

## Экзосомы и передача (эпи)генетической информации опухолевыми клетками

Е.М. Чевкина, А.М. Щербаков, А.Ю. Журавская, С.Е. Семина, А.В. Комельков, М.А. Красильников

Научно-исследовательский институт канцерогенеза ФГБУ «Российский онкологический научный центр им. Н.Н. Блохина»  
Минздрава России; Россия, 115478, Москва, Каширское шоссе, 24

**Контакты:** Михаил Александрович Красильников [krasilnikovm@main.crc.umos.ru](mailto:krasilnikovm@main.crc.umos.ru)

В обзоре рассматриваются современные представления об экзосомах – везикулах, образующихся внутри клеток и секретируемых в окружающую среду. Они формируются на плазматической мембране клеток и представляют собой сферические структуры, ограниченные своей мембраной и содержащие различные биомолекулы, включая нуклеиновые кислоты, белки, липиды и проч. Обнаруженные в последние годы свойства экзосом перемещаться между клетками, проходить в кровяное русло, достигая самых различных тканей, и в итоге проникать внутрь клеток-реципиентов обеспечили пристальное внимание исследователей к изучению их биологических функций. Установлено, что экзосомы, проникая в клетки-реципиенты, могут вызывать в них целый каскад изменений на геномном (за счет интеграции ДНК) и эпигеномном (за счет изменения экспрессии/содержания белков, микроРНК и проч.) уровнях. Безусловно, одним из самых интересных и значимых достижений в изучении экзосом явилось установление возможности горизонтальной передачи информации от клетки к клетке с их участием – факт, неоднократно продемонстрированный исследователями на разных моделях. В обзоре приводятся современные данные об основных характеристиках и свойствах экзосом; о роли экзосом в развитии злокачественных новообразований, в частности – об их участии в опухолевой трансформации, метастазировании, формировании лекарственной устойчивости. Заключительный раздел обзора посвящен одному из наиболее стремительно развивающихся направлений в этой области – использованию экзосом в клинической практике, в том числе для избирательной доставки противоопухолевых препаратов в опухоль.

**Ключевые слова:** экзосомы, злокачественные опухоли, микроРНК, опухолевая трансформация, метастазирование, лекарственная устойчивость, гормональная устойчивость, доставка лекарственных препаратов

DOI: 10.17650/2313-805X-2015-2-3-8-20

### Exosomes and transfer of (epi)genetic information by tumor cells

E.M. Tchekina, A.M. Shcherbakov, A.Yu. Zhuravskaya, S.E. Semina, A.V. Komel'kov, M.A. Krasil'nikov

Research Institute of Carcinogenesis, N.N. Blokhin Russian Cancer Research Center, Ministry of Health of Russia;  
24 Kashirskoe shosse, Moscow, 115478, Russia

In this review, we will introduce the current knowledge about exosomes – vesicles that are generated in the cells and released into the extracellular space. Exosomes are forming in the cell plasma membrane and represent the spherical shapes restricted by their membrane and contained the various biomolecules including nucleic acids, proteins, lipids etc. The intent interest to exosomes is based on their ability to horizontal transfer between the cells, to permeate into vascular system reaching the different tissues and to incorporate into the recipient cells. It was shown that exosome incorporation into the cells lead to remarkable changes in the recipient cells both in genomic level (via the integration of exosomal DNA into the host DNA) and in epigenomic level (via the modulation of the content and/or activity of the signaling proteins, microRNA etc.). Undoubtedly, one of the most interesting and perspective achievements in the exosome study is the demonstration of exosome ability to provide the horizontal transfer of the genetic information from cell to cell – the fact supported in the different studies with the various cell models. Here, we will discuss the recent data regarding the main characteristics and properties of exosomes, the role of exosomes in the tumorigenesis including neoplastic transformation, metastasis, multi-drug resistance. The final part of the review involves the most growing area in the exosome study – the possible usage of exosomes in the cancer treatment, in particular – as the specific drug delivery system.

**Key words:** exosomes, malignant tumors, microRNA, neoplastic transformation, metastasis, multi-drug resistance, hormonal resistance, drug delivery

#### Введение

Впервые термин «экзосомы» был использован в начале 80-х годов прошлого века для обозначения мембранных везикул, продуцируемых неопластическими клетками [1]. Довольно быстро такие образования были обнаружены для многих типов клеток, как нормальных, так и опухолевых [2], а в качестве основной

функции экзосом рассматривалось быстрое удаление из клеток некоторых белков, преимущественно мембраносвязанных [3]. Однако вскоре обнаружилась принципиальная особенность экзосом: благодаря своей уникальной структуре, во многом напоминающей миниатюрную копию клетки (в первую очередь за счет плазматической мембраны (ПМ) – фрагмента кле-

точной мембраны, надежно изолирующей экзосомы от внешней среды), содержимое экзосом могло достаточно долго сохраняться в неповрежденном виде. При этом состав экзосом оказался довольно разнообразным и включал практически все классы биомолекул клеток: белки, ДНК, РНК, липиды, низкомолекулярные соединения [4]. А тот факт, что экзосомы могут перемещаться между клетками, проникать в кровяное русло и достигать самых различных тканей, заставил исследователей обратить пристальное внимание на их биологические функции.

Было установлено, что экзосомы могут легко абсорбироваться на поверхности клеток и в итоге проникать внутрь клеток-реципиентов. Собственно, все современные исследования экзосом можно условно разделить на 2 направления, так или иначе связанных с этой их способностью. Во-первых, это изучение состава экзосом и влияния определенных их компонентов на те или иные свойства клеток-реципиентов, начиная от скорости деления и до опухолевой трансформации. И во-вторых, исследование возможностей экзосом как биологического средства доставки лекарственных препаратов, к тому же имеющего некоторое сходство к опухолевым клеткам.

Безусловно, одним из самых интересных и значимых достижений в изучении экзосом явилось установление возможности горизонтальной передачи информации от клетки к клетке с их участием – факт, неоднократно продемонстрированный учеными на разных моделях. Исследования показали, что экзосомы могут транспортировать в клетки-реципиенты различные биомолекулы, в том числе белки, РНК, ДНК, вирусные частицы, вызывая целый каскад изменений в клетках на геномном (за счет интеграции ДНК)

и эпигеномном (за счет изменения экспрессии/содержания белков, микроРНК и проч.) уровнях [5]. И конечно, проблема злокачественных опухолей: какие экзосомы продуцируют опухолевые клетки, что за информация переносится этими экзосомами, могут ли они участвовать в опухолевой трансформации, влияют ли на метастазирование, распространение лекарственной устойчивости и проч.?

В настоящем обзоре представлены современные достижения в исследовании экзосом опухолевых клеток, обсуждаются новые представления о механизме опухолевой трансформации и прогрессии с участием экзосом, оцениваются перспективы применения экзосом в клинической практике.

### Общие представления об экзосомах

Межклеточная коммуникация является необходимым условием функционирования многоклеточного организма и может осуществляться как непосредственно с помощью межклеточных контактов, так и посредством передачи секретируемых молекул с помощью экзоцитоза. В последние 2 десятилетия был обнаружен и стал активно изучаться третий механизм межклеточной коммуникации – передача молекул с помощью так называемых экстраклеточных везикул. Везикулы представляют собой покрытые мембранным бислоем сферические структуры, обогащенные различными биомолекулами, включая все известные на сегодняшний день типы РНК, различные белки и липиды [6]. Биофизически эти структуры соответствуют фрагментам цитоплазмы, окруженным липидным бислоем с наружными доменами трансмембранных белков, обращенными во внешнюю среду (рис. 1). Для определения таких структур за время, прошедшее с момен-

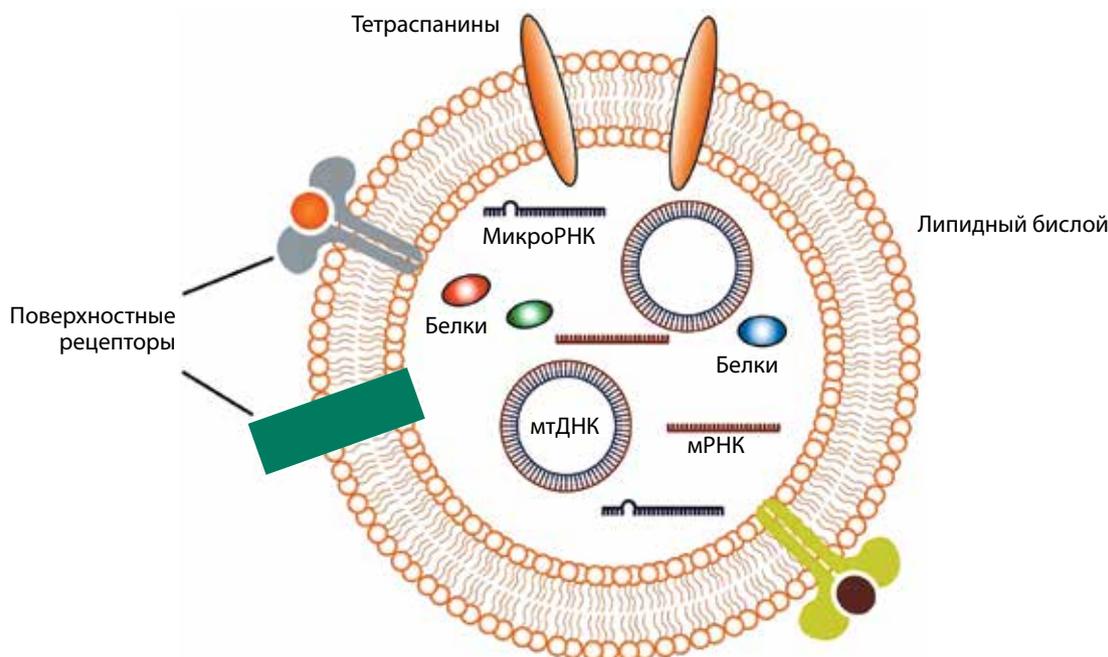


Рис. 1. Молекулярная структура экзосом. мтДНК – митохондриальная ДНК; мРНК – матричная РНК

