

ВОЗМОЖНОСТИ ДИАГНОСТИКИ КОЛОРЕКТАЛЬНОГО РАКА С ПОМОЩЬЮ ДЕТЕКЦИИ ТКАНЕ-СПЕЦИФИЧНЫХ ВНЕКЛЕТОЧНЫХ НАНО-ВАЗИКУЛ

Назарова И.В.^{1,2}, Никифорова Н.С.^{1,2}, Сидина Е.И.^{1,2}, Слюсаренко М.А.^{1,2}, Котова З.С.¹, Семиглазова Т.Ю.^{1,4}, Служев М.И.^{5,1}, Семиглазов В.В.^{5,1}, Гоголев А.Б.¹, Артемьева А.С.¹, Рыбаков Е.Г.³, Малек А.В.^{1,2}

¹ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Петрова» Минздрава России (пос. Песочный, ул. Ленинградская, д.68, г.Санкт-Петербург, 197758, Россия)

²ООО «Онко-система» (ул.Луговая, д.4, территория инновационного центра Сколково, г.Москва, 143026, Россия)

³ФГБУ «НМИЦ колопроктологии имени А.Н. Рыжих» Минздрава России (ул. Саляма Адила, д.2, г.Москва, 123423, Россия)

⁴ФГБОУ ВО «СЗГМУ им. И.И. Мечникова» Минздрава России (Кирочная улица, д.41, г.Санкт-Петербург, 191015, Россия)

⁵ФГБУ «Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет им. акад. И.П. Павлова» (ул.Льва Толстого, д.6-8, г.Санкт-Петербург, 197022, Россия)

Разработка методов эффективной диагностики и мониторинга терапии колоректального рака (КРР) является актуальной научной задачей. В состав циркулирующей плазмы входят внеклеточные нано-везикулы (ВНВ), секретируемые, преимущественно, клетками крови и эндотелия. Минорная фракция ВНВ плазмы продуцируется клетками различных тканей, включая клетки кишечного эпителия. Биохимический состав таких везикул должен иметь ткане-специфические особенности. Целью представленной работы являлся поиск поверхностных маркеров везикул, секретируемых клетками кишечного эпителия, и оценка возможности выделения и количественного анализа таких везикул с целью диагностики КРР. В исследовании были использованы клеточные линии (HCT-116, HT-29, COLO-320, Hs578T, SW637), плазма пациентов с КРР и здоровых доноров. Методы анализа траекторий нано-частиц, атомно-силовой микроскопии, дот-блоттинга и проточной цитометрии применялись для исследования ВНВ. С помощью оригинальной технологии иммуносорбции было показано, что концентрация ВНВ, на поверхности которых экспрессируются белки CLRN3, GAL4 и Meprin A, в плазме пациентов с КРР выше, чем в плазме здоровых доноров. На основе количественного анализа таких ВНВ могут быть разработаны новые методы диагностики и мониторинга терапии КРР.

[Ключевые слова: колоректальный рак, внеклеточные нано-везикулы, ткане-специфические маркеры, экзосомы, диагностика]

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ: Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Для цитирования: Назарова И.В., Никифорова Н.С., Сидина Е.И., Слюсаренко М.А., Котова З.С., Семиглазова Т.Ю., Служев М.И., Семиглазов В.В., Гоголев А.Б., Артемьева А.С., Рыбаков Е.Г., Малек А.В. Возможности диагностики колоректального рака с помощью детекции ткане-специфических внеклеточных нано-везикул. *Колопроктология*. 2020; т.19, №4, с. 32-56. <https://doi.org/10.33878/2073-7556-2020-19-4-32-56>

COLORECTAL CANCER DIAGNOSTICS VIA DETECTION OF TISSUE-SPECIFIC EXTRACELLULAR NANO-VESICLES

Inga V.Nazarova^{1,2}, Nadezhda S.Nikiforova^{1,2}, Elena I.Sidina^{1,2}, Maria A.Slyusarenko^{1,2}, Zarina S.Kotova¹, Tatyana Yu.Semiglazova¹, Maksim I.Sluzhev¹, Vladislav V.Semiglazov^{5,1}, Artyom B.Gogolev¹, Anna S.Artemyeva¹, Evgeny G.Rybakov³, Anastasia V.Malek^{1,2}

¹N.N. Petrov National Medical Research Center of Oncology of Ministry of Health of Russia (Leningradskaya str., 68, Pesochny, St. Petersburg, 197758, Russia)

²Onco-System Co Ltd. (Lugovaya str., 4, building 9, office 16, The innovation center "Skolkovo", Moscow, 143026, Russia)

³Ryzhikh National Medical Research Center of Coloproctology (Salyama Adilya str., 2, Moscow, 123423, Russia)

⁴North-Western State Medical University named after I.I. Mechnikov (Kirochnaya str., 41, Saint-Petersburg, 191015, Russia)

⁵Pavlov First Saint Petersburg State Medical University (L.Tolstogo str., 6/8, St.-Petersburg, 197089, Russia)

The development of methods for effective diagnosis and monitoring of colorectal cancer (CRC) treatment is one of the basic scientific problem. The circulating plasma contains extracellular nanovesicles (EVs) secreted mainly by blood and endothelial cells. The minor fraction of plasma EVs is produced by cells of various tissues, including cells of the intestinal epithelium. The biochemical composition of such vesicles should have tissue-specific features. Presented study was aimed to identify surface markers of EVs secreted by intestinal epithelium cells and to assess the possibility of isolating and quantification of such vesicles for the diagnosis of CRC. The cell cultures (HCT-116, HT-29, COLO-320, HuTu-80, SW837), plasma of CRC patients and healthy donors were used in the study. The methods of nanoparticle tracking analysis (NTA), atomic force microscopy (AFM), dot-blotting and flow cytometry were applied for EVs characterization. With the original technology of immunosorption we have demonstrated an increased amount of CLRN3, GAL4 and Meprin A, i.e. positive EVs in plasma of CRC patients comparing to healthy donors. Based on the quantitative analysis of such EVs, new methods of diagnostics and monitoring of CRC therapy can be developed.

[Key words: colorectal cancer, extracellular nanovesicles, tissue-specific markers, exosomes, diagnostics]

CONFLICTS OF INTERESTS: The authors declare no conflicts of interest.

For citation: Nazarova I.V., Nikiforova N.S., Sidina E.I., Slyusarenko M.A., Kotova Z.S., Semiglazova T.Yu., Sluzhev M.I., Semiglazov V.V., Gogolev A.B., Artemeva A.S., Rybakov E.G., Malek A.V. Colorectal cancer diagnostics via detection of tissue-specific extracellular nanovesicles. *Koloproktologia*. 2020; v.19, no.4, pp. 32-56. <https://doi.org/10.33878/2073-7556-2020-19-4-32-56>

Адрес для переписки: Малек А.В., ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Петрова» Минздрава России, пос. Песочный-2, ул. Ленинградская, д.68, Санкт-Петербург, 197758, Россия; e-mail: Anastasia@malek.com

Address for correspondence: Malek A.V., N.N. Petrov National Medical Research Center of Oncology, Pesochny-2, Leningradskaya str, 68, St.-Petersburg, 197758, Russia; e-mail: Anastasia@malek.com

Дата поступления – 12.08.2020
Received – 12.08.2020

После доработки – 08.09.2020
Revised – 08.09.2020

Принято к публикации – 09.12.2020
Accepted for publication – 09.12.2020

ВВЕДЕНИЕ

Колоректальный рак (КРР) занимает одну из лидирующих позиций в структуре онкологической смертности, что обосновывает актуальность разработки новых методов скрининга и ранней диагностики. Клинические рекомендации, отечественные [1] и зарубежные [2], на протяжении последних десятилетий сводятся к различным сочетаниям эндоскопических технологий и методов выявления скрытой крови в стуле, но оба подхода имеют ограничения.

Ведутся активные исследования по разработке методов анализа компонентов циркулирующей плазмы [3], хотя до практического применения пока не доведен ни один из вариантов технологии

т.н. «жидкостной биопсии». Одной из основных причин такой ситуации является отсутствие надежных молекулярных маркеров КРР. Идентификация и создание методов анализа мульти-молекулярных циркулирующих комплексов, например, внеклеточных нано-везикул (ВНВ), представляется решением проблемы. Циркулирующая плазма содержит порядка 10¹¹-10¹² ВНВ/мл. Это гетерогенная популяция мембранных везикул, секретруемых, преимущественно, клетками крови и эндотелия [4]. Минорная фракция этих везикул попадает в плазмоток из клеток различных тканей [5]. Фракция ткане-специфичных везикул отражает биохимический состав клеток соответствующих органов, и именно она может иметь диагностический потенциал. Если эта фракция существенна

по сравнению с тотальной популяцией циркулирующих везикул, ее количественные или качественные изменения могут влиять на количество или состав везикул плазмы. Так, например, повышение общей концентрации всех циркулирующих нано-везикул эндосомального происхождения (или экзосом) было описано у пациентов с КРР [6]. Несмотря на очевидно низкую диагностическую специфичность такого подхода, авторы исследования рекомендовали количественный анализ циркулирующих экзосом в качестве метода скрининга. С другой стороны, выявление в плазме специфической фракции ВНВ, содержащих КРР-ассоциированные РНК [7], микроРНК [8] или протеазы [9], может иметь более высокую диагностическую специфичность, чем просто подсчет везикул. Однако сложность выявления минорной фракции ВНВ с определенными биохимическими характеристиками в составе «фоновой» популяции всех везикул плазмы компрометирует диагностическую чувствительность и практическую значимость такого подхода.

