

На правах рукописи

СКРЯБИН ГЛЕБ ОЛЕГОВИЧ

**СОСТАВ И ФУНКЦИОНАЛЬНОЕ ЗНАЧЕНИЕ БЕЛКОВ ЛИПИДНЫХ РАФТОВ В
ЭКЗОСОМАХ И МИКРОВЕЗИКУЛАХ, СЕКРЕТИРУЕМЫХ КЛЕТКАМИ
ЗЛОКАЧЕСТВЕННЫХ ОПУХОЛЕЙ**

3.1.6 Онкология, лучевая терапия

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Москва – 2025

Работа выполнена в федеральном государственном бюджетном учреждении «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии имени Н.Н. Блохина» Министерства здравоохранения Российской Федерации.

Научный руководитель:

Чевкина Елена Максимовна

доктор биологических наук, заведующий лабораторией регуляции клеточных и вирусных онкогенов НИИ канцерогенеза ФГБУ «НМИЦ онкологии имени Н.Н. Блохина» Минздрава России

Официальные оппоненты:

Малек Анастасия Валерьевна

доктор медицинских наук, заведующая научной лабораторией субклеточных технологий с группой онкоэндокринологии, врач-трансфузиолог ФГБУ «НМИЦ онкологии имени Н.Н. Петрова» Минздрава России

Спирин Павел Владимирович

доктор биологических наук, старший научный сотрудник лаборатории клеточных основ развития злокачественных заболеваний Института молекулярной биологии имени В.А. Энгельгардта РАН

Ведущая организация:

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт биологии гена Российской академии наук

Защита состоится «27» апреля 2026 года на заседании диссертационного совета ПДС 0300.025, созданного на базе ФГАОУ ВО «Российский университет дружбы народов имени Патриса Лумумбы», по адресу: 117198, г. Москва, ул. Миклухо-Макляя, д. 6.

С диссертацией можно ознакомиться в читальном зале УНИБЦ (Научная библиотека) ФГАОУ ВО «Российский университет дружбы народов имени Патриса Лумумбы» 117198, г. Москва, ул. Миклухо-Макляя, д. 6.

Электронные версии диссертации и автореферата размещены на сайте РУДН по адресу: <https://www.rudn.ru/science/dissovet> и отправлены для размещения на официальном сайте ВАК при Минобрнауки России: <https://vak.minobrnauki.gov.ru>

Автореферат разослан «____» _____ 2026 года.

Ученый секретарь
диссертационного совета ПДС 0300.025
доктор биологических наук, профессор

Лукашева Елена Васильевна

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы исследования и степень ее разработанности

Внеклеточные везикулы (ВВ), к числу которых относятся экзосомы и микровезикулы, являются наноразмерными частицами, окружёнными липидной мембраной и секретируемыми практически всеми типами клеток. Они играют ключевую роль в межклеточной коммуникации за счёт переноса различных биоактивных молекул. Взаимодействие опухолевых ВВ с клетками-реципиентами приводит к изменению сигналинга и формированию новых фенотипических свойств, обеспечивающих конкурентные преимущества для опухолевого роста. Потенциал использования ВВ в диагностике и терапии злокачественных новообразований очевиден, однако широкое внедрение ограничено недостатком фундаментальных знаний о механизмах их биогенеза, принципах селекции и загрузки молекул содержимого, а также особенностях взаимодействия с клетками-мишенями. Процесс формирования ВВ может осуществляться за счет различных механизмов, наименее изученным из которых является механизм, опосредованный липидными рафтами (ЛР). ЛР – это мембранные микродомены, обогащённые холестерином, сфинголипидами и специфическими рафт-образующими белками (РОБ). К ним относятся флотиллины и стоматин, являющиеся структурными белками плоских ЛР, а также кавеолины, составляющие основу кавеол – специализированных мембранных инвагинаций. Эти белки обеспечивают пространственную организацию плазматической мембраны, сборку сигнальных платформ, участие в эндоцитозе, межклеточной сигнализации и других процессах. Для кавеолина-1 и флотиллинов показана вовлечённость в опухолевую прогрессию, однако данные очень противоречивы. Сведения об их участии в секреции ВВ фрагментарны, а стоматин в этом контексте, как и в контексте в опухолевой прогрессии, ранее практически не изучался.

Важнейшим ограничением исследований в области ВВ остаются методологические проблемы, связанные с валидацией везикулярной природы частиц, дифференциацией различных типов ВВ, а также отсутствием единых подходов к количественному анализу. Необходимость решения этих вопросов подчёркивается в рекомендациях ISEV – Международного сообщества по изучению ВВ. В этой связи актуальными задачами являются сравнительное изучение РОБ в составе ВВ различного происхождения, определение их роли в регуляции продукции везикул опухолевыми клетками, поиск надёжных маркеров малых везикул (экзосом), а также оптимизация методов количественной оценки ВВ в биологических жидкостях (БЖ). Решение данных задач будет способствовать углублённому пониманию механизмов секреции ВВ и созданию новых терапевтических подходов.

Цель исследования

Целью работы является исследование состава и уровня представленности белков липидных рафтов флотиллинов, стоматина и кавеолина-1 во внеклеточных везикулах различного происхождения, определение влияния данных белков на продукцию везикул и характеристики клеток немелкоклеточного рака легкого.

Задачи исследования

1. Выделить и охарактеризовать внеклеточные везикулы из различных биологических жидкостей, включая кондиционированную среду опухолевых клеток, плазму крови больных немелкоклеточным раком легкого (НМРЛ), асцитическую жидкость, а также впервые – из маточных аспиратов и желудочного сока; сравнить размеры и морфологию везикул из данных биологических жидкостей.

2. Сравнить эффективность различных методов анализа концентрации везикул применительно к ВВ, выделенным из данных биологических источников.

3. Провести анализ рафт-образующих белков флотиллина, кавеолина и стоматина в ВВ из указанных источников, включая биологические жидкости пациентов с онкологическими заболеваниями и здоровых доноров, сравнить представленность данных белков, а также их соотношение с экзосомальными маркерами CD9 и TSG101, в ВВ различного происхождения.

4. С использованием направленной модификации экспрессии оценить влияние флотиллина-2, стоматина и кавеолина-1 на пролиферацию и миграционную активность клеток немелкоклеточного рака легкого.

5. Исследовать влияние модификации экспрессии каждого из исследуемых белков на уровень других белков липидных рафтов в клетках НМРЛ и секретлируемых ими ВВ.

6. Изучить возможное участие исследуемых белков в секреции ВВ клетками НМРЛ.

Научная новизна

Впервые проведён системный анализ РОБ – флотиллинов, кавеолина-1 и стоматина – в составе ВВ, выделенных из различных БЖ. Исследование стоматина, ранее не рассматривавшегося в контексте ВВ, выявило его присутствие во всех изученных типах везикул, а также показало его соответствие основным критериям экзосомальных маркеров и преимущества по сравнению с рядом традиционно используемых белков. Установлена взаимосвязь между флотиллином-2, стоматином и кавеолином-1, регулирующая как внутриклеточный уровень этих белков, так и их представленность в составе ВВ. Показано, что в клетках НМРЛ флотиллин-2 играет роль вышестоящего регулятора, контролирующего уровни стоматина и кавеолина-1, при этом между последними также

существует негативная взаиморегуляция. Впервые обнаружено, что нокдаун любого из исследованных белков стимулирует продукцию ВВ, а нокдаун стоматина смещает размерное распределения в сторону более крупных ВВ. Установлено участие стоматина, а также других РОБ, в регуляции злокачественного потенциала опухолевых клеток через модуляцию их пролиферации и миграционной активности. Впервые охарактеризованы ВВ из желудочного сока и индивидуальных образцов маточных аспиратов. Обнаружено наличие атипичных фенотипов ВВ, показана высокая гетерогенность везикул желудочного сока как по морфологии, так и по составу экзосомальных маркеров.

