Биомедицинская химия, 2018 том 64, вып. 1, с. 110-114.

КЛИНИКО-ДИАГНОСТИЧЕСКИЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

©Коллектив авторов

СРАВНИТЕЛЬНЫЙ СУБПОПУЛЯЦИОННЫЙ АНАЛИЗ ЭКЗОСОМ ПЛАЗМЫ КРОВИ БОЛЬНЫХ ЗЛОКАЧЕСТВЕННЫМИ НОВООБРАЗОВАНИЯМИ

С.Н. Тамкович[1,3]*#, Н.В. Юнусова[2]#, А.К. Сомов[1], С.Г. Афанасьев[2], Г.В. Какурина[2], Е.С. Колегова[2], Е.А. Тугутова[2], П.П. Лактионов[1], И.В. Кондакова[2]

[1]Институт химической биологии и фундаментальной медицины Сибирского отделения РАН, 630090 Новосибирск, пр. ак. Лаврентьева, 8; эл. почта: s.tamk@niboch.nsc.ru
[2]НИИ онкологии Томский НИМЦ, Томск
[3]Новосибирский государственный университет, Новосибирск

Для увеличения чувствительности и специфичности разрабатываемых методов диагностики онкологических заболеваний с использованием экзосом крови необходим этап пре-селекции опухолевых экзосом из общего пула циркулирующих в крови микровезикул. В представленной работе выявлены универсальные белки, экспрессия которых повышена в составе экзосом крови больных колоректальным раком, плоскоклеточными карциномами головы и шеи и раком лёгкого. Использование антител против мажорных универсальных белков экзосом позволит в дальнейшем разработать простой и высокопроизводительный метод аффинного выделения опухолевых экзосом.

Ключевые слова: экзосомы, трансмиссионная электронная микроскопия, проточная цитофлуориметрия, белковый спектр, колоректальный рак, плоскоклеточные карциномы головы и шеи, рак лёгкого

DOI: 10.18097/PBMC20186401110

ВВЕДЕНИЕ

Злокачественные онкологические заболевания на протяжении многих лет занимают лидирующие позиции по показателям заболеваемости и смертности среди населения, как в мире, так и в России [1]. Несмотря на эффективность инструментальных методов диагностики злокачественных новообразований, эти методы мало информативны для выявления заболевания на начальных стадиях, дифференциальной диагностики злокачественных новообразований, скрининга пациентов группы риска и мониторнига больных после курсов терапии [2]. Надежные протеомные маркеры для выявления онкологических заболеваний в настоящее время отсутствуют, а широко используемые белковые маркеры в связи с низкой чувствительностью и специфичностью применимы только в сочетании с УЗИ/МРТ для мониторинга эффективности противоопухолевой терапии [2]. Действительно, низкая эффективность выявления опухолеспецифических белков в крови определяется в первую очередь их низкой концентрацией, экспрессией при неонкологических процессах и в норме и высокой концентрацией балластных белков. Поскольку в крови онкологических больных присутствуют экзосомы (везикулы эндоцитозного происхождения, размером 30-100 нм), секретируемые опухолевыми клетками и несущие в своем составе биополимеры, характерные для родительских клеток, эти везикулы всё чаще используют в качестве материала для “жидкой биопсии” опухолей [3, 4]. Экзосомы могут быть использованы не только для выявления мишеней для диагностики и тераностики, но и выяснения особенностей функционального статуса клеток, профилирования протеома опухолей. Более того, исследование протеома экзосом крови онкологических больных имеет огромное преимущество перед исследованием протеома плазмы крови, поскольку позволяет удалить из анализа основной набор белков крови и повысить чувствительность за счёт концентрирования образца экзосом [5]. Однако по данным запроса в базе публикаций PubMed, исследование протеома плазмы/сыворотки крови онкологических больных представлено в 611 работах, в то время как протеом экзосом плазмы крови практически не исследован – всего 1 публикация [6].

