

КЛИНИКО-ДИАГНОСТИЧЕСКИЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

©Коллектив авторов

ИНТЕРНАЛИЗАЦИЯ ВНЕКЛЕТОЧНЫХ ВЕЗИКУЛ ОНКОЛОГИЧЕСКИХ БОЛЬНЫХ МОНОНУКЛЕАРАМИ ПЕРИФЕРИЧЕСКОЙ КРОВИ ПРИ ПРОВЕДЕНИИ ПОЛИХИМИОТЕРАПИИ: СВЯЗЬ С НЕЙРОТОКСИЧНОСТЬЮ

Н.В. Юнусова^{1,2}, Е.В. Кайгородова^{1,2}, П.А. Панфилова^{2*}, Н.О. Попова¹,
И.Н. Удинцева¹, И.В. Кондакова¹, Д.А. Сваровский^{1,2}, В.Е. Гольдберг¹

¹Научно-исследовательский институт онкологии Томского Научно-исследовательского медицинского центра,
634009, Томск, пер. Кооперативный, 5; *эл. почта: teofen@yandex.ru

²Сибирский государственный медицинский университет, Томск

Внеклеточные везикулы (ВВ), функциональная активность которых, по-видимому, опосредуется их интернализацией клетками-реципиентами, вовлечены в патогенез лекарственно-индуцированной полинейропатии (ЛИПНП) — частого осложнения противоопухолевой терапии. В данной работе на модельной системе мононуклеарных лейкоцитов оценена интернализация ВВ, полученных от больных колоректальным раком в условиях проведения полихимиотерапии, и её связь с проявлением нейротоксичности. Циркулирующие ВВ выделены от 8 больных колоректальным раком, получивших противоопухолевую терапию по схемам FOLFOX или XELOX до начала химиотерапии (точка 1) и после 3–4 курсов (точка 2). Мононуклеарные лейкоциты здорового донора служили в качестве клеточной модельной системы для интернализации ВВ *in vitro*. Оценку интернализации ВВ проводили методом флуоресцентной микроскопии. Показано, что интернализация ВВ, полученных от больных колоректальным раком с проявлением высокой нейротоксичности, была выше, чем в группе с низкой нейротоксичностью. Способность CD11b-позитивных (CD11b⁺) и CD11b-негативных (CD11b⁻) мононуклеарных лейкоцитов здорового донора интернализировать ВВ, полученные от больных до проведения химиотерапии и после, не обнаружила значимых различий. Выявлена прямая взаимосвязь между относительным количеством CD11b⁺ клеток с интернализированными ВВ и интегральным показателем нейротоксичности по шкале NRS на пике её проявления (точка 2) ($r=0,675$, $p<0,05$). К окончанию 3–4 курса полихимиотерапии по схемам FOLFOX или XELOX отмечена тенденция увеличения относительного количества мононуклеарных лейкоцитов периферической крови (сумма CD11b⁺ и CD11b⁻ клеток) с интернализированными ВВ с усилением проявлений ЛИПНП у больных колоректальным раком.

Ключевые слова: внеклеточные везикулы; интернализация; мононуклеарные лейкоциты периферической крови; колоректальный рак; полихимиотерапия; лекарственно-индуцированная полинейропатия

DOI: 10.18097/PBMC20247004240

ВВЕДЕНИЕ

Внеклеточные везикулы (ВВ) — наноразмерные (40–1000 нм) мембранные округлые структуры преимущественно эритроцитарного, тромбоцитарного, лейкоцитарного и эндотелиоцитарного происхождения, детектируемые у человека практически во всех биологических жидкостях (кровь, слюна, моча, цереброспинальная жидкость) [1]. В настоящее время пристальное внимание уделяют изучению функциональной активности везикул, которая, как полагают, опосредуется их интернализацией клетками-реципиентами. Мононуклеарные лейкоциты периферической крови (PBMCs) давно и успешно используются в качестве модельной системы для изучения интернализации циркулирующих ВВ пациентов разных возрастных групп [2], пациентов в эуликемическом состоянии и больных сахарным диабетом II типа [3], интернализации ВВ от клеток Лангенгарса поджелудочной железы человека [4], циркулирующих ВВ от больных с мультиформной глиобластомой, а также продуцируемых анапластическими олигодендроглиальными клетками человека ВВ [5] и др. Ранее также было показано, что клетки моноцитарно-макрофагального ряда, а также в меньшей степени В-лимфоциты, являющиеся

основными компонентами PBMCs, представляют основные клетки крови, которые интернализируют ВВ любого происхождения [3, 6]. Простота получения PBMCs, возможность как кратковременной (до 2 ч), так и длительной (до 48 ч) инкубации PBMCs с ВВ при сохранении их функциональной активности, наличие недорогих современных красителей для окрашивания мембран ВВ, возможность использования в методике *in vitro* различных ингибиторов для выяснения доминирующих механизмов интернализации — все эти моменты делают использование PBMCs весьма привлекательным для исследователей [7]. Однако данная методология ранее не использовалась для поиска новых доступных предикторов лекарственно-индуцированной полинейропатии (ЛИПНП).

Известно, что полихимиотерапия не обладает специфичностью действия только на опухолевые клетки, поэтому у пациентов могут возникать серьёзные осложнения со стороны различных систем органов, обусловленные токсическим действием препаратов. ЛИПНП как медико-социальная проблема стоит достаточно остро, она развивается более чем у 70% больных при применении широкого спектра современных цитостатиков и

таргетных препаратов (препараты платины, таксаны, винкаалкалоиды, бортезомиб). Тяжесть проявлений ЛИПНП далеко не всегда коррелирует с дозой препарата, усугубляется при наличии предшествующей полинейропатии любого генеза. У значительной части онкологических больных, особенно получавших таксаны, тяжесть симптомов ЛИПНП со временем может нарастать, существенно снижая качество жизни и даже снижая показатели выживаемости больных [8, 9].