Можно предполагать два принципиальных решения проблемы. Во-первых, применение ультравысокочувствительных технологий детекции везикулярных маркеров с помощью, например, электрокинетических чипов [10] или поверхностно-усиленной рамановской спектроскопии [11]. Во-вторых, разработка методов концентрации (в идеале, специфического выделения) везикул, секретируемых клетками КРР. Простым примером такого подхода может служить метод анализа везикул из образца плазмы, полученного из вен брыжейки [12], но практическое применение такого метода кажется затруднительным. Концентрация отдельной фракции везикул из плазмы, полученной традиционным путем с помощью технологий иммуносорбции, представляется более перспективной, и она была уже реализована в рамках разработки методов диагностики плоскоклеточного рака головы и шеи [13] и меланомы [14].

В основе представленного исследования лежит предположение о том, что клетки кишечного эпителия секретируют специфический набор мембранных протеинов, и эти протеины могут секретироваться в составе мембраны ВНВ. При развитии КРР клетки средне- или высокодифференцированной опухоли сохраняют тканевую дифференцировку, их наружная мембрана и мембрана секретируемых ими ВНВ содержат ткане-специфичные маркеры. Эти маркеры могут быть использованы для выделения и анализа ткане-специфичных ВНВ, а повышение концентрации таких везикул в плазме может служить признаком развития КРР.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Биологический материал

Биологический материал был получен от доноров и пациентов, проходивших обследование или лечение в ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н.Петрова» Минздрава России (Санкт-Петербург) и ФГБУ «НМИЦ колопроктологии имени А.Н. Рыжих» Минздрава России (Москва). Венозная кровь собиралась в вакутейнеры с ЭДТА, плазма отделялась в течение 10 минут после забора крови, замораживалась и хранилась при -80°C . Материал соскобов эпителия получали непосредственно после операций с участков неизмененной кишечной стенки.

Клетки

В работе использовали клетки пяти стабильных линий НСТ-116, НТ-29, СОЛО-320, НtTu-80, SW837, полученных из коллекции клеточных культур Института Цитологии РАН (Санкт-Петербург). Клетки культивировали в среде RPMI-1640 с добавлением 10% эмбриональной бычьей сыворотки и смеси антибиотиков Пен-Стреп, 100 мкг/мл (все от ООО «Биолот», РФ) в стандартных условиях. Для экспериментов по проточной цитометрии и дот-блоттинга клетки выращивали до плотности не более 70%, снимали с субстрата смесью растворов трипсина (0,025%) и Версена (1:1), отмывали фосфатно-солевым буфером (ФСБ) и разводили до концентрации 1×10^6 кл/мл. Для выделения ВНВ клетки культивировались в стандартных условиях в среде, содержащей 10% телячьей сыворотки без ВНВ, кондиционированную клеточную среду накапливали в течение нескольких пассажей до объема 200 мл.

Выделение нано-везикул

Для выделения ВНВ плазму (2 мл) размораживали до $+4^{\circ}\text{C}$, разводили 1:1 в фосфатно-солевом буфере (ФСБ) и последовательно центрифугировали $300g - 10'$, $2000g - 10'$ и $10000g - 10'$ для осаждения клеточного детрита и крупных мембранных везикул. Экзосомы выделяли из супернатанта путем ультра-центрифугирования (Beckman Coulter: Optima XPN 80, ротор 70.1 Ti/k-фактор 36, ротор 45Ti/k-фактор 133) согласно классической процедуре [15] с незначительными модификациями. Раствор плазмы центрифугировали $110000g - 2$ часа, удаляли супернатант, осадок растворяли в 100 мкл ФСБ. Для выделения экзосом, секретируемых клетками *in vitro*, культуральную среду также очищали от клеточного детрита и крупных мембранных везикул путем дифференциального центрифугирования, затем ультра-центрифугировали при $110\,000g$ в течение ночи при $+4^{\circ}\text{C}$. Осадок,

содержащий экзосомы, разводили в 100 мкл ФСБ для последующего анализа.

Дот-блоттинг

Для детекции общего содержания «маркерных» протеинов в биологических образцах (соскобах кишечного эпителия, клеточных культурах или ВНВ) материал лизировали с помощью буферного раствора RIPA (Thermo Scientific, США). При исследовании экспрессии протеинов в составе поверхностной мембраны использовали суспензии клеток или везикул в ФСБ. Общая концентрация белка в исследуемых образцах оценивалась методом Бредфорда и выравнивалась до 1 мкг/мкл. Образцы наносили на нитроцеллюлозную мембрану (каждый «дот» - 0,5 мкл) с размером пор 0,45 мкм (BioRad Laboratories, США), блокировали (Трис-буферный солевой раствор (ТБС), 0,05% Tween-20, 5% альбумин бычьей сыворотки (все от Sigma, США)) в течение 1 часа. Первичные антитела (указаны в таблице 1) использовали в концентрациях, рекомендованных производителем. Инкубация проводилась в течение 30 мин., затем мембрану «отмывали» раствором ТБС с 0,05% Tween-20 трижды по 5 минут и инкубировали с вторичными антителами, меченными пероксидазой хрена (Ab6721, Ab6789) в разведении 1:20 000 в течение 30 минут. После трехкратной «отмывки» мембраны детекция пероксидазной активности проводилась путем хемилюминесцентной реакции с использованием Pierce ECL Western Blotting Substrate (Thermo Scientific, США) и системы визуализации Invitrogeni Bright FL1500 Imaging System

(Thermo Fisher, США). Полученные данные обрабатывались в программе Image J, США.

Анализ траекторий наночастиц (АТН)

Измерения проводились на анализаторе Nanosight NS300 («Malvern», США). Каждый образец изучался в 4-5 разных микрообъемах путём прокачки образца через камеру. Длительность каждого измерения – 60 секунд. Уровень камеры: 14, ползунок затвора: 1259, усиление ползунка: 366, пороговый уровень: для осадка – 5, для ВФ2 – 6. Анализ экспериментальных данных проводился с помощью Nanosight NTA 3.2 Software.

Атомно-силовая микроскопия (АСМ)

Использовалась для изучения формы и распределения частиц по размерам. Измерения проводились с использованием сканирующего зондового микроскопа NT-MDT SolverBio («NT-MDT», Россия). Режим - полуконтактный, зонд - NSG01_DLC («NT-MDT», Россия). Образцы наносили на поверхность слюды («2SPI», США) непосредственно после снятия верхнего слоя. Затем проводилась инкубация в течение 30 секунд с последующей двойной отмывкой дистиллированной водой. Далее проводилась сушка сжатым воздухом. Обработку и анализ изображений проводили в программах Gwyddion (gwyddion.net) и Image Analysis («NT-MDT», Россия).

