

Экзосомы и развитие резистентности опухолевых клеток к метформину: пилотное исследование

С.Е. Семина¹, Е.А. Руденская¹, А.Г. Миттенберг², С.В. Шабельников², М.А. Красильников¹

¹НИИ канцерогенеза ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России; Россия, 115478 Москва, Каширское шоссе, 24;

²ФГБУН «Институт цитологии Российской академии наук»; Россия, 194064 Санкт-Петербург, Тихорецкий проспект, 4

Контакты: Светлана Евгеньевна Семина s.e.semina@gmail.com

Цель работы — исследование роли межклеточных взаимодействий в развитии резистентности клеток рака молочной железы к метформину — антидиабетическому препарату из группы бигуанидов, обладающему выраженным противоопухолевым эффектом.

Результаты. В основу работы легли данные, полученные нами ранее при изучении гормональной резистентности клеток рака молочной железы и продемонстрировавшие возможность передачи резистентного фенотипа горизонтальным путем, от клетки к клетке, в том числе с участием экзосом.

В настоящей работе мы показали возможность развития устойчивости к метформину горизонтальным путем, как и в случае гормональной резистентности. Установлено, что решающим фактором в подобном горизонтальном пути передачи резистентности являются межклеточные взаимодействия, реализуемые в том числе с участием экзосом, продуцируемых метформинрезистентными клетками. Анализ протеома экзосом подтвердил присутствие в экзосомах резистентных клеток белков, регулирующих ответ клеток на действие апоптотических агентов.

Заключение. Полученные данные подтверждают существование неизвестного ранее механизма распространения резистентности, основанного на межклеточных взаимодействиях, и открывают новые возможности в поиске мишеней противоопухолевой терапии.

Ключевые слова: рак молочной железы, резистентность, метформин, экзосомы, межклеточное взаимодействие, протеом

DOI: 10.17650/2313-805X-2017-4-3-92-98

Exosomes and development of cancer cell resistance to metformin: pilot study

S.E. Semina¹, E.A. Rudenskaya¹, A.G. Mittenberg², S.V. Shabel'nikov², M.A. Krasil'nikov¹

¹Research Institute of Carcinogenesis, N.N. Blokhin National Medical Research Center of Oncology, Ministry of Health of Russia; 24 Kashirskoe Shosse, Moscow 115478, Russia;

²Institute of Cytology of the Russian Academy of Sciences; 4 Tikhoretskiy Prospekt, Saint Petersburg 194064, Russia

Objective: to study the role of the intercellular interactions in the progression of the cancer cells resistance to metformin, a biguanide antidiabetic drug exhibited the marked anti-tumor activity.

Results. Earlier we have demonstrated the effect of horizontal transferring of hormonal resistance of breast cancer cells from cell to cell, and showed the key role of exosomes on the transferring of the resistance.

Here we have shown the effect of the horizontal transferring of metformin resistance in breast cancer cells — similar to the progression of hormonal resistance. We found that horizontal transferring of the metformin resistance is mediated via exosomes secreted by the resistant cells. The proteome analysis of the exosomes revealed several proteins differentially expressed in the exosomes of metformin-resistant cells and associated with the regulation of cell response to apoptotic drugs.

Conclusions. Totally, the data presented demonstrate the new mechanism of the development of the cancer cell resistance based on the intercellular interactions, opening the new insights in the target therapy of breast cancer.

Key words: breast cancer, resistance, metformin, exosomes, intercellular interactions, proteome

Введение

Известно, что одним из основных факторов, снижающих эффективность противоопухолевых препаратов, является резистентность образований к их действию — либо врожденная, либо приобретенная в процессе терапии. В тех случаях, когда речь идет о таргетных средствах, на первый план среди причин подобной резистентности

выходит реаранжировка внутриклеточных сигнальных путей, обеспечивающая передачу ростового сигнала в обход заблокированных белков.

Сравнительно недавно внимание исследователей привлек метформин — антидиабетический препарат из группы бигуанидов, с успехом применяющийся для лечения сахарного диабета 2-го типа.

Целый ряд клинико-эпидемиологических исследований показал, что этот препарат существенно снижает риск развития онкологических заболеваний и проявляет высокую противоопухолевую активность как *in vivo*, так и *in vitro* [1, 2]. Более того, изучение механизма действия бигуанидов продемонстрировало, что их антипролиферативная активность реализуется как минимум частично, через активацию аденозинмонофосфат-активируемой протеинкиназы (adenosine monophosphate-activated protein kinase, AMPK) и AMPK-зависимое подавление сигналинга mTOR (мишень рапамицина в клетках млекопитающих) [3, 4].

