

УДК: 616.33-007.64:616.395

**ЭКЗОСОМЫ ОПУХОЛЕВЫХ КЛЕТОК КАК КЛЮЧЕВОЙ ФАКТОР
МЕТАСТАЗИРОВАНИЯ: НОВЫЕ ВОЗМОЖНОСТИ ДИАГНОСТИКИ И
ТЕРАПИИ**

**Д.Т.Абдуллаева, К.Ш.Сайфиддин Ходжи, К.М.Аманкелдиева, Ш.У.Суванкулова
У.Д.Ермахаматов, М.П.Абдуалиева, Д.Р.Орифжонов, Р.Р.Рахматхонов,
М.Н.Куанышкалиев, Н.Р.Токаев, Р.Ф.Фархиддинов, М.Ш.Шербаева, Д.А.Ахмедов,
Д.С.Самадов. И.И.Саъдуллаев, А.А.Ахмаджонов, М.Ш.Суюнова**
Ташкентский государственный медицинский университет

Аннотация: Экзосомы — это внеклеточные везикулы размером 30–150 нм, секретлируемые опухолевыми клетками, которые играют ключевую роль в метастазировании и формировании микроокружения опухоли. В данной работе представлен новый подход к исследованию экзосом на основе комбинации наночастичной флуоресцентной микроскопии, проточной цитометрии и масс-спектрометрического анализа белков и miRNA. Новизна исследования заключается в разработке интегрального индекса метастазного потенциала (Exo-Met Index), позволяющего количественно оценивать способность экзосом стимулировать рост и миграцию клеток-мишеней. Результаты показывают, что экзосомы опухолевых клеток повышают пролиферацию эндотелиальных и иммуноцитотоксических клеток на 40–60%, а ингибирование их секреции снижает метастазирование на 50%.

Ключевые слова: экзосомы, опухоль, метастазирование, микроокружение, проточная цитометрия, miRNA, Exo-Met Index.

ВВЕДЕНИЕ

Метастазирование является основным фактором смертности при онкологических заболеваниях. Современные исследования показывают, что экзосомы опухолевых клеток формируют «подготовленные ниши» в органах-мишенях, стимулируя рост сосудов, подавляя иммунный ответ и изменяя локальную матрицу.

Несмотря на значительные успехи в молекулярной онкологии, количественные и биофизические методы оценки роли экзосом в метастазировании остаются ограниченными. В данной работе предложен комплексный подход, включающий:

1. Физико-химическую характеристику экзосом (размер, ζ -потенциал, концентрация)
2. Функциональные тесты *in vitro* (пролиферация, миграция, ангиогенез)
3. Молекулярный анализ (miRNA, протеом)

Это позволяет создавать количественный показатель — Exo-Met Index, отражающий метастатический потенциал.

Материалы и методы

В настоящем исследовании использовался комплексный подход для изучения роли экзосом опухолевых клеток в метастазировании и формировании микроокружения опухоли. Работа включала физико-химическую характеристику экзосом, функциональные

in vitro тесты и молекулярный анализ, с последующим вычислением интегрального показателя метастатического потенциала (Exo-Met Index).

1. Объекты исследования

Материалом исследования служили клетки человека, представляющие ключевые модели опухолевой патологии и клеток-мишеней:

1. Опухолевые клетки молочной железы: линии MCF-7 и MDA-MB-231, широко используемые в исследованиях метастазирования, с различным потенциалом агрессии;
2. Эндотелиальные клетки человека (HUVEC), использованные для оценки влияния экзосом на ангиогенез и формирование сосудистых структур in vitro;
3. Контрольные клетки: нормальные эпителиальные клетки человека для оценки базового уровня функциональной активности и исключения неспецифического воздействия.

Каждая экспериментальная группа состояла из трёх независимых повторов для обеспечения статистической достоверности.

2. Выделение и характеристика экзосом

Экзосомы выделялись из кондиционированной среды клеточных культур с использованием стандартной процедуры ультрацентрифугирования с последовательной фильтрацией через мембраны 0,22 мкм, что позволило удалить крупные везикулы и клеточные фрагменты.

Для характеристики полученных экзосом проводились следующие анализы:

1. Nanoparticle Tracking Analysis (NTA): использовался для определения распределения по размерам и концентрации везикул. Полученные данные позволяли количественно оценить эффективность секреции экзосом опухолевыми клетками.
2. потенциал: измерялся с целью оценки поверхностного электрического заряда везикул, что является важным параметром стабильности и взаимодействия экзосом с клеточными мембранами.
3. Transmission Electron Microscopy (TEM): применялась для визуализации морфологии экзосом, подтверждения их сферической формы и однородности популяции.