Проточная цитометрия (ПЦ) для анализа клеток

Суспензию клеток (1 x 10⁶ кл/мл) в ФСБ аликвотировали по 100 мкл, осаждали центрифугированием при 1000g, супернатант удаляли, добавляли 100 мкл

Таблица 1. Список потенциальных маркеров ВНВ, секретируемых клетками КРК
Table 1. The list of potential markers of EVs secreted by the cells of CRC

Gene Símbol	Uni Prot ID	Exo Carta ID	Название протеина	Клеточная функция	Антитела
EPCAM	P16422	4072	Epithelial Cell Adhesion Molecule	Physical homophilic interaction molecule	ab20160
CD47	Q08722	282661	CD47 molecule	Cell adhesion	ab108415
CD63	P08962	967	TSPAN30	Lysosomal-Associated Membrane Protein	ab59479
VAMP1	P23763	6843	Vesicle Associated Membrane Protein 1	Endoplasmic reticulum unfolded protein response	ab151712
CEACAM5	P06731	1048	CEA-related cell adhesion molecule 5	Cell surface glycoprotein	ab190718
CD177	Q8N6Q3	(RAT)	CD177 molecule	Formation of with beta-2 integrin heterodimer	ab203025
CDH17	Q12864	1015	Cadherin 17	Cadherins are calcium-dependent cell adhesion proteins	ab109220
CDHR5	Q9HBB8	53841	Cadherin-related family member 5	Intermicrovillar adhesion molecule	ab189111
CLRN3	Q8NCR9	119467	Clarin 3	Integral component of membrane	ab177695
DHRS11	DHRS11	(RAT)	Dehydrogenase/reductase member 11	Steroid metabolism	ab98276
GCNT3	O95395	9245	Glucosaminyl (N-acetyl) transferase 3	Synthesis of mucin beta 6 N-acetylglucosaminides	ab98134
GPA33	Q99795	10223	Cellsurface A33 antigen	Cell-cell recognition and signaling	ab108938
LGALS4	P56470	3960	Lectin, galactoside-binding, soluble, 4	Assembly of adherens junctions	ab170638
MEP1A	Q16819	4224	Meprin A, alpha	Hydrolysis of protein and peptide substrates	ab107548
PIGY	Q3MUY2	84992	GPI-GlcNAc transferase	Modification of cell surface proteins	ab79453
REG4	Q9BYZ8	83998	Regenerating family member 4	Calcium-independentlectin	ab200723

FACS-блокирующего буфера (1% БСА, растворённого в ФСБ), инкубировали 30 мин. на льду, затем вновь осаждали и удаляли супернатант. В случае анализа содержания «маркерных» протеинов в составе цитоплазмы клетки обрабатывали с помощью набора BD Cytofix/CytoPerm Kit (Becton Dickinson and Company, США). Клетки инкубировали с первичными антителами (Табл.1) в разведении 1:200 в течение 30' при +4°C. После трехкратной «отмывки» в ФСБ, клетки инкубировали со вторичными антителами, меченными FITC в разведении 1:1000 в течение 30' при +4°C, и трижды отмывали ФСБ. Приготовленные таким образом клетки ресуспендировали в 200 мкл ФСБ и анализировали.

Проточная цитометрия (ПЦ) для анализа тотальной популяции ВНВ

Пробоподготовка образцов осуществлялась с помощью коммерческого набора Exo-FACS (Hansa BioMed, Эстония) согласно протоколу производителя и предполагала неспецифическую фиксацию ВНВ к латексным микросферам. Детекция «экзосомальных» маркеров CD63 и CD9 была проведена с помощью антител, конъюгированных с флуоресцентными метками FITC (CD63-FITC, Ab18235, Abcam, США) PE (CD9-PE, 312105, Bio Legends, США). Выявление ткане-специфичных протеинов проводилась с помощью первичных антител к соответствующим белкам (Табл.1) и вторичных флуоресцентно меченных антител (Ab6717, Ab6785 Abcam, США).

Создание иммуно-частиц и проточная цитометрия (ПЦ) для анализа ВНВ, выделенных методом иммуносорбции

Для проведения этого исследования были изготовлены иммуно-частицы, связывающие везикулы, на поверхности которых представлены «маркерные» протеины (Mepin alpha, CLRN3, GAL4) – рисунок 6. Соответствующие антитела (Табл.1) очистили от консерванта (азид натрия), сконцентрировали с помощью набора ультрафильтров Amicon Ultra-0.5 mL Centrifugal Filters for DNA and Protein Purification and Concentration (Millipore, Ирландия) и конъюгировали с биотином с помощью набора Pierce Antibody Biotinylation Kit for IP (Thermo Scientific, США). Эффективность реакции связывания биотина оценивали набором для количественного определения биотина Pierce Biotin Quantitation Kit (Thermo Scientific, США). Биотинилированные антитела (10 мкл) инкубировали с суперпарамагнитными частицами, СПМЧ (1 мкл), поверхность которых модифицирована стрептавидином (ООО «Силекс», Москва) в течение часа при +4 °C. В результате образования связи биотин-стрептавидин в ходе этой инкубации образовались комплексы СПМЧ-АТ, или иммуно-

частицы (Рис.6А), физические характеристики которых определяют возможность их анализа методом проточной цитометрии.

Приготовленные таким образом иммуно-частицы инкубировали с ВНВ, выделенным с помощью ультра-центрифугирования, в объеме 100 мкл в течение ночи при +4°C (Рис.6Б). Полученный комплекс «СПМЧ-АТ-ВНВ» (Рис.6В) отмывали 3 раза ФСБ на магнитном штативе, блокировали в 200 мкл 0,2% буфера Tropix i-Block (Thermo Fisher, США) в течение 1 часа при +4°C, дважды промывали ФСБ 2 раза. Для количественной оценки связанных ВНВ, комплексы инкубировали с антителами к классическому «экзосомальному» маркеру CD63 (CD63-FITC, Ab18235, Abcam, США) в течение 2 часов при +4°C в темноте. Полученные комплексы промывали 2 раза, разводили в 200 ФСБ и анализировали. В качестве отрицательного контроля использовали комплекс СПМЧ-АТ без экзосом, «проведенный» через аналогичные процедуры блокировки, мечения антителами CD63-FITC и отмывки.

Все исследования были проведены на проточном цитометре Cytoflex (Beckman Coulter, США), оборудованном аргонным лазером с длиной волны 488 нм для измерения прямого рассеяния света (FSC) и бокового рассеяния (SSC). Анализ результатов был проведен с помощью программного обеспечения CytExpert (Beckman Coulter, США) и Excel (Microsoft).

Финансирование и этическое обоснование

План исследования был одобрен локальным этическим комитетом ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н.Петрова» Минздрава России (Санкт-Петербург), работы проводились в рамках НИР АААА-А18-118012390156-5 в сотрудничестве с ФГБУ «НМИЦ колопроктологии имени А.Н. Рыжих» Минздрава России (Москва). Все пациенты подписали информированное согласие относительно участия в исследовании. Биологический материал включался в работу после деперсонализации клинических данных.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Выбор потенциальных маркеров

С целью идентификации потенциальных экзосомальных маркеров КРК был проведен анализ доступных баз данных (Human Protein Atlas [16], Uni Prot [17]). Были отобраны 12 молекул, для которых характерна экспрессия (исключительно или преимущественно) в клетках кишечного эпителия, мембранная внутриклеточная локализация и отсутствие секретируемых (циркулирующих) форм. Так, результаты проведенного анализа сведены в таблицу 1. Все выбранные молекулы (кроме CDH177 и DHRS11) были ранее детектирова-

ны в составе ВНВ, секретируемых клетками человека, что отражено в базе данных Exo Carta [18]. CDH177 и DHRS11 были пока обнаружены в ВНВ, секретируемых клетками крысиных линий, что указывает на возможность их наличия в составе везикул, секретируемых клетками кишечного эпителия человека.

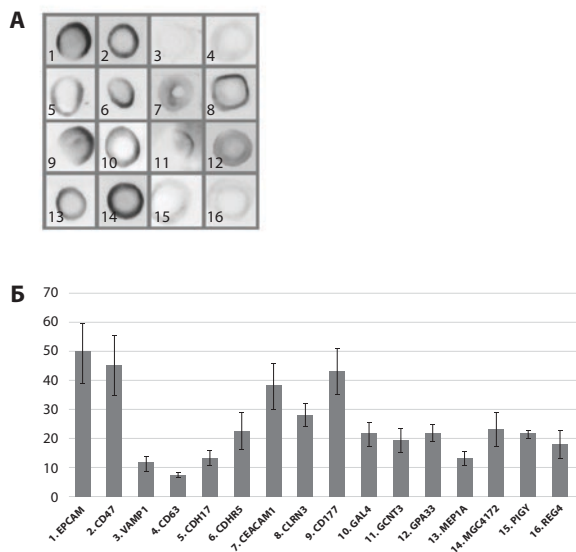


Рисунок 1. Анализ экспрессии потенциальных маркеров в соскобах эпителия толстой кишки, метод дот-блот. А. - Репрезентативный пример анализа 16 молекул в одном образце. Б. - Результаты, усредненные для 5 образцов.

Figure 1. Analysis of the expression of potential markers in large intestine epithelial scrapings dot-blotting method. А. - Representative example of analysis of 16 molecules in one sample. Б. - Results averaged for 5 samples

С целью позитивного контроля системы детекции в анализ были включены два белка (ЕрСАМ и CD47), активная экспрессия которых характерна для всех эпителиальных клеток. В качестве позитивного контроля детекции везикулярных маркеров был использован «классический» экзосомальный маркер CD63 и VAMP1 – молекула, определяемая в составе мембраны различных типов везикул, не только экзосом. Кроме информации о ткане-специфичном характере экспрессии и внутриклеточной локализации, при выборе потенциальных маркеров учитывались данные о функции белка, которая предполагала возможность его «появления» в составе мембраны ВНВ.

