

СТИМУЛЯЦИЯ МЕТАСТАТИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ КЛЕТОК РАКА МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ ЭКЗОСОМАМИ ПЛАЗМЫ

Р.Б. Самсонов^{1,2}, И.М. Коваленко², Д.А. Васильев², Е.В. Цырлина², Г.А. Дашян²,
Х. Шохат-Карвальо³, Д. Карасик³, Л.М. Берштейн², В.В. Лютынский⁴, А.В. Малек^{1,2}

¹ООО «Онкосистема»; Россия, 194356, Санкт-Петербург, ул. Хошимина, 11/1, 207;

²ФГБУ «НИИ онкологии им. Н.Н. Петрова» Минздрава России; Россия, 197758, Санкт-Петербург, пос. Песочный, ул. Ленинградская, 68;

³Университет им. Бар-Илана; Израиль, 13100, Цфат, ул. Генриеты Сольд, 8;

⁴ООО «Компания Альгимед»; Беларусь, 220020, Минск, ул. Нарочанская, 11

Контакты: Анастасия Валерьевна Малек anastasia@malek.com

Введение. Злокачественный фенотип опухолевых клеток и метастатический потенциал опухоли определяются генетическими факторами. В дополнение к ним значимую роль в регуляции структурных и функциональных характеристик злокачественных клеток играют компоненты нормальной биологической среды, в том числе и наноразмерные везикулы, или экзосомы.

Цель исследования — изучение механизмов и оценка эффекта влияния экзосом плазмы на клетки рака молочной железы в условиях *in vitro*.

Материалы и методы. В исследовании использованы культура клеток рака молочной железы MDA-MB-231 и экзосомы, выделенные из плазмы или культуральной среды. Для анализа экзосом применялись методы корреляционной спектроскопии, вестерн-блоттинг. Функциональные эффекты экзосом оценивались в экспериментах *in vitro* и *in vivo*.

Результаты. В представленной работе показано, что экзосомы плазмы стимулируют адгезивную и двигательную активность клеток рака молочной железы, потенцируя процесс метастатической диссеминации. Для реализации стимулирующего эффекта достаточно контактного взаимодействия, которое опосредовано фибронектином на поверхности экзосом и цитоплазматическим сигнальным каскадом, зависимым от киназы фокальной адгезии.

Выводы. Углубленное изучение роли экзосом плазмы или межклеточной жидкости в формировании и регуляции злокачественного фенотипа клеток опухоли может открыть перспективы разработки новых методов терапии онкологических заболеваний.

Ключевые слова: рак молочной железы, экзосомы, адгезия, метастазы, фибронектин

DOI: 10.17650/1726-9784-2016-15-2-6-15

STIMULATION OF METASTATIC ACTIVITY OF BREAST CANCER CELLS BY PLASMA EXOSOMES

R.B. Samsonov^{1,2}, I.M. Kovalenko², D.A. Vasilyev², E.V. Tsyrlina², G.A. Dashan²,
Ch. Shochat-Carvalho³, D. Karasik³, L.M. Bernstein², V.V. Lutyanskiy⁴, A.V. Malek^{1,2}

¹Oncosystem, Ltd.; 11/1—207 Hoshimina St., Saint-Petersburg, 194256, Russia;

²Petrov Institute of Oncology; 68 Leningradskaya St., Saint-Petersburg, 197758, Russia;

³Bar-Ilan University; Henrietta Szold 8, Safed, 13100 Israel;

⁴Company Algimed, Ltd; 11 Narochanskaya St., Minsk, 220020, Belarus

Background. Malignant phenotype of cancer cells and metastatic potency of the tumor are determined by genetic factors. In addition, normal biological environment, including the nano-vesicles or exosomes, plays an important role in regulation of the structural and functional characteristics of malignant cells.

Objective: presented study was aimed to evaluate mechanisms and to estimate effect of interaction of plasma exosomes and breast cancer cells in experimental conditions.

Materials and methods. We used breast cancer cell culture MDA-MB-231 and exosomes isolated from plasma and cultural medium. Exosomes were analyzed by dynamic light scattering method and western blotting. Functional effects of exosomes were evaluated in *in vitro* and *in vivo* models.

Results. In the present study we demonstrated that plasma exosomes stimulate the adhesion and the motility of breast cancer cells and induce the process of metastatic dissemination. Contact interaction of exosomes with cell surface is sufficient for stimulatory effect that is mediated by exosomal fibronectin and FAK-dependent signaling cascade.

Conclusions. Further investigation of plasma exosomes structure and functions is required to better understand their input in regulation of malignant cell phenotype. This research has a potential to provide novel approaches for cancer therapy.

Key words: breast cancer, exosome, cell adhesion, metastases, fibronectin

Введение

Экзосомы — один из нескольких типов наноразмерных везикул, секретируемых клетками в межклеточное пространство. В биогенезе экзосом имеет место этап формирования в цитоплазме мультивезикулярных телец, содержащих множество одинаковых по составу и размеру микровезикул. На этом этапе формируются специфические отличия экзосом от других типов везикул (эктосом, апоптотических телец). Предполагается, что секреция экзосом происходит как постоянно (или конститутивно), так и в результате стимуляции различными внутри- и (или) внеклеточными факторами [1]. Биологическая значимость процессов формирования и секреции нановезикул точно не определена и является предметом активных исследований. С различной степенью уверенности принято считать, что секреция экзосом — это способ «очистки» клетки от ненужных метаболитов, изменения состава клетки в ходе процесса дифференцировки, модификации внеклеточной среды и стромы [2]. Кроме того, в последние годы сформировалась концепция экзосомальной системы межклеточных «коммуникаций». Получены разнообразные экспериментальные доказательства того, что экзосомы, попав во внеклеточное пространство, могут взаимодействовать с самой клеткой-продуцентом, соседними или анатомически отдаленными клетками [3]. Таким образом, экзосомы, опосредуя межклеточный транспорт ряда протеинов и нуклеиновых кислот, могут выполнять роль комплексного фактора ауто-, пара- и эндокринной регуляции гомеостаза тканей различных органов и систем [4]. Существует несколько механизмов взаимодействия экзосом с клеточной поверхностью, включая различные варианты эндоцитоза, взаимодействие с поверхностными рецепторами, слияния мембран везикулы и клетки и др. (рис. 1).