Важно также отметить, что ВВ при их инкубации с клетками-реципиентами могут как интернализироваться в эндосомальный компартмент с накоплением содержимого ВВ в цитоплазме клетки, так и в дальнейшем отсортировываться в лизосомы с последующей деградацией содержимого. Кроме того, часть везикул может локализоваться снаружи клетки в плазматической мембране [7, 10]. Описан также вариант интернализации ВВ в ядерный компартмент, что может быть связано с изменением функциональной активности клеток-реципиентов [11].

Во многих исследованиях отмечается, что механизм и вариант интернализации ВВ зависит как от типа и состава ВВ, так и от клеток-реципиентов (тип клеток, липидный состав и вариант кластеризации белков и липидов в мембране), причём выявлены ассоциированные с возрастом особенности интернализации ВВ, что диктует необходимость определённой стандартизации и унификации этих исследований [2]. С учётом отсутствия чётких предикторов ЛИПНП тяжёлой степени, клинической важности проблемы подбора, совместимости, длительности медикаментозной коррекции ЛИПНП исследование интернализации ВВ на модельных клеточных системах представляет особый научный интерес.

В связи с этим целью нашего исследования была оценка интернализации ВВ, полученных от больных колоректальным раком в условиях проведения полихимиотерапии и её связь с проявлением нейротоксичности на модельной системе мононуклеарных лейкоцитов.

МЕТОДИКА

Обследованы 8 больных (4 женщины и 4 мужчин, средний возраст $55,5 \pm 12,5$ лет) колоректальным раком (T3-4N0-2M0-1), получивших противоопухолевую

терапию по схемам FOLFOX или XELOX. Схема FOLFOX включала оксалиплатин 85 мг/м^2 в виде 2-часовой инфузии в 1 день, кальция фолиат 400 мг/м^2 в/в в течение 2 ч с последующим болюсным введением фторурацила 400 мг/м^2 в/в струйно и 46-часовой инфузией фторурацила 2400 мг/м^2 . Начало очередного курса на 15 день. Схема XELOX включала оксалиплатин 130 мг/м^2 в 1 день, капецитабин 2000 мг/м^2 в сутки в 1–14 дни. Начало очередного курса на 22 день. Средняя продолжительность химиотерапии составила $2,04 \pm 0,35$ месяца.

Характеристика пациентов, схемы полихимиотерапии и количество полученных курсов химиотерапии представлены в таблице 1.

Кровь для получения циркулирующих ВВ брали до начала химиотерапии (точка 1) и на пике проявления лекарственной токсичности (точка 2), обычно после окончания 3–4 курса. В обеих точках степень выраженности клинических проявлений периферической полинейропатии оценивали с использованием цифровой ранговой шкалы боли (ЦРШ: NRS), при этом пациентам предлагалось оценить интенсивность боли в баллах от 0 до 10. Оценивали следующие симптомы: покалывающая боль, ощущение жжения, болезненное ощущение холода, ощущение как от удара током, ощущение ползания мурашек, онемение. В таблицах и на рисунках представлен интегральный показатель боли. В соответствии с рекомендациями по использованию “Общих терминологических критериев для оценки нежелательных эффектов (version 5.0, 2017)” Национального института рака США [11] были сформированы группы больных с отсутствием ЛИПНП/слабой выраженностью полинейропатии (интегральный показатель по шкале NRS < 4) и с выраженной ЛИПНП (интегральный показатель по шкале NRS ≥ 4) [12].

Малые ВВ из плазмы крови больных выделены методом ультрафильтрации с двойным ультрацентрифугированием (ультрацентрифуга OptimaXP, “Beckman Coulter”, США). Фракционирование клеток крови (около 18 мл венозной крови, стабилизированной ЭДТА) выполняли на высокоскоростной центрифуге с угловым ротором при 4°C в течение 20 мин при ускорении $1000 g$ (TGL-24MC, “Drawell”, Китай). Полученную

Таблица 1. Характеристика пациентов, схемы полихимиотерапии и количество курсов

№	Пол пациента	Возраст, лет	Наличие СД2	Стадия рака (TNM)	Схема ХТ	Количество курсов ХТ
1	Женский	43	–	T4N2M1	FOLFOX	4
2	Мужской	47	–	T3N1aM0	XELOX	3
3	Женский	72	+	T3N1cM0	XELOX	3
4	Женский	68	–	T3N2M0	FOLFOX	4
5	Женский	72	+	T4NxM0	FOLFOX	4
6	Мужской	43	–	T4aN2M1	FOLFOX	4
7	Мужской	39	–	T4aN0M0	FOLFOX	4
8	Мужской	60	+	T4aN1aM1	FOLFOX	4

Примечание: СД2 – сахарный диабет 2 типа, ХТ – химиотерапия.

при первом центрифугировании плазму повторно центрифугировали при 4°C, 20 мин, 13000 g. Супернатант разводили PBS (таблетки для приготовления буферного раствора, “Хеликон”, Россия) и фильтровали через PES-фильтры с диаметром пор 220 нм (“Nest”, Китай). Фильтрат ультрацентрифугировали дважды на ультрацентрифуге с бакет-ротором (Optima XPN 80, “Beckman Coulter”), 4°C, 90 мин, 100000 g. Полученные аликваты малых ВВ хранили при -80°C.