Вопрос о резистентности опухолей к препаратам, действующим на AMPK/mTOR-сигнальный путь, несмотря на очевидную актуальность, практически не исследован во многом из-за относительно непродолжительного опыта их применения в качестве противоопухолевых соединений. Известны лишь единичные работы, в которых изучалось развитие устойчивости рака молочной железы (РМЖ) к ингибитору mTOR эверолимусу [5] и метформину [6] и описывались изменения отдельных сигнальных каскадов в основном пролиферативного и промембранного профилей при развитии резистентности.

Ранее в экспериментах, выполненных на культивируемых *in vitro* клетках аденокарциномы молочной железы линии MCF-7, мы показали, что длительное, в течение 60 сут, культивирование клеток MCF-7 с метформинном приводит к развитию их устойчивости к цитостатическому действию метформина, сохраняющемуся на протяжении не менее 80 пассажей. Было обнаружено, что такие клетки, обозначенные нами как MCF-7/M, отличаются, наряду с активацией некоторых сигнальных путей (PI3K/Akt, Snail1), заметным снижением транскрипционной активности рецептора эстрогена и, соответственно, частичной резистентностью к антипролиферативному действию антиэстрогенов [7].

Цель исследования — изучение механизма развития резистентности клеток РМЖ к метформину, в частности, роли межклеточных взаимодействий в развитии такой резистентности. В основу работы легли данные, полученные нами ранее при изучении гормональной резистентности клеток линии MCF-7 и продемонстрировавшие возможность передачи резистентного фенотипа горизонтальным путем, от клетки к клетке, в том числе с участием экзосом [8]. В настоящей работе мы показали, что устойчивость к метформину может передаваться от резистентных к чувствительным клеткам при их совместном культивировании, продемонстрировали участие экзосом в таком распространении резистентности и исследовали основные особенности белкового спектра экзосом чувствительных и резистентных клеток.

Материалы и методы

Культивирование клеток. Клетки РМЖ человека линии MCF-7 культивировали в стандартной среде DMEM, содержащей 7 % эмбриональную сыворотку телят (FBS HyClone, США) и гентамицин (50 ед/мл) (ПанЭко, Россия), при 37 °С и 5 % CO₂. При анализе скорости роста и чувствительности к метформину и/или тамоксифену количество клеток определяли либо при подсчете в камере Горяева, либо с использованием МТТ-теста, основанного на утилизации живыми клетками реагента МТТ (3-(4,5-диметилтиазол-2)-2,5-дифенилтетразол бромид).

Трансфекция клеток. Трансфекцию клеток плазмидой pEGFP-N1 (предоставлена Д.Е. Андреевым, НИИ физико-химической биологии им. А.Н. Белозерского МГУ им. Ломоносова, Москва) проводили в течение 4 ч с использованием реагента Metafectene PRO (Biontech Laboratories GmbH, Германия) при температуре 37 °С. Селекцию клеток выполняли в присутствии G-418 в течение 14 сут. Эффективность трансфекции и последующей селекции оценивали при определении количества флуоресцирующих GFP-позитивных клеток с помощью флуоресцентного микроскопа AxioPlan 2 ZEISS (Carl Zeiss, Германия).

Для определения транскрипционной активности рецептора эстрогенов проводили трансфекцию клеток плазмидой, содержащей ген-репортер люциферазы под контролем промотора с эстроген-респонсивным элементом, любезно предоставленной Dr. George Reid [9]. Для контроля за эффективностью и потенциальной токсичностью процедуры трансфекции применяли котрансфекцию клеток плазмидой, содержащей ген β-галактозидазы. Все последующие эксперименты на клетках-трансфектантах выполняли в течение 48 ч после окончания трансфекции. Активность люциферазы измеряли по стандартному протоколу (Promega, США) на люминометре Turner BioSystems 20/20n (США). Расчет активности люциферазы проводили в условных единицах (отношение общей активности люциферазы к активности галактозидазы в исследованных образцах).

Выделение и характеристика препаратов экзосом. Экзосомы выделяли из кондиционированной культуральной среды по стандартной методике, описанной С. They и соавт. [10]. Клетки культивировали в течение 4 сут в стандартной среде, затем культуральную жидкость в равных объемах с каждой линии собирали и последовательно центрифугировали 30 мин при 300 g и 6000 g, и 2 ч при 100 000 g. После каждого центрифугирования супернатант переносили в новые пробирки, конечный осадок растворяли в 500 мкл PBS. Все работы выполняли с соблюдением стерильных условий. Для проведения иммуноблоттинга препараты экзосом лизировали в буфере следующего состава: 50 mM Tris-HCl pH 7,4, 1 % Igepal CA-630, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1 mM DTT, 1 мкг/мл апротинина, лейпептина и пепстатина, 1 mM NaF и 1 mM ортованадат Na. Обра-

цы центрифугировали (10 000 g, 10 мин, 40 °С) и проводили стандартный электрофорез и иммуноблоттинг как описано ранее [8], с использованием антител к CD81 (BioLegend, США) и β -актину (Cell Signaling, США).