та их открытия, использовались различные термины: «микровезикулы», «экзосомы», «мембранные фрагменты», «микрочастицы», «секретируемые везикулы» и проч. [7–10]. Термин «экзосомы» изначально употреблялся для обозначения везикулярных частиц размером от 40 до 1000 нм (позднее – до 100 нм), секретируемых культивируемыми клетками [11]. Однако происхождение этих частиц оставалось неясным. Позднее классический путь образования экзосом с формированием мультивезикулярных эндосом (МВЭ) был показан на процессе дифференцировки ретикулоцитов [6, 12], а спустя еще 10 лет аналогичный процесс был обнаружен в дендритных клетках и В-лимфоцитах [13, 14]. В дальнейшем выброс экзосом был показан и для ряда других типов нормальных клеток, включая Т-клетки, тромбоциты, тучные клетки, нейроны, олигодендроциты, клетки эпителия кишечника [4, 15].

Секретируемые клетками микровезикулярные частицы делятся на 2 класса, различающихся по механизму секреции: 1) микровезикулы, «отпочковывающиеся» непосредственно от ПМ и обладающие в среднем более крупным размером (100–1000 нм), и 2) экзосомы, секретируемые из клеток посредством слияния с ПМ МВЭ (иногда объединяемых в одно понятие с поздними эндосомами), в составе которых находятся будущие экзосомы (называемые также интралюминальными везикулами (ИЛВ)). МВЭ, в свою очередь, являются результатом слияния ранних эндосом (а также везикулярных структур, отпочковывающихся от транс-Гольджи-сети). Таким образом, очевидно, что механизм секреции экзосом является результатом везикулярного транспорта и напрямую связан с эндоцитозом.

Вкратце, первичные эндосомальные структуры с эндоцитируемым содержимым, образующиеся на ПМ посредством клатрин-зависимого, клатрин-независимого, кавеолин-зависимого, а также других форм эндоцитоза, транспортируются к ранним эндосомам [16] (согласно другим данным, все эти структуры считаются ранними эндосомами). Ранние эндосомы располагаются преимущественно на периферии клеток и часто обладают тубулярной структурой (как и везикулы, отпочковывающиеся от транс-Гольджи-сети). Поздние, или мультивезикулярные, эндосомы образуются из ранних, и в течение этого процесса происходит уменьшение рН, изменение состава белков и слияние с другими везикулами и эндосомами. Поздние эндосомы располагаются проксимально к ядру и обладают сферической формой. Некоторые специалисты выделяют этап формирования МВЭ из поздних эндосом, при этом основным отличием МВЭ считают способность образовывать собственные ИЛВ посредством инвагинации собственных мембранных участков и отпочковывания внутрь дочерних везикул [17]. Поздние эндосомы в дальнейшем либо сливаются с лизосомами, либо транспортируются к ПМ, где в результате слияния внешней мембраны МВЭ с ПМ происходит высвобождение экзосом во внеклеточную среду (рис. 2).

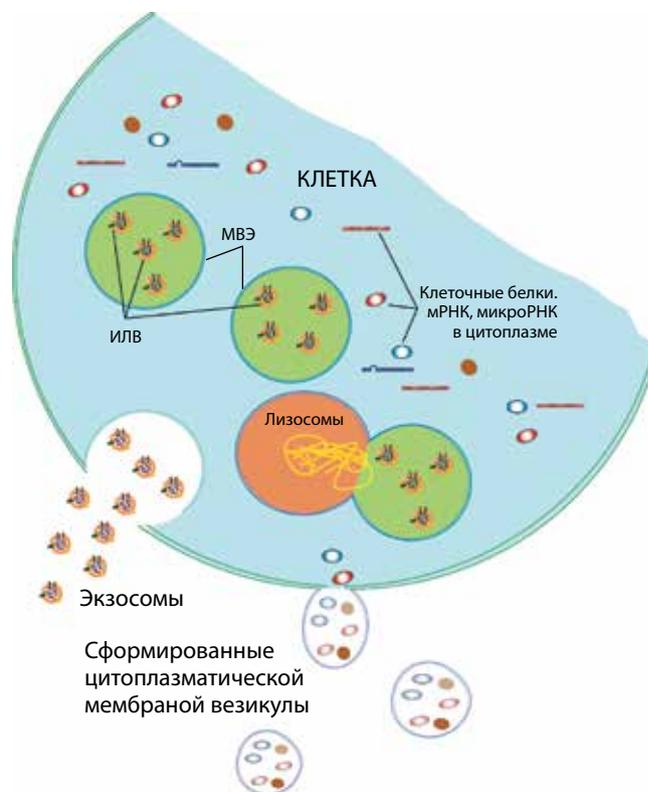


Рис. 2. Образование и созревание экзосом

Важно отметить, что многие типы клеток секретируют как экзосомы, так и микровезикулы. Это показано для тромбоцитов [18], эндотелиальных клеток [19], клеток рака молочной железы (РМЖ) [20] и др. Кроме того, существуют везикулы, соответствующие по размеру экзосомам, но образующиеся путем непосредственного отпочковывания от ПМ [21]. Более того, ряд работ указывают на то, что секретируемые экзосомы/микровезикулы, полученные от опухолевых клеток как *in vivo*, так и *in vitro*, обладают сходными размером, морфологией (по данным электронной микроскопии), плотностью (при ультрацентрифугировании в градиенте сахарозы), а также демонстрируют наличие как общих эндосомальных маркеров, так и маркеров ПМ [22]. Большинство исследований указывают и на то, что четкое разделение этих 2 классов везикул не только мало осуществимо технически, но и не имеет практического смысла для понимания их функций и биологического значения, поскольку они совместно и одинаковым образом воздействуют на клетки-мишени.

На сегодняшний день уже понятно, что состав содержимого экзосом не является случайным и не соответствует составу белков ПМ клеток-продуцентов, но представляет собой «микрокарты», соответствующие накоплению определенных клеточных маркеров [23]. Как осуществляется сортировка белков и других компонентов внутрь экзосом – один из важнейших вопросов, пока не имеющий однозначного ответа.

Поскольку эти структуры имеют общее эндосомальное происхождение, то вне зависимости от типа

продуцирующих их клеток они содержат ряд белков, участвующих в формировании МВЭ, таких как комплекс ESCRT (endosomal sorting complex responsible for transport) (TSG101, Alix) [24]. Другими маркерами, служащими для идентификации экзосом, являются тетраспанины (CD63, CD81 и CD9), а также белки теплового шока (HSP60, HSP70 и HSP90) [25]. Есть и маркеры экзосом, секретируемых определенными типами клеток, например белки главного комплекса гистосовместимости МНС-I и -II в экзосомах, продуцируемых антигенпрезентирующими клетками, или интегрин CD41a в экзосомах, секретируемых тромбоцитами.

Экзосомы обнаружены в большинстве тканей и практически во всех биологических жидкостях, включая кровь, грудное молоко, слюну [26], цереброспинальную жидкость, сперму, мочу [27]. В число экзосомальных белков входят малые гуанозинтрифосфатазы (ГТФазы) семейства Rab, участвующие в формировании экзосом и слиянии их с другими мембранными структурами [28], аннексины I, II, V и VI, регулирующие динамику мембран-цитоскелетных взаимодействий, а также различные молекулы адгезии и цитоскелета [29].

Механизм взаимодействия экзосом с клетками-реципиентами до конца не ясен. Исследователи рассматривают несколько вариантов такого механизма, в том числе: 1) лиганд-рецепторные взаимодействия; 2) встраивание экзосомальной мембраны в клеточную; 3) фагоцитоз экзосом клетками-реципиентами [30]. Так, описано взаимодействие изолированных экзосом В-клеток с фолликулярными дендритными клетками [31], с CD8<sup>+</sup> и CD4<sup>+</sup> Т-клетками, приводящее к заметному усилению иммунного ответа [32]. Показано, что экзосомы, полученные из инфицированных клеток, содержат патогенные антигены, модулирующие иммунный ответ. В частности, экзосомы эндотелиальных клеток, инфицированных цитомегаловирусом, способны индуцировать специфический иммунный ответ. Экзосомы инфицированных вирусом иммунодефицита человека 1-го типа макрофагов специфически связываются с Т-клетками, что обеспечивает распространение инфекции и супрессию иммунного ответа [33].

