профилей микроРНК плазмы и ткани опухоли. С другой, в основе наблюдаемого феномена лежит механизм так называемой «активной сортировки» или специфической внутриклеточной селекции молекул микроРНК в процессе формирования экзосом.

Возможно предполагать, что такая селекция «должна отвечать» потребностям локального роста и метастатической диссеминации опухоли, т.е. может отчасти «унифицировать» профиль экзосомальной фракции микроРНК и «нивелировать» его индивидуальные особенности.

Эта гипотеза подтверждается многими исследованиями, описывающими специфические изменения профиля микроРНК в экзосомах, выделенных из плазмы пациентов с РМЖ [64], КРР [54], РЛ [12] и другими онкологическими заболеваниями. Рост объема и активности исследований в этой области в течение последних нескольких лет является косвенным подтверждением огромного потенциала, который может иметь анализ микроРНК экзосом, выделенных из циркулирующей плазмы, для диагностики и мониторинга онкологических заболеваний. Работы в этом направлении ведутся и в нашей стране [1].

### Литература

1. Гусаченко О.Н., Зенкова М.А., Власов В.В. Нуклеиновые кислоты экзосом: маркеры заболеваний и молекулы межклеточной коммуникации: обзор // Биохимия. – 2013. – № 78(1) – С. 5–13.
2. Джагаров Д.Э. Экзосомы – бутылочная почта организма // Химия и жизнь – XXI век. – 2013. – № 6. – С. 6–9.
3. Семин С.Е., Багров Д.В., Красильников М.А. Межклеточные взаимодействия и развитие гормональной резистентности клеток рака молочной железы // Успехи молекулярной онкологии. – 2015. – № 2(2). – С. 50–5.
4. Штам Т.А., Нарыжный С.Н., Ланда С.Б., и др. Получение и анализ экзосом, секретируемых злокачественно трансформированными клетками человека в системах *in vitro* // Цитология. – 2012. – № 54(5). – С. 430–8.
5. Abd Elmageed Z.Y., Yang Y., Thomas R. et al. Neoplastic reprogramming of patient-derived adipose stem cells by prostate cancer cell-associated exosomes // Stem cells. – 2014. – 32(4). – P. 983–97.
6. Al-Nedawi K., Meehan B., Kerbel R.S. et al. Endothelial expression of autocrine VEGF upon the uptake of tumor-derived microvesicles containing oncogenic EGFR // Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. – 2009. – 106(10). – P. 3794–9.
7. Andreu Z., Yanez-Mo M. Tetraspanins in extracellular vesicle formation and function // Frontiers in immunology. – 2014. – 5. P. 442.
8. Battke C., Ruiss R., Welsch U. et al. Tumour exosomes inhibit binding of tumour-reactive antibodies to tumour cells and reduce ADCC // Cancer immunology, immunotherapy. – 2011. – 60(5). – P. 639–48.
9. Bergmann C., Strauss L., Wieckowski E. et al. Tumor-derived microvesicles in sera of patients with head and neck cancer and their role in tumor progression // Head & neck. – 2009. – 31(3). – P. 371–80.
10. Brinton L.T., Sloane H.S., Kester M., Kelly K.A. Formation and role of exosomes in cancer // Cellular and molecular life sciences. – 2015. – 72(4). P. 659–71.
11. CARIS Life science U: <http://www.carislifesciences.com/>
12. Cazzoli R., Butti F., Di Nicola M. et al. microRNAs derived from circulating exosomes as noninvasive biomarkers for

### Заключение

В реальности разработка и внедрение в клиническую практику методик анализа экзосомальной микроРНК еще требует решения некоторых принципиальных проблем. В частности, недавно в печати появилось уникальное исследование [17], авторы которого провели количественный и стехиометрический анализ микроРНК в составе экзосом плазмы и показали что соотношение количества уникальных молекул микроРНК к соответствующему количеству экзосом – 1 : 100. Иными словами, популяция циркулирующих экзосом очень гетерогенна и для детекции одной (!) определенной молекулы микроРНК нужно проанализировать порядка сотни экзосом. Это наблюдение лишний раз подтверждает необходимость «преселекции» опухолевых экзосом из популяции всех циркулирующих экзосом и разработку методов количественного анализа компонентов (например, микроРНК) этой субпопуляции. Как следует из предыдущих параграфов этого обзора, экзосомы представляют собой биохимически комплексную, но стабильную структуру, что является важным условием и предпосылкой успешной разработки комбинированных диагностических тестов. Так, например, опухолевые клетки в большинстве случаев характеризуются аномально активным метаболизмом или активацией процесса анаэробного гликолиза, что приводит к повышению концентрации специфических белков (например, TM9SF4) в составе их поверхностной мембраны и, следовательно, в составе мембраны секретируемых этими клетками экзосом. Антитела к этим белкам могут быть использованы для иммуноаффинной «преселекции» экзосом, секретируемых такими клетками. Последующий анализ профиля микроРНК изолированной фракции экзосом будет иметь существенно большую диагностическую ценность по сравнению с «профайлингом» общей популяции экзосом плазмы. Разработка такого рода комплексных методов представляется наиболее перспективным направлением создания систем для диагностики и мониторинга опухолевых заболеваний.