Изменения работы системы экзосомального транспорта или состава секретируемых клетками экзосом наблюдаются при ряде физиологических состояний, например при беременности [5] или ста-

рении [6]. Специфические искажения биохимического профиля циркулирующих экзосом характерны для хронических системных заболеваний, включая болезни нейродегенеративные и центральной нервной системы [7, 8], метаболические нарушения и атеросклероз [9], патологии иммунной системы [10] и вирусные инфекции [11]. Практический интерес представляет изучение роли экзосом в развитии и прогрессии онкологических заболеваний [12]. Причем объектом большинства исследований являются экзосомы, секретируемые злокачественными клетками [13].

Патологические эффекты опухолевых экзосом (ОЭ) были показаны во множестве экспериментальных работ. Например, экзосомы, секретируемые клетками первичной опухоли поджелудочной железы, переносятся током плазмы в лимфатические узлы и паренхиму легких, где они индуцируют экспрессионные и морфологические изменения, которые оптимизируют условия для колонизации этих тканей циркулирующими опухолевыми клетками и формирования метастазов [14]. В другой работе было показано, что экспрессионные изменения, индуцируемые опухолевыми экзосомами в исходно нормальных донорских Т-лимфоцитах (CD4+) при культивации *in vitro*, приводят к потере поверхностных лимфоцитарных маркеров (CD69) и снижению функциональной активности клеток [15]. Интересно, что наблюдаемый эффект не требовал интернализации экзосом Т-клетками, а был опосредован активацией поверхностных рецепторов. В целом, описан ряд механизмов, с помощью которых экзосомы, секретируемые опухолевыми клетками, прямо или опосредовано влияют на развитие, дифференцировку и функциональную активность иммунных клеток, что в результате приводит к угнетению противоопухолевой иммунной реакции [16].

Особого внимания заслуживает роль ОЭ в процессе модификации соединительной ткани вокруг растущей опухоли путем изменения структуры стромы и активности клеточных компонентов (эндотелиоцитов, фибробластов) [17]. Результаты активных исследований особенностей состава и патологических эффектов ОЭ создали почву для разработки новых методов диагностики и мониторинга [18].

Как известно, все (или почти все) клетки организма секретируют экзосомы и в норме экзосомы могут быть выделены из большинства биологических жидкостей, включая плазму, мочу, ликвор, молоко, синовиальную жидкость и др. Следовательно, на клетки растущей опухоли оказывают воздействие экзосомы, секретируемые нормальными клетками окружающей стромы. Циркулирующие опухолевые клетки находятся под воздействием «коктейля» экзосом плазмы, имеющих различное (преимущественно тромбо-



Рис. 1. Схематическое изображение механизмов взаимодействия экзосом с клетками

цитарное) происхождение. Образование метастазов неизбежно сопровождается влиянием экзосом, секретируемых клетками нормальной ткани, на опухолевые клетки в очаге диссеминации. Логично предположить, что в дополнение к феномену воздействия ОЭ на клетки здоровых тканей, определенное значение в патогенезе онкологических заболеваний имеет воздействие, которое оказывают на клетки опухоли экзосомы, секретируемые клетками нормальных тканей. Число исследований в этой области существенно меньше по сравнению с количеством работ, сфокусированных на изучении ОЭ. Очевидно, исследования циркулирующих ОЭ ведут к созданию новых диагностических методов, в то время как разработка новых терапевтических подходов скорее основывается на коррекции (модуляции) эффекта, который оказывают циркулирующие или тканевые экзосомы на опухолевые клетки. Это предположение косвенно подтверждается позитивным терапевтическим эффектом метода экстракорпоральной изоляции экзосом из плазмы крови онкологических пациентов с помощью связывания специфических поверхностных протеинов или гликопротеинов антителами или лектинами соответственно [19]. Авторы упомянутой работы и ряда аналогичных ей публикаций объясняют наблюдаемый эффект преимущественно фактом уменьшения депрессивного эффекта ОЭ на иммунную систему. Но изоляция экзосом из плазмы не была селективной, т. е. изолировались все, а не только опухолевые экзосомы, поэтому эффект мог быть обусловлен и уменьшением активирующего эффекта экзосом плазмы на опухолевые клетки. Некоторые экспериментальные данные свидетельствуют в пользу этой гипотезы. Например, в эксперименте *in vitro* было показано, что экзосомы сыворотки стимулируют пролиферацию клеток рака молочной железы (РМЖ) в условиях отсутствия адгезивного контакта [20]. Секретируемые тромбоцитами экзосомы стимулируют пролиферацию, адгезию к эндотелиальным клеткам, инвазивную активность клеток карциномы легких [21]. А экзосомы, секретируемые фибробластами, стимулируют рост стволовых клеток коло ректальной карциномы и повышают резистентность этой опухоли к цитостатической терапии [22].

В целом, опубликованные данные позволяют предположить, что «поведение» опухолевых клеток в ряде аспектов регулируется «коктейлем» экзосом, секретируемых клетками нормальных тканей. Следовательно, экзосомы плазмы могут оказывать влияние на жизнеспособность и метастатический потенциал циркулирующих опухолевых клеток. Исследование возможных механизмов и эффектов такого влияния может создать основу для разработки новых методов профилактики или терапии метастатической диссеминации.

Целью данного исследования была оценка реакции клеток РМЖ на контакт с экзосомами. В ряде экспериментов *in vitro* и *in vivo* было показано, что экзосомы стимулируют адгезивную и двигательную активность, повышая инвазивный потенциал клеток РМЖ. Причем наблюдаемый эффект: а) не зависел от происхождения экзосом, б) предполагал контактное взаимодействие молекул фибронектина (ФН) на поверхности экзосом и поверхностных рецепторов клетки и в) был опосредован сигнальным каскадом, который регулируется ферментом – киназой фокальной адгезии (focal adhesion kinase, FAK).