Продемонстрировано участие экзосом в функционировании эпителиальных и нервных тканей. Так, экзосомы, секретируемые клетками эпителия кишечника, участвуют в регуляции противовоспалительных процессов [34]. Экзосомы эпителиальных клеток бронхов, содержащие повышенное количество цитокинов, в случае бронхиальной астмы обеспечивают распространение противовоспалительного эффекта по всем тканям дыхательной системы [35]. Нейроны, олигодендроглиальные клетки и микроглия секретируют везикулы, которые мигрируют к определенным клеткам-мишеням. Показано участие экзосом в формировании миелина, играющего ключевую роль в функционировании и выживании нейронов [36]. Продемонстрировано, что ряд патогенных белков, вызывающих наруше-

ния центральной нервной системы, такие как прионы, супероксиддисмутаза и  $\alpha$ -синуклеин, обнаруживаются в составе экзосом и могут переноситься от клетки к клетке; наличие таких экзосом в плазме крови может использоваться в качестве маркера ранних стадий дегенеративных заболеваний [37]. Экзосомы, продуцируемые мезенхимальными стволовыми клетками (МСК), участвуют в устранении повреждений и регенерации тканей [38].

### Экзосомы опухолевых клеток

Исследования показали, что опухолевые клетки продуцируют экзосомы в значительно большем количестве, чем нормальные клетки. Продуцируемые клетками опухолей экзосомы обнаруживаются практически во всех биологических жидкостях организма, включая сыворотку крови, мочу, сперму, асцитные и плевральные жидкости. За счет наличия на своих мембранах адгезионных рецепторов и лигандов, специфичных для различных типов клеток и тканей, экзосомы «прицельно» взаимодействуют с определенными типами клеток, доставляя в последние биологические молекулы самого широкого спектра действия, в том числе факторы роста, цитокины, рецепторы, биоактивные липиды и различные виды РНК. Секреция экзосом показана для подавляющего большинства злокачественных опухолей и, по-видимому, является характерной чертой неопластической трансформации клеток.

Посредством переноса огромного количества информационно-молекулярных экзосомы осуществляют важнейшие функции при формировании первичных опухолей и опухолевой прогрессии, включая реорганизацию микроокружения и стромальных клеток [39, 40], увеличение инвазивной способности клеток [41], усиление ангиогенеза и экспрессии клетками проангиогенных факторов [42], формирование множественной лекарственной устойчивости, активацию онкогенных и антиапоптотических сигнальных путей, а также избавление от проапоптотических факторов или доставку проапоптотических факторов к клеткам, задействованным в процессах противоопухолевого иммунитета [43] (рис. 3).

Огромный фактический материал накоплен в отношении роли экзосом в подавлении противоопухолевого иммунитета, включая угнетение функций Т-лимфоцитов и натуральных киллеров (НК-клеток), а также подавление дифференцировки антигенпрезентирующих клеток. Кроме того, опухолевые экзосомы увеличивают количество и усиливают активность иммуносупрессорных клеток, способствуют активному переносу различного рода вирусов, включая вирусы, ассоциированные с канцерогенезом. Ряд данных свидетельствуют о том, что опухолевые клетки посредством секреции экзосом избавляются от химиопрепаратов (в частности, доксорубина), и этот процесс лежит в основе приобретения малигнизированными клетка-



Рис. 3. Эффекты экзосом в опухолевой ткани и микроокружении опухоли

ми устойчивости к противоопухолевой терапии [44, 45]. Отдельный пул данных касается способности экзосом изменять важнейшие функции опухолевых клеток (пролиферации, дифференцировки, выживания и др.) с помощью эпигенетических механизмов регуляции транскрипции генов посредством переноса информационных и малых РНК [46]. Эти данные во многом объясняют и феномен генетической нестабильности, лежащий в основе селекции наиболее малигнизированных клеток [47, 48]. Известно также, что экзосомы, секретируемые эмбриональными стволовыми клетками, способны эпигенетически перепрограммировать различные клетки-мишени [49]. Более того, имеются данные, указывающие на то, что экзосомы способны «передавать» клеткам-мишеням способность к метастазированию [50, 51].

Исследование состава переносимых экзосомами белков свидетельствует о том, что спектр этих белков неслучаен и напрямую зависит от типа продуцирующей их опухоли, что может быть использовано для определения маркеров конкретных заболеваний. Однако это требует дальнейших масштабных исследований.

Молекулярные механизмы, обеспечивающие различные этапы биогенеза и секреции экзосом, на сегодняшний день остаются малоизвестными. Это касается формирования МВЭ, отбора содержимого ИЛВ, определения дальнейшей «судьбы» МВЭ (слияние с лизосомальным компартментом (для большинства из них) или транспорт к ПМ для последующей секреции экзосом), механизмов экзоцитоза и акцептирования экзосом клетками-мишенями (которое также может происходить как за счет непосредственного слияния мембран, так и посредством эндоцитоза) и других процессов. Известно, что формирование МВЭ зависит от убиквитин-связывающих белков. Механизмы сортировки белков включают различные виды их убиквитинирования: моноубиквитинирование служит сигналом для эндоцитоза и включения в состав МВЭ, в то время как полиубиквитинирование является сигналом для деградации в протеасомах. Предполагается, что олигоубиквитинирование также может служить сортировочным сигналом для включения в МВЭ, что

может повышать эффективность отбора [52]. Комплексы ESCRT-0, -I, -II и -III при помощи VPS-27 (vacuolar protein sorting 27) распознают моноубиквитинированные белки и обеспечивают их включение в МВЭ. Это происходит за счет привлечения белком VPS-27 комплексов ESCRT и TSG101, что приводит к активации белка AIP/Alix [53]. Этот мультибелковый комплекс инициирует сортировку белков и заключение их в отпочковывающиеся внутрь МВЭ везикулы [54].

### Экзосомы и микроокружение опухоли

Как уже отмечалось, одной из главных функций экзосом и других микровезикул является обеспечение межклеточной коммуникации — как с соседними клетками, так и с клетками, находящимися на удаленном расстоянии. В частности, посредством экзосом клетки опухоли влияют на клеточное микроокружение, что приводит к «созреванию» опухолевой стромы и последующей стимуляции роста опухоли [55]. В состав стромы входят клетки различного типа: опухоль-ассоциированные фибробласты (ОАФ), эндотелиальные клетки, перициты, макрофаги, нейтрофилы, тучные клетки и МСК [56].

ОАФ представляют собой миофибробласты, которые образовались в результате дифференцировки клеток различного типа (резидентных фибробластов, эпителиальных и эндотелиальных клеток, перицитов, циркулирующих фиброцитов и МСК) [57], причем главным активатором данного процесса является TGF- $\beta$ 1 [58]. Установлено, что экзосомы, продуцируемые клетками опухоли, содержащие TGF- $\beta$  и  $\beta$ -гликан, запускают дифференцировку нормальных фибробластов в миофибробласты [59]. В дальнейшем миофибробласты стимулируют эпителиально-мезенхимальный переход опухолевых клеток, способствуют росту опухоли и клеточной инвазии и в целом формируют благоприятную среду для прогрессии опухоли [57].

Особую роль экзосом в формировании стромы доказывает и тот факт, что опухоли с дефицитом экзосом не способны к росту, связанному со стимуляцией микроокружением, в тестах *in vivo* [58]. Установлено, что предотвратить дифференцировку миофибробластов можно путем нокдауна малой ГТФазы Rab27 — одного из регуляторов секреции экзосом [58].

Под действием экзосом клеток опухоли миофибробласты также могут формироваться из МСК жировой ткани (adipose tissue derived mesenchymal stem cells). Обработка МСК опухолевыми экзосомами приводит к возникновению у них характеристик, типичных для опухоль-ассоциированных миофибробластов (в частности, к продукции  $\alpha$ -актина гладкой мускулатуры), а также стимулирует экспрессию белков SDF-1, VEGF, CCL5 и TGF- $\beta$  [60, 61]. Для экзосом клеток опухоли желудка показана способность индуцировать дифференцировку МСК пуповины [62].

Таким образом, можно говорить о процессе ремоделирования стромы (качественном изменении со-

става стромы) под действием экзосом, продуцируемых клетками опухоли.

ОАФ также способны воздействовать на клетки опухоли посредством экзосом. Экзосомы, секретируемые ОАФ, участвуют в доставке таких биоактивных молекул, как HGF, IL-6, PDGF, простагландины, протеазы и микроРНК [55, 63]. Показано, что ОАФ секретируют экзосомы, стимулирующие образование протрузий клетками РМЖ, а также подвижность и метастатическую активность этих клеток с участием сигнального пути Wnt-PCP (planar cell polarity) [64].

Интересным представляется тот факт, что стимулировать опухолевые клетки могут и микровезикулы тромбоцитов, не относящихся к клеткам микроокружения опухоли. Микровезикулы тромбоцитов переносят тромбоцитарный интегрин CD4, активируют ERK1/2 и серин-треониновые протеинкиназы, усиливают экспрессию MT1-MMP, MMP-9, VEGF, IL-8 и HGF и стимулируют пролиферацию и инвазию клеток [49].

### **Экзосомы, трансформация и туморогенез**

Согласно ряду данных, экзосомы злокачественных клеток способны инициировать процесс опухолевой трансформации нормальных клеток. Это демонстрирует возможность клональной экспансии опухоли посредством перепрограммирования нормальных клеток при помощи экзосом. Так, экзосомы, продуцируемые клетками рака предстательной железы, стимулируют трансформацию стволовых клеток жировой ткани [65]. Процесс сопряжен с переносом экзосомами мРНК *HRAS* и *KRAS*, онкомикроРНК miR-125b, miR-130b и miR-155, малых ГТФаз. Экзосомы клеток РМЖ способны вызывать опухолевую трансформацию нормальных клеток эпителия, развивающуюся с участием пре-микроРНК (pre-miRNAs), ассоциированных с белками комплекса RISC (RNA-induced silencing complex) [66]. Кроме того, оказалось, что инъекция мышам экзосом, выделенных из сыворотки крови больных РМЖ, вместе с нетуморогенными эпителиальными клетками приводит к формированию у них опухолей [67].