Для подтверждения морфологии выделенных частиц выполнена трансмиссионная электронная микроскопия. Везикулы из препаратов адсорбировали в течение 1 мин на медных сетках, покрытых карбонизированной плёнкой. Затем сетки подвергались воздействию в течение 5–10 с 0,5% уранилацетата. Препараты были изучены на микроскопе Jem1400 (“Jeol”, Япония). Гидродинамический размер и концентрация выделенных везикул изучены с помощью анализа траекторий наночастиц (nanoparticle tracking analysis, NTA) с использованием прибора NanoSight LM10 (“Malvern Instruments”, Великобритания). Предварительно образцы везикул разводили PBS в пропорциях 1:100, 1:1000 и 1:10000. Анализировали средний гидродинамический диаметр (размер везикул, их распределение) и концентрацию везикул. Для подтверждения везикулярной природы выделенных частиц исследовали уровень тетраспанинов CD81, CD63 и гликопротеина CD24 методом проточной цитометрии с укрупнением везикул на латексных частицах. Цитометрия выполнена на приборе Cytoflex (“Beckman Coulter”), полученные данные анализировались с помощью программы CytExpert 2.0 Software. Медиана интенсивности флуоресценции (MFI) ВВ была проанализирована по сравнению с изотипическими и отрицательными контролями.

Мононуклеарные лейкоциты выделяли из периферической крови условно здорового донора (52 года) без онкопатологии методом седиментации в одноступенчатом градиенте плотности фикола. Около 50 мкл ВВ окрашивали витальным красителем для клеточных мембран PKH26 в соответствии с инструкцией фирмы-производителя (LumiTrace PKH Cell Membrane Labeling Kits manual, “Lumiprobe Corp.”, Китай). Для постановки реакции интернализации готовили смесь мононуклеаров с ВВ. Около 600–700 мкл меченных PKH26 и отмытых от блокирующей сыворотки везикул инкубировали в течение 2 ч на водяной бане (Bios BW-5, Россия) при 37°C с 100 мкл суспензии PBMCs (1 млн. клеток на мл). Для блокирования неспецифического связывания смесь инкубировали с FC block antibody (“Elabscience”, Китай) в течение 15 мин, после чего клетки отмывали в PBS в течение 10 мин при 1000 g. Далее клетки инкубировали с первичными антителами к CD11b (E-AB-F10081A, “Elabscience”) в течение 20 мин, после отмывки в PBS докрашивали ядра реактивом Nuclear Blue (“ThermoFS”, США) по 1 капле на пробу; одновременно добавляли вторичные антитела anti-rat с Alexa 488 (DF7421-F488, “Affinity Biosciences”,

Китай) в рекомендуемом разведении 1:400, клетки однократно отмывали PBS, весь осадок переносили на стекло с адгезивным покрытием (Superfrost Plus, “ThermoFS”), мазок высушивали, фиксировали в изопроноле в течение 1 мин. Одновременно ставили контроли — окрашивали смесь мононуклеарных лейкоцитов без добавления ВВ по методике, представленной выше, а также готовили контрольный мазок — только окрашенные везикулы. Оценку интернализации ВВ проводили методом флуоресцентной микроскопии (флуоресцентный микроскоп Axio Imager. M2, “Carl Zeiss”, Германия). Проводили подсчёт общего количества мононуклеарных лейкоцитов крови, а также CD11b⁺ и CD11b⁺ клеток с признаками интернализации ВВ и без, на 100 клеток.

Статистическую обработку проводили с использованием программ пакета Microsoft Office Excel-2021, GraphPad Prism 8 и Statistica 10 для Windows. Различия считали статистически значимыми при $p < 0,05$. Проверку нормальности распределения исследуемых выборок проводили с использованием критерия Шапиро-Уилка. Для оценки статистической значимости вариаций признака (популяций клеток) в динамике измерений использовали непараметрический критерий Вилкоксона для связанных выборок. Для сравнения признаков в группах с низкой и высокой нейротоксичностью использовали непараметрический критерий Манна-Уитни. Выполнен непараметрический корреляционный анализ. В таблице 2 представлены коэффициенты ранговой корреляции Спирмена.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Интегральный показатель нейротоксичности значительно увеличивался у подавляющего числа больных. Нейротоксичность до начала полихимиотерапии была обусловлена наличием СД2 и проявлениями диабетической полинейропатии (рис. 1).

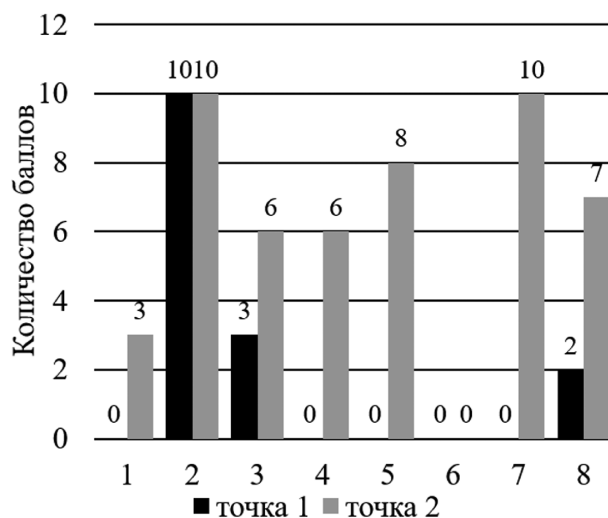


Рисунок 1. Интегральный показатель выраженности ЛИПНП по шкале NRS.

Основные характеристики выделенных циркулирующих ВВ представлены на рисунке 2.

Все препараты содержали ВВ разного размера, часть везикул (рис. 2А) имела морфологию, позволяющую идентифицировать их как малые ВВ (размеры 40–200 нм, округлая или чашеобразная форма). Анализ NTA показал, что в образцах практически не было везикул крупнее 200 нм. У больных колоректальным раком средний размер везикул составил $94,0 \pm 2,50$ нм (рис. 2Б). Связывание везикул с мечеными антителами к специфическим

маркерам тетраспанинам CD81, CD63 и CD9 (рис. 2В) подтверждало принадлежность везикул к малым ВВ.