Теоретическая и практическая значимость работы

Полученные результаты расширяют современные представления о механизмах биогенеза и секреции ВВ, прежде всего о роли РОБ в этих процессах. Установлены взаимосвязи между флотиллином-2, кавеолином-1 и стоматином, регулирующие как внутриклеточный, так и везикулярный уровень данных РОБ, а также контролирующие продукцию ВВ, что вносит вклад в понимание механизмов рафт-зависимой секреции экзосом. Обнаруженное влияние РОБ на пролиферацию и миграционную активность клеток НМРЛ подчёркивает их значимость в опухолевой прогрессии и открывает перспективы разработки новых мишеней и подходов к таргетной терапии.

Практическая значимость работы также определяется разработкой и внедрением новых методических решений. Впервые предложены эффективные методики выделения ВВ из желудочного сока и маточных аспиратов, даны рекомендации по выбору методов количественной оценки везикул, полученных из различных биологических источников. Установлены ограничения применимости флотиллинов и кавеолина-1 в качестве экзосомальных маркеров, впервые предложен новый высокоспецифичный маркер – стоматин – для использования в экспериментальных и диагностических исследованиях.

Создана коллекция производных линий НМРЛ со стабильной модифицированной экспрессией трех РОБ, представляющая ценный ресурс для дальнейших исследований их роли в канцерогенезе и биогенезе ВВ. На основании полученных данных о повышенной представленности флотиллин-содержащих везикул в БЖ онкологических пациентов можно рекомендовать проведение последующих исследований, направленных на оценку их перспективности в качестве потенциальных онкомаркеров для жидкостной биопсии. Таким образом, результаты исследования могут быть положены в основу разработки новых терапевтических стратегий с использованием ВВ, включая создание таргетных противоопухолевых препаратов и развитие нанотехнологических подходов для иммунотерапии и доставки противоопухолевых агентов.

Методология и методы исследования

В исследовании применён комплексный подход, включающий современные методы работы с ВВ, молекулярной и клеточной биологии. Везикулы выделяли дифференциальным центрифугированием и ультрацентрифугированием, анализ морфологии осуществляли с помощью трансмиссионной и криоэлектронной микроскопии. Количественную оценку проводили с использованием анализа траекторий движений наночастиц (NTA) в сочетании с определением содержания белка и активности ацетилхолинэстеразы. Белковый состав исследовали методом иммуноблоттинга с антителами к классическим маркерам и РОБ, а их субклеточную локализацию – методом конфокальной микроскопии. Для функционального анализа РОБ получено 9 стабильных сублиний клеток НМРЛ с направленной модификацией экспрессии генов *FLOT2*, *STOM* и *CAVI*. Влияние этих изменений оценивали по пролиферативной и миграционной активности клеток, а также по продукции ВВ с применением авторской методики нормализации данных, что обеспечило корректное сопоставление результатов.

Положения, выносимые на защиту

1. Белок ЛР стоматин предлагается в качестве нового высоко специфичного маркера экзосом; в отличие от стоматина, белки ЛР флотиллин и кавеолин-1 не могут считаться универсальными маркерами экзосом, уровень флотиллин-позитивных ВВ может быть связан с опухоль-ассоциированными нарушениями.

2. Белки ЛР стоматин, флотиллин-2, и кавеолин-1 участвуют в регуляции злокачественного фенотипа клеток НМРЛ: нокдаун каждого из трех белков подавляет пролиферацию клеток и их способность к направленной миграции.

3. Показана роль белков ЛР в продукции ВВ: подавление экспрессии, стоматина, кавеолина-1 и флотиллина-2 стимулирует секрецию ВВ клетками НМРЛ, при этом нокдаун стоматина также изменяет размерное распределение везикул, увеличивая долю более крупных везикул.

4. Уровни представленности белков ЛР флотиллина-2, стоматина и кавеолина-1 в клетках НМРЛ и секретируемых ВВ взаимосвязаны: флотиллин-2 является вышестоящим негативным регулятором кавеолина-1 и стоматина, которые, в свою очередь, связаны между собой негативной регуляторной связью.

Степень достоверности и апробация результатов

Разработанные в ходе диссертационной работы методические подходы к выделению, валидации и количественному анализу ВВ из различных БЖ используются в научно-исследовательской деятельности НИИ канцерогенеза ФГБУ «НМИЦ онкологии им.

Н.Н. Блохина» Минздрава России в рамках проектов, направленных на создание тест-систем для жидкостной биопсии и ранней диагностики злокачественных новообразований. Результаты исследований включены в научно-практический курс «Биология опухолевой клетки» для студентов Биологического факультета МГУ им. М.В. Ломоносова. Полученные генно-модифицированные линии доступны для отечественных и зарубежных исследователей. Результаты вносят вклад в развитие представлений о биологии ВВ и создают предпосылки для практического применения в диагностике и терапии онкологических заболеваний.

Апробация диссертации состоялась 30 сентября 2025 года на совместной научной конференции лаборатории регуляции клеточных и вирусных онкогенов, отдела экспериментальной биологии опухолей, лаборатории механизмов канцерогенеза, лаборатории цитогенетики, лаборатории молекулярной биологии вирусов и лаборатории онкопротеомики НИИ канцерогенеза ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России.

По материалам диссертации опубликовано 15 работ, из них 11 – в журналах, рекомендованных ВАК при Минобрнауки России (2021-2025 гг. публикации).

Объем и структура работы

Диссертация изложена на 148 страницах, содержит 30 рисунков и 3 таблицы и состоит из следующих разделов: Введение, Обзор литературы, Материалы и методы, Результаты и Обсуждения, Заключение, Выводы, Список сокращений и условных обозначений, Список литературы, Список публикаций по теме диссертации. Список литературы включает 237 ссылок на литературные источники.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Материалы и методы исследования

В работе использованы современные методы выделения, валидации и характеристики ВВ в соответствии с рекомендациями ISEV из следующих биологических источников: кондиционированной среды (КС) опухолевых клеток, плазмы крови, асцитической жидкости (АЖ), маточных аспириатов (МА) и желудочного сока (ЖС). Для выделения везикул применяли дифференциальное центрифугирование и ультрацентрифугирование с авторскими модификациями в зависимости от типа БЖ. Анализ нативной структуры и морфологии ВВ проводили методами трансмиссионной электронной микроскопии (ТЭМ) с негативным контрастированием и криоэлектронной микроскопии. Размерное распределение и концентрацию ВВ оценивали методом NTA, а

также с использованием дополнительных подходов – измерения содержания белка и анализа ацетилхолинэстеразной активности. Белковый состав ВВ исследовали иммуноблоттингом с использованием антител к экзосомальным маркерам CD9, TSG101 и РОБ – флотиллину-1, флотиллину-2, кавеолину-1 и стоматину. Для уточнения субклеточной локализации белков применялся иммунофлуоресцентный анализ в сочетании с конфокальной микроскопией. Для оценки роли РОБ в биогенезе везикул использовали клеточные модели НМРЛ (Н1975, Н358), экспрессию генов флотиллина-2, стоматина и кавеолина-1 модифицировали с применением систем на основе лентивирусных и ретровирусных векторов. Было получено 9 стабильных сублиний с подтверждённой модификацией экспрессии целевых белков. Функциональные эффекты оценивали по пролиферативной активности (с помощью коммерческого набора ССК-8 и методом прямого подсчета клеток в камере Горяева), направленной миграции клеток в камере Бойдена, а также по уровню продукции везикул.