Микровезикулы клеточных линий РМЖ и глиобластомы способны формировать фенотип, характерный для трансформированных клеток, у фибробластов и клеток эпителия благодаря совместному действию тканевой трансаминазы и фибронектина [68]. При этом для поддержания трансформированного фенотипа клеткам-реципиентам необходимо постоянное присутствие микровезикул, секретируемых опухолевыми клетками.

Установлено, что экзосомы, секретируемые опухолевыми клетками, содержат онкогенные белки, ответственные за трансформацию клеток, — K-Ras, H-Ras и N-Ras, EGFR, киназы семейства Src и интегрин [69]. Примечательно, что в то же время в экзосомах обнаруживается опухолевый супрессор PTEN, сохра-

няющий свою функциональную активность и приводящий к снижению уровня фосфорилирования Akt [70].

### **Роль экзосом в формировании премеаастатических ниш**

Согласно общепринятой концепции, метастазированию опухолевых клеток предшествует образование так называемых премеаастатических ниш, обеспечивающих формирование вторичного очага роста метастазов [71]. Оказалось, что экзосомы и микровезикулы способны изменять внеклеточный матрикс и доставлять онкогенные факторы во вторичные очаги опухолевого роста [51, 72, 73]. В частности, экзосомы, секретируемые клетками высокометастазирующих линий меланомы, усиливают рост и метастазирование первичной опухоли [73]. При этом экзосомы клеток меланомы при внутривенном введении преимущественно распределяются в «сторожевые» лимфатические узлы, подготавливая условия для миграции и роста опухолевых клеток. Данный эффект опосредуется рецепторной тирозинкиназой MET, играющей важную роль в миграции, инвазии и ангиогенезе.

Экзосомальная микроРНК miR-105, секретируемая клетками опухоли, также играет важную роль на ранней стадии формирования премеаастатических ниш. МикроРНК miR-105 разрушает васкулярно-эндотелиальный барьер и увеличивает проницаемость сосудов и капилляров легких, печени и головного мозга, позволяя клеткам первичной опухоли проникать в кровотоки и колонизировать определенные дистальные органы [74]. В формировании стромы премеаастатических ниш участвуют также экзосомальные микроРНК miR-494 и miR-542-3p, мишенью для которых служат лимфатические узлы и легочный эпителий [75]. На формирование премеаастатических ниш влияют и экзосомы, секретируемые клетками опухолевой стромы и окружающей ткани [76, 77], поддерживая тем самым постоянно высокий уровень метастатической активности опухолевых клеток.

Отдельный интерес представляет исследование образования экзосом в условиях гипоксии — фактора, постоянно сопровождающего рост и прогрессию злокачественных опухолей. Гипоксия стимулирует «перестройку» ряда сигнальных путей в клетках опухоли и ее микроокружения [78, 79], которая ведет к появлению более агрессивного фенотипа злокачественных клеток и формированию устойчивости к радио- и химиотерапии. Экзосомы, являясь элементом межклеточной коммуникации, также участвуют в адаптации опухоли к гипоксическим условиям.

Вопрос, изменяются ли синтез экзосом клетками и содержимое экзосом при гипоксии, активно обсуждается в литературе последние 5 лет [80–86]. Хорошо известно, что программа клеточной реакции на гипоксию активируется через универсальный механизм — стабилизацию транскрипционных факторов HIF. Оказалось, что и продукция экзосом не является

исключением – снижение уровня кислорода до 1 % вызывает небольшое HIF-1 $\alpha$ -зависимое увеличение (в 1,3–1,4 раза) количества экзосом в культуральной среде от клеток РМЖ линий MCF-7 и MDA-MB-231. Более глубокая (до 0,1 % кислорода) гипоксия приводит к значительному накоплению экзосом в среде: их количество возрастает в 2 раза по сравнению с нормоксией [87]. Используя химический стабилизатор HIF-1 $\alpha$  (диметилноксалилглицин) и малые интерферирующие РНК HIF-1 $\alpha$ , авторы доказали прямое участие HIF-1 $\alpha$  в усилении продукции экзосом при гипоксии [87]. Так как экзосомы представляют собой фактор межклеточной коммуникации, их содержимое при гипоксии меняется и перестраивается вслед за изменениями внутриклеточных молекулярных путей. Показано, что в «гипоксических» экзосомах опухолевых клеток накапливается ряд специфических молекул; снижение уровня кислорода в опухоли ведет к увеличению содержания в экзосомах гипоксической микроРНК miR-210 [87], miR-135b [88], фермента, регулирующего дезаминирование (LOXL2) [85], кавеолина-1 (CAV-1) [81], тромбопластина (TF) [86], тетраспанинов (CD63 и CD81), белков теплового шока (HSP90 и HSP70), аннексина II [82]. Интересный факт обнаружили недавно М. Ага и соавт. Оказалось, что основной регулятор ответа клетки на гипоксию, HIF-1 $\alpha$ , также переносится экзосомами, распространяя среди клеток «волну» ответа на кислородное голодание [89]. Список гипоксических молекул, переносимых экзосомами, активно пополняется в настоящее время. Экзосомы, содержащие такие молекулы, попадают в соседние клетки опухоли и микроокружения и дополнительно активируют в них сигнальные пути. В частности показано, что экзосомы, секретлируемые опухолевыми клетками в состоянии гипоксии, стимулируют образование сосудов (неоангиогенез) [40, 90]. Помимо этого, совсем недавно доказана роль гипоксических экзосом в повышении инвазивности опухоли: экзосомы, секретированные в условиях гипоксии и перенесенные к клеткам в нормоксии, снижают в них экспрессию молекул межклеточной адгезии [82].

Дальнейшее исследование экзосом, продуцируемых опухолевыми клетками, поможет более точно установить особенности их влияния как на клетки самой опухоли, так и на процессы, происходящие в опухолевом микроокружении.

### **Экзосомы и лекарственная устойчивость опухолей**

Как известно, одной из характерных особенностей опухолевых клеток является способность быстро адаптироваться к окружающим условиям, в том числе и к токсическому действию внешних факторов, будь то гипоксия, облучение, цитотоксические препараты и др. Столь эффективная адаптация опухолевых клеток, приводящая в итоге к развитию лекарственной, гормональной, радио- и других вариантов резистент-

ности опухолей, основана как на действии специфических систем защиты – репарации ДНК, выведения ксенобиотиков (ABC-транспортеры), функционирующих на фоне угнетенного апоптоза, так и на способности к быстрой перестройке внутриклеточных сигнальных путей в тех случаях, когда активность отдельных сигнальных молекул заблокирована в результате действия специфических цитотоксических препаратов.

Исследования последних лет показали, что в развитии практически любого варианта резистентности опухолей могут принимать участие экзосомы, выступающие в роли переносчиков биомолекул от клетки к клетке. Речь идет о горизонтальном пути распространения резистентности, когда экзосомы, продуцируемые резистентными клетками, достигают клеток-реципиентов, модулируя у них соответствующие изменения лекарственной или другой устойчивости. Принципиальная возможность горизонтального пути развития лекарственной резистентности продемонстрирована в экспериментах по ко-культивированию чувствительных и резистентных клеток: так, на примере клеток РМЖ показано, что ко-культивирования чувствительных и доксорубицин-устойчивых клеток в течение 6 сут достаточно для того, чтобы чувствительные клетки приобрели относительно высокий уровень лекарственной устойчивости [91]. Обнаружено, что экзосомы принимают участие в распространении такой резистентности в первую очередь благодаря их способности инкапсулировать собственно ABC-транспортеры, в частности Р-гликопротеин, кодируемый геном множественной лекарственной устойчивости *MDR1*, и переносить их в клетки-реципиенты. Подобный эффект был убедительно продемонстрирован в экспериментах на линиях клеток РМЖ и рака предстательной железы: оказалось, что экзосомы, полученные от опухолевых клеток с высоким уровнем лекарственной устойчивости, отличаются высоким содержанием Р-гликопротеина, который они могут транспортировать в клетки-реципиенты [91, 92]. Но не только ABC-транспортеры являются объектами экзосомального трафика белков. Среди соединений, находящихся в составе опухолевых экзосом, были идентифицированы белки различных сигнальных каскадов, в том числе и тирозинкиназные рецепторы ростовых факторов. Оказалось, что продукция опухолевыми клетками экзосом, содержащих, в частности, HER-2/neu, оказывается достаточной для блокирования действия трастузумаба – таргетного препарата на основе моноклональных антител к HER-2/neu. В этом случае экзосомы, несущие на своей поверхности HER-2/neu, непосредственно связывают трастузумаб, снижая его эффективную концентрацию и предотвращая его взаимодействие с опухолевыми клетками [93].

Следует отметить, что состав белков экзосом необычайно разнообразен, причем экзосомы, продуцируемые опухолевыми клетками, отличает высокое содержание

белков, в той или иной степени ассоциированных с опухолевым ростом. Анализ протеома экзосом опухолевых клеток выявил присутствие в них ключевых сигнальных белков, в частности белков семейств Ras, Src, MAPK и проч. [94–96]. Проникновение таких белков в клетки-реципиенты стимулирует соответствующие сигнальные каскады, в том числе антиапоптотические, приводя тем самым к повышению общего уровня лекарственной устойчивости клеток.