В препаратах PBMCs были представлены CD11b-позитивными (CD11b⁺) и CD11b-негативными (CD11b⁻) клетками. В обеих точках исследования также визуализируются ВВ, свободно лежащие вне мононуклеарных лейкоцитов, и их конгломераты (рис. 3). Способность CD11b⁺ и CD11b⁻ мононуклеарных лейкоцитов здорового донора интернализировать ВВ, полученные от больных до проведения химиотерапии и после, не обнаружила значимых различий.

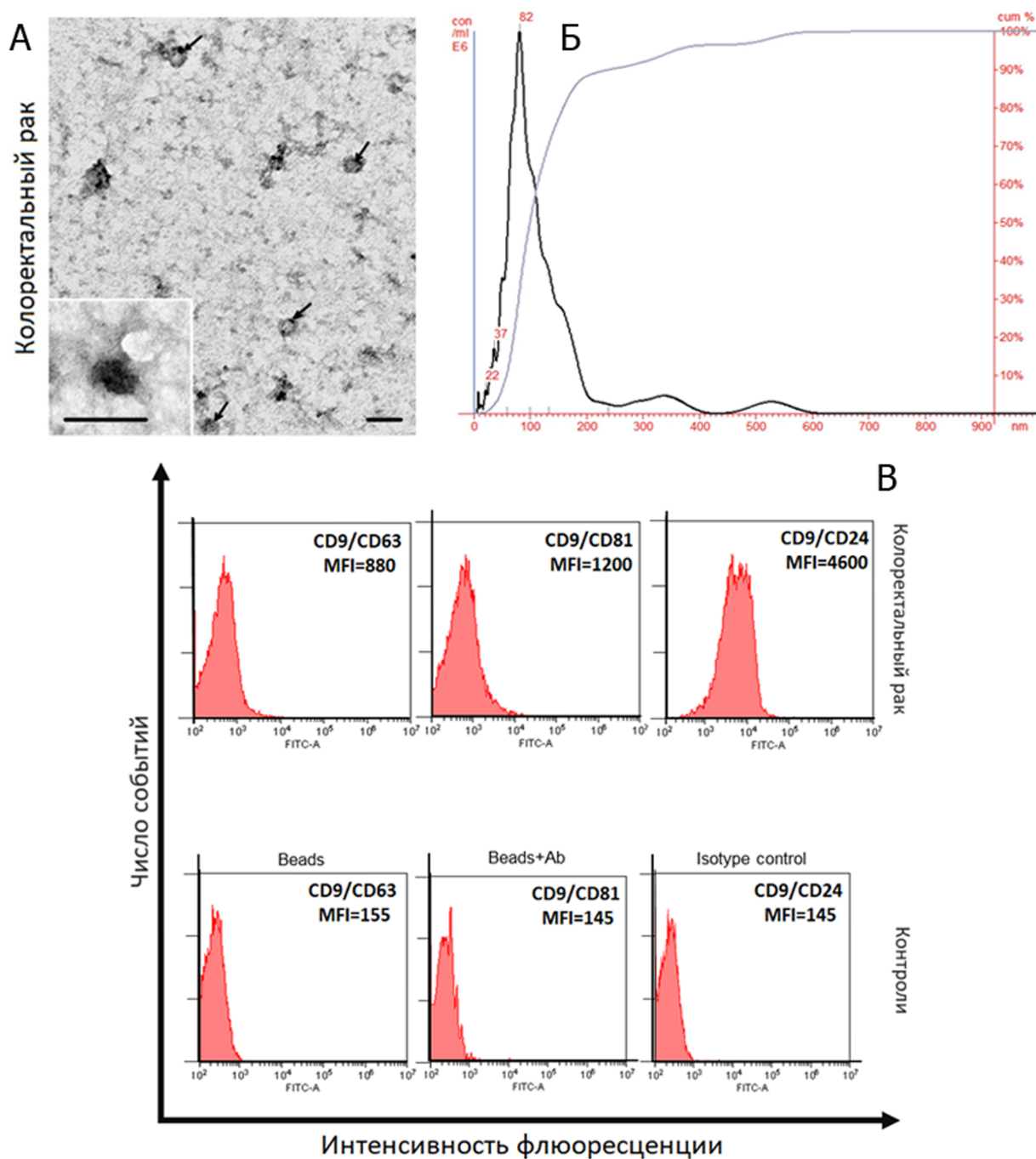


Рисунок 2. Идентификация изолированных ВВ. **А** – трансмиссионная электронная микроскопия показала наличие везикул размером не более 200 нм, на вставке показаны малые ВВ, масштабные линии соответствуют 100 нм; **Б** – распределение размеров ВВ, выделенных у пациентов с колоректальным раком, оценка с помощью NTA; **В** – экспрессия CD63, CD81 и CD24 на CD9⁺ везикулах, репрезентативные значения средних значений интенсивности флуоресценции (MFI), проточная цитометрия.