Материалы и методы

Клеточные линии и эксперименты *in vitro*

В исследовании была использована стабильная культура клеток РМЖ MDA-MB-231, полученная из опухолевых клеток плеврального экссудата. Клетки этой линии сохраняют злокачественный (ER–) фенотип на протяжении многократных пассажей и культивируются в стандартных условиях: при температуре 37 °C и 5 % содержании CO₂ в питательной среде RPMI-1640 с L-глутамином и 10 % эмбриональной сывороткой телят («БиоЛот», СПб). Клетки линии MDA-MB-231, стабильно экспрессирующие зеленый флуоресцентный белок и РНК-дуплекс, ингибирующий экспрессию молекулы FAK, были предоставлены коллегами из Университета им. Бар-Илана (доктором Nava Gil-Henn). При необходимости применения среды без экзосом использовалась сыворотка Ехо-FBS («SBI», США). Стандартный культуральный пластик («ПанЭко», Москва) применялся для культивации клеток в адгерентном монослое; для анализа неадгерентного (суспензионного) роста клеток пластик предварительно покрывали раствором полимера – Poly-HEMA, Sigma-Aldrich (Москва) по методу, описанному нами ранее [23]. Пролиферативная активность клеток определялась с помощью колориметрического теста CK04-13 Cell Counting Kit-8 («Dojindo Molecular Technologies, Inc.», США). Для анализа движения клеток по плоскости была использована система IN Cell Analyzer HCA Systems («GE Healthcare Life Sciences», США), с помощью которой проводилось автоматическое фотографирование клеток каждые 5 мин в течение 8 ч. Полученные данные анализировались с помощью программ «ImageJ» (NIH, США) и «Chemotaxis and Migration Tool» («Ibidi GmbH», Германия). Для оценки способности клеток направленно мигрировать в трехмерном матриксе были использованы специальные культуральные камеры (Corning® Transwell® polycarbonate membrane cell culture inserts), проницаемое дно которых покрывалось тонким слоем геля Matrigel Basement Membrane Matrix («BD Biosciences», США), каждая из которых помещалась в лунку 12-луночно-

го планшета. Среда «внутренней» камеры содержала 0,5 % сыворотки, и в нее помещались клетки. Концентрация сыворотки в среде «внешней» камеры составляла 10 %. Градиент питательных веществ и хемоаттрактантов стимулировал перемещение клеток из внутренней камеры во внешнюю. После 12 ч инкубации клетки, переместившиеся из внутренней камеры, оказывались на нижней поверхности мембраны, где они фиксировались 10 % раствором метанола и окрашивались Bromophenol Blue («Sigma Aldrich», Москва). Клетки фотографировали и подсчитывали в 4 полях зрения для каждого эксперимента.

Данио-реριο (zebrafish) и эксперименты *in vivo*

В работе была использована линия рыбок данио-реριο (*Danio rerio*, zebrafish «casper» [24]), у которых в результате гомозиготных мутаций в 2 генах снижено число пигментных клеток, что делает такую модель удобной для экспериментальных трансплантаций. Кроме того, иммунная система эмбрионов в течение первой недели еще недостаточно сформирована для отторжения ксенографтных клеток. Поэтому имплантация опухолевых клеток человека в ходе коротких экспериментов не требует специальных усилий для угнетения иммунитета. Эмбрионы (48 ч после оплодотворения) помещали в раствор трикаина (80–100 мкг/мл) для анестезии и седации за 5–10 мин до инъекции. Адгерентно растущие клетки РМЖ (MDA-MB-231) отделяли от пластика традиционным методом с помощью трипсина, дважды «отмывали» фосфатно-солевым буфером; после центрифугирования осадок клеток ресуспендировался в буфере, содержащем или не содержащем (контроль) экзосомы. Концентрацию экзосом в суспензии определяли с помощью анализа концентрации белков методом Бредфорда («Bio-Rad Laboratories, Ltd.», США). Клетки РМЖ инкубировались в суспензии экзосом, приблизительно соответствующей концентрации экзосом в плазме. (Методы более точного анализа, например корреляционная спектроскопия, не применимы для таких концентрированных растворов везикул.) После 30 мин инкубации суспензию клеток и экзосом имплантировали в желточный мешок эмбрионов с помощью тонкой стеклянной иглы (диаметром 15 мкм) и автоматической помпы, позволяющей дозированно injectировать объем суспензии, содержащий 250–300 клеток.

Эффективность имплантации и жизнеспособность эмбрионов оценивались через 30 мин, эмбрионы помещались в лунки 96-луночного планшета и инкубировались еще 2 дня при температуре 35 °С. Каждая экспериментальная группа включала 30 эмбрионов. Результаты (наличие и распределение флуоресцентных клеток) оценивали с помощью флуоресцентного микроскопа после эвтаназии концентрированным раствором трикаина.

Экзосомы: изоляция, анализ

Экзосомы изолировались из 3 источников: эмбриональной телячьей сыворотки, сыворотки крови пациенток с РМЖ и культуральной среды. В последнем случае клетки культивировались в среде с сывороткой без экзосом Ехo-FBS («SBI», США) для исключения контаминации. Для экспериментов *in vitro* и *in vivo* экзосомы выделялись классическим методом дифференциального ультрацентрифугирования [25], преимущества и недостатки которого обсуждались в предыдущих наших публикациях [26]. Кратко о методе: плазма (разведение 1:1 с фосфатно-солевым буфером) или среда центрифугировались последовательно в 3 этапа:

- 1) 2000 × G – 30 мин;
- 2) 17 000 × G – 60 мин;
- 3) 100 000 × G – 90 мин.

Первые 2 этапа позволяли осадить клетки и клеточный детрит, при этом экзосомы оставались в супернатанте. Экзосомы осаждались в ходе заключительного этапа ультрацентрифугирования в виде светлого осадка, который легко ресуспендировался в изотоническом буфере. Концентрация экзосом оценивалась либо с помощью набора реагентов для соответствующих измерений ЕхoTEST («Hansa Bio Med», Эстония), либо путем экстраполяции результатов измерения концентрации протеинов методом Бредфорда («Bio-Rad Laboratories, Ltd.», США). Эксперименты *in vitro* проводились при концентрации экзосом 2×10^{11} везикул/мл, что примерно в 5 раз ниже количества нановезикул в плазме. В ходе эксперимента *in vivo* инкубация и трансплантация клеток РМЖ проводились в суспензии экзосом, концентрация которых приблизительно соответствовала концентрации нановезикул в плазме: 1×10^{12} везикул/мл.

Метод сравнительного анализа специфических белков (вестерн-блоттинг) описан нами ранее [27]. Кратко о методе: осадки экзосом, полученные после центрифугирования, были лизированы (0,05 моль Tris-HCl, pH 7,4; 0,15 моль NaCl, 1 % Triton X-100, 1 % SDS) в присутствии смеси ингибиторов протеолиза P8340 («Sigma Aldrich», США) в течение 30 мин при температуре 4 °С. Лизаты вновь центрифугировали для удаления фрагментов мембран, экстракты протеинов нормализовали методом Бредфорда («Bio-Rad Laboratories, Ltd.», США). Электрофорез проводили в 10 % SDS-PAAG, для нанесения использовался стандартный нередуцирующий буфер. Разделенные электрофорезом белки переносили на поливиниловую мембрану, которую блокировали в течение часа в 0,1 % растворе казеина в трис-солевом буфере с твином-20 и инкубировали с соответствующими антителами: анти-CD63 (ab68418), антифибронектином (ab2413), анти-бета-актином (ab8227), анти-FAK (ab40794) производства компании «Abcam» (США).