Результаты исследования

Характеризация внеклеточных везикул из различных биологических жидкостей

Проведена комплексная характеристика ВВ, выделенных из плазмы крови, АЖ и КС клеточных культур, а также впервые – из МА и ЖС. Для обеспечения достоверности применялся многоступенчатый подход к валидации везикул в соответствии с рекомендациями ISEV, включавший анализ морфологии (ТЭМ и Крио-ЭМ), оценку размерного распределения (NTA) и спектра экзосомальных маркеров. Достоверных различий среднеразмерного распределения ВВ из различных БЖ не выявлено, с применением крио-ЭМ впервые изучена нативная структура и показана высокая морфологическая гетерогенность ВВ ЖС и МА, включая атипичные морфологические типы, ранее описанные для отдельных биологических источников. Сравнительный анализ профилей экзосомальных маркеров показал, что состав белков везикул существенно зависит от биологического источника. В частности, для ЖС отмечена выраженная вариабельность содержания как классических маркеров, так и исследуемых РОБ. Такая молекулярная гетерогенность хорошо согласуется с обнаруженной морфологической гетерогенностью ВВ из ЖС.

Сравнение методов анализа концентрации внеклеточных везикул

В работе проведено сопоставление трёх подходов к количественной оценке внеклеточных везикул – метода NTA, измерения общей концентрации белка и теста FluoroCet, основанного на активности ацетилхолинэстеразы. Анализ ВВ из КС клеточных культур продемонстрировал исключительно высокую согласованность между методами:

коэффициенты корреляции Спирмена превышали 0.95 при любом сопоставлении методов ($p < 0.001$). Для плазмы крови, АЖ и МА результаты оказались менее согласованными. Здесь были зафиксированы относительно слабые корреляции, а характер зависимости в случае белок/FluoroCet носила нелинейный характер (Таблица 1).

Таблица 1 – Анализ корреляции результатов определения концентрации ВВ с помощью нанотрекингового анализа (NTA), набора для количественного анализа экзосом FluoroCet и концентрации белка с помощью набора для количественного анализа белков NanoOrange®

Пара сравниваемых методов	Коэффициент корреляции Спирмена				
	КС	Плазма	Асцит	МА	ЖС
Белок/FluoroCet	0.97	0.95*	0.93*	0.62	0.97
NTA/Белок	0.95	0.63	0.33	0.52	0.63
NTA/FluoroCet	0.95	0.63	0.42	0.07	0.67

Приведены коэффициенты ранговой корреляции Спирмена между результатами анализа концентрации ВВ тремя методами количественного анализа в различных типах БЖ. Жирным выделены статистически достоверные значения. *Зависимость носит нелинейный характер

Особый интерес представили результаты анализа ЖС: здесь обнаружена исключительно сильная корреляция между FluoroCet и содержанием белка ($r = 0.97$, $p < 0.001$), что отражает преимущественно везикулярное происхождение белковых фракций препаратов ВВ из ЖС. При этом связь между NTA и другими методами была умеренной, но достоверной, что указывает на сохранение вклада невезикулярных частиц, хотя и в меньшей степени.

Стоматин – новый маркер экзосом

Исследование стоматина в составе ВВ позволило получить ряд новых данных, уточняющих его роль и значение как потенциального маркера. Впервые показано, что этот белок, как и флотиллин, конститутивно экспрессируется во всех исследованных БЖ – плазме крови, асцитах, МА и ЖС, а также в везикулах, секретлируемых как опухолевыми, так и нормальными клетками *in vitro* (Рисунок 1).

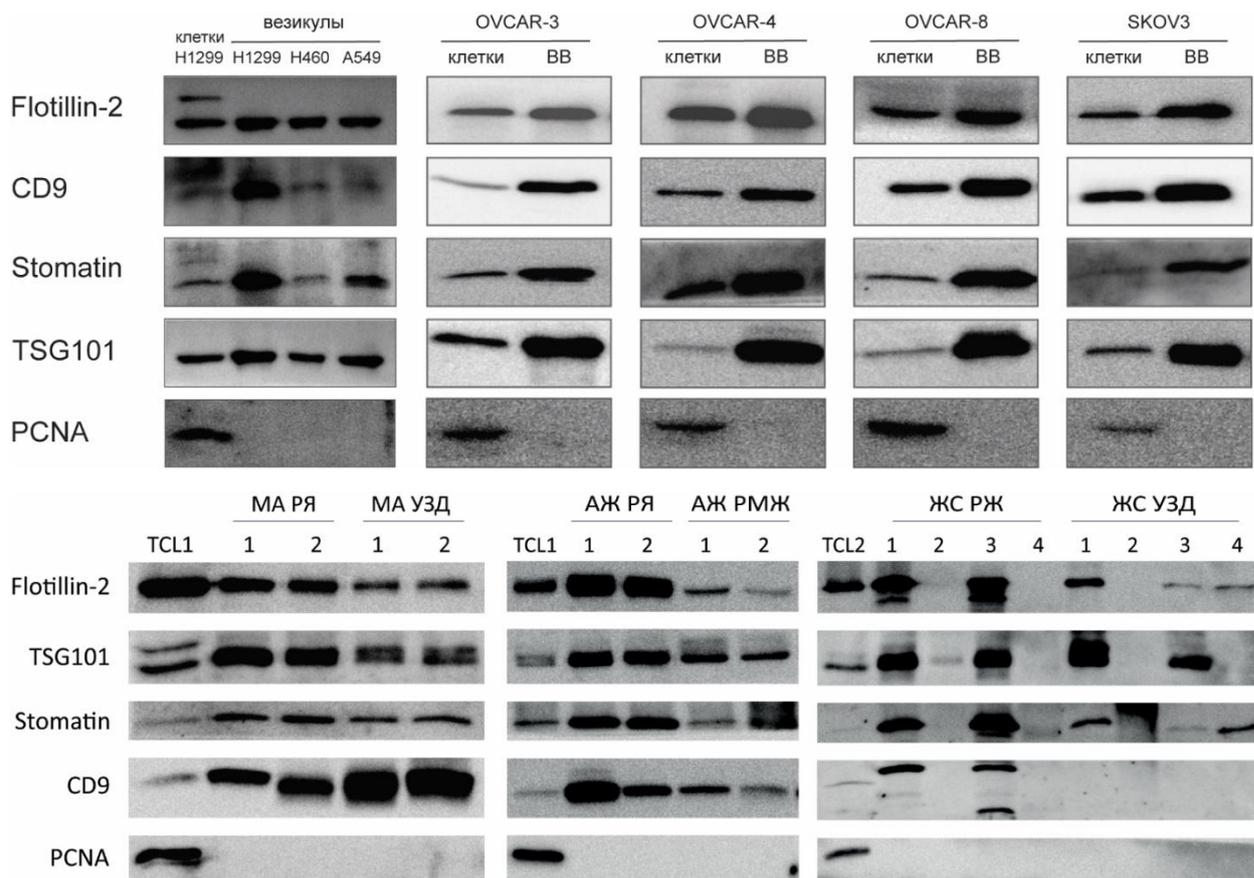


Рисунок 1 – Вестерн-блот анализ стоматина в сравнении с экзосомальными маркерами в ВВ, выделенных из различных биологических жидкостей.