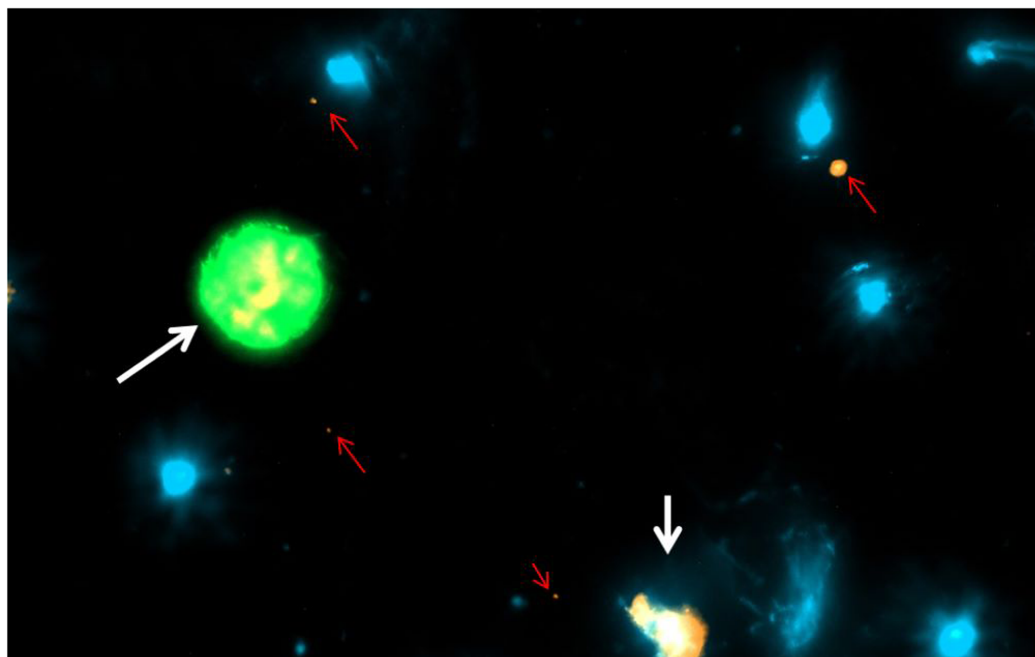


Рисунок 3. Микрофотография интернализации внеклеточных везикул мононуклеарными клетками *in vitro*, флуоресцентная микроскопия ($\times 400$). Белая стрелка – CD11b⁺ клетки (зелёная метка) с интернализированными ВВ и CD11b⁻ клетки с интернализацией ВВ в перинуклеарное пространство. Красная стрелка – ВВ без интернализации.

Таблица 2. Коэффициенты корреляции Спирмена (r) при достигнутом уровне значимости $p < 0,05$ у больных с выраженной ЛИПНП на точке 2

Параметры	NRS	CD11b ⁺ с инт., %	CD11b ⁻ с инт., %
NRS	1,000	-0,048	0,675
CD11b ⁺ с инт., %	-0,048	1,000	-0,024
CD11b ⁻ с инт., %	0,675	-0,024	1,000

Примечание: NRS – интегральный показатель нейротоксичности по шкале NRS, CD11b⁺ с инт. – CD11b⁺ клетки с интернализированными ВВ, CD11b⁻ с инт. – CD11b⁻ клетки с интернализированными ВВ

На модельной системе *in vitro* было показано, что интернализация ВВ, полученных от больных колоректальным раком с проявлением высокой нейротоксичности, была выше на уровне статистической тенденции ($p = 0,0667$), чем в группе с низкой нейротоксичностью (рис. 4В).

В точке 2 наблюдения отмечена тенденция увеличения относительного количества мононуклеарных лейкоцитов с интернализацией ВВ, полученных от больных с усилением лекарственной нейротоксичности: у пациентов с отсутствием/слабой выраженностью ЛИПНП среднее количество мононуклеарных лейкоцитов с интернализацией (сумма CD11b⁺ клеток с интернализацией и CD11b⁻ клеток с интернализацией) составило 12,24% (медиана 14,61%), а в группе с выраженной ЛИПНП — 23,62% (медиана 29,12%) (рис. 4).

Для решения задачи выявления субпопуляций клеток, чьи изменения в динамике химиотерапии были ассоциированы с проявлениями нейротоксичности, был выполнен корреляционный анализ. Выявлена прямая взаимосвязь между относительным количеством CD11b⁻ клеток с интернализированными ВВ и интегральным показателем нейротоксичности по шкале NRS на пике нейротоксичности (точка 2) ($r = 0,675$, $p < 0,05$) (табл. 2).

ОБСУЖДЕНИЕ

Поскольку функциональная активность циркулирующих ВВ, как полагают, опосредуется их интернализацией клетками-реципиентами, была исследована интернализация ВВ больных колоректальным раком на этапах полихимиотерапии. В качестве клеток-реципиентов были использованы PBMCs здорового донора, а результаты интернализации проанализированы во взаимосвязи с проявлениями ЛИПНП. Ранее было показано, что ВВ эффективно интернализуются по механизмам эндоцитоза и макропиноцитоза нейронами, глиальными клетками, в том числе Шванновскими клетками. Они несут в своем составе функционально активные белки (рецепторы, цитокины, ростовые факторы, ферменты), некодирующие РНК и могут участвовать в патогенезе ЛИПНП [13, 14]. Однако, например, экзосомы от мультипотентных мезенхимальных стволовых клеток, несущих большое количество трофических факторов, с успехом применялись для лечения диабетической периферической нейропатии [15, 16]. Считается, что интернализация ВВ нейронами и нейроглией является наиболее критичным моментом для терапевтического эффекта ВВ. Было показано, что внутривенное введение малых ВВ от нормальных