- screening and diagnosing lung cancer // Journal of thoracic oncology : official publication of the International Association for the Study of Lung Cancer. – 2013. – 8(9) – P. 1156–62.
13. *Challagundla K.B., Wise P.M., Neviani P. et al.* Exosome-mediated transfer of microRNAs within the tumor microenvironment and neuroblastoma resistance to chemotherapy // Journal of the National Cancer Institute. – 2015. – 107(7).
  14. *Chen W.X., Cai Y.Q., Lv M.M. et al.* Exosomes from docetaxel-resistant breast cancer cells alter chemosensitivity by delivering microRNAs // Tumour biology : the journal of the International Society for Oncodevelopmental Biology and Medicine. – 2014. – 35(10). – P. 9649–59.
  15. *Cheng L., Sharples R.A., Scicluna B.J., Hill A.F.* Exosomes provide a protective and enriched source of miRNA for biomarker profiling compared to intracellular and cell-free blood // Journal of extracellular vesicles. – 2014. – 3.
  16. *Cheruvanky A., Zhou H., Pisitkun T. et al.* Rapid isolation of urinary exosomal biomarkers using a nanomembrane ultrafiltration concentrator // American journal of physiology Renal physiology. – 2007. – 292(5). – P. 1657–61.
  17. *Chevillet J.R., Kang Q., Ruf I.K. et al.* Quantitative and stoichiometric analysis of the microRNA content of exosomes // Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. – 2014. – 111(41). – P. 14888–93.
  18. *Chowdhury R., Webber J.P., Gurney M. et al.* Cancer exosomes trigger mesenchymal stem cell differentiation into pro-angiogenic and pro-invasive myofibroblasts // Oncotarget. – 2015. – 6(2). – P. 715–31.
  19. *Cocucci E., Meldolesi J.* Ectosomes and exosomes: shedding the confusion between extracellular vesicles // Trends in cell biology. – 2015. – 25(6). P. 364–72.
  20. *Colombo M., Moita C., van Niel G. et al.* Analysis of ESCRT functions in exosome biogenesis, composition and secretion highlights the heterogeneity of extracellular vesicles // – Journal of cell science. – 2013. – 126(Pt 24). – P. 5553–65.
  21. *Corcoran C., Rani S., O'Brien K. et al.* Docetaxel-resistance in prostate cancer: evaluating associated phenotypic changes and potential for resistance transfer via exosomes // PloS one. – 2012. – 7(12):e50999.
  22. *Costa-Silva B., Aiello N.M., Ocean A.J. et al.* Pancreatic cancer exosomes initiate pre-metastatic niche formation in the liver // Nature cell biology. – 2015. – 17(6). P. 816–26.
  23. *De Toro J., Herschlik L., Waldner C., Mongini C.* Emerging roles of exosomes in normal and pathological conditions: new insights for diagnosis and therapeutic applications // Frontiers in immunology. – 2015. – 6. – P. 203.
  24. *Ding G., Zhou L., Qian Y. et al.* Pancreatic cancer-derived exosomes transfer miRNAs to dendritic cells and inhibit RFXAP expression via miR-212-3p // Oncotarget. – 2015. – 6(30). – P. 29877–88.
  25. *Enderle D., Spiel A., Coticchia C.M. et al.* Characterization of RNA from Exosomes and Other Extracellular Vesicles Isolated by a Novel Spin Column-Based Method // PloS one. – 2015. – 10(8):e0136133.
  26. Exosome Science U: <http://www.exosomesciences.com/>.
  27. Exosomes Diagnostics U: <http://www.exomedx.com/>.
  28. Exosomes Siena I: <http://www.exosomics.eu/>.
  29. *Geddings J.E., Hisada Y., Boulaftali Y. et al.* Tissue Factor-positive Tumor Microvesicles Activate Platelets and Enhance Thrombosis in Mice // Journal of thrombosis and haemostasis. – 2015.