Визуализацию бловтов проводили с помощью вторичных антител, конъюгированных с пероксидазой anti-rabbit IgG H&L (HRP): ab6721 («Abcam», США), набора Pierce™ ECL Western Blotting Substrate («Thermo Fischer Scientific», США) на аппарате LAS-4000 («General Electric», США).

Для оценки размера и анализа свойств поверхности экзосом их изолировали с помощью соответствующих наборов — Immunobeads for Overall Exosome capture («Hansa Bio Med», Эстония). Эти наборы предполагают связывание экзосом антителами (анти-CD9), фиксированными на поверхности латексных частиц размером до 1 мк. Последующее «отмывание» и отделение от частиц позволяет получить препарат экзосом более чистый, чем это возможно путем ультрацентрифугирования. Анализ экзосом проводился на аппарате NanoSight NS300 (Malvern, Великобритания) при нескольких разведениях в соответствии с инструкциями производителя.

Результаты и обсуждение

Стимуляция адгезивной и миграционной активности клеток РМЖ при контактом взаимодействии их с экзосомами

Целью 1-го эксперимента было подтверждение результатов, опубликованных ранее J. Ochieng и соавт. [20], в условиях *in vitro* и *in vivo*. Мы начали с простого сравнения эффективности адгезии клеток РМЖ (MDA-MB-231) к культуральному пластику в присутствии эмбриональной телячьей сыворотки с содержанием и без экзосом. Эффект оценивался через час после культивации в суспензии равного количества клеток. Аналогичные эксперименты были проведены с использованием плазмы крови пациенток с РМЖ (содержащей и не содержащей экзосомы), а также в среде с сывороткой без экзосом (содержащей и не содержащей экзосомы, полученные в ходе культивации клеток той же линии). В ходе всех 3 экспериментов присутствие экзосом определяло большую эффективность адгезивного взаимодействия клеток с субстратом (рис. 2, а и б).

Для оценки эффекта, который могут оказывать экзосомы на способность клеток к суспензионному росту, культуральный пластик был покрыт полимером, предотвращающим адгезию клеток (Poly-HEMA). Были протестированы экзосомы из 3 источников: телячьей эмбриональной сыворотки, сыворотки крови пациенток с РМЖ и культуральной среды. Во всех 3 экспериментах наблюдался схожий эффект: в присутствии экзосом клетки образовывали многоклеточные конгломераты сфероидной или неправильной формы в течение 3–4 ч культивации. Фотографии клеток, культивируемых в среде, содержащей экзосомы эмбриональной телячьей сыворотки, и в среде без экзосом (контроль) представлены на рис. 2, в и г.

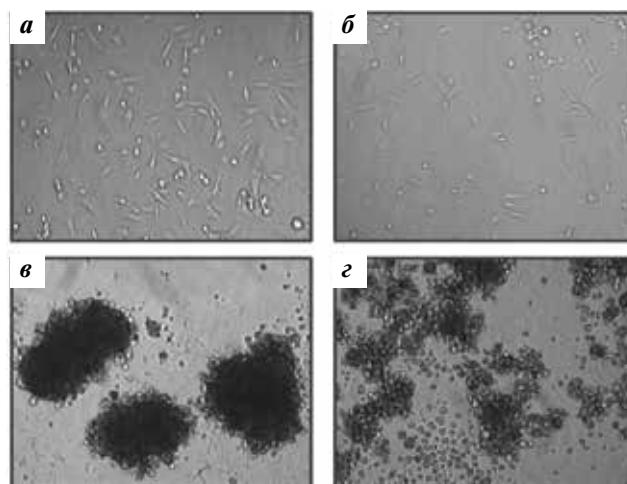


Рис. 2. Эффект воздействия экзосом на адгезивные характеристики клеток РМЖ (MDA-MB-231) *in vitro*: а, б — рост клеток на адгезивном пластике; в, г — рост клеток на неадгезивном пластике в условиях суспензии; а, в — концентрация экзосом в культуральной среде, эквивалентная 20 % концентрации экзосом в плазме; б, г — отсутствие экзосом в культуральной среде

Сама по себе способность эпителиальных клеток к формированию адгезивных контактов с базальной мембраной и соседними клетками является нормальным свойством, которое имеет тенденцию утрачиваться в результате трансформации. Злокачественный фенотип определяется сочетанием специфических адгезивных характеристик и двигательной активности. Для оценки функционального эффекта воздействия экзосом на клетки РМЖ, мы использовали модель *in vivo* (эмбрионы данио-рерио, zebrafish), которая позволяла приблизить условия эксперимента к реальной ситуации. Клетки линии MDA-MB-231, экспрессирующие флуоресцентный белок, в состоянии суспензии инкубировали с экзосомами, концентрированными из культуральной среды, и инъектировали в желточный мешок эмбрионов. Наличие клеток РМЖ в теле эмбриона, их пролиферация и локализация оценивались через 48 ч с помощью флуоресцентной микроскопии. Репрезентативные результаты представлены на рис. 3. В присутствии экзосом опухолевые клетки были способны мигрировать из желточного мешка в различные части эмбрионов (рис. 3, а). В контрольной группе (рис. 3, б) флуоресцирующие клетки заметны только в пределах желточного мешка. Эти данные показывают, что экзосомы стимулируют эффективную комбинацию адгезивной и двигательной активности клеток РМЖ, что может определять повышение метастатического потенциала.

Опосредование фибронектином стимулирующего действия экзосом

Цель следующего этапа работы — количественная оценка наблюдаемых результатов и определение

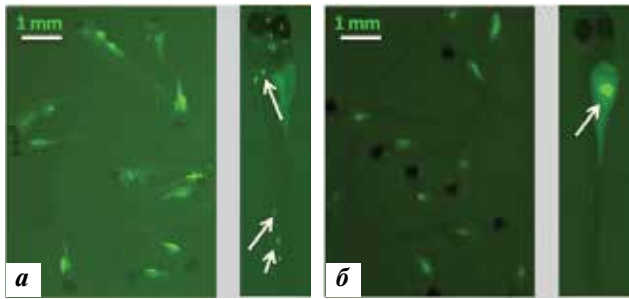


Рис. 3. Эффект воздействия экзосом на миграторную активность клеток РМЖ (MDA-MB-231) *in vivo*. Стрелками показаны флуоресцирующие опухолевые клетки. Суспензия клеток линии MDA-MB-231, экспрессирующей зеленый флуоресцентный белок, инъецированная в желточный мешок 2-дневных эмбрионов данио-рерио (фотографии сделаны после 2 дней инкубации): а — инкубация (30 мин) и инъецирование клеток в суспензии экзосом в концентрации, соответствующей физиологической концентрации экзосом в плазме; б — инъецирование клеток в растворе фосфатно-солевого буфера (контроль)

механизма, который может лежать в основе стимулирующего действия экзосом на клетки РМЖ.