А – Анализ стоматина в опухолевых клетках различной нозологий и продуцируемых ими ВВ. **Б** – Анализ стоматина в маточных аспиратах (МА) больных раком яичника (РЯ) и условно-здоровых доноров (УЗД), асцитической жидкости (АЖ) больных РЯ и раком молочной железы (РМЖ), ЖС больных раком желудка (РЖ) и УЗД.

Особенно показателен был анализ ЖС, где при высокой гетерогенности экзосомальных маркеров стоматин детектировался в тех же образцах, что и CD9, а в ряде случаев выявлялся даже при его отсутствии, что подчёркивает его самостоятельную диагностическую ценность. Во всех других БЖ уровень стоматина достоверно коррелировали с классическим экзосомальным маркером CD9, что указывает на то, что стоматин, подобно CD9, стабильно присутствует в большинстве субпопуляций экзосом и может рассматриваться как перспективный маркер ВВ (Рисунок 2).

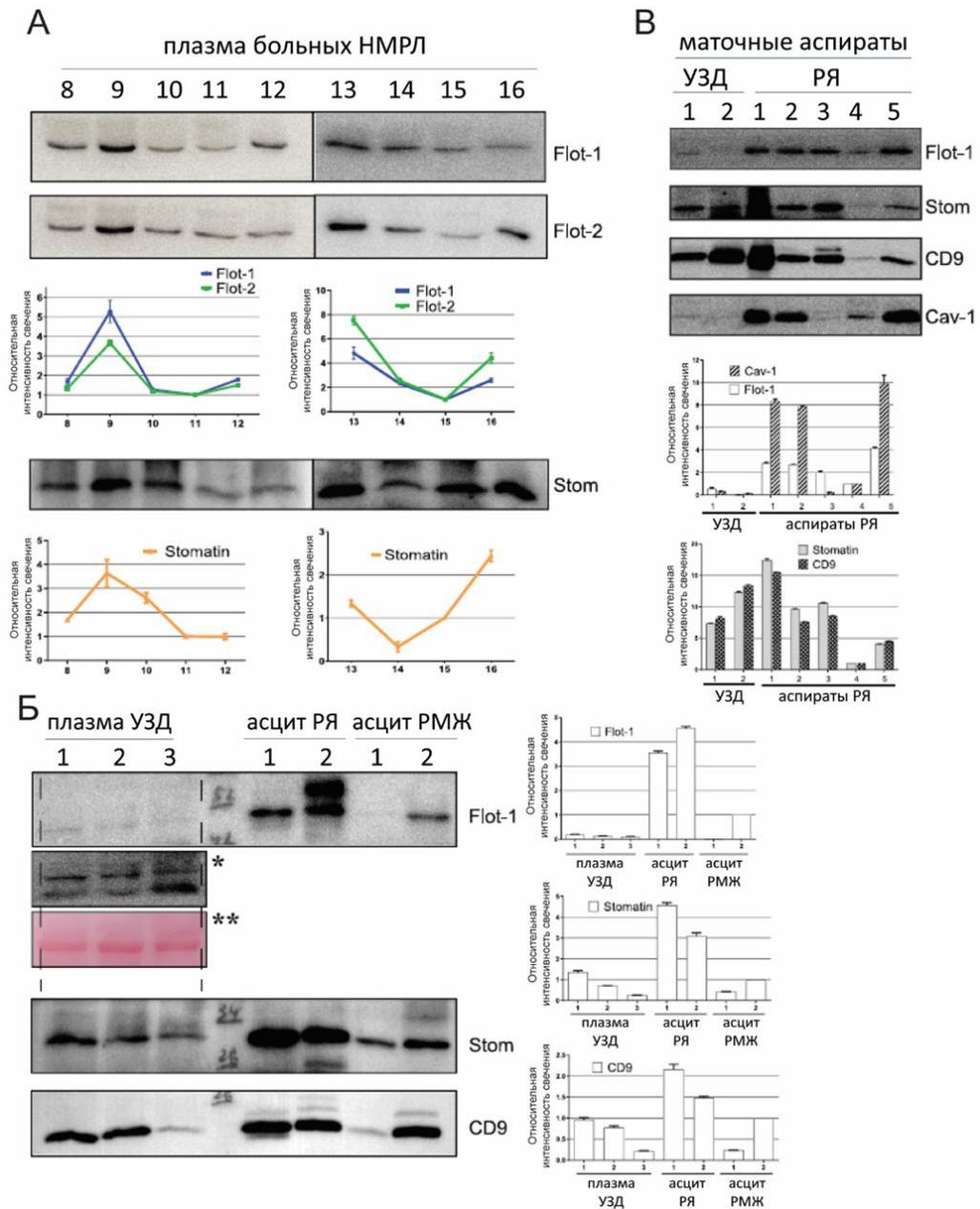


Рисунок 2 – Вестерн-блот анализ стоматина в сравнении с флотиллинами и CD9 в ВВ из различных биологических источников.

А – Флотиллины Flot-1 и Flot-2 в сравнении со стоматином в ВВ, выделенных из плазмы крови больных НМРЛ (дорожки 8-16). Графики соответствуют относительным уровням белка по данным денситометрического анализа Flot-1 (синий), Flot-2 (зеленый) и Stom (оранжевый). За единицу приняты значения оптической плотности образцов «11» и «15» на каждой мембране. **Б** – Flot-1, Stom и CD9 в ВВ, выделенных из асцитической жидкости пациентов (правая часть мембраны) с раком яичников (РЯ), раком молочной железы (РМЖ) и плазмы крови условно-здоровых доноров (УЗД, левая часть мембраны). *Фрагмент той же мембраны после более длительной экспозиции. Поскольку количество Flot-1 в ВВ из плазмы крови здоровых доноров существенно ниже по сравнению с Flot-1 в ВВ из асцитической жидкости, присутствующей на той же мембране, мы дополнительно экспонировали этот фрагмент мембраны во время ECL-визуализации, чтобы усилить люминесцентный сигнал для лучшей визуализации. **Фрагмент той же мембраны, окрашенной красителем Ponceau S. На диаграмме приведены относительные значения уровней исследуемых белков по данным денситометрического анализа результатов иммуноблоттинга. Значение оптической плотности соответствующих белков в дорожке «асцит РМЖ №2» взята за единицу. **В** – Flot-1, Stom, CD9 и Cav-1 в ВВ, выделенных из маточных аспиратов

больных раком яичников и УЗД. На диаграмме приведены относительные значения уровней исследуемых белков по данным денситометрического анализа результатов иммуноблоттинга. Значение оптической плотности соответствующих белков в дорожке «4» взято за единицу. Столбики представляют собой среднее значение относительной экспрессии белка \pm SD по трем независимым измерениям.

В то же время статистически значимой корреляции с флотиллином-1 не наблюдалось, при этом гомологи флотиллин-1 и -2 демонстрировали высокую степень корреляции друг с другом в везикулах плазмы больных НМРЛ. В сочетании с показанным нами отсутствием корреляции с другими экзосомальными маркерами эти результаты подтверждают предположение о том, что флотиллины совместно участвуют в формировании отдельных субпопуляций ВВ, причем, вероятно, – везикул опухолевого происхождения, поскольку уровни флотиллина-1 в ВВ из МА и плазмы крови здоровых доноров были либо крайне низкими, либо вовсе не определялись. Сходные результаты получены и для кавеолина-1, который, как и флотиллин-1, чаще встречался в опухолевых образцах и не демонстрировал корреляции с классическими экзосомальными маркерами. Более того, в отличие от стоматина и флотиллинов, для кавеолина-1 не было показано обогащение в ВВ по сравнению с клетками-продуцентами (Рисунок 3).