Оценка экспрессии выбранных молекул в эпителии толстой кишки

С целью верификации факта экспрессии выбранных протеинов были собраны образцы (n=5) соскоба эпителия с участков нормальной кишечной стенки после гемиколэктомии. Белковые лизаты были нор-

мализованы по содержанию общего белка методом Бредфорда, по 2 мкл лизата было нанесено на нитроцеллюлозную мембрану и относительное содержание каждого из 16 выбранных молекул (включая 4 контроля) было проанализировано с помощью дот-блоттинга. На рисунке 1А представлен репрезентативный пример результатов анализа одного образца. Данные по всем образцам были оцифрованы, нормализованы относительно среднего значения интенсивности сигнала. Значения, средние для пяти образцов, представлены на рисунке 1Б. Представленные результаты подтверждают высокий уровень белков ЕрСам и CD47, экспрессия которых ожидаема в клетках всех типов эпителиев. Был детектирован низкий уровень экспрессии везикулярных маркеров (VAMP1 и CD63). Экспрессия остальных молекул определялась отчетливо, с различной степенью интенсивности. Относительно высокий уровень экспрессии наблюдался у CEACAM1 и CD177, низкий – у CHD17 и MER1A (Merpin A). Полученные результаты подтвердили факт экспрессии выбранных протеинов в эпителии толстой кишки и обосновали предположение о возможности их наличия в составе ВНВ, секретируемых клетками нормального кишечного эпителия и трансформированного эпителия, сохранившего тканевую дифференцировку.

Оценка экспрессии выбранных молекул в клетках колоректальной карциномы in vitro

Задачей следующего этапа исследования был анализ экспрессии выбранных протеинов клетками кишечного эпителия с целью последующей оценки их секреции в составе ВНВ в условиях in vitro. Такой подход обеспечил возможность работы с «чистой» популяцией ВНВ, секретируемых клетками кишечного эпителия. Были выбраны пять стабильных линий, полученных из материала аденокарцином различных отделов ЖКТ (Табл.2). Используемые линии имели различные генетические характеристики и морфологию (Рис.2). Все линии являлись дериватами высоко- или умереннодифференцированных аденокарцином кишечного эпителия и сохранили способность формировать ксенографтные опухоли аналогичной морфологии [19]. Этот факт позволял предполагать, что в клетках этих линий сохранилась экспрессия тканеспецифичных протеинов, и эти протеины могут быть обнаружены в секретируемых клетками ВНВ. Перед началом трудоемкого этапа выделения и анализа ВНВ мы оценили относительный уровень экспрессии потенциальных маркеров клетками КРР.

Для повышения степени достоверности результатов мы использовали две технологии: дот-блоттинга и проточной цитометрии. Оба метода позволяют оценивать общее содержания протеинов в составе клеток и отдельно анализировать их содержа-

Таблица 2. Клеточные линии
Table 2. Cell lines

Клеточная линия	Первичная опухоль		Особенности ксенографтной опухоли в модели <i>in vivo</i>
	Локализация	Гистологическая форма	
HT-29	Ободочная кишка	Аденокарцинома, G-II	Высокодифференцированная аденокарцинома (G-I)
HuTu89	12-перстная кишка	Аденокарцинома, G-III	Высокодифференцированная аденокарцинома (G-I)
HCT-116	Ободочная кишка	Аденокарцинома, G-III	Умеренно дифференцированная опухоль (G-II), отдаленные метастазы
COLO320	Ободочная кишка	Аденокарцинома, G-II	Высокодифференцированная аденокарцинома (G-I)
SW837	Прямая кишка	Аденокарцинома, G-IV	Высокодифференцированная аденокарцинома (G-III)

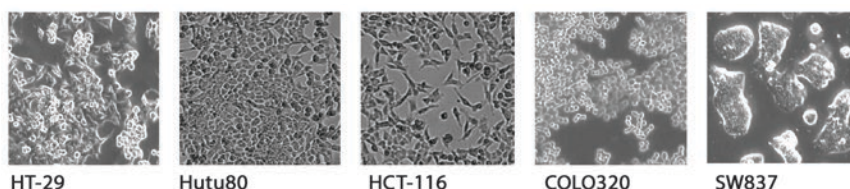


Рисунок 2. Морфология использованных клеточных линий
Figure 2. Morphology of the cell lines used

ние в составе поверхностной клеточной мембраны. Предполагалось, что обнаружение «потенциальных маркеров» в составе клеточной мембраны повышало шансы «присутствия» этих белков в составе мембраны секретируемых клетками ВНВ. Так тотальная (общ.) и мембранная (мембр.) экспрессия каждого из 16 «потенциальных» маркеров была оценена в клетках пяти линий двумя технологиями. Результаты, полученные методом дот-блоттинга, представлены в таблице 3 (столбцы «клетки»: М (мембранная) и Об. (общая), репрезентативный пример данных, полученных для одного протеина методами дот-блоттинга и проточной цитометрии (GAL4), представлен на рисунке 3. На этом примере видно, что оба метода показывают сходные соотношения тотальной и мембранной фракции протеина GAL4 в клетках разных линий. Например, в клетках HT29 этот протеин содержится, преимущественно, в цитоплазме, а в клетках HuTu80 – в составе поверхностной мембраны. Так, соотношения, определенные с помощью дот-блоттинга, подтвердились результатами проточной цитометрии и для других клеточных линий. Поэтому методика дот-блоттинга была выбрана для последующих исследований ВНВ как более простая и надежная.

Выделение и анализ ВНВ, секретируемых клетками *in vitro*

Перед исследованием экспрессии «потенциальных» маркеров КРК в составе секретируемых клетками ВНВ, везикулы были выделены из культуральной

среды и исследованы в соответствии с рекомендациями ISEV [20]. Размер и концентрация выделенных нано-частиц была оценена с помощью анализа траекторий нано-частиц – АТН (nanoparticles tracking analysis, NTA). После пересчета полученных данных с учетом исходного объема среды концентрация нано-частиц колебалась в пределах $2 \cdot 10 \times 10^8$ /мл. Размер мажорной фракции нано-частиц оценивался в диапазоне 80–110 нм. Репрезентативный пример результатов измерения представлен на рисунке 4А. Оценка морфологии и степени гетерогенности выделенных нано-частиц была проведена с помощью атомно-силовой сканирующей микроскопии АСМ (atomic force microscopy, AFM). Пример полученного изображения представлен на рисунке 4Б (верхняя панель). Размеры частиц были оцифрованы, распределение частиц по размерам представлено на гистограмме (Рис.4, нижняя панель). Согласно полученным данным, выделенные частицы представлены относительно гомогенной популяцией, с мономодальным распределением по размеру (размер мажорной фракции 60-80 нм). Разница в результатах оценки размера частиц определяется особенностями методов анализа: в случае АТН производится расчет гидродинамического радиуса частиц в суспензии, а АСМ оценивает размер частиц, фиксированных к поверхности слюды, отмытых и высушенных. В целом, полученные результаты оценки физических характеристик, выделенных из культуральной среды частиц, позволяют предполагать их везикулярную

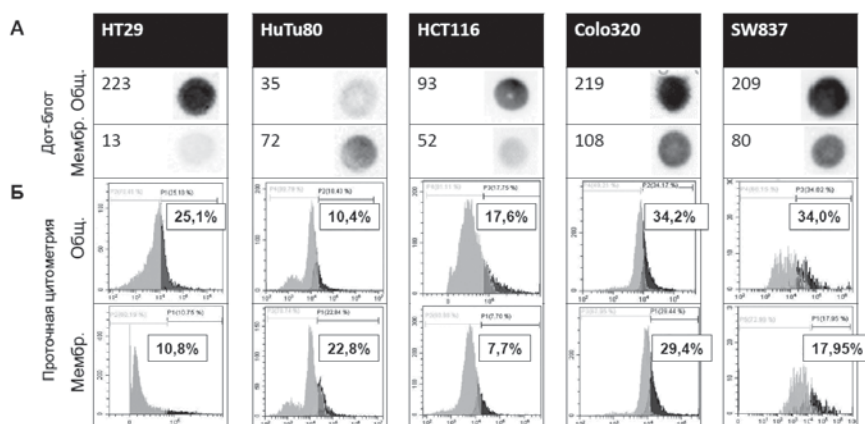


Рисунок 3. Результаты анализа уровня экспрессии молекулы GAL3 клетками пяти линий.

А. Анализ, проведенный методом дот-блот, при использовании клеточного лизата (верхний ряд «Общ.» – общее содержание белка GAL3 в клетках) и при использовании неизмененных клеток (нижний ряд «Мембр.» – содержание белка GAL4 в составе поверхностной мембраны).