Развитие диагностических методов, основанных на анализе экзосом, сдерживается трудоёмкостью и низкой эффективностью используемых в настоящее время методов выделения. Кроме того, поскольку в кровотоке пациентов циркулируют экзосомы, продуцируемые не только патологическими, но и нормальными клетками, для увеличения чувствительности и специфичности разрабатываемых аналитических систем необходим этап предварительной селекции определенной субпопуляции экзосом.

Отсутствие в научной литературе данных об универсальных белках в составе циркулирующих в крови онкологических больных экзосом определило цель исследования как изучение субпопуляционного состава экзосом в плазме пациентов с различными новообразованиями: раком легкого, колоректальным раком, а также плоскоклеточными карциномами головы и шеи.

МЕТОДИКА

Образцы крови здоровых доноров (n=10, 5 мужчин и 5 женщин, средний возраст 52,2±2,51 лет) были получены из Центральной клинической

* - адресат для переписки
# -авторы внесли равный вклад в работу

больницы СО РАН, первичных больных колоректальным раком (n=20), раком лёгкого (n=5) и плоскоклеточными карциномами головы и шеи (n=10) из Клиники НИИ Онкологии Томского НИМЦ. Клиническая характеристика пациентов представлена в таблице 1. Работу проводили с соблюдением принципов добровольности и конфиденциальности в соответствии с Основами законодательства РФ об охране здоровья граждан. Стадию заболевания определяли по TNM-классификации. Образцы крови после забора путём венепункции в вакутейнеры, содержащие K_3EDTA, хранили при 4°C и обрабатывали в ближайший час.

Экзосомы из плазмы крови выделяли путём ультрафильтрации с последующим ультрацентрифугированием как описано ранее [7]. Экзосомы ресуспендировали в 200 мкл фосфатно-солевого буфера (10 мМ фосфатный буфер, 0,15 М NaCl, pH 7,5) (ФБ), замораживали в жидком азоте и хранили при -80°C.

Для оценки концентрации белка экзосом использовали коммерческий набор NanoOrange Protein Quantitation kit (“Invitrogen”, Великобритания) в соответствии с рекомендациями производителя.

Трансмиссионную электронную микроскопию и типирование экзосом методом проточной цитофлуориметрии проводили как описано ранее [7]. В частности, латексные частицы (“Invitrogen”) покрывали моноклональными антителами против CD9 (“BD bioscience”, Великобритания) либо против CD24 (“Abcam”, Великобритания) и затем связывали с экзосомами. Оставшиеся реакционные центры блокировали глицином, комплексы частиц с антителами и экзосомами отмывали и вносили иммуноглобулин G (“BD bioscience”). Сорбированные на покрытых антителами к тетраспанинам латексных гранулах экзосомы были окрашены коньюгированными с флуорохромом (ФИТЦ) антителами к специфическим экзосомальным белкам CD9, CD24, CD63 и CD81 (“BD bioscience”). Цитофлуориметрия была выполнена на проточном цитофлуориметре FACS Canto II (“Bioline”, США). В выделенной популяции экзосом анализировали медиану интенсивности флуоресценции (MFI) в сравнении с изотипическим контролем (“BD Bioscience”) и отрицательными контролями.

Для гель-электрофоретического разделения на первом этапе белки экзосом лизировали в буфере, содержащем 62 мМ трис-HCl, 2% додецилсульфат натрия (SDS), 40 мМ дитиотреитол, pH 6,8 на льду в течение 10 мин, затем прогревали при 95°C в течение 10 мин и центрифугировали при комнатной температуре при 10000 *g* в течение 10 мин. Для разделения белков использовали 10-20% градиентный SDS-содержащий ПААГ. В качестве стандартной смеси белков для определения масс использовали набор маркеров “PageRuler Prestained Protein Ladder” (10 кДа – 180 кДа, “Thermo Scientific”, США). Визуализацию белковых пятен в гелях осуществляли методом окрашивания нитратом серебра с сульфатом натрия [8].

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Для проведения сравнительного анализа субпопуляционного состава экзосом в норме и при различных онкологических заболеваниях, были сформированы группы клинически здоровых доноров и пациентов с плоскоклеточными карциномами головы и шеи, раком лёгкого и колоректальным раком.