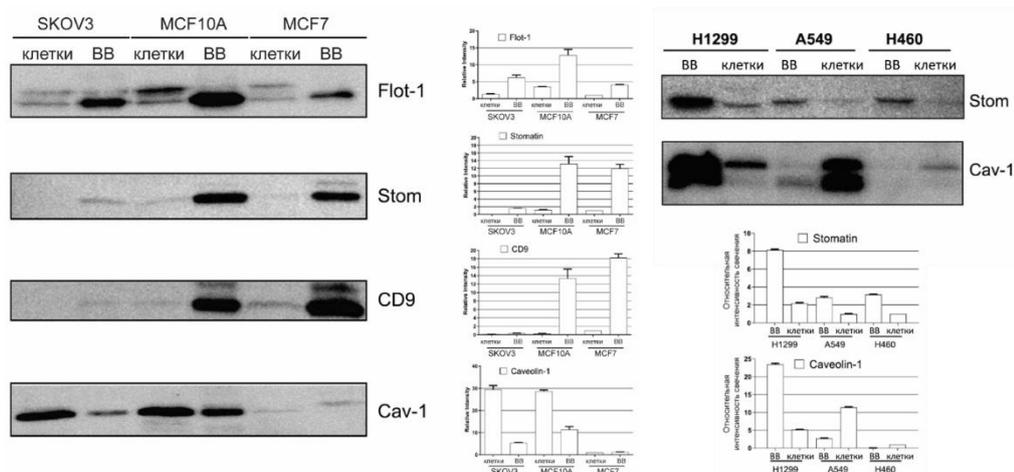


Рисунок 3 – Вестерн-блот анализ стоматина и кавеолина-1 в ВВ, секретируемых клетками НМРЛ, SKOV3, MCF7 и MCF10A.

На диаграмме приведены относительные значения уровней исследуемых белков по данным денситометрического анализа результатов иммуноблоттинга. Столбики представляют собой среднее значение изменения доли белка \pm SD трех независимых измерений.

Соотношение РОБ в клетках и ВВ, соответствующих экзосомам и микровезикулам, полученное после фракционирования ВВ по размерам, показало, что уровень стоматина, наряду с флотиллином-1 и экзосомальными маркерами CD9, Alix и TSG101, повышен в обеих фракциях ВВ по сравнению с клетками-продуцентами, однако только в случае стоматина его содержание стабильно выше в экзосомальных фракциях (Рисунок 4).

Кавеолин-1 в ряде случаев практически не детектировался в везикулах, а в линии A549 преимущественно секретировался в составе микровезикул.

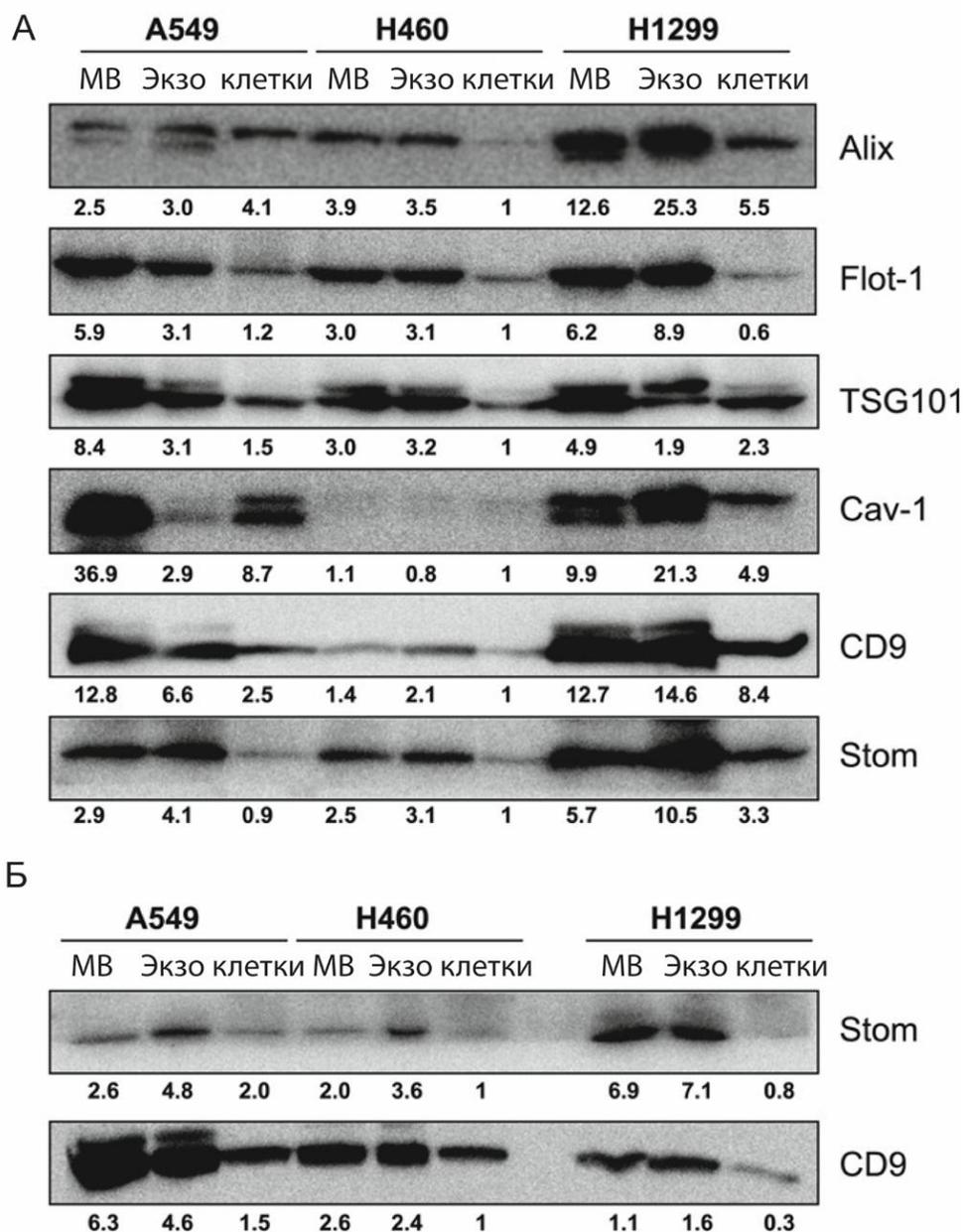


Рисунок 4 – Анализ содержания стоматина в различных фракциях ВВ, секретлируемых клетками трех линий НМРЛ, а также в клетках-продуцентах.

А – Сравнение уровней РОБ (Stom, Flot-1, и Cav-1) и экзосомальных маркеров (Alix, TSG101 и CD9) во фракциях ВВ, соответствующих экзосомам (Экзо) и микровезикулам (МВ), выделенных из кондиционированной среды клеток НМРЛ по общему протоколу. **Б** – Анализ стоматина в ВВ, выделенных в более строгих условиях разделения. Цифры обозначают относительные значения уровней исследуемых белков по данным денситометрического анализа результатов иммуноблоттинга. Значения оптической плотности соответствующих белков в дорожке «клетки H460» взято за единицу.

Таким образом, по универсальности, обогащенности в ВВ, и в особенности в малых ВВ, стоматин может рассматриваться как новый экзосомальный маркер.

Участие белков липидных рафтов флотиллина-2, стоматина и кавеолина-1 в регуляции малигнизированного фенотипа клеток НМРЛ

Для исследования влияния флотиллина-2, стоматина и кавеолина-1 на характеристики злокачественного фенотипа клеток НМРЛ были получены стабильные сублинии клеточных линий Н1975 и Н358 с направленной модификацией экспрессии соответствующих генов (Рисунок 5).