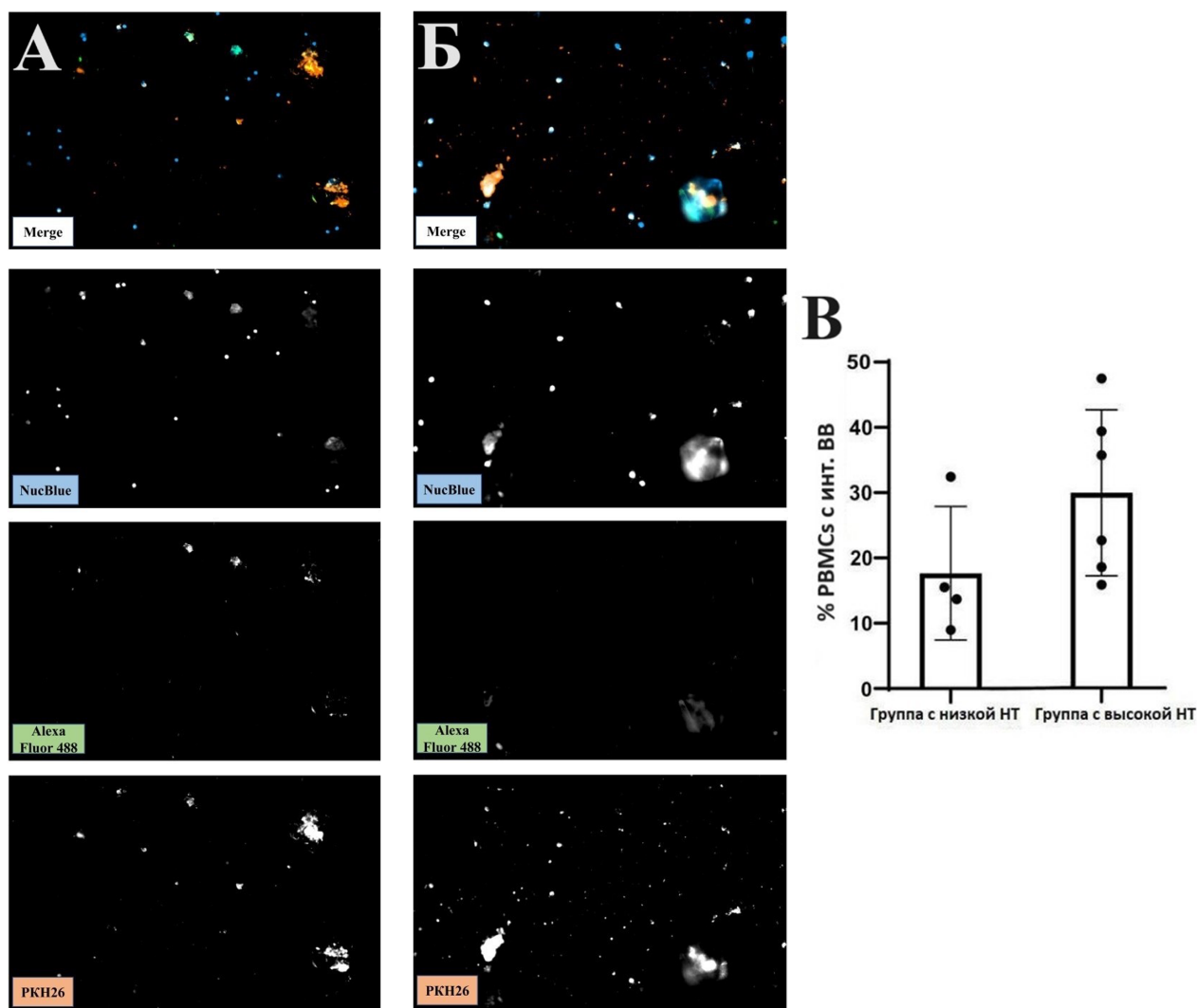


Рисунок 4. Интернализация ВВ, полученных из крови больных (точка 2) с низкой (А) и высокой (Б) степенью нейротоксичности, флуоресцентная микроскопия ($\times 200$). Процент мононуклеарных лейкоцитов с интернализацией ВВ, полученных от больных с низкой и высокой нейротоксичностью (В). Примечание: Сравнение групп с помощью непараметрического критерия Манна-Уитни, $p=0,0667$.

Шванновских клеток заметно облегчает течение периферической нейропатии у мышей с диабетом [13]. Хотя ряд молекулярных маркеров (полиморфные гены TLR6, IL4, IL-1 β , мутации в генах IL10 и IL2) предложены в качестве потенциальных молекулярных маркеров индуцированной бортезомибом полинейропатии у пациентов с множественной миеломой [17], винкрестин-индуцированной полинейропатии у детей [18] и таксан-индуцированной полинейропатии [19], однако поиск этих маркеров в доступных биологических жидкостях в настоящее время безусловно актуален. В качестве источника этих маркеров в настоящее время рассматриваются ВВ, широко представленные в плазме крови.

В нашем исследовании выявлена прямая взаимосвязь между количеством CD11b⁺ мононуклеарных лейкоцитов с интернализированными ВВ до лечения и интегральным показателем нейротоксичности по шкале NRS на пике нейротоксичности (3–4 цикла полихимиотерапии) ($r=0,675$, $p<0,05$). Расширение выборки, на наш взгляд, позволит

в перспективе выявить и валидировать объективные предикторы ЛИПНП. Из достоинств предлагаемой методики хотелось бы отметить простоту и стандартизованность выделения PBMcs — классических клеток, которые преимущественно интернализируют ВВ, простоту, быстроту (вся процедура от окрашивания ВВ до визуализации клеток с интернализированными ВВ в препарате занимает не более 6–7 ч) и относительную дешевизну методики исследования интернализации ВВ *in vitro*.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

К окончанию 3–4 курса полихимиотерапии по схемам FOLFOX или XELOX отмечена тенденция увеличения относительного количества мононуклеарных лейкоцитов периферической крови (сумма CD11b⁺ клеток с интернализацией и CD11b⁺ клеток с интернализацией) с усилением проявлений лекарственно-индуцированной полинейропатии у больных колоректальным раком. Выявлена прямая

взаимосвязь между количеством CD11b⁺ клеток с интернализированными ВВ до лечения и интегральным показателем нейротоксичности по шкале NRS на пике нейротоксичности (3–4 цикла химиотерапии). Расширение выборки позволит в перспективе выявить и валидировать объективные предикторы лекарственно-индуцированной полинейропатии.