С учетом динамики наблюдаемого эффекта и данных литературы мы предположили, что контактного взаимодействия экзосом с поверхностью клетки может быть достаточно для реализации стимулирующего действия экзосом. Один из возможных механизмов такого контактного взаимодействия был описан для экзосом, секретируемых клетками миеломы [28]. Авторы этой работы показали, что контакт экзосом с клеточной мембраной опосредуется молекулами ФН, фиксированными на поверхности экзосом. ФН является мажорным белком плазмы и может неспецифично связываться с поверхностью циркулирующих везикул вне зависимости от их происхождения.

Можно предположить, что циркулирующие опухолевые клетки неизбежно контактируют с экзосомами плазмы и экзосомальный ФН может служить медиатором такого контактного взаимодействия. Для проверки этой гипотезы мы обработали экзосомы раствором трипсина (фермент класса гидролаз), отмыли фосфатно-солевым буфером и изолировали методом иммунно-аффинной сорбции. По результатам измерений, проведенных методом корреляционной спектроскопии (рис. 4, а), процедура привела к ожидаемому снижению концентрации и некоторому уменьшению размера частиц. Использование дополнительно к этому новой технологии, сочетающей в себе метод корреляционной спектро- и микроскопии, позволило оценить интенсивность излучения, отраженного от поверхности анализируемых частиц. Этот параметр характеризует структуру поверхности. Его изменения показаны по оси z на рис. 4, б. Как видно при сравнении верхней и нижней панелей (рис. 4, б), обработка трипсином привела к существенному изменению структуры поверхности экзосом.

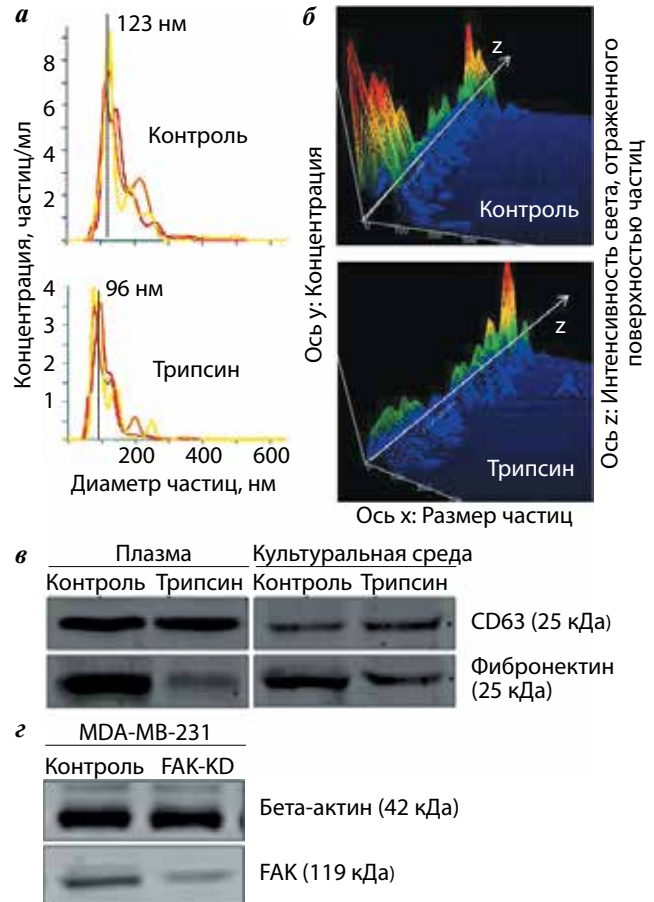


Рис. 4. Физические и биохимические характеристики экзосом: а, б — результаты анализа экзосом (выделенных из культуральной среды и обработанных трипсином для удаления поверхностного ФН) методом корреляционной спектроскопии на аппарате Nano Sight NS300 («Malvern», Великобритания); а — соотношение размера и концентрации экзосом; б — трехмерный график: по оси z показаны изменения характеристик света, отраженного от поверхности экзосом; в, г — анализ содержания специфических протеинов методом вестерн-блоттинга; в — анализ содержания ФН и экзосомального маркера CD63 (контроль) в экзосомах, выделенных из плазмы крови пациенток с РМЖ и культуральной среды; г — анализ содержания FAK и бета-актина (контроль) в клетках РМЖ линии MDA-MB-231

На заключительном этапе эквивалентное количество нативных и обработанных трипсином частиц было сконцентрировано и использовано для анализа содержания экзосомального маркера CD63 и ФН методом вестерн-блоттинга (рис. 4, в). Как предполагалось, инкубация с раствором трипсина привела к разрушению экзосомального ФН, но не повлияла на содержание в препарате трансмембранного тетраспонина CD63. В совокупности описанные результаты показали, что обработка трипсином приводит к незначительному уменьшению размера, существенному изменению структуры поверхности экзосом и частичному удалению трипсина из их состава. Интересно, что экзосомы из культуральной среды «очистились» от ФН значительно эффективней, чем экзосомы плазмы (правая и левая панели на рис. 4, в).

Это может быть связано с тем, что культуральная среда содержала лишь 10 % сыворотки, которая является источником ФН, поэтому экзосомы из среды содержали меньше ФН, чем экзосомы из плазмы.

Описанная процедура ферментативного разрушения экзосомального ФН была проведена с экзосомами, выделенными из плазмы крови пациенток и культуральной среды; после чего эффект таких экзосом на жизнеспособность и пролиферативную активность клеток РМЖ (MDA-MB-231) в условиях суспензии был оценен с помощью колориметрического теста. Исследование проводилось 5 дней (рис. 5, а и б): в присутствии экзосом плазменного или культурального происхождения наблюдалась активная пролиферация клеток с достижением «плато» к 4-му дню. В присутствии экзосом, «очищенных» от ФН трипсином, наблюдалась менее активная пролиферация клеток.