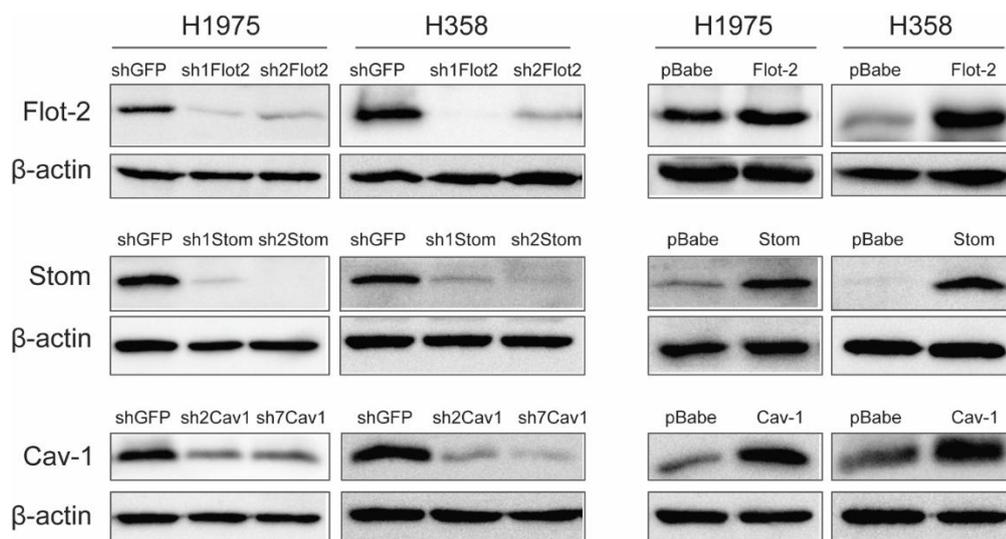


Рисунок 5 – Вестерн-блот анализ продукции исследуемых РОБ в производных сублиниях НМРЛ Н1975 и Н358 с направленной модификацией экспрессии соответствующих генов.

Для сублиний с нокдаун исследуемых генов контролем являются соответствующие производные сублинии, экспрессирующие shGFP в составе вектора pLKO.1, для сублиний с гиперэкспрессией исследуемых генов – сублинии, экспрессирующие «пустой» вектор pBabe. В качестве контроля нанесения белка использованы антитела к β-актину. Приведены относительные значения экспрессии белков (изменения в разах относительно контрольных сублиний, которые в каждом случае были взяты за единицу) по данным денситометрического анализа.

В каждом случае нокдаун осуществляли с помощью двух малых шпилечных РНК, клонированных в плазмиду pLKO.1, а гиперэкспрессию – методом трансдукции кодирующей последовательности в составе ретровирусного вектора pBabe. В качестве показателей злокачественного фенотипа анализировались пролиферативная активность и способность к направленной миграции. Установлено, что подавление каждого из трех исследуемых РОБ в обеих линиях клеток приводило к значительному уменьшению скорости роста клеток по сравнению с клетками контрольных сублиний (Рисунок 6).

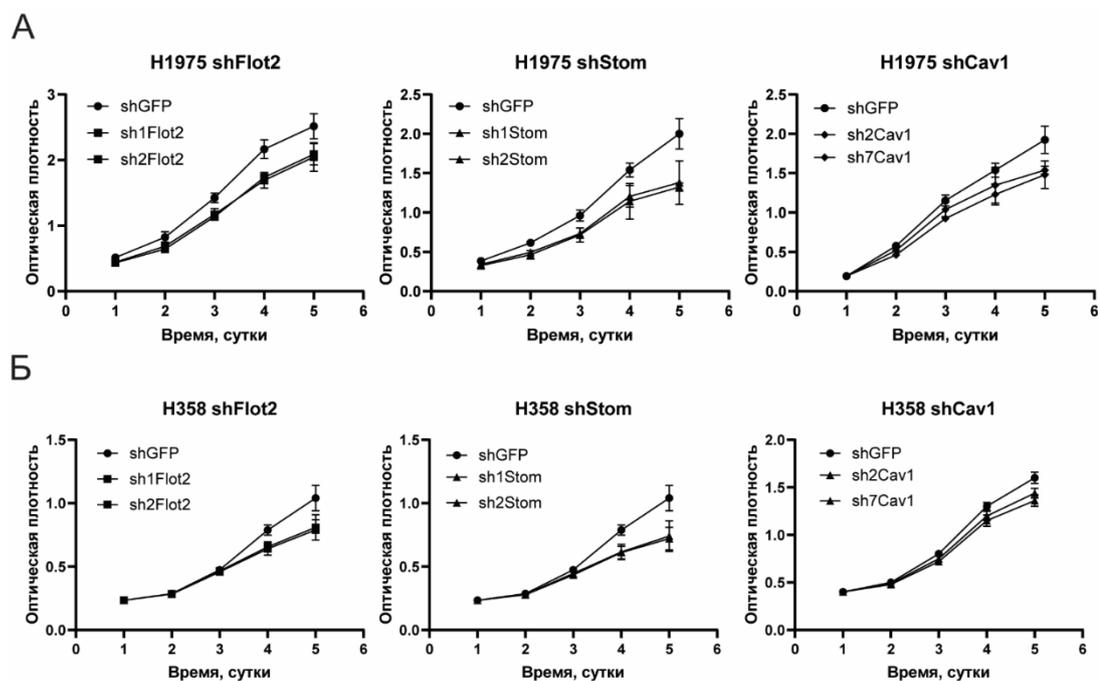


Рисунок 6 – Анализ влияния модификации экспрессии генов, кодирующих РОБ Flotillin-2, Stomatin и Caveolin-1 на динамику пролиферации клеток НМРЛ.

А – Кривые роста клеток линии Н1975 с подавлением флотиллина-2 (shFlot2), стоматина (shStom) и кавеолина-1 (shCav1). **Б** – Кривые роста для клеток линии Н358 с подавлением флотиллина-2 (shFlot2), стоматина (shStom) и кавеолина-1 (shCav1). В качестве контроля использовались сублинии Н1975shGFP и Н358shGFP соответственно.

Наиболее выраженный эффект для обеих линий наблюдался при подавлении экспрессии стоматина, тогда как наименьший – при нокдауне флотиллина-2 (для клеток Н1975) или кавеолина-1 (для клеток Н358). Так, в клеточной линии Н1975 снижение уровня стоматина приводило к уменьшению скорости роста на 25-35% по сравнению с контролем. Подавление кавеолина-1 вызывало снижение пролиферации на 20-23%, а нокдаун флотиллина-2 – на 11-16%. В клеточной линии Н358 наблюдалась аналогичная тенденция, хотя эффект был менее выраженным: снижение экспрессии стоматина уменьшало скорость роста на 15–17%, кавеолина-1 – на 10-13%, а флотиллина-2 – на 8-10%.

Для анализа миграционной активности клеток использовали тест на направленную миграцию в камерах Бойдена. Поскольку клеточная линия Н358 исходно почти не проявляет миграционной активности, эксперименты проводились только на линии Н1975. Нокдаун флотиллина-2 привел к снижению миграционной способности клеток на 43–52%, подавление экспрессии стоматина - в среднем на 30%, а кавеолина-1 —на 20% по сравнению с контролями (Рисунок 7).