  30. *Geddings J.E., Mackman N.* Tumor-derived tissue factor-positive microparticles and venous thrombosis in cancer patients // Blood. – 2013. – 122(11). – P. 1873–80.
  31. *Graner M.W., Alzate O., Dechkovskaia A.M., Keene J.D. et al.* Proteomic and immunologic analyses of brain tumor exosomes // FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology. – 2009. – 23(5). – P. 1541–57.
  32. *Harding C., Heuser J., Stahl P.* Receptor-mediated endocytosis of transferrin and recycling of the transferrin receptor in rat reticulocytes // The Journal of cell biology. – 1983. – 97(2). – P. 329–39.
  33. *Hong C.S., Muller L., Whiteside T.L., Boyiadzis M.* Plasma exosomes as markers of therapeutic response in patients with acute myeloid leukemia // Frontiers in immunology. – 2014. – 5. – P. 160.
  34. *Hoshino D., Kirkbride K.C., Costello K. et al.* Exosome secretion is enhanced by invadopodia and drives invasive behavior // Cell reports. – 2013. – 5(5). – P. 1159–68.
  35. *Houali K., Wang X., Shimizu Y. et al.* A new diagnostic marker for secreted Epstein-Barr virus encoded LMP1 and BARF1 oncoproteins in the serum and saliva of patients with nasopharyngeal carcinoma // Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research. – 2007. – 13(17). P. 4993–5000.
  36. *Huber V., Fais S., Iero M. et al.* Human colorectal cancer cells induce T-cell death through release of proapoptotic microvesicles: role in immune escape // Gastroenterology. – 2005. – 128(7). – P. 1796–804.
  37. *Jakobsen K.R., Paulsen B.S., Baek R. et al.* Exosomal proteins as potential diagnostic markers in advanced non-small cell lung carcinoma // Journal of extracellular vesicles. – 2015. – 4. – P. 26659.
  38. *Jella K.K., Rani S., O'Driscoll L. et al.* Exosomes are involved in mediating radiation induced bystander signaling in human keratinocyte cells // Radiation research. – 2014. – 181(2). – P. 138–45.
  39. *Jenjaroenpun P., Kremenska Y., Nair V.M. et al.* Characterization of RNA in exosomes secreted by human breast cancer cell lines using next-generation sequencing // PeerJ. – 2013. – 1:e201.
  40. *Kesimer M., Gupta R.* Physical characterization and profiling of airway epithelial derived exosomes using light scattering // Methods. – 2015. – 87. – P. 59–63.
  41. *Khan S., Bennit H.F., Turay D. et al.* Early diagnostic value of survivin and its alternative splice variants in breast cancer // BMC cancer. – 2014. – 14. – P. 176.
  42. *King H.W., Michael M.Z., Gleadle J.M.* Hypoxic enhancement of exosome release by breast cancer cells // BMC cancer. – 2012. – 12. – P. 421.
  43. *Klibi J., Niki T., Riedel A. et al.* Blood diffusion and Th1-suppressive effects of galectin-9-containing exosomes released by Epstein-Barr virus-infected nasopharyngeal carcinoma cells // Blood. – 2009. – 113(9). – P. 1957–66.
  44. *Koumangoye R.B., Sakwe A.M., Goodwin J.S. et al.* Detachment of breast tumor cells induces rapid secretion of exosomes which subsequently mediate cellular adhesion and spreading // PloS one. – 2011. – 6(9):e24234.
  45. *Li J., Sherman-Baust C.A., Tsai-Turton M. et al.* Claudin-containing exosomes in the peripheral circulation of women with ovarian cancer // BMC cancer. – 2009. – 9. – P. 244.
  46. *Li Y., Zhang Y., Qiu F., Qiu Z.* Proteomic identification of exosomal LRG1: a potential urinary biomarker for detecting NSCLC // Electrophoresis. – 2011. – 32(15). – P. 1976–83.
  47. *Logozzi M., De Mito A., Lugini L. et al.* High levels of exosomes expressing CD63 and caveolin-1 in plasma of melanoma patients // PloS one. – 2009. – 4(4):e5219.
  48. *Marleau A.M., Chen C.S., Joyce J.A., Tullis R.H.* Exosome removal as a therapeutic adjuvant in cancer // Journal of translational medicine. – 2012. – 10. – P. 134.