Другой путь, горизонтального (от клетки к клетке) распространения лекарственной резистентности основан на передаче специфических микроРНК с участием экзосом. Сегодня микроРНК рассматриваются в качестве универсальных регуляторов экспрессии генов, не менее значимых, чем классические транскрипционные факторы, и неудивительно, что микроРНК достаточно быстро попали в сферу интересов исследователей экзосом. Оказалось, что микроРНК необычайно широко представлены в экзосомах — по разным данным, в их составе обнаруживается не менее 600 видов микроРНК [97, 98]. Среди них удалось идентифицировать микроРНК, ассоциированные с развитием лекарственной устойчивости и обнаруживаемые в экзосомах резистентных клеток. Так, в экзосомах резистентных клеток РМЖ существенно возрастает содержание микроРНК miR-100, miR-222 и miR-30a; продемонстрировано, что такие экзосомы успешно переносят микроРНК в клетки-реципиенты [98]. Вопрос о механизме развития лекарственной устойчивости под действием микроРНК остается во многом открытым. Известные сегодня немногочисленные работы на эту тему отводят центральную роль изменениям ключевых сигнальных каскадов под действием микроРНК, в том числе ответственных за регуляцию пролиферации (MAPK-сигналинг, циклинзависимая регуляция, PTEN и проч.) [98].

Сравнительно недавно продемонстрировано, что не только лекарственная, но и гормональная резистентность опухолей, в первую очередь — опухолей молочной железы, может распространяться горизонтальным путем с участием экзосомальной микроРНК. Исследователи анализировали трансфер miR-221/222, участие которых в развитии резистентности к тамоксифену достоверно установлено, в том числе показана их способность подавлять экспрессию рецептора эстрогенов [99]. Обнаружено, что тамоксифен-резистентные клетки РМЖ продуцируют экзосомы с повышенным содержанием miR-221/222, продемонстрирована способность таких экзосом проникать внутрь клеток-реципиентов и приводить к снижению гормональной зависимости этих клеток [100]. В наших экспериментах показано, что ко-культивирование чувствительных и резистентных к тамоксифену клеток РМЖ приводит к развитию устойчивости в чувствительных клетках, продемонстрировано участие в этом процессе экзосом, продуцируемых резистентными клетками. Примечательно, что вызванная подобным образом резис-

тентность сохраняется длительное время и после разъединения клеточных культур [101].

В целом, суммируя приведенные данные, можно заключить, что межклеточные взаимодействия, в том числе реализуемые с участием экзосом, могут играть решающую роль в развитии, а главное — в распространении резистентности по всей массе опухоли, во многом определяя столь быструю адаптацию злокачественных опухолей к действию цитотоксических факторов.

### Экзосомы: от эксперимента к клинической практике

Развитие современных методов поиска лекарственных средств позволило за последние годы достичь определенных успехов в формировании арсенала противоопухолевых препаратов. С одной стороны, широкомасштабный скрининг химических библиотек предоставляет ряд перспективных молекул-кандидатов для доклинических исследований. С другой — применение в клинике практически всех разрабатываемых препаратов обнаруживает существенные проблемы, снижающие эффективность терапии. Общая и органоспецифическая токсичность, короткое время жизни молекул-кандидатов, развитие резистентности, острые психогенные реакции и лекарственная (медикаментозная) аллергия часто являются причиной неудачи в доклинических исследованиях в онкологии [102–104]. Одним из способов преодоления таких трудностей, как полагают, является разработка нетоксичных средств лекарственной доставки. Какими же свойствами должно обладать «идеальное» средство доставки препарата? Это прежде всего низкая токсичность, большее время жизни в организме, чем у переносимой молекулы, и достаточная иммунологическая совместимость с пациентом. Биологические свойства экзосом, описанные выше, делают их вполне востребованными для исследования и разработки новых средств доставки противоопухолевых препаратов. Стоит подчеркнуть, что важными конкурентными преимуществами экзосом для клинической практики являются их аутологичность (происхождение от пациента, получающего лечение) и возможность *ex vivo* манипуляций с экзосомами больного [105]. В частности, аутологичность экзосом позволит в будущем преодолеть ряд побочных эффектов, возникающих при использовании в терапии липосом (синтетических везикул) [106].

Существует 3 основных метода «упаковки» лекарственных средств в экзосомы человека [105, 107, 108]. Первый способ основан на культивировании *in vitro* клеток пациента (например, полученных из асцита) в целях наработки нативных экзосом. Выделенные таким методом экзосомы затем инкубируют с препаратом для его проникновения внутрь и «загрузки». Для пассивного проникновения препарата в экзосомы необходимо, чтобы он обладал липофильными свойствами. Второй метод заключается в инкубации препарата непосредственно с клетками пациента *ex vivo*. Клетки, обработанные лекарственным средством, на-

чинают «запаковывать» его в экзосомы и секретировать в культуральную среду. Среду собирают и выделяют из нее экзосомы, содержащие лекарственное средство. Третий метод состоит в трансфекции клеток пациента *in vitro* и позволяет включить в экзосомы необходимые последовательности ДНК, РНК и синтезированные белки [109, 110]. Использование описанных методов не нарушает аутологичности экзосом, что в будущем будет способствовать созданию лекарственных средств, не вызывающих аллергических и острых токсических реакций у пациента [105, 110].

Возможность проникновения (инкорпорирования, «загрузки») противоопухолевых средств в экзосомы продемонстрирована для нескольких классов химических соединений [105, 111]. К сожалению, даже для липофильных молекул, обладающих большим сродством к мембране экзосом, наблюдается не очень высокая степень инкорпорирования. Эффективность заполнения экзосом препаратом можно повысить с помощью различных методов: при дополнительном использовании электропорации доксорубицин проникает приблизительно в 20 % экзосом дендритных клеток [111]. Наиболее эффективным способом «упаковки» доксорубицина оказалась обработка клеток линии MCF-7 препаратом в условиях гипертермии (42 °C) в течение 1 ч [112]. Известно, что применение еще одного противоопухолевого средства, паклитаксела, ограничено высокой частотой реакций повышенной чувствительности к препарату. Инкорпорирование паклитаксела в средства доставки, в частности в экзосомы, может снизить частоту таких реакций. Обнаружено, что мезенхимальные клетки, культивируемые *in vitro*, способны интегрировать паклитаксел в экзосомы [113, 114]. Паклитаксел в экзосомах, выделенных мезенхимальными клетками, продемонстрировал высокую токсичность на клеточной линии рака поджелудочной железы человека CFPAC-1.

Некоторые противовоспалительные средства также поддаются введению в экзосомы, например куркумин. Куркумин (полифенол природного происхождения) обладает не только противовоспалительным, но и проапоптотическим, противоокислительным, противоамилоидным и даже антидепрессивным действием. В работе D. Sun и соавт. продемонстрировано проникновение куркумина в экзосомы при комнатной температуре. Куркумин, интегрированный в экзосомы, обладает улучшенными фармакологическими характеристиками: повышаются его биологическая доступность и растворимость, увеличивается стабильность препарата [115]. В перспективе такие экзосомы с куркумином могут быть использованы в сопровождающей терапии в онкологии.

В целом разработка новых средств доставки противоопухолевых препаратов в экзосомах пока находится в доклинической стадии. Только отдельные проекты переходят к I фазе клинических исследований. Более интенсивно развивается другое «экзосомное»

направление в онкологии — иммунотерапия. Первые эксперименты с экзосомами из асцита пациентов оказались достаточно успешными, и результаты I фазы исследования применения экзосом из асцита в комбинации с GM-CSF в иммунотерапии у больных раком толстой кишки были опубликованы в 2008 г. Продемонстрирована безопасность такой терапии, а также выявлено увеличение специфического иммунного противоопухолевого ответа у больных [116]. В другом исследовании B. Escudier и соавт. [117] провели вакцинирование 15 больных метастатической меланомой экзосомами из аутологичных дендритных клеток. Авторами продемонстрирована возможность дополнительной загрузки пептидов (МНС) в экзосомы для усиления специфического противоопухолевого ответа. Иммунотерапия экзосомами показывает хорошую переносимость и низкую частоту побочных эффектов.

Несмотря на то, что исследования экзосом в лабораториях ведутся с середины 1980-х годов, до клинической стадии доходит очень небольшое число проектов. Поиск по базе ClinicalTrials.gov в сентябре 2015 г. выявил всего 15 исследований по запросу “exosomes and cancer”. В исследовании NCT02507583 оценивается возможность иммунизации больных глиомой с помощью экзосом, секретлируемых гибнущими опухолевыми клетками. Клетки, полученные при хирургическом вмешательстве, обрабатывают специфической олигонуклеотидной последовательностью IGF-1R/AS ODN, затем помещают в капсулу и имплантируют больному. IGF-1R/AS ODN вызывает снижение экспрессии рецепторов IGF-1, что ведет к запуску апоптоза в опухолевых клетках. При гибели клетки продолжают секретировать экзосомы, содержащие опухолевые антигены. Экзосомы и апоптотные тельца (мембранные везикулы, образующиеся при апоптозе) постепенно попадают из капсулы-имплантата в организм больного и усиливают противоопухолевый иммунный ответ.