Необходимость функциональной активности рецепторной киназы фокальной адгезии для стимулирующего эффекта экзосом

ФН — один из ключевых белков межклеточного матрикса, неколлагеновый структурный гликопротеин, синтезируемый и выделяемый в межклеточное пространство многими клетками. Его вариант, синтезируемый преимущественно гепатоцитами, существует в растворимой форме и является одним из основных белков плазмы. Вероятно, именно этот тип ФН связывается с поверхностью циркулирующих везикул. Каждая субъединица ФН содержит последовательность Арг-Гли-Асп (RGD), с помощью которой он может присоединяться к клеточным рецепторам.

Наиболее полно изучен механизм взаимодействия плазменного ФН с интегринами [29]. Такое взаимодействие активирует сигнальный каскад, регулирующий многие аспекты клеточного гомеостаза, включая пролиферативную и миграционную активность. Ключевой молекулой, контролирующей работу этих сигнальных путей, является FAK [30]. Патологическая активация этой сигнальной молекулы часто сопровождает процесс малигнизации клеток разных типов [31], включая протоковый эпителий молочных желез [32].

На основе сказанного мы предположили, что FAK может участвовать в передаче (регуляции) активирующего сигнального каскада, который инициируется в результате контакта экзосомального ФН и рецепторных интегринов в составе поверхностной мембраны клеток РМЖ. Для проверки этого предположения, мы использовали клетки той же линии (MDA-MB-231), в которых экспрессия FAK была стабильно ингибирована на пост-транскрипционном уровне. Активность пролиферации модифицированных и контрольных клеток была оценена в парал-

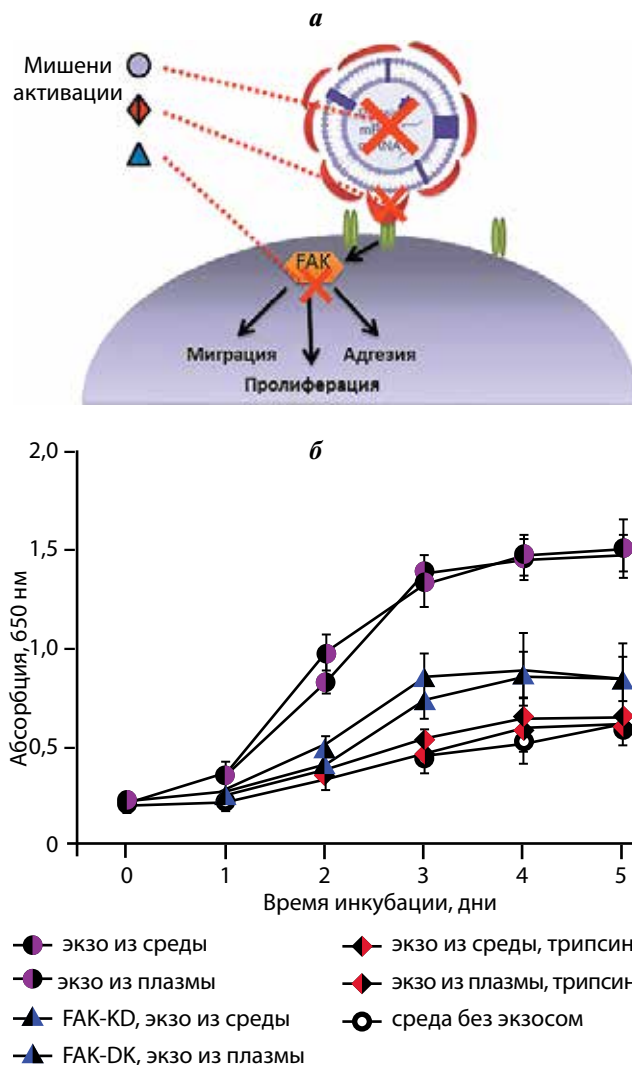


Рис. 5. Результаты анализа пролиферативной активности клеток колориметрическим методом в условиях неадгезивного роста. В эксперименте тестировалось действие на клетки линии MDA-MB-231 экзосом — нативных (○), обработанные трипсином (Δ) и в состоянии инактивации молекулы FAK (◆). Каждый эксперимент был проведен дважды с использованием экзосом, выделенных либо из культуральной среды, либо из плазмы (что отражено характером заполнения фигур легенды). Контролем служили клетки линии MDA-MB-231, культивирующейся в условиях среды без экзосом.

лельных экспериментах с использованием интактных или «очищенных» от ФН экзосом, полученных либо из бычьей сыворотки, либо из культуральной среды (схему и результаты эксперимента см. на рис. 5, а и б). Инактивация FAK снижала способность клеток «отвечать» на стимулирующее влияние экзосом вне зависимости от их происхождения. Интересно, что пролиферация модифицированных клеток в присутствии экзосом была несколько выше, чем пролиферация контрольных клеток в среде, содержащей «очищенные» от ФН экзосомы, или в среде без экзосом. Это может быть свидетельством существования сигнальных путей, альтернативных FAK-каскаду,

и дополнительных возможностей «трансляции» стимулирующего влияния экзосом.

Стимуляция экзосомами миграционной активности клеток рака молочной железы (MDA-MB-231) *in vitro*

С целью количественной оценки влияния экзосом на адгезивные и миграционные характеристики клеток РМЖ были использованы модели *in vitro*. Они лишь приближенно отражают реальную ситуацию миграции опухолевых клеток по плоскости (2D) или в толще ткани (3D), но позволяют провести достаточно точные измерения. Например, при культивации на адгезивном пластике клетки «передвигаются» по его плоскости. Это движение характеризуется определенной цикличностью и сопровождается изменением формы, образованием псевдоподий на «лидирующем» крае клетки, формированием «фокальных» контактов клетки с матриксом, «подтягиванием» клетки к переднему краю и т.д. Такое движение приблизительно отражает перемещение клеток вдоль плотных образований типа поверхности эпителия или базальной мембраны. В условиях 2D эксперимента миграцию клетки можно наблюдать в течение длительного периода времени, что позволяет оценить различные характеристики движения (траекторию, перемещение, скорость) (рис. 6, а).

В нашем эксперименте наблюдение проводилось за клетками, которые культивировались в среде содержащей (не содержащей) экзосомы в течение 8 ч.