Протеомный анализ. Масс-спектрометрический анализ LC–МАЛДИ проводили на приборе AB Sciex 5800 TOF/TOF (AB Sciex, Германия) в режиме рефлектрона (МС) и tandemной масс-спектрометрии (МС/МС). Данные о масс-спектрах направляли в программу Protein Pilot v. 4.0, использующую поисковую машину Mascot для анализа масс-спектров с помощью международных баз данных (SwissProt, UniProt, NCBI) для идентификации пептидов и определения белков.

Хроматографическое разделение пептидов выполняли в системе высокоэффективной жидкостной хроматографии на приборе Милихром (Россия), совмещенном с МАЛДИ-споттером. Использовали колонку с обращенной фазой Jupiter Proteo C12, мертвый объем колонки 350 мкл (7 мин). Пептиды с колонки смывали градиентом ацетонитрила (от 10 до 50 %) с 0,1 % трифторуксусной кислоты в объеме 2,3 мл.

Статистическую обработку данных осуществляли с помощью программы Microsoft Excel. Во всех случаях статистические критерии считали достоверными при $p < 0,05$.

Результаты

Развитие резистентности клеток к метформину: роль межклеточных взаимодействий. Эксперименты проводили на клетках РМЖ линии MCF-7 и метформинрезистентной сублинии MCF-7/М, полученной в результате длительного культивирования родительских клеток MCF-7 с метформином.

Клетки MCF-7/М были трансфицированы плазмидой pEGFP-N1, кодирующей зеленый флуоресцентный белок (green fluorescent protein, GFP), с последующей селекцией GFP-позитивных клонов. В результате селекции были выделены стабильные клоны с содержанием GFP-позитивных клеток $\geq 98\%$, достаточным для проведения дальнейших экспериментов. Экспрессия GFP сохранялась на высоком уровне, достаточном для детекции клеток, на протяжении не менее 2 мес культивирования (рис. 1а). В дальнейших экспериментах по совместному культивированию родительских клеток MCF-7 (GFP-негативных) с резистентными (GFP-позитивными) клетками MCF-7/М и определению чувствительности обеих линий к метформину мы обнаружили, что кокультивирование этих 2 линий в течение 10 сут приводит к развитию частичной резистентности к метформину у родительских клеток MCF-7 (рис. 1б). Примечательно, что уровень чувствительности резистентных клеток MCF-7/М/GFP в этих условиях не изменяется (рис. 1в).

Для того чтобы исключить артефакты, вызванные возможной контаминацией пула родительских клеток клетками MCF-7/М/GFP, потерявшими способность