В настоящее время рассматривается возможность использования не только аутологичных экзосом как средства доставки препаратов, но и экзосом растительного происхождения. Ранее была показана достаточно высокая эффективность уже упомянутого выше фитоэстрогена куркумина при раке толстой кишки [118, 119]. Однако эффективность этого препарата ограничена низкой биодоступностью: даже прием высоких доз (8–12 г в день) не приводил к достаточному накоплению куркумина в тканях [118, 120]. В исследовании I фазы NCT01294072 (проводится в James Graham Brown Cancer Center) оценивается увеличение биодоступности куркумина с помощью создания конъюгатов препарата с растительными экзосомами. Будет проведено сравнение 3 групп больных раком толстой кишки: в 1-ю войдут пациенты, получающие куркумин, во 2-ю — конъюгат куркумина и растительных экзосом, а в 3-ю — больные, не получающие препараты (контрольная группа). Авторы исследования

ожидают, что применение созданных таблетированных форм конъюгатов куркумина с экзосомами позволит повысить концентрацию препарата в тканях. В декабре 2015 г. станут известны первые результаты этого исследования. Растительные экзосомы находят применение в онкологии не только как средства доставки, но и как препараты для проведения сопровождающей терапии. В исследовании NCT01668849 рассматривается возможность использования экзосом, выделенных из винограда, для снижения побочных эффектов комбинированной радио- и химиотерапии при опухолях головы и шеи.

В целом применение экзосом в доклинической и клинической онкологии развивается в 4 направлениях (рис. 4). Наиболее успешным можно считать иммунотерапию – в этой области завершены несколько клинических исследований I фазы, получены достоверные сведения об увеличении иммунного ответа при вакцинации экзосомами [116, 117, 121]. Доставке таргетных препаратов с помощью экзосом также уделяется много внимания, однако большинство проектов пока не дошло до стадии клинических исследований. Одна из причин такой ситуации – не очень высокая эффективность «загрузки» лекарственных средств в экзосомы. Постепенно приобретают популярность исследования экзосом в качестве средств доставки в опухоль специфических нуклеиновых кислот (малых интерферирующих РНК, микроРНК).

*Работы авторов по тематике обзора поддержаны Российским научным фондом (проект № 14-15-00362) и Российским фондом фундаментальных исследований (проекты № 14-04-31119 (раздел об исследованиях в гипоксии) и № 14-04-01706).*



Рис. 4. Перспективы применения экзосом в клинической практике

Кроме того, отдельно стоит упомянуть возможность диагностических процедур с анализом экзосом онкологического больного, а также прогностического мониторинга. С одной стороны, накапливаются сведения о корреляциях белкового/ДНК/РНК-профиля экзосом (например, из асцита) и опухолевых клеток. С другой, пока нет четкого представления о том, какой выигрыш даст профилирование экзосом для клинико-лабораторных исследований [122]. Таким образом, исследования экзосом открывают ряд новых и уникальных возможностей в онкологии, и дальнейшие шаги помогут внедрить некоторые из экспериментальных разработок в клиническую практику.

## ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

1. Trams E.G., Lauter C.J., Salem N. Jr, Heine U. Exfoliation of membrane ectoenzymes in the form of micro-vesicles. *Biochim Biophys Acta* 1981;645(1):63–70.
2. Keller S., Sanderson M.P., Stoeck A., Altevogt P. Exosomes: from biogenesis and secretion to biological function. *Immunol Lett* 2006;107(2):102–8.
3. Harding C., Heuser J., Stahl P. Receptor-mediated endocytosis of transferrin and recycling of the transferrin receptor in rat reticulocytes. *J Cell Biol* 1983;97(2):329–39.
4. Simons M., Raposo G. Exosomes – vesicular carriers for intercellular communication. *Curr Opin Cell Biol* 2009;21(4):575–81.
5. Ogorevc E., Kralj-Iglic V., Veranic P. The role of extracellular vesicles in phenotypic cancer transformation. *Radiol Oncol* 2013;47(3):197–205.
6. Bellingham S.A., Guo B.B., Coleman B.M., Hill A.F. Exosomes: vehicles for the transfer of toxic proteins associated with neurodegenerative diseases? *Front Physiol* 2012;3:124.
7. Holme P.A., Solum N.O., Brosstad F. et al. Demonstration of platelet-derived microvesicles in blood from patients with activated coagulation and fibrinolysis using a filtration technique and western blotting. *Thromb Haemost* 1994;72(5):666–71.
8. Hess C., Sadallah S., Hefti A. et al. Ectosomes released by human neutrophils are specialized functional units. *J Immunol* 1999;163(8):4564–73.
9. Cocucci E., Racchetti G., Meldolesi J. Shedding microvesicles: artefacts no more. *Trends Cell Biol* 2009;19(2):43–51.
10. Gyorgy B., Szab T.G., Pásztoi M. et al. Membrane vesicles, current state-of-the-art: emerging role of extracellular vesicles. *Cell Mol Life Sci* 2011;68(16):2667–88.
11. Harding C., Heuser J., Stahl P. Endocytosis and intracellular processing of transferrin and colloidal gold-transferrin in rat reticulocytes: demonstration of a pathway for receptor shedding. *Eur J Cell Biol* 1984;35(2):256–63.
12. Pan B.T., Teng K., Wu C. et al. Electron microscopic evidence for externalization of the transferrin receptor in vesicular form in sheep reticulocytes. *J Cell Biol* 1985;101(3):942–8.
13. Zitvogel L., Regnault A., Lozier A. et al. Eradication of established murine tumors using a novel cell-free vaccine: dendritic cell-derived exosomes. *Nat Med* 1998;4(5):594–600.
14. Raposo G., Nijman H.W., Stoorvogel W. et al. B lymphocytes secrete antigen-presenting vesicles. *J Exp Med* 1996;183(3):1161–72.
15. Thery C., Ostrowski M., Segura E. Membrane vesicles as conveyors of immune responses. *Nat Rev Immunol* 2009;9(8):581–93.
16. Piper R.C., Katzmann D.J. Biogenesis and function of multivesicular bodies. *Annu Rev Cell Dev Biol* 2007;23:519–47.
17. Taylor D.D., Gercel-Taylor C. Exosomes/microvesicles: mediators of cancer-associated