ФИНАНСИРОВАНИЕ

Работа выполнена в рамках госзадания по теме НИР по Фундаментальным научным исследованиям FGW-2022-0019. Работа выполнена с использованием оборудования ЦКП Томского НИМЦ “Медицинская геномика”.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Получено письменное информационное согласие пациентов и здорового добровольца на использование их биологического материала в исследовании. Исследование проведено в соответствии с Хельсинкской декларацией и одобрено этическим комитетом НИИ онкологии Томского НИМЦ (протокол №10 от 10.02.2022 г.).

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

ЛИТЕРАТУРА

- Gustafson C.M., Shepherd A.J., Miller V.M., Jayachandran M. (2015) Age- and sex-specific differences in blood-borne microvesicles from apparently healthy humans. *Biol. Sex. Differ.*, **6**, 10. DOI: 10.1186/s13293-015-0028-8
- Eitan E., Green J., Bodogai M., Mode N.A., Bæk R., Jørgensen M.M., Freeman D.W., Witwer K.W., Zonderman A.B., Biragyn A., Mattson M.P., Noren Hooten N., Evans M.K. (2017) Age-related changes in plasma extracellular vesicle characteristics and internalization by leukocytes. *Sci. Rep.*, **7**(1), 1342. DOI: 10.1038/s41598-017-01386-z
- Freeman D.W., Noren Hooten N., Eitan E., Green J., Mode N.A., Bodogai M., Zhang Y., Lehrmann E., Zonderman A.B., Biragyn A., Egan J., Becker K.G., Mattson M.P., Ejiogu N., Evans M.K. (2018) Altered extracellular vesicle concentration, cargo, and function in diabetes. *Diabetes*, **67**(11), 2377–2388. DOI: 10.2337/db17-1308
- Rutman A.K., Negi S., Gasparrini M., Hasilo C.P., Tchervenkova J., Paraskevas S. (2018) Immune response to extracellular vesicles from human islets of Langerhans in patients with type 1 diabetes. *Endocrinology*, **159**(11), 3834–3847. DOI: 10.1210/en.2018-00649
- Hellwinkel J.E., Redzic J.S., Harland T.A., Gunaydin D., Anchordoquy T.J., Graner M.W. (2016) Glioma-derived extracellular vesicles selectively suppress immune responses. *Neuro Oncol.*, **18**(4), 497–506. DOI: 10.1093/neuonc/nov170
- Czernek L., Chworos A., Duechler M. (2015) The uptake of extracellular vesicles is affected by the differentiation status of myeloid cells. *Scand. J. Immunol.*, **82**(6), 506–514. DOI: 10.1111/sji.12371
- Pantazopoulou M., Lamprokostopoulou A., Karampela D.S., Alexaki A., Delis A., Coens A., Samiotaki M., Kriebardis A.G., Melki R., Pagakis S.N., Stefanis L., Vekrellis K. (2023) Differential intracellular trafficking of extracellular vesicles in microglia and astrocytes. *Cell. Mol. Life Sci.*, **80**(7), 193. DOI: 10.1007/s00018-023-04841-5
- Reeves B.N., Dakhil S.R., Sloan J.A., Wolf S.L., Burger K.N., Kamal A., Le-Lindqwister N.A., Soori G.S., Jasowski A.J., Kelaghan J., Novotny P.J., Lachance D.H., Loprinzi C.L. (2012) Further data supporting that paclitaxel-associated acute pain syndrome is associated with development of peripheral neuropathy: North Central Cancer Treatment Group trial N08C1. *Cancer*, **118**(20), 5171–5178. DOI: 10.1002/cncr.27489
- Золотовская И.А., Давыдкин И.Л., Локштанова Т.М., Орлов А.Е. (2018) Клинические проявления полинейропатии у онкологических больных на фоне химиотерапии и возможность их фармакокоррекции (результаты Наблюдательной Программы Посейдон). *Архив внутренней медицины*, **8**(2), 137–144. [Zolotovskaya I.A., Davydkin I.L., Lokshtanova T.M., Orlov A.E. (2018) Clinical signs of chemotherapy-induced neuropathy in cancer patients and pharmacotherapy correction options. *The Russian Archives of Internal Medicine*, **8**(2), 137–144.] DOI: 10.20514/2226-6704-2018-8-2-137-144
- Юнусова Н.В., Дандарова Е.Э., Сваровский Д.А., Денисов Н.С., Костромицкий Д.Н., Патышева М.Р., Черемисина О.В., Спирина Л.В. (2021) Продукция и интернализация внеклеточных везикул в норме и в условиях гипергликемии и инсулинорезистентности. *Биомедицинская химия*, **67**(6), 465–474. [Yunusova N.V., Dandarova E.E., Svarovsky D.A., Denisov N.S., Kostromitsky D.N., Patysheva M.R., Cheremisina O.V., Spirina L.V. (2021) Production and internalization of extracellular vesicles in normal and under conditions of hyperglycemia and insulin resistance. *Biomeditsinskaya Khimiya*, **67**(6), 465–474.] DOI: 10.18097/PBMC20216706465
- Common Terminology Criteria for Adverse Events (CTCAE) Version 5.0. Retrieved April 26, 2024, from: https://ctep.cancer.gov/protocoldevelopment/electronic_applications/docs/ctcae_v5_quick_reference_5x7.pdf
- Wang L., Chopp M., Szalad A., Lu X., Zhang Y., Wang X., Cepparulo P., Lu M., Li C., Zhang Z.G. (2020) Exosomes derived from Schwann cells ameliorate peripheral neuropathy in type 2 diabetic mice. *Diabetes*, **69**(4), 749–759. DOI: 10.2337/db19-0432
- Zhang Y., Li C., Qin Y., Cepparulo P., Millman M., Chopp M., Kemper A., Szalad A., Lu X., Wang L., Zhang Z.G. (2021) Small extracellular vesicles ameliorate peripheral neuropathy and enhance chemotherapy of oxaliplatin on ovarian cancer. *J. Extracell. Vesicles*, **10**(5), e12073. DOI: 10.1002/jev2.12073
- Misawa S., Denda T., Kodama S., Suzuki T., Naito Y., Kogawa T., Takada M., Suichi T., Shiosakai K., Kuwabara S. (2023) MiroCIP study group. Efficacy and safety of mirogabalin for chemotherapy-induced peripheral neuropathy: A prospective single-arm trial (MiroCIP study). *BMC Cancer*, **23**(1), 1098. DOI: 10.1186/s12885-023-11560-4
- Zhao H., Shang Q., Pan Z., Bai Y., Li Z., Zhang H., Zhang Q., Guo C., Zhang L., Wang Q. (2018) Exosomes from adipose-derived stem cells attenuate adipose inflammation and obesity through polarizing M2 macrophages and beiging in white adipose tissue. *Diabetes*, **67**(2), 235–247. DOI: 10.2337/db17-0356