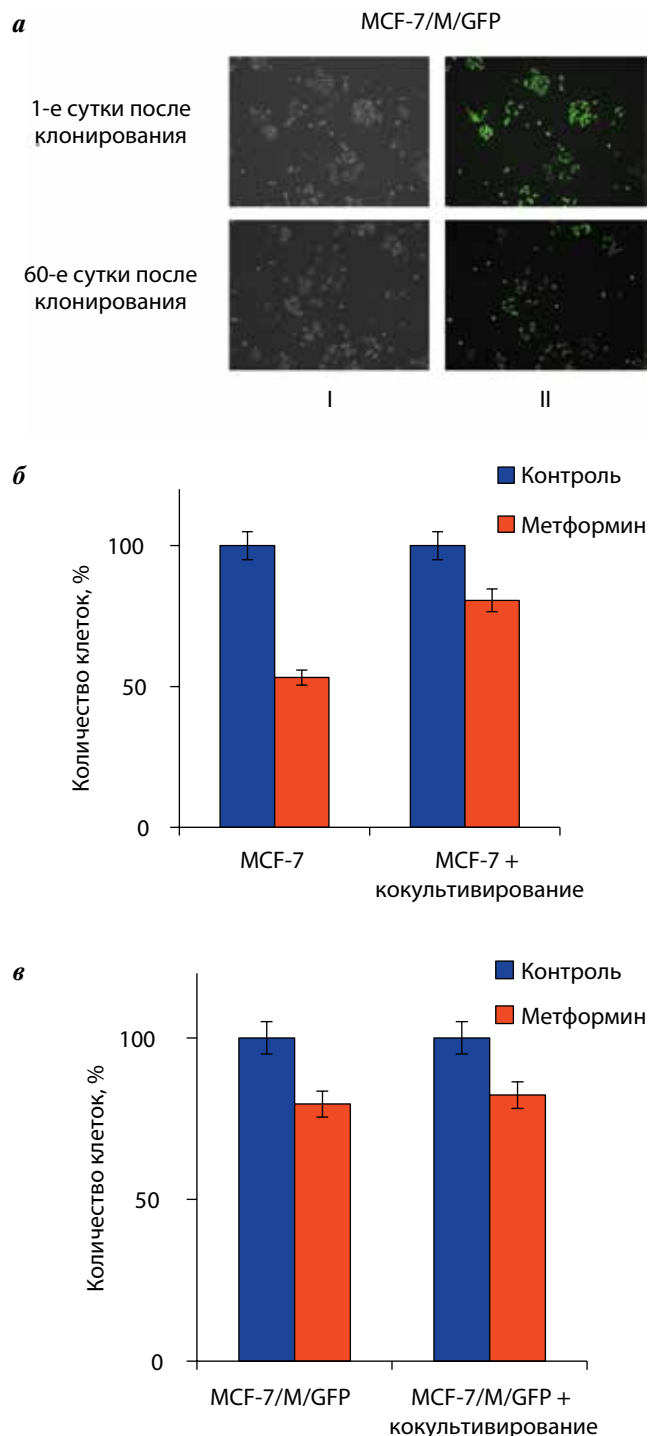


Рис. 1. Кокультивирование метформинчувствительных и резистентных клеток MCF-7 и MCF-7/М: клетки MCF-7/М, трансфицированные плазмидой pEGFP-N1. Доля GFP-позитивных клеток в популяции составляет $\geq 98\%$. I – общий вид клеток MCF-7/М при световой микроскопии; II – флуоресценция GFP-позитивных клеток MCF-7/М/GFP через 1 и 60 сут после клонирования (а). Влияние на чувствительность к метформину совместного культивирования клеток MCF-7 и MCF-7/М/GFP. Клетки MCF-7 и MCF-7/М/GFP кокультивировали в течение 10 сут в стандартной среде. Затем добавляли метформин в концентрации 5 мкМ на 3 сут и определяли количество нефлуоресцирующих клеток MCF-7 (б) и флуоресцирующих клеток MCF-7/М/GFP (в) в камере Горяева. Представлены средние значения \pm стандартное отклонение значений, полученных в 4 независимых экспериментах

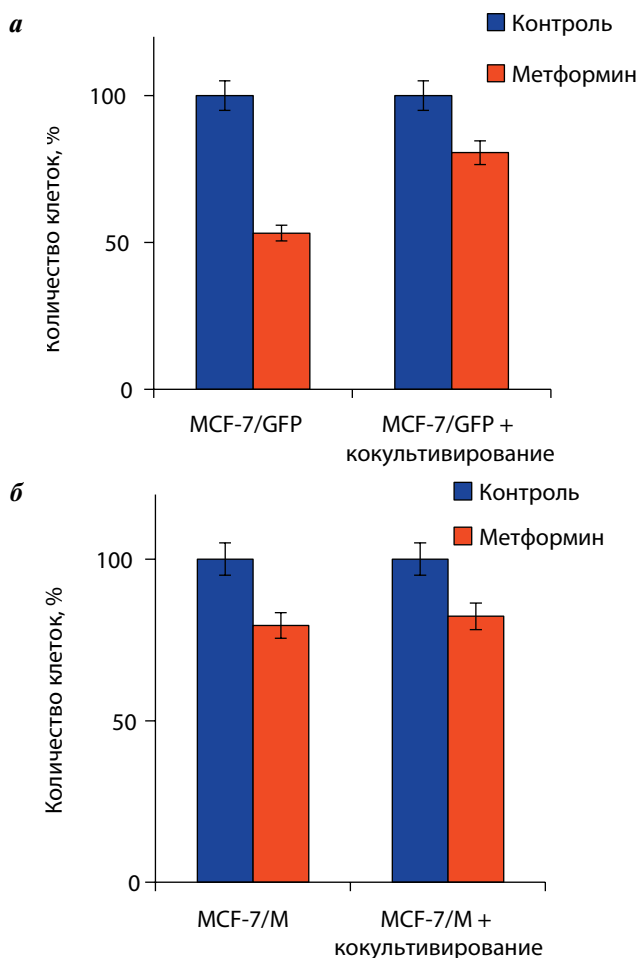


Рис. 2. Перекрестный эксперимент: влияние совместного культивирования клеток MCF-7/GFP и MCF-7/M на чувствительность к метформину. Предварительно клетки MCF-7 были трансфицированы плазмидой rEGFP-N1, затем клетки MCF-7/GFP и MCF-7/M кокультивировали в течение 10 сут с последующим определением чувствительности к метформину клеток MCF-7/GFP (а) и MCF-7/M (б). Представлены средние значения \pm стандартное отклонение значений, полученных в 3 независимых экспериментах

к экспрессии GFP, проведены перекрестные эксперименты, в которых уже родительские клетки MCF-7 были трансфицированы GFP-плазмидой, и полученные клетки MCF-7/GFP кокультивировали с нетрансфицированными клетками MCF-7/M. В результате этих экспериментов были получены сходные результаты: через 10 сут кокультивирования в клетках MCF-7/GFP развивалась резистентность к метформину (рис. 2а). Соответственно, уровень чувствительности к метформину у резистентных клеток MCF-7/M в этих условиях также не изменяется (рис. 2б). Все дальнейшие эксперименты проводили с использованием первого варианта кокультивирования: MCF-7 + MCF-7/M/GFP.