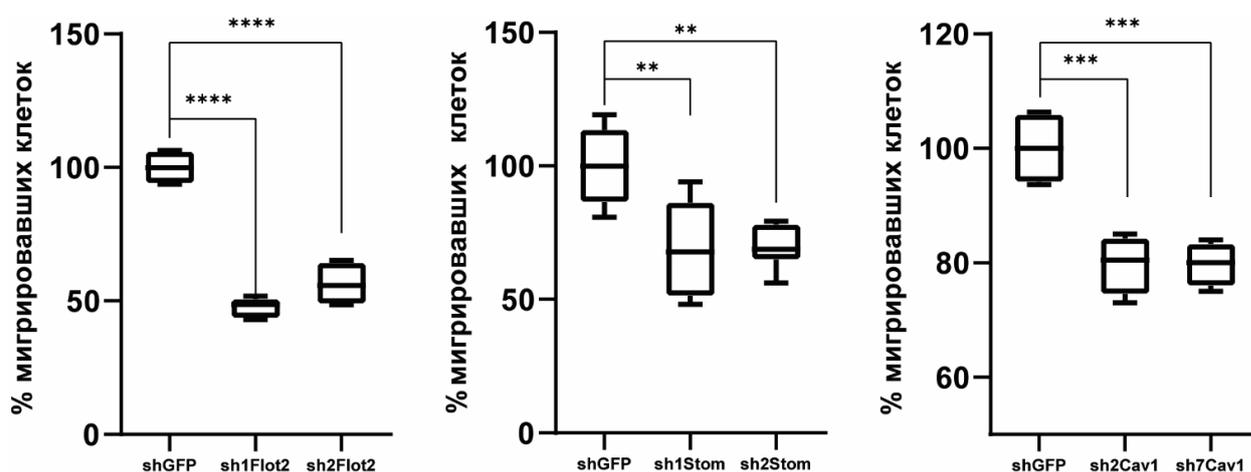


Рисунок 7 – Влияние подавления экспрессии флотиллина-2, стоматина и кавеолина-1 на миграционную активность клеток Н1975.

Приведены данные процентного соотношения мигрировавших клеток по сравнению с контрольными клетками линии shGFP. Однофакторный дисперсионный анализ (ANOVA) с пост-тестом Даннета для множественного сравнения $**p < 0.01$, $***p < 0.001$, $****p < 0.0001$.

В то же время гиперэкспрессия ни одного из белков не привела к статистически значимым изменениям исследуемых характеристик, что свидетельствует о необходимости участия ко-факторов в обнаруженной РОБ-зависимой регуляции злокачественного фенотипа клеток НМРЛ. Таким образом, подавление каждого из трех исследованных белков – флотиллина-2, стоматина и кавеолина-1 приводило к достоверному снижению как пролиферации, так и миграционной активности клеток. Эти данные впервые свидетельствуют о значимой роли исследуемых РОБ в поддержании злокачественного фенотипа клеток НМРЛ.

Влияние модификации экспрессии РОБ флотиллина-2, стоматина и кавеолина-1 на продукцию ВВ

Участие РОБ в регуляции секреции ВВ проводили с использованием полученных субклинций с направленной модификацией экспрессии соответствующих генов. Количественный анализ проводили методом НТА с нормализацией на число продуцирующих клеток, что исключало влияние различий в скорости их роста. Результаты при высокой сходимости в повторах оказались достаточно неожиданными – подавление любого из трех исследуемых РОБ значительно увеличивало продукцию ВВ в клетках Н1975, причем наиболее выраженный эффект оказывал нокдаун стоматина и кавеолина-1 (увеличение на 55% и 70%, соответственно) (Рисунок 8А-Б).

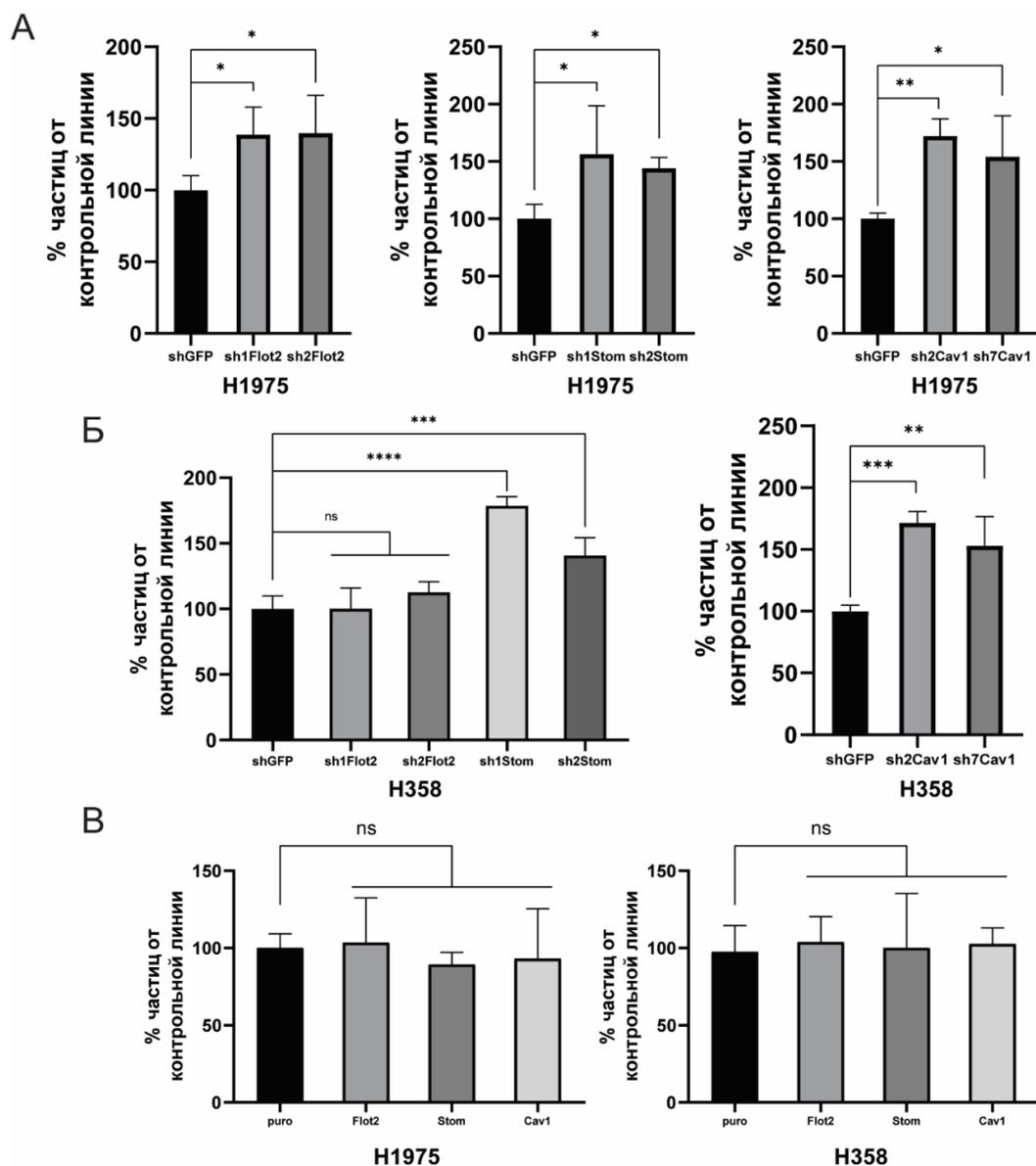


Рисунок 8 – Анализ влияния модификации экспрессии РОБ флотиллина-2, стоматина и кавеолина-1 на продукцию ВВ клетками НМРЛ.