Figure 3. Results of analysis of the level of GAL3 molecule expression by cells of five lines

A. Dot-blotting analysis using cell lysate (upper row of “Total” – total GAL3 protein content in cells) and using unchanged cells (lower row of “Membrane” – GAL4 protein content in the surface membrane)

Б. Analysis performed using flow cytometry, after the cell membrane permobilization procedure (upper row of “Total” – the total content of GAL3 protein in cells) and when using cells with an unchanged membrane (lower row of “Membrane” – the content of GAL4 protein in the surface membrane)

природу. Для оценки наличия на поверхности частиц классических «экзосомальных» маркеров частицы были фиксированы к латексным микросферам инкубированы с антителами к тетраспанинам CD63 и CD9. Методом проточной цитометрии показано, что на микро-сферах (98,5%) детектируется флуоресцентный сигнал по двум каналам (FITC-CD63, PE-CD9), т.е. в мембране фиксированных к микро-сферам частиц присутствуют оба маркера (Рис.3В). Таким образом, выделенные из среды частицы представлены, как минимум, частично ВНВ эндосомального происхождения или экзосомами.

Анализ экспрессии выбранных молекул в составе ВНВ секретируемых клетками КРК

Количественный анализ «потенциальных» маркеров в составе ВНВ был проведен методом дот-блоттинга по аналогии с исследованием клеток двумя способами: путем нанесения на мембрану интактных или лизированных ВНВ. Первый метод позволяет исследовать преимущественно состав поверхностной мембраны, а второй – общий состав везикулярных белков. Пример результатов, полученных при анализе протеина GAL4 в составе везикул из всех пяти клеточных линий представлен на рисунке 5. В таблице 3 (столбцы «ВНВ») представлены результаты по остальным протеинам. С целью оценки факта концентрации исследуемых протеинов в ВНВ, содержание этих молекул в везикулах было выра-

жено в % от содержания в клетках. Значения этого параметра, усредненные для пяти клеточных линий, представлены в таблице (столбец «ВНВ/Кл, %»). Концентрация семи (CLRN3, CD177, GAL4, GCNT3, Meprin A, MGC4172, PIGY) из 14 протеинов, исключая контроли (VAMP1, CD63), в ВНВ оказалась выше в составе лизированных ВНВ, чем в клеточном лизате. Это наблюдение подтверждает гипотезу о возможной специфической секреции (концентрации) этих протеинов в составе везикул. Так как в качестве диагностических маркеров могут быть использованы молекулы в составе поверхностной мембраны везикул, мы провели сравнительную оценку содержания исследуемых протеинов в составе поверхностных мембран ВНВ и в составе лизированных везикул. Это соотношение также было выражено в %, средние значения для ВНВ из пяти клеточных линий представлены в таблице 3 (столбец «М/Об, %»). Так, ожидаемо, классический «экзосомальный» маркер тетраспанin CD63 представлен преимущественно в составе везикулярной мембраны (179%). Из исследуемых протеинов, в основном, мембранная локализация была определена у CEACAM6, CLRN3, GAL4 и Meprin A.

Полученные результаты показали, что клетки КРК секретируют протеины CLRN3, GAL4 и Meprin A в составе ВНВ, причем эти протеины локализованы преимущественно в везикулярной мембране. Эти данные позволяли предполагать, что развитие КРК

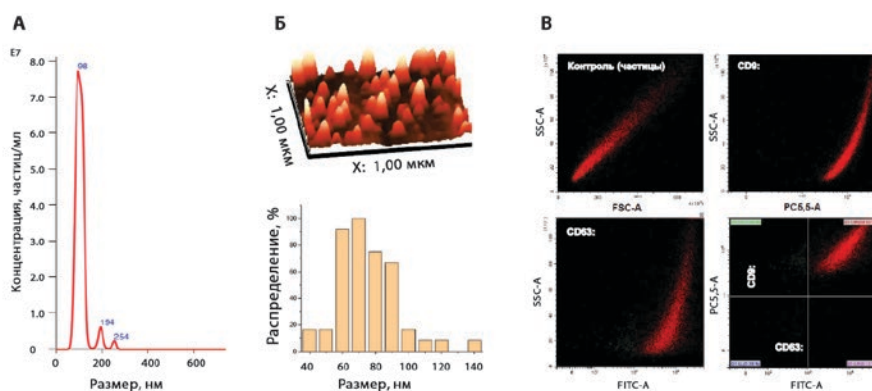


Рисунок 4. Анализ ВНВ, выделенных из культуральной среды (HT-29).

А. Оценка размера и концентрации ВНВ с помощью технологии анализа траекторий наночастиц (nanoparticle tracking analysis, NTA).

Б. Оценка степени гомогенности популяции выделенных ВНВ с помощью атомно-силовой микроскопии (atomic force microscope, AFM). Сверху – изображение фрагмента подложки с фиксированными на ней везикулами. Снизу – гистограмма распределения везикул по размеру.

В. Анализ экспрессии «экзосомальных» маркеров CD63 и CD9 на мембране везикул с помощью набора Exo FACS (Hansa BioMed, Эстония). Везикулы выделены ультра-центрифугированием и неспецифично фиксированы к латексным микро-сферам. После инкубации с флуоресцентно мечеными антителами (CD9 или CD63), проведен анализ по интенсивности флуоресценции по соответствующим каналам (FITC, PC5.5). Нижний правый квадрат – результат совмещения данных по двум каналам: 98,5% частиц с фиксированными ВНВ связывают оба антитела, т.е. практически все везикулы – позитивны по двум «экзосомальным» маркерам.

Figure 4. Analysis of EVs isolated from the cultural medium (HT-29)

A. Evaluation of the size and concentration of EVs using nanoparticle tracking analysis (NTA)

B. Evaluation of the degree of homogeneity of the population of isolated EVs using atomic force microscopy (AFM). Above is an image of a fragment of the substrate with vesicles fixed on it. Below is a histogram of the vesicle size distribution.

B. Analysis of the expression of “exosomal” markers CD63 and CD9 on the vesicle membrane using the Exo FACS kit (Hansa BioMed, Estonia). Vesicles were isolated by ultra-centrifugation and non-specifically fixed to latex micro-spheres. After incubation with fluorescently labeled antibodies (CD9 or CD63), an analysis of the fluorescence intensity was performed for the corresponding channels (FITC, PC5.5). The lower right square is the result of combining data on two channels: 98.5% of particles with fixed EVs bind both antibodies, i.e. almost all vesicles are positive for two “exosomal” markers

может сопровождаться появлением (повышением концентрации) в плазме специфичных везикул, обогащенных CLRN3, GAL4 и/или Merpin A. Мембранная локализация этих маркеров определяла возможность разработки метода их выделения путем иммуносорбции и детекции с помощью проточной цитометрии.

Создание метода иммуносорбции КРК-экзосом и количественный анализ ткане-специфичных ВНВ в плазме.

Количественный анализ (или, как минимум, детекция) ткане-специфичных ВНВ может быть основан на технологии их специфического выделения. Для решения этой задачи мы создали иммуночастицы, состоящие из суперпарамагнитных микросфер (1 мкм), поверхность которых «декорирована» антителами к «потенциальным» маркерам: CLRN3, GAL4 и/или Merpin A. Взаимодействие частиц с антителами осуществлялось за счет высоко-аффинной связи биотин-стрептавидин (Рис.6А). При инкубации

таких иммуно-частиц с ВНВ, выделенными из плазмы, происходит селективная фиксация везикул, мембрана которых содержит маркерный протеин (Рис.6Б). Затем «фиксированные» везикулы метятся антителами к любому из «классических» экзосомальных маркеров (в нашем случае CD63), и количественная оценка «фиксированных» везикул проводится методом проточной цитометрии (Рис.6В).

Созданная технология была сначала протестирована для исключения ложноположительных результатов из-за неспецифического взаимодействия антител. Затем мы проанализировали десять образцов плазмы от пяти пациентов с верифицированным диагнозом КРК и пяти доноров. Пример результата количественной оценки Merpin A (+) ВНВ в шести образцах плазмы (3 пациента с КРК и 3 донора) представлен на рисунке 7. Так, в плазме пациентов отчетливо детектируется повышенное содержание везикул, мембрана которых содержит ткане-специфичный маркер Merpin A.

Усредненные результаты анализа трех маркеров,

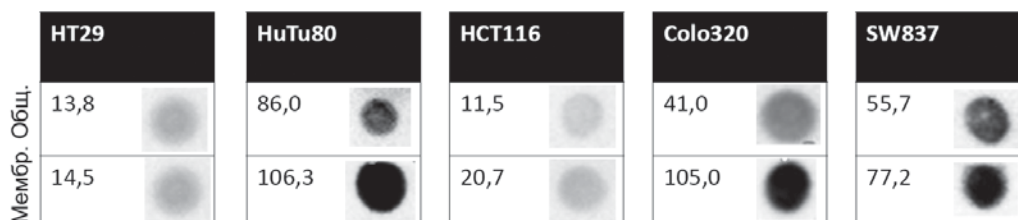


Рисунок 5. Результаты анализа концентрации GAL3 в ВНВ, секретируемых клетками КРР.