Эффект перекрестной резистентности к метформину и тамоксифену. Как уже отмечалось, исходная сублиния MCF-7/M, резистентная к метформину, отличается перекрестной резистентностью к метформину и тамоксифену. Этот эффект предположительно связан с подавлением активности рецептора эстрогенов в клетках

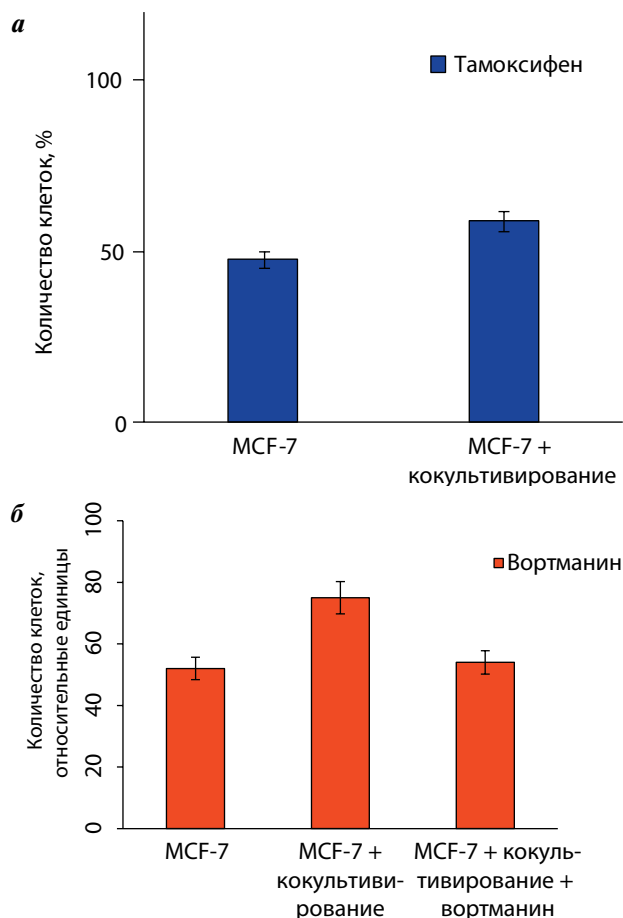


Рис. 3. Эффект кокультивирования клеток MCF-7 и MCF-7/M: чувствительность к тамоксифену и вортманину: а – влияние на чувствительность к тамоксифену совместного культивирования клеток MCF-7 и MCF-7/M/GFP. К клеткам MCF-7 и MCF-7/M/GFP после совместного культивирования добавляли тамоксифен в концентрации 5 мкМ на 3 сут и определяли количество клеток как описано выше; б – влияние вортманина на эффективность совместного культивирования клеток MCF-7 и MCF-7/M. Клетки MCF-7 и MCF-7/M/GFP кокультивировали в течение 10 сут в присутствии 5 мкМ вортманина и без него с последующим определением чувствительности клеток MCF-7 к метформину. Представлены средние значения \pm стандартное отклонение значений, полученных в 3 независимых экспериментах

MCF-7/M [7]. Мы обнаружили, что клетки MCF-7 с резистентностью к метформину, приобретенной в процессе кокультивирования с клетками MCF-7/M, также характеризуются перекрестной резистентностью к тамоксифену (рис. 3а).

С учетом того, что перекрестная резистентность клеток MCF-7/M к метформину развивается на фоне активированного mTOR/PI3K/Акт-сигналинга [7], в следующей серии экспериментов исследовали роль PI3K в развитии резистентности, приобретенной при кокультивировании клеток. Было обнаружено, что кокультивирование родительских и метформинрезистентных клеток в присутствии ингибитора PI3K вортманина полностью блокирует распространение резистентности на родительские клетки, что свидетельствует о ключевой роли mTOR/PI3K/Акт-сигналинга в развитии приобретенной резистентности (рис. 3б).