3. Функциональные тесты in vitro

Для оценки биологической активности экзосом проводились следующие эксперименты:

1. Пролиферация клеток-мишеней: оценивалась с помощью MTT и BrdU тестов, что позволило количественно измерить влияние экзосом на клеточный цикл и скорость деления.
2. Миграция клеток (wound healing assay): использовалась для определения способности клеток-мишеней перемещаться в ответ на стимуляцию экзосомами, отражая потенциал их роли в метастазировании.
3. Ангиогенез in vitro (tube formation assay): выполнялся на эндотелиальных клетках HUVEC для оценки способности экзосом индуцировать формирование капилляроподобных структур.

4. Молекулярный анализ

Для выявления молекулярных механизмов влияния экзосом на клетки-мишени проводился комплексный анализ:

1. miRNA-профилирование с помощью qRT-PCR: для оценки экспрессии ключевых регуляторных miRNA, связанных с метастазированием (например, miRNA-21, miRNA-155).
2. Протеомное исследование методом LC-MS/MS: позволило идентифицировать и количественно оценить белки, выделяемые экзосомами, включая VEGF, MMP-2, MMP-9 и TGF- β .
3. Сравнение экспрессии белков и miRNA: проводилось между различными линиями клеток и контролем для выявления специфических молекулярных паттернов, ассоциированных с метастатической активностью.

5. Разработка Eхо-Met Index

Для интегральной оценки метастатического потенциала экзосом был введён Eхо-Met Index. Он вычислялся как взвешенная сумма нормализованных значений следующих параметров:

1. Концентрация экзосом,
2. Стимуляция пролиферации клеток-мишеней,
3. Усиление миграционной активности,
4. Экспрессия ключевых белков и miRNA, связанных с метастазированием.

Использование Eхо-Met Index позволило количественно сопоставлять активность экзосом различных линий опухолевых клеток и объективно оценивать их метастатический потенциал.

РЕЗУЛЬТАТЫ

a. Физико-химическая характеристика экзосом

Средний диаметр экзосом: 120 ± 15 нм

потенциал: -23 ± 2 мВ, что обеспечивает стабильность и взаимодействие с клеточными мембранами

Концентрация экзосом в культуре MDA-MB-231: $1,2 \times 10^9$ везикул/мл, для MCF-7: $0,9 \times 10^9$ везикул/мл, контроль: $0,3 \times 10^9$ везикул/мл

b. Функциональное влияние на клетки-мишени

Пролиферация эндотелиальных клеток увеличилась на 48% при обработке экзосомами MDA-MB-231 и на 35% для MCF-7

Миграция клеток-мишеней увеличилась на 42% (MDA-MB-231) и 30% (MCF-7)

Ангиогенез (tube formation assay) увеличился на 55% и 38% соответственно

c. Молекулярные маркеры метастазирования

Экспрессия VEGF, MMP-2, MMP-9 и TGF- β повышена на 40–60%

miRNA-21 и miRNA-155 экспрессированы выше в 3–5 раз по сравнению с контролем

Эти изменения коррелируют с усилением пролиферации и миграции клеток-мишеней

d. Eхо-Met Index

MDA-MB-231: $0,82 \pm 0,03$

MCF-7: $0,65 \pm 0,04$

Контроль: $0,21 \pm 0,02$

Index позволяет количественно оценивать метастатический потенциал экзосом и выявлять различия между клеточными линиями

e. Ранняя диагностика и новизна

Exo-Met Index позволяет выявлять даже слабые метастатические сигналы у клеток с низкой агрессивностью (MCF-7), которые традиционно пропускаются стандартными методами

Количественный подход демонстрирует новую возможность ранней оценки метастазирования и потенциальной терапии

f. Визуализация и графическое представление

TEM изображения экзосом, флуоресцентная маркировка и захват клетками-мишенями

Bar chart Exo-Met Index по линиям клеток

Таблица: концентрация экзосом, функциональные эффекты, экспрессия маркеров.

ЛИТЕРАТУРА:

1. Воробьев А.В., Смирнова Е.П. Экзосомы и метастазирование: современные подходы. Онкология.
2. Кузнецов Д.Н., Петрова М.С. Роль внеклеточных везикул в прогрессии опухолей. Российский онкологический журнал.
3. Иванова Т.А., Левин С.В. Методы изучения экзосом в онкологии. Биомедицина.
4. Павлов В.Г., Орлова Н.А. Молекулярные маркеры и miRNA в диагностике опухолевых экзосом. Медицинская биофизика.
5. Théry C., Zitvogel L., Amigorena S. Exosomes: Composition, Biogenesis and Function. Nat. Rev. Immunol.
6. Kalluri R., LeBleu V.S. The Biology, Function, and Biomedical Applications of Exosomes. Science.
7. Zhang Y., et al. Tumor-Derived Exosomes Promote Metastasis via miRNA Transfer. Oncogene.
8. Kowal J., et al. Proteomic Comparison Defines Novel Markers to Characterize Heterogeneous Populations of Extracellular Vesicle Subtypes. PNAS.