- immunosuppressive microenvironments. *Semin Immunopathol* 2011;33(5):441–54.
18. Heijnen H.F., Schiel A.E., Fijnhrer R. et al. Activated platelets release two types of membrane vesicles: microvesicles by surface shedding and exosomes derived from exocytosis of multivesicular bodies and alpha-granules. *Blood* 1999;94(11):3791–9.
19. Deregibus M.C., Cantaluppi V., Calogero R. et al. Endothelial progenitor cell derived microvesicles activate an angiogenic program in endothelial cells by a horizontal transfer of mRNA. *Blood* 2007;110(7):2440–8.
20. Muralidharan-Chari V., Clancy J., Plou C. et al. ARF6-regulated shedding of tumor cell-derived plasma membrane microvesicles. *Curr Biol* 2009;19(22):1875–85.
21. Booth A.M., Fang Y., Fallon J.K. et al. Exosomes and HIV Gag bud from endosome-like domains of the T cell plasma membrane. *J Cell Biol* 2006;172(6):923–35.
22. Kesimer M., Scull M., Brighton B. et al. Characterization of exosome-like vesicles released from human tracheobronchial ciliated epithelium: a possible role in innate defense. *FASEB J* 2009;23(6):1858–68.
23. Mathivanan S., Ji H., Simpson R.J. Exosomes: extracellular organelles important in intercellular communication. *J Proteomics* 2010;73(10):1907–20.
24. Mathivanan S., Lim J.W., Tauro B.J. et al. Proteomic analysis of A33 immunoprecipitated exosomes released from the human colon tumor cell line LIM1215 reveals a tissue-specific protein signature. *Mol Cell Proteomics* 2010;9(2):197–208.
25. Graner M.W., Alzate O., Dechkovskaia A.M. et al. Proteomic and immunologic analyses of brain tumor exosomes. *FASEB J* 2009;23(5):1541–57.
26. Lasser C., Alikhani V.S., Ekström K. et al. Human saliva, plasma and breast milk exosomes contain RNA: uptake by macrophages. *J Transl Med* 2011;9:9.
27. Street J.M., Barran P.E., Mackay C.L. et al. Identification and proteomic profiling of exosomes in human cerebrospinal fluid. *J Transl Med* 2012;10:5.
28. Pfeffer S.R. Two Rabs for exosome release. *Nat Cell Biol* 2010;12(1):3–4.
29. Choi D.S., Kim D.K., Kim Y.K., Gho Y.S. Proteomics, transcriptomics and lipidomics of exosomes and ectosomes. *Proteomics* 2013;13(10–11):1554–71.
30. Thery C., Zitvogel L., Amigorena S. Exosomes: composition, biogenesis and function. *Nat Rev Immunol* 2002;2(8):569–79.
31. Denzer K., van Eijk M., Kleijmeer M.J. et al. Follicular dendritic cells carry MHC class II-expressing microvesicles at their surface. *J Immunol* 2000;165(3):1259–65.
32. Robbins P.D., Morelli A.E. Regulation of immune responses by extracellular vesicles. *Nat Rev Immunol* 2014;14(3):195–208.
33. Garrus J.E., von Schwedler U.K., Pornillos O.W. et al. Tsg101 and the vacuolar protein sorting pathway are essential for HIV-1 budding. *Cell* 2001;107(1):55–65.
34. van Niel G., Raposo G., Candalh C. et al. Intestinal epithelial cells secrete exosome-like vesicles. *Gastroenterology* 2001;121(2):337–49.
35. Prado N., Marazuela E.G., Segura E. et al. Exosomes from bronchoalveolar fluid of tolerized mice prevent allergic reaction. *J Immunol* 2008;181(2):1519–25.
36. Bakhti M., Winter C., Simons M. Inhibition of myelin membrane sheath formation by oligodendrocyte-derived exosome-like vesicles. *J Biol Chem* 2011;286(1):787–96.
37. Kujala P., Raymond C.R., Romeijn M. et al. Prion uptake in the gut: identification of the first uptake and replication sites. *PLoS Pathog* 2011;7(12):e1002449.
38. Lee R.H., Pulin A.A., Seo M.J. et al. Intravenous hMSCs improve myocardial infarction in mice because cells embolized in lung are activated to secrete the anti-inflammatory protein TSG-6. *Cell Stem Cell* 2009;5(1):54–63.
39. Marhaba R., Klingbeil P., Nuebel T. et al. CD44 and EpCAM: cancer-initiating cell markers. *Curr Mol Med* 2008;8(8):784–804.
40. Park J.E., Tan H.S., Datta A. et al. Hypoxic tumor cell modulates its microenvironment to enhance angiogenic and metastatic potential by secretion of proteins and exosomes. *Mol Cell Proteomics* 2010;9(6):1085–99.
41. Graves L.E., Ariztia E.V., Navari J.R. et al. Proinvasive properties of ovarian cancer ascites-derived membrane vesicles. *Cancer Res* 2004;64(19):7045–9.
42. Al-Nedawi K., Meehan B., Kerbel R.S. et al. Endothelial expression of autocrine VEGF upon the uptake of tumor-derived microvesicles containing oncogenic EGFR. *Proc Natl Acad Sci USA* 2009;106(10):3794–9.
43. Ichim T.E., Zhong Z., Kaushal S. et al. Exosomes as a tumor immune escape mechanism: possible therapeutic implications. *J Transl Med* 2008;6:37.
44. Safaei R., Larson B.J., Cheng T.C. et al. Abnormal lysosomal trafficking and enhanced exosomal export of cisplatin in drug-resistant human ovarian carcinoma cells. *Mol Cancer Ther* 2005;4(10):1595–604.
45. Shedden K., Xie X.T., Chandaroy P. et al. Expulsion of small molecules in vesicles shed by cancer cells: association with gene expression and chemosensitivity profiles. *Cancer Res* 2003;63(15):4331–7.
46. Skog, J., Würdinger T., van Rijn S. et al. Glioblastoma microvesicles transport RNA and proteins that promote tumour growth and provide diagnostic biomarkers. *Nat Cell Biol* 2008;10(12):1470–6.
47. Viswanathan M., Sangiliyandi G., Vinod S.S. et al. Genomic instability and tumor-specific alterations in oral squamous cell carcinomas assessed by inter-(simple sequence repeat) PCR. *Clin Cancer Res* 2003;9(3):1057–62.
48. Camussi G., Deregibus M.C., Tetta C. Paracrine/endocrine mechanism of stem cells on kidney repair: role of microvesicle-mediated transfer of genetic information. *Curr Opin Nephrol Hypertens* 2010;19(1):7–12.
49. Janowska-Wieczorek A., Wysoczynski M., Kijowski J. et al. Microvesicles derived from activated platelets induce metastasis and angiogenesis in lung cancer. *Int J Cancer* 2005;113(5):752–60.
50. Hao S., Ye Z., Li F. et al. Epigenetic transfer of metastatic activity by uptake of highly metastatic B16 melanoma cell-released exosomes. *Exp Oncol* 2006;28(2):126–31.
51. Jung T., Castellana D., Klingbeil P. et al. CD44v6 dependence of premetastatic niche preparation by exosomes. *Neoplasia* 2009;11(10):1093–105.
52. Qu J.L., Qu X.J., Qu J.L. et al. The role of cbl family of ubiquitin ligases in gastric cancer exosome-induced apoptosis of Jurkat T cells. *Acta Oncol* 2009;48(8):1173–80.
53. Wöllert T., Hurley J.H. Molecular mechanism of multivesicular body biogenesis by ESCRT complexes. *Nature* 2010;464(7290):864–9.
54. Katzmann D.J., Stefan C.J., Babst M., Emr S.D. Vps27 recruits ESCRT machinery to endosomes during MVB sorting. *J Cell Biol* 2003;162(3):413–23.
55. Roma-Rodrigues C., Fernandes A.R., Baptista P.V. Exosome in tumour microenvironment: overview of the crosstalk between normal and cancer cells. *Biomed Res Int* 2014;2014:179486.
56. van Zijl F., Krupitza G., Mikulits W. Initial steps of metastasis: cell invasion and endothelial transmigration. *Mutat Res* 2011;728(1–2):23–34.
57. Otranto M., Sarrazy V., Bonté F. et al. The role of the myofibroblast in tumor stroma remodeling. *Cell Adh Migr* 2012;6(3):203–19.
58. Webber J.P., Spary L.K., Sanders A.J. et al. Differentiation of tumour-promoting stromal myofibroblasts by cancer exosomes. *Oncogene* 2015;34(3):290–302.
59. Webber J., Steadman R., Mason M.D. et al. Cancer exosomes trigger fibroblast to myofibroblast differentiation. *Cancer Res* 2010;70(23):9621–30.
60. Cho J.A., Park H., Lim E.H. et al. Exosomes from ovarian cancer cells induce adipose tissue-derived mesenchymal stem cells to acquire the physical and functional characteristics of tumor-supporting myofibroblasts. *Gynecol Oncol* 2011;123(2):379–86.
61. Cho J.A., Park H., Lim E.H., Lee K.W. Exosomes from breast cancer cells can convert adipose tissue-derived mesenchymal stem cells into myofibroblast-like cells. *Int J Oncol* 2012;40(1):130–8.
62. Gu J., Qian H., Shen L. et al. Gastric cancer exosomes trigger differentiation of umbilical cord derived mesenchymal stem cells to carcinoma-associated fibroblasts through TGF- $\beta$ /Smad pathway. *PLoS One* 2012;7(12):e52465.