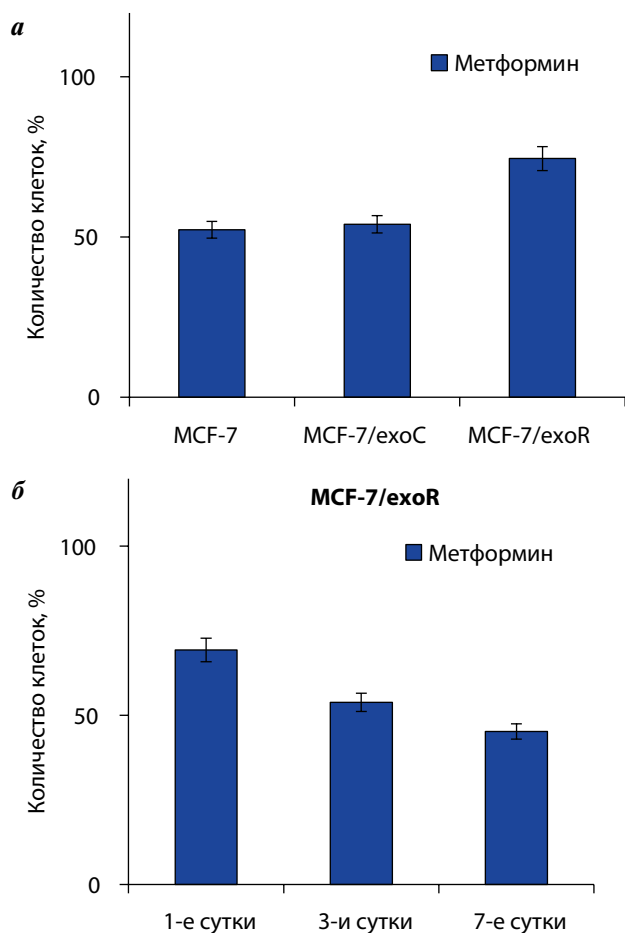


Рис. 4. Экзосомы и резистентность к метформину. Клетки MCF-7 культивировали в присутствии экзосом, полученных от клеток MCF-7(exoC) и MCF-7/M(exoR), в течение 14 сут и определяли чувствительность к метформину как описано выше (а). Параллельно продолжали культивирование клеток в среде без экзосом и определяли чувствительность к метформину на 1, 3 и 7-е сутки после отмены экзосом (б). Представлены средние значения \pm стандартное отклонение значений, полученных в 4 независимых экспериментах

Роль экзосом в развитии резистентности к метформину. Экзосомы — везикулы или мультивезикулярные комплексы, секретируемые клетками в окружающую среду, одним из важнейших свойств которых является их способность перемещаться между клетками, проходить в кровяное русло, достигая самых различных тканей, и в итоге проникать внутрь клеток-реципиентов. Задачей настоящего этапа исследования стало изучение роли экзосом в межклеточной коммуникации и распространение резистентности горизонтальным путем — от клетки к клетке.

Препараты экзосом получали из кондиционированной культуральной среды метформинчувствительных клеток MCF-7 и резистентных клеток MCF-7/M методом высокоскоростного центрифугирования. Присутствие экзосом в полученных препаратах было верифицировано с помощью иммуноблоттинга с антителами к специфическому маркеру экзосом CD81 и методом линии просвечивающей электронной ми-

кроскопии, как описано в разделе «Материалы и методы».

Для изучения роли экзосом в развитии резистентности к метформину клетки MCF-7 культивировали в присутствии экзосом, полученных от метформинрезистентных клеток MCF-7/M. В качестве контроля использовались экзосомы родительских клеток MCF-7. Обнаружено, что регулярное добавление (в течение 14 сут) к клеткам MCF-7 экзосом, полученных от резистентных клеток MCF-7/M, приводит к выраженному снижению чувствительности клеток MCF-7 к метформину (MCF-7/exoR). В то же время экзосомы, полученные от родительских клеток MCF-7, не обладают такой активностью, и их добавление не приводит к изменению метода чувствительности клеток (MCF-7/exoC) (рис. 4а). Отмена экзосом сопровождается постепенным восстановлением чувствительности клеток MCF-7 к метформину (рис. 4б).

Выше уже отмечалось, что для метформинрезистентных клеток MCF-7/M характерны снижение транскрипционной активности рецептора эстрогена и частичная резистентность к антипролиферативному действию тамоксифена. Изучение клеток, полученных после обработки экзосомами, показало, что длительное культивирование клеток MCF-7 с экзосомами резистентных клеток вызывает сходные изменения эстрогенового сигналинга: снижение активности рецептора эстрогенов и частичную резистентность к тамоксифену — в отличие от клеток, обработанных контрольными экзосомами (рис. 5).

Сравнительный масс-спектрометрический анализ протеома экзосом клеток MCF-7 и MCF-7/M. Цель настоящего эксперимента — сравнительный анализ протеома экзосом родительских клеток MCF-7 и метформинрезистентных клеток MCF-7/M. Протеомный анализ проводили на тандемном времяпролетном масс-спектрометре AB Sciex 5800 TOF/TOF (AB Sciex, Германия) с последующим анализом идентифицированных пептидов с помощью программного обеспечения Protein Pilot v.4.0 с использованием международных баз данных (SwissProt, UniProt, NCBI).