Для подтверждения экзосомальной природы выделенных микровезикул “Обществом по изучению внеклеточных везикул” рекомендованы оценка размера и выявление экзосомальных мембранных или цитозольных белков методами Вестерн-блоттинга либо проточной цитофлуориметрии [9].

Сочетание ультрафильтрации и двойного ультрацентрифугирования позволяет получить препараты везикул без примесей частиц более 100 нм, а форма и размер этих везикул соответствуют характеристикам экзосом, выделенных из других биологических жидкостей [10-13]. В полученных нами препаратах основная часть везикул из плазмы здоровых доноров и онкологических больных имела размеры 40-100 нм и морфологические характеристики экзосом [7]. Не было обнаружено морфологических отличий экзосом, полученных из плазмы крови здоровых доноров и пациентов с различными онкологическими заболеваниями.

Антитела к рецепторам семейства тетраспанинов CD63, CD9 и CD81 являются обязательным структурным компонентом мембраны экзосом [14]. Кроме того, рецептор CD9 представлен на многих гематопоэтических и эпителиальных клетках [15, 16], рецептор CD63 также экспрессируется в гематопоэтических клетках и в тканевых макрофагах, а рецептор CD81 экспрессируется гематопоэтическими, эндотелиальными и

Таблица 1. Клинико-морфологическая характеристика больных колоректальным раком, плоскоклеточными карциномами головы и шеи и раком лёгкого

Показатели	Колоректальный рак, n= 20	Плоскоклеточные карциномы головы и шеи, n=10	Рак лёгкого, n=5
Средний возраст, M±m лет	58,9±2,22	55,9±1,14	60,2±6,0
Распределение по полу: мужчины женщины	 10 10	 7 3	 3 2
Гистологический тип: аденокарцинома плоскоклеточный рак	 20 0	 0 10	 3 2
Стадия (TNM, 2012)	$T_{2-4a}N_{0-2}M_0$	$T_{2-4a}N_{0-2}M_0$	$T_{2-4}N_{0-1}M_0$

эпителиальными клетками [15], при этом не экспрессируется эритроцитами, тромбоцитами и нейтрофилами. Рецептор CD24 экспрессируется в гемопоэтических клетках, в частности В-лимфоцитах различной степени зрелости, на гранулоцитах, а также эндотелиоцитах. Сорбированные на покрытых антителами к тетраспанинам латексных гранулах экзосомы были окрашены коньюгированными с флуорохромом (ФИТЦ) антителами к специфическим экзосомальным белкам. Предложенная модификация метода оценки экспрессии экзосомальных мембранных протеинов путём комбинирования неконьюгированных и коньюгированных антител позволяет охарактеризовать различные субпопуляции экзосом. По убыванию интенсивности MFI в крови здоровых доноров и онкологических больных были идентифицированы следующие субпопуляции экзосом:

CD24/CD9>CD9/CD81>CD9/CD63=CD24/CD63 – для здоровых доноров,

CD9/CD24>CD9/CD81>CD24/CD81> CD9/CD63=CD24/CD9>CD24/CD63 – для больных колоректальным раком,

CD9/CD24>CD9/CD81>CD24/CD81>CD9/CD63 =CD24/CD63 – для больных с плоскоклеточными карциномами головы и шеи,

CD9/CD24>CD9/CD81=CD24/CD81>CD9/CD63 =CD24/CD63 – для больных раком лёгкого.

Таким образом, различия в субпопуляционном составе экзосом больных местно-распространёнными формами рака (колоректальный рак, плоскоклеточные карциномы головы и шеи, рак лёгкого) минимальны (табл. 2). Наиболее часто в крови онкологических больных встречаются экзосомы, экспрессирующие рецепторы CD9, CD24 и CD81, которые, по-видимому, были секретированы эпителиоцитами и клетками эндотелия и крови.

Повышенная экспрессия CD9 и CD81 на поверхности экзосом плазмы крови в норме и при колоректальном раке и карциномах головы и шеи позволяет предположить, что, используя методы иммуносорбции после осаждения ультрацентрифугированием суммарного пула микровезикул возможно обогащение опухоле-специфическими экзосомами.