  49. *Mathivanan S., Ji H., Simpson R.J.* Exosomes: extracellular organelles important in intercellular communication // Journal of proteomics. – 2010. – 73(10). – P. 1907–20.
  50. *Mizutani K., Terazawa R., Kameyama K. et al.* Isolation of prostate cancer-related exosomes // Anticancer research. – 2014. – 34(7). – P. 3419–23.
  51. *Moshhammer M.I., Kalipcian M., Bartsch R. et al.* Exosomal microRNA transfer varies with specific microRNAs functional in colorectal cancer and cellular differentiation // International journal of clinical pharmacology and therapeutics. – 2014. – 52(1). – P. 87–8.

52. Muller L., Muller-Haeggele S., Mitsuhashi M. et al. Exosomes isolated from plasma of glioma patients enrolled in a vaccination trial reflect antitumor immune activity and might predict survival // *Oncoimmunology*. – 2015. – 4(6):e1008347.
53. Nazarenko I., Rana S., Baumann A. et al. Cell surface tetraspanin Tspan8 contributes to molecular pathways of exosome-induced endothelial cell activation // *Cancer research*. – 2010. – 70(4). – P. 1668–78.
54. Ogata-Kawata H., Izumiya M., Kurioka D. et al. Circulating exosomal microRNAs as biomarkers of colon cancer // *PloS one*. – 2014. – 9(4):e92921.
55. Pan B.T., Johnstone R.M. Fate of the transferrin receptor during maturation of sheep reticulocytes in vitro: selective externalization of the receptor // *Cell*. – 1983. – 33(3). – P. 967–78.
56. Park J.E., Tan H.S., Datta A. et al. Hypoxic tumor cell modulates its microenvironment to enhance angiogenic and metastatic potential by secretion of proteins and exosomes // *Molecular & cellular proteomics*. – 2010. – 9(6). – P. 1085–99.
57. Peinado H., Aleckovic M., Lavotshkin S. et al. Melanoma exosomes educate bone marrow progenitor cells toward a pro-metastatic phenotype through MET // *Nature medicine*. – 2012. – 18(6). – P. 883–91.
58. Principe S., Jones E.E., Kim Y. et al. In-depth proteomic analyses of exosomes isolated from expressed prostatic secretions in urine // *Proteomics*. – 2013. – 13(10–11). – P. 1667–71.
59. Raimondo F., Morosi L., Corbetta S. et al. Differential protein profiling of renal cell carcinoma urinary exosomes // *Molecular bioSystems*. – 2013. – 9(6). – P. 1220–33.
60. Rana S., Claas C., Kretz C.C. et al. Activation-induced internalization differs for the tetraspanins CD9 and Tspan8: Impact on tumor cell motility // *The international journal of biochemistry & cell biology*. – 2011. – 43(1). – P. 106–19.
61. Rana S., Malinowska K., Zoller M. Exosomal tumor microRNA modulates premetastatic organ cells // *Neoplasia*. – 2013. – 15(3). – P. 281–95.
62. Raposo G., Nijman H.W., Stoorvogel W. et al. B lymphocytes secrete antigen-presenting vesicles // *The Journal of experimental medicine*. – 1996. – 183(3). – P. 1161–72.
63. Raposo G., Stoorvogel W. Extracellular vesicles: Exosomes, microvesicles, and friends // *J Cell Biol*. – 2013. – 200. – P. 373–83.
64. Rodriguez M., Silva J., Herrera A. et al. Exosomes enriched in stemness/metastatic-related mRNAs promote oncogenic potential in breast cancer // *Oncotarget*. – 2015.
65. Safaei R., Larson B.J., Cheng T.C. et al. Abnormal lysosomal trafficking and enhanced exosomal export of cisplatin in drug-resistant human ovarian carcinoma cells // *Molecular cancer therapeutics*. – 2005. – 4(10). – P. 1595–604.
66. Samsonov R., Shtam T., Burdakov V. et al. Lectin-induced agglutination method of urinary exosomes isolation followed by mi-RNA analysis: Application for prostate cancer diagnostic // *The Prostate*. – 2015.
67. Sato-Kuwabara Y., Melo S.A., Soares F.A., Calin G.A. The fusion of two worlds: non-coding RNAs and extracellular vesicles--diagnostic and therapeutic implications (Review) // *International journal of oncology*. – 2015. – 46(1). – P. 17–27.