Всего в экзосомах клеток MCF-7 были идентифицированы 57 белков, в экзосомах клеток MCF-7/M — 48 белков. Среди последних выявлены 7 белков, дифференциально экспрессированных в экзосомах клеток MCF-7/M по сравнению с клетками MCF-7, в их числе 3 белка с выраженными антиапоптотическими/цитопротективными свойствами: Complement C1q tumor necrosis factor-related protein 3 [11], Hornerin [12], myosin 4 [13].

Белки, дифференциально экспрессированные в клетках MCF-7/M

Белок	Ген
Tubulin alpha 4A chain	TUBA4A
Actin, alpha cardiac muscle 1	ACTC1
Myosin 4	MYH4
Myosin 13	MYH13

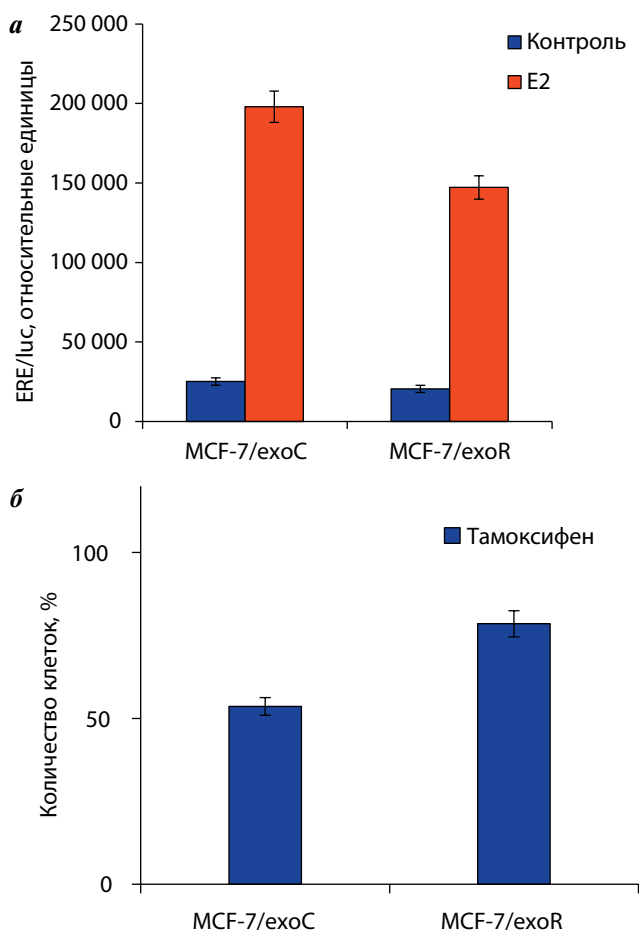


Рис. 5. Экзосомы и гормональная зависимость: а – транскрипционная активность рецептора эстрогенов. Клетки MCF-7 культивировали в присутствии экзосом, полученных от клеток MCF-7 и MCF-7/M, в течение 14 сут. Активность рецептора эстрогенов определяли методом репортерного анализа в отсутствие экзогенного эстрогена и после стимуляции клеток 17 β -эстрадиолом (E2) в концентрации 10–8 М в течение 24 ч. Результаты для каждого образца представлены как отношение активности люциферазы к активности галактозидазы; б – чувствительность клеток MCF-7 к тамоксифену после культивирования с экзосомами. К клеткам MCF-7 после культивирования с экзосомами добавляли тамоксифен в концентрации 5 мкМ на 3 сут и определяли количество клеток, как описано выше. Представлены средние значения \pm стандартное отклонение значений, полученных в 3 независимых экспериментах

Hornerin	HRNR
Complement C1q tumor necrosis factor-related protein 3	CIQTNF3
Phosphoglycerate kinase 2	PGK2

Мы рассчитываем, что продолжение этих исследований, в том числе дальнейшее изучение роли

идентифицированных выше белков в формировании резистентного фенотипа клеток, позволит установить некоторые из путей передачи резистентности с помощью экзосом.

Заключение

Выше уже отмечалось, что при исследовании механизма развития резистентности клеток РМЖ к эстрогенам/антиэстрогенам мы продемонстрировали возможность распространения гормональной резистентности от клетки к клетке при совместном культивировании чувствительных и резистентных клеток и показали участие экзосом в этом процессе. Следующий вопрос был вполне логичным: характерны ли обнаруженные закономерности только для случая гормональной резистентности, или подобный путь может распространяться и на другие варианты резистентности? В настоящей работе мы исследовали механизм формирования резистентности клеток РМЖ к метформину – соединению из группы бигуанидов. Выбор для работы именно этого соединения был обусловлен 2 основными факторами. С одной стороны, метформин принадлежит к совершенно отличному от стероидов классу соединений, и его противоопухолевая активность ассоциирована, преимущественно, с подавлением АМПК и mTOR-сигналинга [14]. С другой стороны, в основе приобретенной резистентности к метформину лежит компенсаторная реактивация сигнальных путей [7], как и в случае гормональной резистентности, что могло свидетельствовать о существовании общих механизмов распространения обоих видов резистентности.