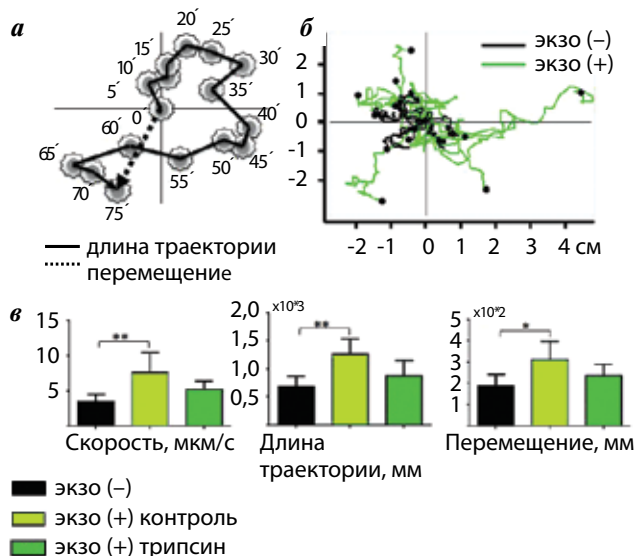


Рис. 6. Анализ миграции клеток РМЖ по плоскости культурального пластика: а — схема эксперимента и обозначение измеряемых параметров; б — изображение траекторий движения клеток (зеленые — в присутствии экзосом, черные — в среде без экзосом) после совмещения точек старта; в — сравнительные результаты усредненной для группы клеток оценки скорости, длины пути и перемещения в течение 8 ч. Статистическая значимость разницы определена по U-критерию Манна–Уитни; $p < 0,5$ (*), $p < 0,05$ (**)

На рис. 6, б показаны траектории движения 16 клеток после сопоставления точек старта (8 клеток в среде, содержащей экзосомы, 8 — в среде без экзосом) На рис. 6, в представлены сравнительные результаты 3 экспериментов в средах: 1) без экзосом, 2) с нативными экзосомами, 3) с «очищенными» от ФН экзосомами.

Эти результаты позволяют сделать вывод, что экзосомы стимулируют 2D миграционную активность клеток, но стимулирующий эффект зависит от наличия ФН на поверхности экзосом.

Использование камеры, разделенной проницаемой для клеток мембраной и слоем геля, позволяет несколько приблизить условия *in vitro* эксперимента к реальности (рис. 7, а). Для стимуляции направленного движения клеток из одной камеры в другую был создан градиент питательных веществ и хемокинов (10 % vs. 0,5 % эмбриональной телячьей сыворотки). Как и в предыдущем случае, сравнение проводилось между клетками, которые культивировались в средах: без экзосом, с нативными экзосомами и с «очищенными» от ФН экзосомами. В этом эксперименте были получены аналогичные результаты, которые подтверждают способность экзосом стимулировать 3D миграцию клеток РМЖ и зависимость этого феномена от экзосомального ФН.

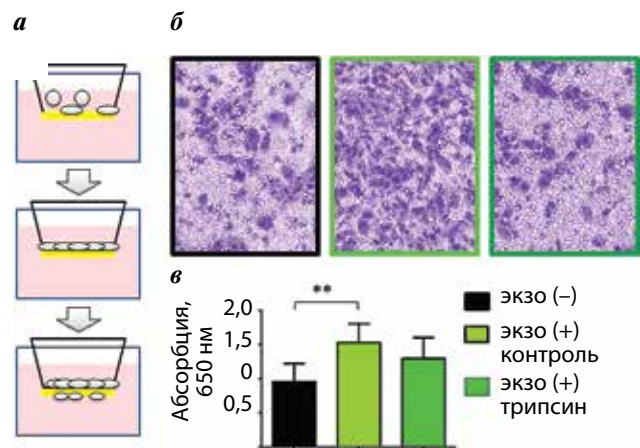


Рис. 7. Анализ миграции клеток РМЖ в трехмерном пространстве: а — схема эксперимента; б — репрезентативные изображения клеток, «прошедших» сквозь мембрану, фиксированных метанолом и окрашенных бром-фенолом на нижней поверхности мембраны; в — сравнительная оценка количества клеток, «прошедших» сквозь мембрану, в 3 параллельных экспериментах. Статистическая значимость разницы определена по U-критерию Манна–Уитни, $p < 0,05$ (**)

Заключение

В практической медицине традиционно принято оценивать клеточный состав циркулирующей крови и биохимический состав плазмы. Это комплексные показатели, которые объективно отражают состояние организма и течение системных заболеваний. Анализ строения, состава и физиологической роли

циркулирующих субклеточных структур был затруднен в силу технических ограничений. В настоящее время, благодаря развитию и широкому внедрению новых технологий спектроскопии и их сочетанию с традиционными методами световой микроскопии, сделаны первые шаги в исследовании наноразмерных компонентов крови и других биологических жидкостей. Стало очевидно, что циркулирующие нановезикулы являются важным физиологическим фактором, значимо вовлеченным в патогенез многих заболеваний, включая онкологические [33]. Активность исследований в этой области является косвенным доказательством открывающихся возможностей разработки принципиально новых диагностических и терапевтических методов [34].

В основе данного исследования лежало предположение, что в процессе развития и диссеминации РМЖ имеет значение взаимодействие опухолевых клеток и экзосом межклеточной среды и плазмы. В работе было показано, что контакт с экзосомами изменяет адгезивные характеристики и двигательную активность опухолевых клеток — качества, прямо определяющие

метастатический потенциал опухоли. Кроме того, представленные результаты указывают на то, что стимулирующее влияние экзосом может быть опосредовано лишь контактным взаимодействием и не требует «интернализации» экзосомы. Так как компонентам плазмы свойственно с равной вероятностью адсорбироваться на поверхности всех циркулирующих экзосом, стимулирующий эффект последних может не зависеть от их происхождения и быть относительно универсальным. Кроме того, контактный характер взаимодействия может определять динамику эффекта, а именно: относительно быстрое изменение характеристик клетки в зависимости от окружающих условий.

В целом, представленные результаты указывают на значимость наноразмерных компонентов внутренней среды организма на процесс развития онкологического заболевания. Разработка методов оценки, осмысленного анализа и коррекции состава этих компонентов может быть основой для нового подхода к терапии рака, включая РМЖ с различным рецепторным фенотипом и, соответственно, различной чувствительностью к гормональным сигналам.