Концентрация экзосомального белка в полученных препаратах может косвенно указывать на содержание экзосом в крови. На рисунке 1 приведены значения концентрации белка экзосом, выделенных из плазмы крови здоровых доноров и больных различными

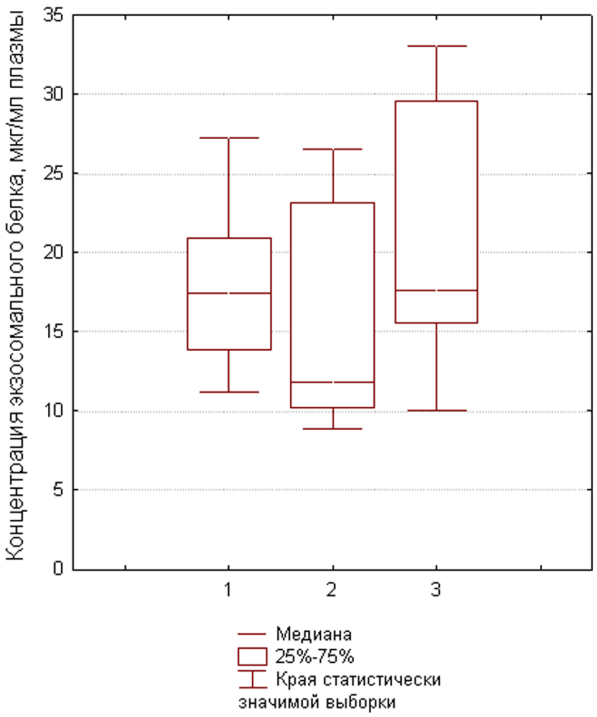

Рисунок 1. Концентрация экзосомального белка в плазме крови здоровых доноров (1), больных колоректальным раком (2) и больных с карциномами головы и шеи (3).

онкологическими заболеваниями. При помощи интеркалирующего красителя NanoOrange™ показано, что при развитии онкологического заболевания с местно-распространёнными формами не происходит достоверного изменения концентрации везикул в плазме крови здоровых доноров, больных с колоректальным раком и больных с карциномами головы и шеи (медиана составила 17,5 мкг/мл, 11,9 мкг/мл и 17,6 мкг/мл крови, соответственно).

Для сравнения спектра молекулярного веса белков в составе циркулирующих в крови экзосом, белки были проанализированы при помощи 10-20%-ного SDS-диск-электрофореза (рис. 2). Для каждого образца экзосом получали как минимум три электрофореграммы. Совпадение индивидуальных белков на геле свидетельствует об адекватности экспериментально подобранных условий для выделения и разделения белков, а также о достоверности полученных данных. С помощью градиентного диск-электрофореза было

Таблица 2. Экспрессия CD24, CD63 и CD81 на поверхности экзосом плазмы крови здоровых доноров и онкологических больных

	CD9-позитивные экзосомы			CD24-позитивные экзосомы		
	Экспрессия CD24	Экспрессия CD63	Экспрессия CD81	Экспрессия CD9	Экспрессия CD63	Экспрессия CD81
Норма	-	509±75	639±96	1195±180	516±75	-
Колоректальный рак	1200±100	720±100	1020±133	680±101	500±65	800±90
Карциномы головы и шеи	1480±140	600±70	1360±180	-	600±80	700±89
Рак лёгкого	1220±100	610±70	750±95	-	620±60	730±96

Примечание. Представлены среднее значение медианы интенсивности флуоресценции (MFI) ± ошибка среднего.