В результате проведенных исследований мы продемонстрировали возможность развития резистентности к метформину горизонтальным путем, от клетки к клетке, как и в случае гормональной резистентности. Установлено, что решающим фактором при подобном пути передачи резистентности являются межклеточные взаимодействия, реализуемые в том числе с участием экзосом, продуцируемых резистентными клетками. Анализ протеома экзосом подтвердил присутствие в экзосомах резистентных клеток белков, регулирующих ответ клеток на действие апоптотических агентов. Мы полагаем, что дальнейшее изучение способов развития и передачи резистентности, а также механизмов сообщения клеток друг с другом позволит установить пути и механизмы формирования резистентного фенотипа клеток и выявить новые мишени действия противоопухолевых препаратов.

Финансирование. Работа профинансирована из средств гранта Российского научного фонда № 14-15-00 362 (эксперименты разделов № 1–3) и Российского фонда фундаментальных исследований № 16-04-00 347 (эксперименты раздела № 4).

Financing. The study was financed by the grant No. 14-15-00 362 from the Russian Science Foundation (experiments in sections No. 1–3) and grant No. 16-04-00 347 from the Russian Foundation for Basic Research (experiments in section No. 4).

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

1. Evans J.M., Donnelly L.A., Emslie-Smith A.M. et al. Metformin and reduced risk of cancer in diabetic patients. *BMJ* 2005;330(7503):1304–5.
2. Shcherbakov A.M., Andreeva O.E., Shatskaya V.A., Krasil'nikov M.A. The relationships between snail1 and estrogen receptor signaling in breast cancer cells. *J Cell Biochem* 2012;113(6):2147–55.
3. Viedma-Rodriguez R., Baiza-Gutman L., Salamanca-Gómez F. et al. Mechanisms associated with resistance to tamoxifen in estrogen receptor-positive breast cancer (review). *Oncol Rep* 2014;32(1):3–15.
4. Nalvarte I., Schwend T., Gustafsson J.A. Proteomics analysis of the estrogen receptor alpha receptosome. *Mol Cell Proteomics* 2010;9(7):1411–22.
5. Bihani T., Ezell S.A., Ladd B. et al. Resistance to everolimus driven by epigenetic regulation of MYC in ER+ breast cancers. *Oncotarget* 2015;6(4):2407–20.
6. Oliveras-Ferraro C., Vazquez-Martin A., Cuyàs E. et al. Acquired resistance to metformin in breast cancer cells triggers transcriptome reprogramming toward a degradome-related metastatic stem-like profile. *Cell Cycle* 2014;13(7):1132–44.
7. Shcherbakov A.M., Sorokin D.V., Tatarskiy V.V. Jr et al. The phenomenon of acquired resistance to metformin in breast cancer cells: the interaction of growth pathways and estrogen receptor signaling. *IUBMB Life* 2016;68(4):281–92.
8. Семина С.Е., Багров Д.В., Красильников М.А. Межклеточные взаимодействия и развитие гормональной резистентности клеток рака молочной железы. *Успехи молекулярной онкологии* 2015;2(2):50–5. [Semina S.E., Bagrov D.V., Krasil'nikov M.A. Intercellular interactions and progression of hormonal resistance of breast cancer cells. *Uspekhi molekulyarnoy onkologii = Advances in Molecular Oncology* 2015;2(2):50–5. (In Russ.)].
9. Reid G., Hübner M.R., Métivier R. et al. Cyclic, proteasome-mediated turnover of unliganded and liganded ERalpha on responsive promoters is an integral feature of estrogen signaling. *Mol Cell* 2003;11(3):695–707.
10. Thery C., Amigorena S., Raposo G., Clayton A. Isolation and characterization of exosomes from cell culture supernatants and biological fluids. *Curr Protoc Cell Biol* 2006. Chapter 3: Unit 3.22.
11. Yang B., Wang S., Yu S. et al. C1q/tumor necrosis factor-related protein 3 inhibits oxidative stress during intracerebral hemorrhage via PKA signaling. *Brain Res* 2017;1657:176–84.
12. Choi J., Kim D.I., Kim J. et al. Hornerin is involved in breast cancer progression. *J Breast Cancer* 2016;19(2):142–7.
13. Wang Z.C., E D., Batu D.L. et al. 2D-DIGE proteomic analysis of changes in estrogen/progesterone-induced rat breast hyperplasia upon treatment with the Mongolian remedy RuXian-I. *Molecules* 2011;16(4):3048–65.
14. Queiroz E.A., Puukila S., Eichler R. et al. Metformin induces apoptosis and cell cycle arrest mediated by oxidative stress, AMPK and FOXO3a in MCF-7 breast cancer cells. *PLoS One* 2014;9(5):e98207.