Анализ проведен методом дот-блот, при использовании лизата ВНВ (верхний ряд «Общ.» – общее содержание белка GAL3 в везикулах) и при использовании неизмененных ВНВ (нижний ряд «Мембр.» – содержание белка GAL4 в составе везикулярной мембраны)

Figure 5. Results of analysis of the AL3 concentration in EVs secreted by CRC cells.

The analysis was carried out by dot-blotting method, when using the EVs lysate (the upper row of “Total” – the total GAL3 protein content in vesicles) and when using unchanged EVs (the lower row of “Membranes” – the GAL4 protein content in the vesicular membrane)

Таблица 3. Результаты дот-блот анализа экспрессии «потенциальных» ткане-специфичных маркеров в клетках линий КРР и внеклеточных везикулах, секретируемых этими клетками in vitro. Исследованы лизаты клеток и везикул, отражающие общее содержание протеинов (столбцы «Об»), и суспензии интактных клеток и везикул, отражающие уровень экспрессии протеинов в составе поверхностной мембраны (столбцы «М»)

Table 3. Results of dot-blotting analysis of the expression of “potential” tissue-specific markers in cells of CRC lines and extracellular vesicles secreted by these cells in vitro. Lysates of cells and vesicles reflecting the total protein content (columns “T”) and suspensions of intact cells and vesicles reflecting the level of protein expression in the surface membrane (columns “M”)

Линии клеток		HT29				HuTu80				HCT116				Colo320				SW837				ВНВ/ Кл, %	М/ Об, %
Материал		клетки		ВНВ		клетки		ВНВ		клетки		ВНВ		клетки		ВНВ		клетки		ВНВ			
Клет. фракция		М	Об	М	Об	М	Об	М	Об	М	Об	М	Об	М	Об	М	Об	М	Об	М	Об		
1	ЕрСАМ	15	99	122	80	100	88	45	25	533	85	131	76	2	24	43	51	301	114	67	70	94,2	136,4
2	CD47	151	159	75	85	30	128	50	81	150	178	43	132	108	107	57	40	111	98	72	105	67,1	78,5
3	VAMP1	42	107	160	151	110	91	185	188	119	90	89	70	111	132	211	208	106	102	150	134	142,9	109,0
4	CD63	160	23	192	92	69	49	110	69	180	153	277	151	163	109	217	130	47	105	231	129	175,5	179,1
5	CDH17	20	85	83	71	305	243	18	219	149	57	107	61	361	67	103	96	325	66	83	73	94,6	104,4
6	CDHR5	199	51	54	87	2	111	30	16	44	100	69	133	115	76	35	100	63	103	54	44	89,4	93,0
7	CEACAM6	37	28	52	38	77	114	58	63	45	104	35	90	56	79	58	49	197	74	36	25	72,4	106,6
8	CLRN3	90	197	320	260	276	95	145	122	87	111	91	48	36	105	238	212	51	99	156	149	131,2	129,5
9	CD177	113	67	121	143	96	63	75	47	65	89	90	66	226	96	57	128	106	99	12	30	104,8	93,3
10	GAL4	13	223	56	104	72	35	272	166	52	93	109	43	108	219	116	87	80	209	213	188	174,6	143,0
11	GCNT3	127	81	67	154	20	113	72	81	78	73	63	91	83	95	75	34	57	58	79	132	110,9	96,2
12	GPA33	188	99	56	40	89	59	32	66	49	103	82	49	79	122	20	36	69	86	80	112	71,9	97,1
13	Meprin A	7	79	102	55	93	69	129	88	22	62	156	136	15	128	138	136	48	124	160	177	133,5	128,2
14	MGC4172	135	66	61	77	184	82	157	113	13	106	85	106	31	83	92	136	0	78	82	103	121,9	89,3
15	PIGY	186	53	4	50	48	152	72	135	15	89	69	212	59	101	79	96	39	87	60	65	117,9	53,7
16	REG4	116	184	73	115	29	109	150	122	15	109	110	136	36	66	59	60	1	112	66	66	89,8	93,5

выбранных в ходе предварительных этапов работы, и эпителиального «маркера» ЕрСАМ в десяти образцах представлены в Таблице 4.

Концентрация ВНВ, мембрана которых содержит ткане-специфические маркеры (CLRN3, GAL4, Meprin A), статистически значимо повышена в

плазме пациентов. Полученные результаты подтверждают гипотезу о возможной диагностической значимости ткане-специфических везикулярных маркеров. Используемая стратегия отбора и валидации «потенциальных» маркеров может быть использована в дальнейших исследованиях.

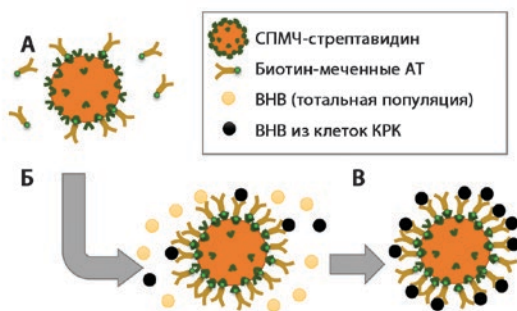


Рисунок 6. Схема создания и использования иммуно-частиц для выделения специфической фракции ВНВ.

А. Фиксация антител (АТ) к супер-парамагнитным частицам (СПМЧ) через взаимодействие биотина на АТ и стрептавидина на СПМЧ.

Б. Инкубация иммуно-частиц (комплексов СПМЧ-АТ) с ВНВ плазмы и взаимодействие иммуно-частиц с фракцией специфических везикул.

В. Отделение комплекса СПМЧ-АТ-ВНВ, содержащего специфические ВНВ от везикул плазмы. Полученные комплексы могут быть использованы для последующего анализа фракции ВНВ.

Figure 6. Scheme of creation and use of immuno-particles for isolation of a specific fraction of EVs

А. Fixation of antibodies (AB) to superparamagnetic particles (SPMP) through the interaction of biotin with AB and streptavidin with SPMP

Б. Incubation of immuno-particles (SPMP- AB complexes) with EVs plasma and interaction of immune-particles with a fraction of specific vesicles.

В. Separation of the SPMP-AB-EVs complex containing specific EVs from plasma vesicles. The resulting complexes can be used for subsequent analysis of the EVs fraction

ОБСУЖДЕНИЕ

Признано, что секретируемые клетками КРР внеклеточные нано-везикулы играют существенную роль в развитии заболевания [21]. ВНВ участвуют в процессе инвазивного роста первичной опухоли путем модификации структуры стромы, изменения морфологии фибробластов, стимуляции патологической васкуляризации. Большой практический интерес

привлекают исследования системных эффектов ВНВ, секретируемых клетками опухоли. Так, например, было показано в экспериментальных работах, что эффективность метастатической диссеминации клеток КРР по системе брыжеечных сосудов в печень регулируется ВНВ. Среди возможных механизмов такой регуляции описан эффект стимуляции дифференцировки моноцитов [22] и клеток, экспрессирующих рецептор к CXCR4 [23]. Так, на фоне множества исследований, описывающих биологические эффекты ВНВ, секретируемых клетками КРР, пока не удалось выделить их из плазмы и сопоставить структурные и функциональные особенности. Пока неизвестны специфические биохимические характеристики, которые позволяли бы физически выделить эту фракцию ВНВ из общего состава везикул плазмы и выяснить молекулярные механизмы наблюдаемых патологических эффектов. Такая ситуация снижает практическую ценность результатов многих экспериментальных исследований.

Кроме того, разработка диагностических технологий на основе анализа ВНВ плазмы представляется мало-перспективным направлением, если принять во внимание тот факт, что диагностическую ценность имеет лишь минорная фракция анализируемых везикул. Ранее мы провели исследование с целью оценки диагностического потенциала экзосомальных микроРНК [24]. В рамках этой работы «определение» фракции везикул, секретируемых клетками КРР, было проведено путем сравнения плазмы пациентов до и после удаления опухоли. Такой подход был основан на предположении, что после удаления опухоли фракция везикул, секретируемых клетками этой опухоли, в плазме уменьшится. Соответственно, отличия профиля везикулярных микроРНК в материале, полученном до и после операции, должны отражать состав везикул именно опухолевого происхождения. Такой подход, дополненный этапом валидации результатов, позволил идентифицировать две молекулы, miР-223 и miР-181a, сочетанный анализ которых имел высокий диагностический потенциал. Но эти результаты не решили проблемы «идентификации» диагностически значимой фракции ВНВ. Оставалась очевидной задача физического выделения везикул, секретиру-

Таблица 4. Результаты анализа ткане-специфичных ВНВ в плазме пациентов с КРК и здоровых доноров с помощью иммуно-частиц методом проточной цитометрии. Представлены усредненные данные по 5 образцам. Статистическая значимость разницы между группой пациентов и доноров оценена с помощью теста Манн-Уитни.