68. Schageman J., Zeringer E., Li M. et al. The complete exosome workflow solution: from isolation to characterization of RNA cargo // *BioMed research international*. – 2013: 253957.
69. Schwarzenbach H. The clinical relevance of circulating, exosomal miRNAs as biomarkers for cancer // *Expert review of molecular diagnostics*. – 2015. – 15(9). – P. 1159–69.
70. Sevenich L., Joyce J.A. Pericellular proteolysis in cancer // *Genes & development*. – 2014. – 28(21). – P. 2331–47.
71. Shao H., Chung J., Balaj L. et al. Protein typing of circulating microvesicles allows real-time monitoring of glioblastoma therapy // *Nature medicine*. – 2012. – 18(12). – P. 1835–40.
72. Shi J., Ren Y., Zhen L., Qiu X. Exosomes from breast cancer cells stimulate proliferation and inhibit apoptosis of CD133+ cancer cells in vitro // *Molecular medicine reports*. – 2015. – 11(1). – P. 405–9.
73. Szajnik M., Derbis M., Lach M. et al. Exosomes in Plasma of Patients with Ovarian Carcinoma: Potential Biomarkers of Tumor Progression and Response to Therapy // *Gynecology & obstetrics*. – 2013. – Suppl 4:3.
74. Szczepanski M.J., Szajnik M., Welsh A. et al. Blast-derived microvesicles in sera from patients with acute myeloid leukemia suppress natural killer cell function via membrane-associated transforming growth factor-beta1 // *Haematologica*. – 2011. – 96(9). – P. 1302–9.
75. Thery C., Amigorena S., Raposo G., Clayton A. Isolation and characterization of exosomes from cell culture supernatants and biological fluids. Current protocols in cell biology / editorial board, Juan S Bonifacio. – 2006. – Chapter 3. – Unit 3 22.
76. Valadi H., Ekstrom K., Bossios A. et al. Exosome-mediated transfer of mRNAs and microRNAs is a novel mechanism of genetic exchange between cells // *Nature cell biology*. – 2007. – 9(6). – P. 654–9.
77. Webber J.P., Spary L.K., Sanders A.J. et al. Differentiation of tumour-promoting stromal myofibroblasts by cancer exosomes // *Oncogene*. – 2015. – 34(3). – P. 290–302.
78. Wei Y., Lai X., Yu S. et al. Exosomal miR-221/222 enhances tamoxifen resistance in recipient ER-positive breast cancer cells // *Breast cancer research and treatment*. – 2014. – 147(2). – P. 423–31.
79. Welton J.L., Khanna S., Giles P.J. et al. Proteomics analysis of bladder cancer exosomes // *Molecular & cellular proteomics*. – 2010. – 9(6). – P. 1324–38.
80. Whiteside T.L. Immune modulation of T-cell and NK (natural killer) cell activities by TEXs (tumour-derived exosomes) // *Biochemical Society transactions*. – 2013. – 41(1). – P. 245–51.
81. Whiteside T.L. The potential of tumor-derived exosomes for noninvasive cancer monitoring // *Expert review of molecular diagnostics*. – 2015. – 15(10). – P. 1293–310.
82. Yang L., Wu X.H., Wang D. et al. Bladder cancer cell-derived exosomes inhibit tumor cell apoptosis and induce cell proliferation in vitro // *Molecular medicine reports*. – 2013. – 8(4). – P. 1272–8.
83. Ye S.B., Li Z.L., Luo D.H. et al. Tumor-derived exosomes promote tumor progression and T-cell dysfunction through the regulation of enriched exosomal microRNAs in human nasopharyngeal carcinoma // *Oncotarget*. – 2014. – 5(14). – P. 5439–52.
84. Yu S., Cao H., Shen B., Feng J. Tumor-derived exosomes in cancer progression and treatment failure // *Oncotarget*. – 2015.
85. Zarovni N., Corrado A., Guazzi P. et al. Integrated isolation and quantitative analysis of exosome shuttled proteins and nucleic acids using immunocapture approaches // *Methods*. – 2015. – 87. – P. 46–58.
86. Zeringer E., Barta T., Li M., Vlassov A.V. Strategies for isolation of exosomes // *Cold Spring Harbor protocols*. – 2015. – 2015(4). – P. 319–23.
87. Zhang W., Peng P., Kuang Y. et al. Characterization of exosomes derived from ovarian cancer cells and normal ovarian epithelial cells by nanoparticle tracking analysis. *Tumour biology // the journal of the International Society for Oncodevelopmental Biology and Medicine* – 2015.