Л И Т Е Р А Т У Р А / R E F E R E N C E S

1. Kowal J., Tkach M., Thery C. Biogenesis and secretion of exosomes. *Curr Opin Cell Biol* 2014;29:116–25.
2. Abels E.R., Breakefield XO. Introduction to Extracellular Vesicles: Biogenesis, RNA Cargo Selection, Content, Release, and Uptake. *Cell Mol Neurobiol* 2016;36(3):301–12.
3. Mulcahy L.A., Pink R.C., Carter D.R. Routes and mechanisms of extracellular vesicle uptake. *J Extracell Vesicles* 2014;4:3. doi: 10.3402/jev.v3.24641. eCollection 2014. PMID: 25143819.
4. Iraci N., Leonardi T., Gessler F. et al. Focus on Extracellular Vesicles: Physiological Role and Signalling Properties of Extracellular Membrane Vesicles. *Int J Mol Sci* 2016;6;17(2). pii: E171. doi: 10.3390/ijms17020171. PMID: 26861302.
5. Mincheva-Nilsson L., Baranov V. Placenta-derived exosomes and syncytiotrophoblast microparticles and their role in human reproduction: immune modulation for pregnancy success. *Am J Reprod Immunol* 2014;72(5):440–57.
6. Weilner S., Schraml E., Redl H. et al. Secretion of microvesicular miRNAs in cellular and organismal aging. *Exp Gerontol* 2013;48(7):626–33.
7. Russo I, Bubacco L, Greggio E. Exosomes-associated neurodegeneration and progression of Parkinson's disease. *Am J Neurodegener Dis* 2012;1(3):217–25.
8. Tsilioni I., Panagiotidou S., Theoharides T.C. Exosomes in neurologic and psychiatric disorders. *Clin Ther* 2014;36(6):882–8.
9. Huber HJ, Holvoet P. Exosomes: emerging roles in communication between blood cells and vascular tissues during atherosclerosis. *Curr Opin Lipidol* 2015;26(5):412–9.
10. Buzas EI, Gyorgy B, Nagy G et al. Emerging role of extracellular vesicles in inflammatory diseases. *Nat Rev Rheumatol* 2014;10(6):356–64.
11. Alenquer M., Amorim M.J. Exosome Biogenesis, Regulation, and Function in Viral Infection. *Viruses* 2015;7(9):5066–83.
12. Малек А.М., Берштейн Л.М., Филатов М.В., Беляев А.М. Система экзосомальных межклеточных коммуникаций и ее роль в процессе метастатической диссеминации. *Вопросы онкологии* 2014;60(4):429–36.
13. Tchevkina E.M., Shcherbakov A.M., Zhuravskaya A.Y. et al. Exosomes and transfer of (epi)genetic information by tumor cells. *Advances in Molecular Oncology* 2015;3(2):8–20.
14. Rana S., Malinowska K., Zoller M. Exosomal tumor microRNA modulates premetastatic organ cells. *Neoplasia* 2013;15(3):281–95.
15. Muller L., Mitsuhashi M., Simms P. et al. Tumor-derived exosomes regulate expression of immune function-related genes in human T cell subsets. *Sci Rep* 2016;6:20254.
16. Whiteside T.L. Exosomes and tumor-mediated immune suppression. *J Clin Invest* 2016;126(4):1216–23.
17. Fu H., Yang H., Zhang X., Xu W. The emerging roles of exosomes in tumor-stroma interaction. *J Cancer Res Clin Oncol* 2016;17. PMID: 26987524.
18. Whiteside T.L. The potential of tumor-derived exosomes for noninvasive cancer monitoring. *Expert Rev Mol Diagn* 2015;15(10):1293–310.
19. Marleau A.M., Chen C.S., Joyce J.A., Tullis R.H. Exosome removal as a therapeutic adjuvant in cancer. *J Transl Med* 2012;10:134.
20. Ochieng J., Pratap S., Khatua A.K., Sakwe A.M. Anchorage-independent growth of breast carcinoma cells is mediated by serum exosomes. *Exp Cell Res* 2009;315(11):1875–88.
21. Janowska-Wieczorek A., Wysoczynski M., Kijowski J. et al. Microvesicles derived from activated platelets induce metastasis and angiogenesis in lung cancer. *Int J Cancer* 2005;113(5):752–60.
22. Hu Y., Yan C., Mu L. et al. Fibroblast-Derived Exosomes Contribute to Chemoresistance through Priming Cancer Stem Cells in Colorectal Cancer. *PLoS One* 2015;10(5):e0125625.
23. Malek A., Catapano C.V., Czubayko F., Aigner A. A sensitive polymerase chain reaction-based method for detection and quantification of immune function-related genes in human T cell subsets. *Sci Rep* 2016;6:20254.

- fication of metastasis in human xenograft mouse models. *Clin Exp Metastasis* 2010;27(4):261–71.
24. White R.M., Sessa A., Burke C. et al. Transparent adult zebrafish as a tool for *in vivo* transplantation analysis. *Cell stem cell* 2008;2(2):183–89.
25. Thery C., Amigorena S., Raposo G., Clayton A. Isolation and characterization of exosomes from cell culture supernatants and biological fluids. *Curr Protoc Cell Biol* 2006;3;Unit 3.22.
26. Malek A.V., Samsonov R.B., Chiesi A. Development of cancer diagnostics and monitoring methods based on analysis of tumor-derived exosomes. *Russian Journal of Biotherapy* 2015;14(4): 9–18.
27. Samsonov R.B., Shtam T.A., Burdakov V.S. et al. Extraction and analysis of the exosomal micro-RNA from the urine: new method of the prostate cancer diagnostics. *Experimental and Clinical Urology* 2015;4:28–32.
28. Purushothaman A., Bandari S.K., Liu J. et al. Fibronectin on the Surface of Myeloma Cell-derived Exosomes Mediates Exosome-Cell Interactions. *J Biol Chem* 2016;291(4):1652–63.
29. Akiyama S.K. Integrins in cell adhesion and signaling. *Hum Cell* 1996;9(3):181–6.
30. Schaller M.D. Cellular functions of FAK kinases: insight into molecular mechanisms and novel functions. *J Cell Sci* 2010;123(7):1007–13.
31. Sulzmaier F.J., Jean C., Schlaepfer D.D. FAK in cancer: mechanistic findings and clinical applications. *Nat Rev Cancer* 2014;14(9):598–610.
32. Luo M., Guan J.L. Focal adhesion kinase: a prominent determinant in breast cancer initiation, progression and metastasis. *Cancer Lett* 2010; 289(2): 127–39.
33. Pupyshv A. B. Extracellular vesicles: intercellular information flow and medical applications. *Tsitologiya* 2015;57(8):551–62.
34. Fais S., O'Driscoll L., Borrás F.E. et al. Evidence-Based Clinical Use of Nanoscale Extracellular Vesicles in Nanomedicine. *ACS Nano* 2016;15.