16. Yunusova N.V., Popova N.O., Udintseva I.N., Klyushina T.S., Kazantseva D.V., Smirnova L.P. (2023) The role of intravesicular proteins and the protein corona of extracellular vesicles in the development of drug-induced polyneuropathy. *Curr. Issues Mol. Biol.*, **45**(4), 3302–3314. DOI: 10.3390/cimb45040216
17. Назарова Е.Л., Минаева Н.В., Зотина Е.Н., Докишина И.А., Сухорукова Э.Е., Шардаков В.И. (2019) Молекулярные маркеры бортезомиб-индуцированной полинейропатии у больных множественной миеломой. *Гематология и трансфузиология*, **64**(1), 79–89. [Nazarova E.L., Minaeva N.V., Zotina E.N., Dokshina I.A., Suhorukova E.E., Shardakov V.I. (2019) Molecular features of bortezomib-induced neuropathy on patient with multiple myeloma. *Russian Journal of Hematology and Transfusiology*, **64**(1), 79–89.] DOI: 10.35754/0234-5730-2019-64-1-79-89
18. Li L., Sajdyk T., Smith E.M.L., Chang C.W., Li C., Ho R.H., Hutchinson R., Wells E., Skiles J.L., Winick N., Martin P.L., Renbarger J.L. (2019) Genetic variants associated with vincristine-induced peripheral neuropathy in two populations of children with acute lymphoblastic leukemia. *Clin. Pharmacol. Ther.*, **105**(6), 1421–1428. DOI: 10.1002/cpt.1324
19. Chen E.I., Crew K.D., Trivedi M., Awad D., Maurer M., Kalinsky K., Koller A., Patel P., Kim J., Hershman D.L. (2015) Identifying predictors of taxane-induced peripheral neuropathy using mass spectrometry-based proteomics technology. *PLoS ONE*, **10**(12), e0145816. DOI: 10.1371/journal.pone.0145816

Поступила в редакцию: 28. 06. 2024.
После доработки: 18. 07. 2024.
Принята к печати: 22. 07. 2024.

INTERNALIZATION OF EXTRACELLULAR VESICLES OF CANCER PATIENTS BY PERIPHERAL BLOOD MONONUCLEAR CELLS DURING POLYCHEMOTHERAPY: CONNECTION WITH NEUROTOXICITY

N.V. Yunusova^{1,2}, E.V. Kaigorodova^{1,2}, P.A. Panfilova^{2*}, N.O. Popova¹,
I.N. Udintseva¹, I.V. Kondakova¹, D.A. Svarovsky^{1,2}, V.E. Goldberg¹

¹Cancer Research Institute, Tomsk National Research Medical Center, Russian Academy of Sciences,
5 Kooperativniy lane, Tomsk, 634009 Russia; *e-mail: teofen@yandex.ru

²Siberian State Medical University, Tomsk, Russia

Extracellular vesicles (EVs), exhibiting their functional activity after internalization by recipient cells, are involved in the pathogenesis of drug-induced polyneuropathy (DIPN), a common complication of antitumor therapy. In this work, the internalization of EVs obtained from colorectal cancer patients undergoing polychemotherapy and its relationship with neurotoxicity were assessed using a model system of mononuclear leukocytes. Circulating EVs were isolated from 8 colorectal cancer patients who received antitumor therapy according to the FOLFOX or XELOX regimens before the start of chemotherapy (point 1) and after 3–4 courses (point 2). Mononuclear leukocytes of a healthy donor served as a cellular model system for EV internalization *in vitro*. EV internalization was assessed using fluorescence microscopy. It was shown that internalization of EVs obtained from colorectal cancer patients with high neurotoxicity was higher than in the group with low neurotoxicity. The ability of CD11b-positive (CD11b⁺) and CD11b-negative (CD11b[−]) mononuclear leukocytes of a healthy donor to internalize EVs obtained from patients before and after chemotherapy did not reveal significant differences. A direct relationship was found between the relative number of CD11b[−] cells with internalized EVs and the integral index of neurotoxicity according to the NRS scale at the peak of its manifestation (point 2) ($r=0.675$, $p<0.05$). By the end of 3–4 courses of polychemotherapy using FOLFOX or XELOX regimens, a tendency towards an increase in the relative number of peripheral blood mononuclear leukocytes (the sum of CD11b⁺ and CD11b[−] cells) with internalized EVs with increased manifestations of DIPN in patients with colorectal cancer was observed.

The whole English version is available at <http://pbmc.ibmc.msk.ru>.

Key words: extracellular vesicles; internalization; peripheral blood mononuclear cells; colorectal cancer; polychemotherapy; drug-induced polyneuropathy

Funding. The work was carried out within the framework of the State Assignment on the research topic Fundamental Scientific Research FGW-2022-0019. Experiments were performed using the equipment of the Center for Collective Use “Medical Genomics” of the Tomsk National Research Center.

Received: 28.06.2024; revised: 18.07.2024; accepted: 22.07.2024.