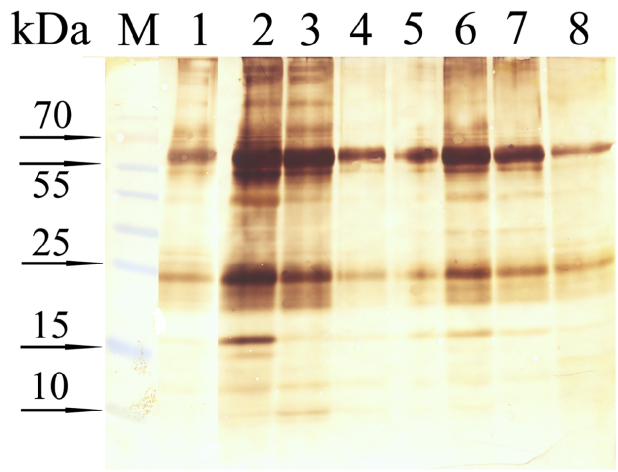

Рисунок 2. Анализ белков экзосом, выделенных из плазмы крови здоровых доноров и онкологических больных. Белки разделяли 10-20% SDS-диск электрофорезом, переносили на нитроцеллюлозную мембрану и окрашивали коллоидным серебром. М - маркер молекулярного веса белков “PageRuler Prestained Protein Ladder” (10 кДа - 180 кДа, “Thermo Scientific”), 1 - белки экзосом плазмы крови здорового донора, 2-4 - белки экзосом плазмы крови больных колоректальным раком, 5-6 - белки экзосом плазмы крови больных с карциномами головы и шеи, 7-8 - белки экзосом плазмы крови больных раком лёгкого.

установлено, что в полученных препаратах экзосом присутствуют белки с молекулярной массой от 12 до 250 кДа, с преобладающими мажорными компонентами 20-70 кДа. Необходимо отметить, что Palazzolo с соавт. [16] был получен аналогичный спектр молекулярных масс белков при протеомном исследовании экзосом культуральной среды клеток линии MDA-MB-231 (карцинома молочной железы). Авторы обнаружили, что по уровню экспрессии и количеству белков спектр экзосомальных белков плазмы крови онкологических больных отличается от таковых для здоровых доноров. В составе всех образцов экзосом представлены мажорные белки с молекулярной массой 70 кДа, 55 кДа, 26 кДа и 20 кДа. В крови онкологических больных были выявлены универсальные экзосомальные белки 15 кДа и 10 кДа, а также в большинстве случаев гиперэкспрессированы белки с молекулярной массой 70 кДа, 43 кДа и 26 кДа.

Идентичность большинства мажорных экзосомальных белков как в норме, так и при онкологических заболеваниях, может объясняться общими механизмами генерации везикул этого типа, а также наличием в кровотоке экзосом не только из патологически изменённых, но и из нормальных клеток. В дальнейшей работе выявленные опухоле-ассоциированные белки планируется идентифицировать методом MALDI TOF для разработки метода предварительной селекции опухолевых экзосом из общего пула экзосом крови, что позволит увеличить эффективность разработки диагностических систем к различным онкологическим заболеваниям.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ И ВЫВОДЫ

Полученные результаты свидетельствуют о том, что в плазме крови в норме и при развитии онкологических заболеваний циркулируют различные типы экзосом. Для обогащения опухоле-ассоциированными экзосомами необходим этап пре-селекции методом иммуносорбции с использованием антител против CD9 и CD81, а также антител к белкам с молекулярными массами 15 кДа и 10 кДа, которые являются универсальными маркерами. Увеличение содержания экзосом опухолевого происхождения в выделенных препаратах микровезикул из плазмы крови онкологических больных позволит повысить чувствительность и специфичность диагностической системы, снизить “шум” мажорных белков экзосом, секретируемых нормальными клетками.

БЛАГОДАРНОСТИ

Работа выполнена при поддержке гранта БОР (№ VI.62.1.4).