63. Thuma F., Zoller M. Outsmart tumor exosomes to steal the cancer initiating cell its niche. *Semin Cancer Biol* 2014;28:39–50.
64. Luga V., Wrana J.L. Tumor-stroma interaction: Revealing fibroblast-secreted exosomes as potent regulators of Wnt-planar cell polarity signaling in cancer metastasis. *Cancer Res* 2013;73(23):6843–7.
65. Abd Elmageed Z.Y., Yang Y., Thomas R. et al. Neoplastic reprogramming of patient-derived adipose stem cells by prostate cancer cell-associated exosomes. *Stem Cells* 2014;32(4):983–97.
66. Melo S.A., Sugimoto H., O'Connell J.T. et al. Cancer exosomes perform cell-independent microRNA biogenesis and promote tumorigenesis. *Cancer Cell* 2014;26(5):707–21.
67. Zhang X., Yuan X., Shi H. et al. Exosomes in cancer: small particle, big player. *J Hematol Oncol* 2015;8:83.
68. Antonyak M.A., Li B., Borouh L.K. et al. Cancer cell-derived microvesicles induce transformation by transferring tissue transglutaminase and fibronectin to recipient cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 2011;108(12):4852–7.
69. Ji H., Greening D.W., Barnes T.W. et al. Proteome profiling of exosomes derived from human primary and metastatic colorectal cancer cells reveal differential expression of key metastatic factors and signal transduction components. *Proteomics* 2013;13(10–11):1672–86.
70. Putz U., Howitt J., Doan A. et al. The tumor suppressor PTEN is exported in exosomes and has phosphatase activity in recipient cells. *Sci Signal* 2012;5(243):ra70.
71. Psaila B., Lyden D. The metastatic niche: adapting the foreign soil. *Nat Rev Cancer* 2009;9(4):285–93.
72. Peinado H., Lavotshkin S., Lyden D. The secreted factors responsible for pre-metastatic niche formation: old sayings and new thoughts. *Semin Cancer Biol* 2011;21(2):139–46.
73. Peinado H., Alečković M., Lavotshkin S. et al. Melanoma exosomes educate bone marrow progenitor cells toward a pro-metastatic phenotype through MET. *Nat Med* 2012;18(6):883–91.
74. Zhou W., Fong M.Y., Min Y. et al. Cancer-secreted miR-105 destroys vascular endothelial barriers to promote metastasis. *Cancer Cell* 2014;25(4):501–15.
75. Rana S., Malinowska K., Zoller M. Exosomal tumor microRNA modulates premetastatic organ cells. *Neoplasia* 2013;15(3):281–95.
76. Luga V., Zhang L., Vitoria-Petit A.M. et al. Exosomes mediate stromal mobilization of autocrine Wnt-PCP signaling in breast cancer cell migration. *Cell* 2012;151(7):1542–56.
77. Ono M., Kosaka N., Tominaga N. et al. Exosomes from bone marrow mesenchymal stem cells contain a microRNA that promotes dormancy in metastatic breast cancer cells. *Sci Signal* 2014;7(332):ra63.
78. Schonenberger M.J., Kovacs W.J. Hypoxia signaling pathways: modulators of oxygen-related organelles. *Front Cell Dev Biol* 2015;3:42.
79. Zinna A., Kurpisz M. Hypoxia-inducible factor-1 in physiological and pathophysiological angiogenesis: applications and therapies. *Biomed Res Int* 2015;2015:549412.
80. Yang Y., Yang X., Yang Y. et al. Exosomes: a promising factor involved in cancer hypoxic microenvironments. *Curr Med Chem* 2015. [Epub ahead of print].
81. Vered M., Lehtonen M., Hotakainen L. et al. Caveolin-1 accumulation in the tongue cancer tumor microenvironment is significantly associated with poor prognosis: an *in-vivo* and *in-vitro* study. *BMC Cancer* 2015;15:25.
82. Ramteke A., Ting H., Agarwal C. et al. Exosomes secreted under hypoxia enhance invasiveness and stemness of prostate cancer cells by targeting adherens junction molecules. *Mol Carcinog* 2015;54(7):554–65.
83. Chiarini F., Lonetti A., Evangelisti C. et al. Advances in understanding the acute lymphoblastic leukemia bone marrow microenvironment: From biology to therapeutic targeting. *Biochim Biophys Acta* 2015. [Epub ahead of print].
84. Belting M., Christianson H.C. Role of exosomes and microvesicles in hypoxia-associated tumour development and cardiovascular disease. *J Intern Med* 2015;278(3):251–63.
85. Yoon J.H., Kim J., Kim K.L. et al. Proteomic analysis of hypoxia-induced U373MG glioma secretome reveals novel hypoxia-dependent migration factors. *Proteomics* 2014;14(12):1494–502.
86. Svensson K.J., Kucharzewska P., Christianson H.C. et al. Hypoxia triggers a proangiogenic pathway involving cancer cell microvesicles and PAR-2-mediated heparin-binding EGF signaling in endothelial cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 2011;108(32):13147–52.
87. King H.W., Michael M.Z., Gleadle J.M. Hypoxic enhancement of exosome release by breast cancer cells. *BMC Cancer* 2012;12:421.
88. Umezū T., Tadokoro H., Azuma K. et al. Exosomal miR-135b shed from hypoxic multiple myeloma cells enhances angiogenesis by targeting factor-inhibiting HIF-1. *Blood* 2014;124(25):3748–57.
89. Aga M., Bentz G.L., Raffa S. et al. Exosomal HIF1 $\alpha$  supports invasive potential of nasopharyngeal carcinoma-associated LMP1-positive exosomes. *Oncogene* 2014;33(37):4613–22.
90. Tadokoro H., Umezū T., Ohyashiki K. et al. Exosomes derived from hypoxic leukemia cells enhance tube formation in endothelial cells. *J Biol Chem* 2013;288(48):34343–51.
91. Pasquier J., Galas L., Boulangé-Lecomte C. et al. Different modalities of intercellular membrane exchanges mediate cell-to-cell p-glycoprotein transfers in MCF-7 breast cancer cells. *J Biol Chem* 2012;287(10):7374–87.
92. Corcoran C., Rani S., O'Brien K. et al. Docetaxel-resistance in prostate cancer: evaluating associated phenotypic changes and potential for resistance transfer via exosomes. *PLoS One* 2012;7(12):e50999.
93. Ciravolo V., Huber V., Ghedini G.C. et al. Potential role of HER2-overexpressing exosomes in countering trastuzumab-based therapy. *J Cell Physiol* 2012;227(2):658–67.
94. Dutta S., Reamtong O., Panvongsa W. et al. Proteomics profiling of cholangiocarcinoma exosomes: A potential role of oncogenic protein transferring in cancer progression. *Biochim Biophys Acta* 2015;1852(9):1989–99.
95. Keerthikumar S., Gangoda L., Liem M. et al. Proteogenomic analysis reveals exosomes are more oncogenic than ectosomes. *Oncotarget* 2015;6(17):15375–96.
96. Demory Beckler M., Higginbotham J.N., Franklin J.L. et al. Proteomic analysis of exosomes from mutant KRAS colon cancer cells identifies intercellular transfer of mutant KRAS. *Mol Cell Proteomics* 2013;12(2):343–55.
97. Villagrasa A., Álvarez P.J., Osuna A. et al. Exosomes derived from breast cancer cells, small trojan horses? *J Mammary Gland Biol Neoplasia* 2014;19(3–4):303–13.
98. Chen W.X., Liu X.M., Lv M.M. et al. Exosomes from drug-resistant breast cancer cells transmit chemoresistance by a horizontal transfer of microRNAs. *PLoS One* 2014;9(4):e95240.
99. Zhao J.J., Lin J., Yang H. et al. MicroRNA-221/222 negatively regulates estrogen receptor alpha and is associated with tamoxifen resistance in breast cancer. *J Biol Chem* 2008;283(45):31079–86.
100. Wei Y., Lai X., Yu S. et al. Exosomal miR-221/222 enhances tamoxifen resistance in recipient ER-positive breast cancer cells. *Breast Cancer Res Treat* 2014;147(2):423–31.
101. 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.)].
102. Zhang W., Meng Y., Liu N. et al. Insights into chemoresistance of prostate cancer. *Int J Biol Sci* 2015;11(10):1160–70.
103. Hong S., Tan M., Wang S. et al. Efficacy and safety of angiogenesis inhibitors in advanced non-small cell lung cancer: a systematic review and meta-analysis. *J Cancer Res Clin Oncol* 2015;141(5):909–21.
104. Fakhoury M. Drug delivery approaches for the treatment of glioblastoma multiforme. *Artif Cells Nanomed Biotechnol* 2015:1–9.

105. Batrakova E.V., Kim M.S. Using exosomes, naturally-equipped nanocarriers, for drug delivery. *J Control Release* 2015. [Epub ahead of print].
106. Tila D., Ghasemi S., Yazdani-Arazi S.N. et al. Functional liposomes in the cancer-targeted drug delivery. *J Biomater Appl* 2015;30(1):3–16.
107. Urbanelli L., Buratta S., Sagini K. et al. Exosome-based strategies for diagnosis and therapy. *Recent Pat CNS Drug Discov* 2015;10(1):10–27.
108. Guo L., Guo N. Exosomes: Potent regulators of tumor malignancy and potential bio-tools in clinical application. *Crit Rev Oncol Hematol* 2015;95(3):346–58.
109. Lasser C. Exosomes in diagnostic and therapeutic applications: biomarker, vaccine and RNA interference delivery vehicle. *Exp Opin Biol Ther* 2015;15(1):103–17.
110. Gyorgy B., Hung M.E., Breakefield X.O., Leonard J.N. Therapeutic applications of extracellular vesicles: clinical promise and open questions. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 2015;55:439–64.
111. Tian Y., Li S., Song J. et al. A doxorubicin delivery platform using engineered natural membrane vesicle exosomes for targeted tumor therapy. *Biomaterials* 2014;35(7):2383–90.
112. Yang Y., Chen Y., Zhang F. et al. Increased anti-tumour activity by exosomes derived from doxorubicin-treated tumour cells via heat stress. *Int J Hyperthermia* 2015;31(5):498–506.
113. Pascucci L., Coccè V., Bonomi A. et al. Paclitaxel is incorporated by mesenchymal stromal cells and released in exosomes that inhibit in vitro tumor growth: a new approach for drug delivery. *J Control Release* 2014;192:262–70.
114. Duchi S., Dambrosio P., Martella E. et al. Thiophene-based compounds as fluorescent tags to study mesenchymal stem cell uptake and release of taxanes. *Bioconjug Chem* 2014;25(4):649–55.
115. Sun D., Zhuang X., Xiang X. et al. A novel nanoparticle drug delivery system: the anti-inflammatory activity of curcumin is enhanced when encapsulated in exosomes. *Mol Ther* 2010;18(9):1606–14.
116. Dai S., Wei D., Wu Z. et al. Phase I clinical trial of autologous ascites-derived exosomes combined with GM-CSF for colorectal cancer. *Mol Ther* 2008;16(4):782–90.
117. Escudier B., Dorval T., Chaput N. et al. Vaccination of metastatic melanoma patients with autologous dendritic cell (DC) derived-exosomes: results of the first phase I clinical trial. *J Transl Med* 2005;3(1):10.
118. Núñez-Sánchez M.A., González-Sarriás A., Romo-Vaquero M. et al. Dietary phenolics against colorectal cancer – from promising preclinical results to poor translation into clinical trials: Pitfalls and future needs. *Mol Nutr Food Res* 2015;59(7):1274–91.
119. Bandyopadhyay D. Farmer to pharmacist: curcumin as an anti-invasive and antimetastatic agent for the treatment of cancer. *Front Chem* 2014;2:113.
120. Shehzad A., Wahid F., Lee Y.S. Curcumin in cancer chemoprevention: molecular targets, pharmacokinetics, bioavailability, and clinical trials. *Arch Pharm(Weinheim)* 2010;343(9):489–99.
121. Pitt J.M., Charrier M., Viaud S. et al. Dendritic cell-derived exosomes as immunotherapies in the fight against cancer. *J Immunol* 2014;193(3):1006–11.
122. Shender V.O., Pavlyukov M.S., Ziganshin R.H. et al. Proteome-metabolome profiling of ovarian cancer ascites reveals novel components involved in intercellular communication. *Mol Cell Proteomics* 2014;13(12):3558–71.