Table 2. Results of analysis of tissue-specific EVs in plasma of patients with CRC and healthy donors using immuno-particles by flow cytometry. The average data for 5 samples is presented. The significance of the difference between the group of patients and donors was assessed using the Mann-Whitney test

Маркеры ВНВ	CLRN3	GAL4	Meprin A	EpCAM
КРК (пациенты), n=5	1,7	2,5	4,8	6,2
Контроль (доноры), n=5	0,3	0,9	1,7	11,6
Стат. Значимость	**	*	**	NS

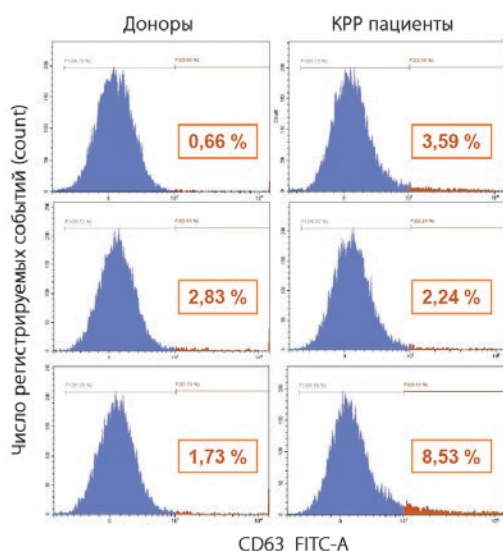


Рисунок 7. Репрезентативные результаты количественной оценки Meprin A-позитивных ВНВ в составе totalной популяции везикул плазмы здоровых доноров и пациентов с КРР.

Везикулы выделены с помощью иммуно-частиц, несущих антитела к Meprin A. После инкубации с везикулами плазмы и отмывки, связавшиеся % Meprin A (+) ВНВ помечены антителами к «экзосомальному» маркеру CD63-FITC. Выделены значения: % Meprin A (+) ВНВ..

Figure 7. Representative results of quantitative evaluation of Meprin A-positive EVs in the total population of plasma vesicles of healthy donors and patients with CRC.

Vesicles were isolated using immuno-particles carrying antibodies to Meprin A. After incubation with plasma vesicles and washing, % Meprin A (+) bound EVs were labeled with antibodies to the "exosomal" marker CD63-FITC. Highlighted values are: % Meprin A (+) EVs

емых клетками КРР, что позволило бы расширить панель маркерных микроРНК и повысить надежность метода в целом.

Для решения этой задачи мы предположили, что везикулы, секретируемые клетками высоко- или средне- дифференцированной аденокарциномы, могут иметь в составе мембраны ткане-специфичные протеины. Для подтверждения этой гипотезы были выбраны 12 молекул – кандидатов, отвечающих ряду критериев: исключительная или преимущественная экспрессия в клетках кишечного эпителия, мембранная локализация и доказанная экспрессия в составе ВНВ. После анализа биопсийного материала из нормального эпителия толстой кишки, клеточных линий, полученных из кишечных аденокарцином и везикул, секретируемых этими клетками в условиях *in vitro*, лист кандидатов сузился до 3 молекул: CLRN3, GAL4, Meprin A. Количественная оценка ВНВ, имеющих один из этих маркеров, в составе плаз-

мы пациентов с КРР и здоровых доноров показал обоснованность нашего предположения. Похожее исследование было недавно проведено группой корейских исследователей [25]. Эта работа решала аналогичную задачу, но имела иной дизайн: анализ протеинов в составе ВНВ, секретируемых клетками двух линий (HT29 и HCT-116), был проведен методом масс-спектрометрии, затем из списка идентифицированных молекул были выбраны молекулы – кандидаты, соответствующие критериям, использованным в нашей работе. В заключении было проведено сравнение концентрации выбранных молекул в составе ВНВ пациентов с КРР и здоровых доноров. Итогом исследования была идентификация нового везикулярного маркера КРР – тетраспаина TSPAN1. В соответствии с базой данных The Protein Atlas [16], экспрессия этой молекулы ограничена кишечником и мочевыделительной системой, т.е. TSPAN1 также является ткане-специфичным маркером ВНВ, секретируемым клетками КРР.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В целом, результаты нашего исследования и работы корейских коллег подтверждают ряд выводов:

1. Клетки КРР секретируют ВНВ, в состав которых входят ткане-специфичные протеины.
2. Количественный анализ везикул, в состав которых входят такие протеины, имеет диагностический потенциал.
3. Методы иммуносорбции могут быть использованы для выделения (или обогащения) и последующего анализа фракции ВНВ, секретируемых клетками КРР. Проведение дальнейших исследований в этом направлении необходимо для расширения списка «маркеров» ВНВ, секретируемых клетками КРР (1), оптимизации технологии специфического выделения этих везикул (2), применения методов последующего качественного анализа этой специфической везикулярной фракции. Наиболее перспективным представляется анализ микроРНК из фракции ткане-специфичных ВНВ. Достижение этих целей будет основой для создания эффективного метода неинвазивной диагностики КРР.

УЧАСТИЕ АВТОРОВ:

Концепция и дизайн исследования: Назарова И.В., Малек А.В.

Сбор и обработка материалов: Назарова И.В., Котова З.С., Семиглазова Т.Ю., Служев М.И., Семиглазов В.В., Гоголев А.Б., Артемьева А.С., Рыбаков Е.Г.

Статистическая обработка: Назарова И.В., Слюсаренко М.А.

Написание текста: Назарова И.В., Малек А.В.

Редактирование: Никифорова Н.С., Сидина Е.И.

THE PARTICIPATION OF THE AUTHORS:

Concept and design of the study: Nazarova I.V., Malek A.V.

Collection and processing of the material: Nazarova I.V., Kotova Z.S., Semiglazova T.Yu., Sluzhev M.I., Semiglazov V.V., Gogolev A.B., Artem'eva A.S., Rybakov E.G.

Statistical processing: Nazarova I.V., Slyusarenko M.A.

Writing of the text: Nazarova I.V., Malek A.V.

Editing: Nikiforova N.S., Sidina E.I.

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ:

ORCID

Назарова И.В. 0000-0002-6812-3088

Никифорова Н.С. 0000-0001-7464-4237

Сидина Е.И. 0000-0003-4174-2839

Слюсаренко М.А. 0000-0002-3677-1558

Котова З.С.

Семиглазова Т.Ю. 0000-0002-4305-6691

Служев М.И. 0000-0002-6346-1029

Семиглазов В.В.

Гоголев А.Б. 0000-0001-9885-1177

Артемяева А.С. 0000-0002-2948-397X

Рыбаков Е.Г.

Малек А.В. 0000-0001-5334-7292.

INFORMATION ABOUT THE AUTHORS:

ORCID

Nazarova I.V. 0000-0002-6812-3088

Nikiforova N.S. 0000-0001-7464-4237

Sidina E.I. 0000-0003-4174-2839

Slyusarenko M.A. 0000-0002-3677-1558

Semiglazova T.Yu. 0000-0002-4305-6691

Sluzhev M.I. 0000-0002-6346-1029

Gogolev A.B. 0000-0001-9885-1177

Artemyeva A.S. 0000-0002-2948-397X

Rybakov E.G. 0000-0002-3919-9067

Malek A.V. 0000-0001-5334-7292

ЛИТЕРАТУРА

1. Пузанов Д.П., Половинкин В.В., Пузанова И.А. Скрининг коло-ректального рака. Обзор существующих мейодов и рекомендаций. *Инновационная медицина Кубани*. 2018; №1, с.58–64.
2. Bénard F, Barkun AN, Martel F, von Renteln D. Systematic review of colorectal cancer screening guidelines for average-risk adults: Summarizing the current global recommendations. *World J Gastroenterol*. 2018; 7:124–138.
3. Stanciu J, Tariman J. Liquid Biopsy: A Tool for the Diagnostic and Prognostic Evaluation of Cancers. *Clin J Oncol Nurs*. 2020; 24:19–21.
4. Brahmer A. et al. Platelets, endothelial cells and leukocytes contribute to the exercise-triggered release of extracellular vesicles into the circulation. *J Extracell Vesicles*. 2019 May 28; 8(1):1615820. DOI: 10.1080/20013078.2019.1615820
5. Larssen P. et al. Tracing Cellular Origin of Human Exosomes Using Multiplex Proximity Extension Assays. *Mol Cell Proteomics*. 2017; 16:1547–1547.
6. Kobayashi M. et al. A Pilot Trial to Quantify Plasma Exosomes in Colorectal Cancer Screening from the International Collaborative Study between Chile and Japan. *Digestion*. 2018; 98:270–274.
7. Wang L, Duan W, Yan S, Xie Y. et al. Circulating long non-coding RNA colon cancer-associated transcript 2 protected by exosome as a potential biomarker for colorectal cancer. *Biomed Pharmacother*. 2019 May 14; 113:108758. DOI: 10.1016/j.biopha.2019.108758
8. Ogata-Kawata H. et al. Circulating Exosomal microRNAs as Biomarkers of Colon Cancer. *PLoS One*. 9, 2014; e92921.
9. Замбалова Е.А. et al. Экзосомальные протеиназы при коло-ректальном раке. *Успехи молекулярной онкологии*. 2018; №5, с.117–126.
10. Lewis JM. et al. Integrated Analysis of Exosomal Protein Biomarkers on Alternating Current Electrokinetic Chips Enables Rapid Detection of Pancreatic Cancer in Patient Blood. *ACS Nano*. 2018; 12:3311–3320.
11. Zhang Y, Mi X, Tan X. et al. Recent Progress on Liquid Biopsy Analysis using Surface-Enhanced Raman Spectroscopy. *Theranostics*. 2019; 9:491–525.
12. Santasusagna S. et al. Proteomic Analysis of Liquid Biopsy from Tumor-Draining Vein Indicates that High Expression of Exosomal ECM1 Is Associated with Relapse in Stage I-III Colon Cancer. *Transl. Oncol*. 2018; 11:715–721.
13. Theodoraki M-N, Matsumoto A, Beccard I, et al. CD44v3 protein-carrying tumor-derived exosomes in HNSCC patients' plasma as potential noninvasive biomarkers of disease activity. *Oncoimmunology*. 2020; 9:1747732.
14. Ferrone S, Whiteside TL. Targeting CSPG4 for isolation of melanoma cell-derived exosomes from body fluids. *HNO*. 2020; 68:100–105.
15. Théry C, Amigorena S, Raposo G. et al. Isolation and Characterization of Exosomes from Cell Culture Supernatants and Biological Fluids. *Curr Protoc Cell Biol*. 2006; 30, 3.22.1–3.22.29.
16. www.proteinatlas.org. The Human Protein Atlas.
17. www.uniprot.org. UniProt Consortium.
18. www.exocarta.org. ExoCarta.
19. Linnekamp JF. et al. Consensus molecular subtypes of colorectal cancer are recapitulated in vitro and in vivo models. *Cell Death Differ*. 2018; 25:616–633.
20. Théry C. et al. Minimal information for studies of extracellular vesicles 2018 (MISEV2018): a position statement of the International Society for Extracellular Vesicles and update of the MISEV2014 guidelines. *J Extracell Vesicles*. 2018; 23(7):1535750. DOI:10.1080/20013078.2018.1535750
21. Mannavola F. et al. Revisiting the Role of Exosomes in Colorectal Cancer: Where Are We Now? *Front Oncol*. 2019 Jun 19; 9:521. DOI: 10.3389/fonc.2019.00521. eCollection 2019.
22. Takano Y. et al. Circulating exosomal microRNA-203 is associated with metastasis possibly via inducing tumor-associated macrophages in colorectal cancer. *Oncotarget*. 2017; 8:78598–78613.
23. WANG X. et al. Investigation of the roles of exosomes in colorectal cancer liver metastasis. *Oncol Rep*. 2015; 33:2445–2453.
24. Самсонов Р.Б. et al. Диагностическое значение экзосомальных МикроРНК при коло-ректальном раке. *Коллопроктология*. 2018; №2 (64), с.25–31.
25. Lee C-H, Im E-J, Moon P-G et al. Discovery of a diagnostic biomarker for colon cancer through proteomic profiling of small extracellular vesicles. *BMC Cancer*. 2018; 18:1058.

REFERENCES

1. Puzanov D.P., Polovinkin V.V., Puzanova I.A. Colorectal cancer screening. current techniques and recommendations review. *Innovative medicine of Kuban*. 2018; no.1, pp.58-64. (in Russ.).
2. Bénard F, Barkun AN, Martel F, von Renteln D. Systematic review of colorectal cancer screening guidelines for average-risk adults: Summarizing the current global recommendations. *World J Gastroenterol*. 2018; 7:124–138.
3. Stanciu J, Tariman J. Liquid Biopsy: A Tool for the Diagnostic and Prognostic Evaluation of Cancers. *Clin J Oncol Nurs*. 2020; 24:19-21.
4. Brahmer A. et al. Platelets, endothelial cells and leukocytes contribute to the exercise-triggered release of extracellular vesicles into the circulation. *J Extracell Vesicles*. 2019 May 28; 8(1):1615820. DOI: 10.1080/20013078.2019.1615820
5. Larssen P. et al. Tracing Cellular Origin of Human Exosomes Using Multiplex Proximity Extension Assays. *Mol Cell Proteomics*. 2017; 16:1547–1547.
6. Kobayashi M. et al. A Pilot Trial to Quantify Plasma Exosomes in Colorectal Cancer Screening from the International Collaborative Study between Chile and Japan. *Digestion*. 2018; 98:270–274.
7. Wang L, Duan W, Yan S, Xie Y. et al. Circulating long non-coding RNA colon cancer-associated transcript 2 protected by exosome as a potential biomarker for colorectal cancer. *Biomed Pharmacother*. 2019 May 14; 113:108758. DOI: 10.1016/j.biopha.2019.108758
8. Ogata-Kawata H. et al. Circulating Exosomal microRNAs as Biomarkers of Colon Cancer. *PLoS One*. 9, 2014; e92921.
9. Zambalova E.A. et al. Exosomal proteases in colorectal cancer. *Advances in Molecular Oncology*. 2018; no.5(4), pp.117-126. (In Russ.).
10. Lewis JM. et al. Integrated Analysis of Exosomal Protein Biomarkers on Alternating Current Electrokinetic Chips Enables Rapid Detection of Pancreatic Cancer in Patient Blood. *ACS Nano*. 2018; 12:3311–3320.
11. Zhang Y, Mi X, Tan X. et al. Recent Progress on Liquid Biopsy Analysis using Surface-Enhanced Raman Spectroscopy. *Theranostics*. 2019; 9:491–525.
12. Santasusagna S. et al. Proteomic Analysis of Liquid Biopsy from Tumor-Draining Vein Indicates that High Expression of Exosomal ECM1 Is Associated with Relapse in Stage I-III Colon Cancer. *Transl. Oncol*. 2018; 11:715–721.
13. Theodoraki M-N, Matsumoto A, Beccard I, et al. CD44v3 protein-carrying tumor-derived exosomes in HNSCC patients' plasma as potential noninvasive biomarkers of disease activity. *Oncoimmunology*. 2020; 9:1747732.
14. Ferrone S, Whiteside TL. Targeting CSPG4 for isolation of melanoma cell-derived exosomes from body fluids. *HNO*. 2020; 68:100-105.
15. Théry C, Amigorena S, Raposo G. et al. Isolation and Characterization of Exosomes from Cell Culture Supernatants and Biological Fluids. *Curr Protoc Cell Biol*. 2006; 30, 3.22.1-3.22.29.
16. www.proteinatlas.org. The Human Protein Atlas.
17. www.uniprot.org. UniProt Consortium.
18. www.exocarta.org. ExoCarta.
19. Linnekamp JF. et al. Consensus molecular subtypes of colorectal cancer are recapitulated in in vitro and in vivo models. *Cell Death Differ*. 2018; 25:616–633.
20. Théry C. et al. Minimal information for studies of extracellular vesicles 2018 (MISEV2018): a position statement of the International Society for Extracellular Vesicles and update of the MISEV2014 guidelines. *J Extracell Vesicles*. 2018; 23(7):1535750. DOI:10.1080/20013078.2018.1535750
21. Mannavola F. et al. Revisiting the Role of Exosomes in Colorectal Cancer: Where Are We Now? *Front Oncol*. 2019 Jun 19; 9:521. DOI: 10.3389/fonc.2019.00521. eCollection 2019.
22. Takano Y. et al. Circulating exosomal microRNA-203 is associated with metastasis possibly via inducing tumor-associated macrophages in colorectal cancer. *Oncotarget*. 2017; 8:78598–78613.
23. WANG X. et al. Investigation of the roles of exosomes in colorectal cancer liver metastasis. *Oncol Rep*. 2015; 33:2445–2453.
24. Samsonov R.B. et al. Diagnostic value of exosomal miRNAs for colorectal cancer. *Koloproktologia*. 2018; no.2(64), pp.25-31. (In Russ.).
25. Lee C-H, Im E-J, Moon P-G et al. Discovery of a diagnostic biomarker for colon cancer through proteomic profiling of small extracellular vesicles. *BMC Cancer*. 2018; 18:1058.