ЛИТЕРАТУРА

1. *Джемал А., Винеис П., Брей Ф., Торре Л., Форман Д.* (2014) Атлас современной онкологии. Издание второе. Атланта, Джорджия: Американское онкологическое общество.
2. *Тамкович С.Н., Войцицкий В.Е., Лактионов П.П.* (2014) Биомед. химия, **60**, 141-160. DOI: 10.18097/PBMC20146002141
3. *Choi D.S., Kim D.K., Kim Y.K., Gho Y.S.* (2013) Proteomics, **13**, 1554-1571.
4. *Sempere L.F., Keto J., Fabbri M.* (2017) Cancers (Basel), **9**, pii: E71. DOI: 10.3390/cancers9070071.
5. *Boukouris S., Mathivanan S.* (2015) Proteomics Clin. Appl., **9**, 358-367.
6. *Clark D.J., Fondrie W.E., Liao Z., Hanson P.I., Fulton A., Mao L., Yang A.J.* (2015) Anal. Chem., **87**, 10462-10469.
7. *Тамкович С.Н., Юнусова Н.В., Стахеева М.Н., Сомов А.К., Фролова А.Е., Кирюшина Н.А., Афанасьев С.Г., Григорьева А.Е., Лактионов П.П., Кондакова И.В.* (2017) Биомед. химия, **63**, 165-169. DOI: 10.18097/PBMC20176302165
8. *Галь Э., Медьеши Г., Верецкеи Л.* (1982) Электрофорез в разделении биологических макромолекул. М.:Мир.
9. *Lötvall J., Hill A.F., Hochberg F., Buzás E.I., Di Vizio D., Gardiner C., Gho Y.S., Kurochkin I.V., Mathivanan S., Quesenberry P. et al.* (2014) J. Extracell. Vesicles, **3**, 26913. DOI: 10.3402/jev.v3.26913
10. *Lässer C., Alikhani V.S., Ekström K., Eldh M., Paredes P.T., Bossios A., Sjöstrand M., Gabrielsson S., Lötvall J., Valadi H.* (2011) J. Transl. Med., **9**, 9.
11. *Théry C., Amigorena S., Raposo G.* (2006) Curr. Protoc. Cell Biol., **3.22**, 3.22.1-3.22.29.
12. *Григорьева А.Е., Тамкович С.Н., Еремина А.В., Тупикин А.Е., Кабилов М.Р., Черных В.В., Власов В.В., Лактионов П.П., Рябчикова Е.И.* (2016) Биомед. химия, **62**, 99-106. DOI: 10.18097/PBMC20166201099
13. *Samsonov R., Shtam T., Burdakov V., Glotov A., Tsyrlina E., Berstein L., Nosov A., Evtushenko V., Filatov M., Malek A.* (2016) Prostate, **76**, 68-79.

14. *Andreu Z., Yanez-Mo M*. (2014) Front. Immunol., **5**, 442.
15. *King J.B., von Furstenberg R.J., Smith B.J., McNaughton K.K., Galanko J.A., Henning C.J.* (2012) Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol., **303**, G443-G452.
16. *Palazzolo G., Albanese N.N., Gianluca D.C., Gygax D., Vittorelli M.L., Pucci-Minafram I.* (2012) Anticancer Res., **32**, 847-860.

Поступила: 11. 10. 2017.
Принята к печати: 01. 11. 2017.

COMPARATIVE SUB-POPULATION ANALYSIS OF EXOSOMES FROM BLOOD PLASMA OF CANCER PATIENTS

S.N. Tamkovich[1,3], N.V. Yunusova[2], A.K. Somov[1], S.G. Afanas'ev[2], G.V. Kakurina[2], E.S. Kolegova[2], E.A. Tugurova[2], P.P. Laktionov[1], I.V. Kondakova[2]

[1]Institute of Chemical Biology and Fundamental Medicine, Siberian Branch of Russian Academy of Sciences, 8 Lavrentieva av., Novosibirsk, 630090 Russia; e-mail: s.tamk@niboch.nsc.ru
[2]Tomsk Cancer Research Institute, Tomsk, Russia
[3]Novosibirsk State University, Novosibirsk, Russia

To increase the sensitivity and specificity of the developed methods for diagnosis of oncological diseases using exosomes of blood, a stage of pre-selection of tumor exosomes from a common pool of circulating microvesicles is required. In the present work, universal proteins have been identified, their expression has been increased in the exosomes of patients with colorectal cancer, head and neck squamous cell carcinomas, and lung cancer. The use of antibodies against major exosomal proteins will further develop a simple and high-performance method of affinity isolation of tumor exosomes.

Key words: exosomes, transmission electron microscopy, flow cytometry, proteins, colorectal cancer, head and neck squamous cell carcinoma, lung cancer