А – Влияние подавления экспрессии исследуемых РОБ на продукцию ВВ клетками Н1975. **Б** – Влияние подавления исследуемых РОБ на продукцию ВВ клетками Н358. **В** – Влияние гиперэкспрессии исследуемых РОБ на продукцию ВВ клетками Н1975 и Н358. Приведены данные относительного количества частиц для каждой сублинии по сравнению с контролем – соответствующими сублиниями shGFP (рисунки А-Б) и puro (рисунок В). * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$.

Подавление флотиллина-2 также стимулировало секрецию везикул, хотя и в меньшей степени (в среднем на 43%). В клетках Н358 в целом наблюдались схожие эффекты, за исключением подавления флотиллина-2, которое не оказало существенного влияния на количество везикул. При этом подавление стоматина и кавеолина-1, как и в клетках Н1975, оказывало сильный стимулирующий эффект (увеличение на 50 и 65 %

соответственно). Примечательно, что в отличие от нокдауна, гиперэкспрессия белков не оказывала эффекта на продукцию ВВ ни в одной из клеточных линий.

Мы предположили, что нокдаун РОБ может изменять соотношение секретируемых ВВ в сторону экзосом или микровезикул. Для проверки этого предположения был проведен сравнительный анализ размерного распределения ВВ, продуцируемых сублиниями с модифицированной экспрессией РОБ. Результаты показали, что нокдаун стоматина статистически значимо увеличивает средний размер ВВ и долю крупных частиц (>100 нм) в обеих исследуемых клеточных линиях – Н1975 и Н358 (Рисунок 9).

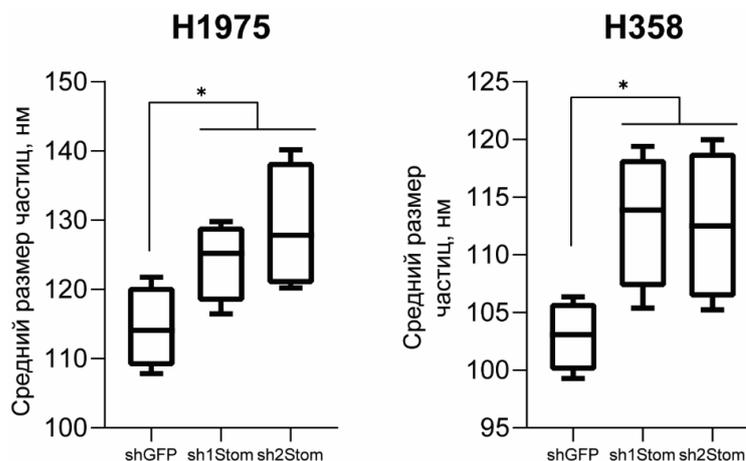


Рисунок 9 – Влияние нокдауна стоматина в клетках НМРЛ на размер продуцируемых ВВ (* $p < 0.05$).

В отличие от стоматина, модификация экспрессии флотиллина-2 или кавеолина-1 не вызвала значимых изменений размерного распределения частиц. Усиление продукции ВВ при снижении РОБ на первый взгляд кажется парадоксальным, однако оно согласуется с литературными данными о том, что изменение белкового состава ЛР приводит к нарушению баланса холестерина на мембране, изменяя её текучесть и кривизну и облегчая формирование ВВ.

Исследование взаимовлияния экспрессии флотиллина-2, стоматина и кавеолина-1 в клетках НМРЛ и секретируемых ими ВВ

Для того, чтобы выяснить, существует ли баланс на уровне самих рафт-образующих белков, мы далее исследовали, как направленная модификация экспрессии каждого из РОБ влияет на внутриклеточный уровень двух других РОБ, а также на их представленность в секретируемых ВВ (Рисунок 10).

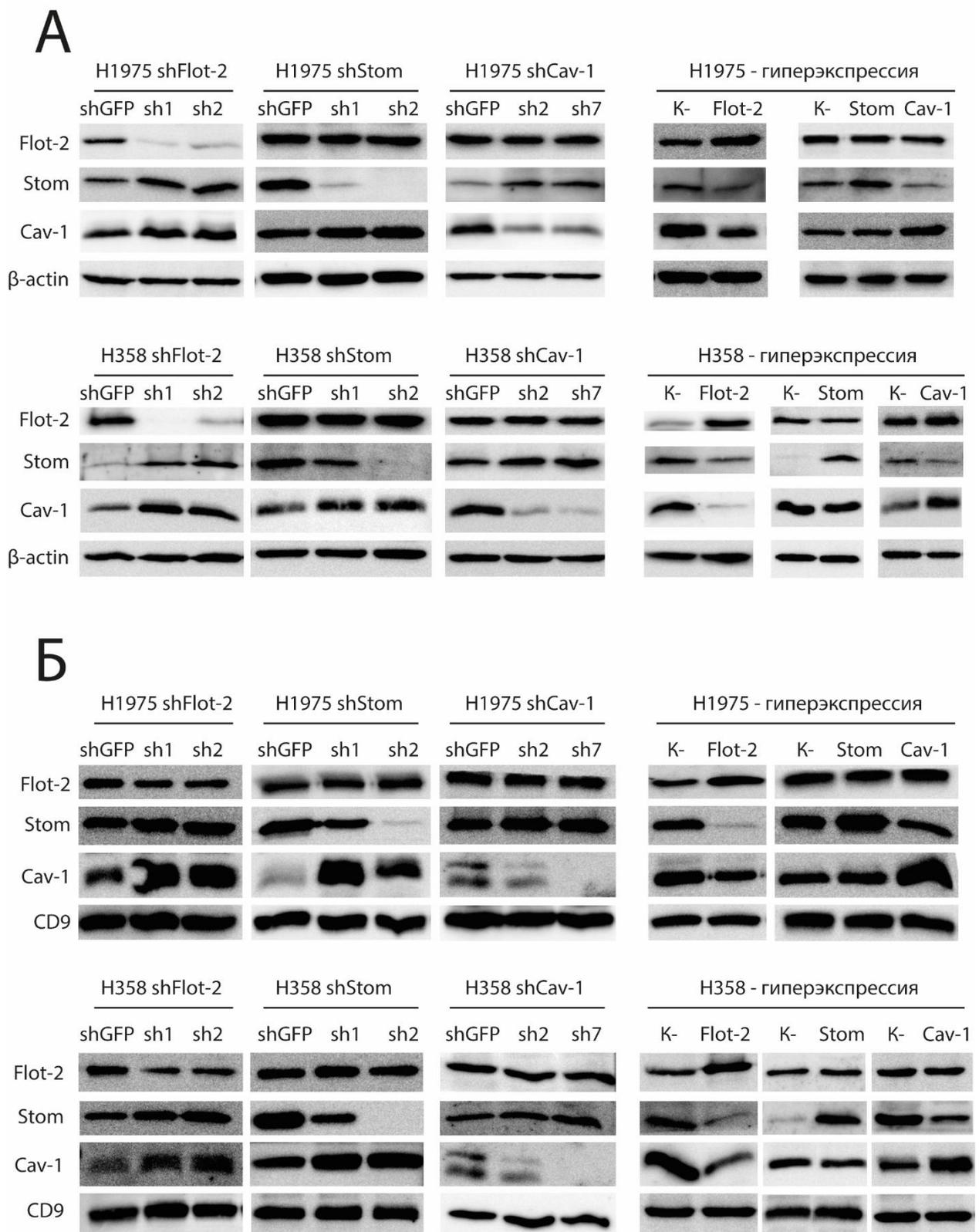


Рисунок 10 – Взаимное влияние экспрессии исследуемых РОБ в клетках НМРЛ (А) и секретируемых ими ВВ (Б).

Для сублиний с нокдауном исследуемых генов контролем являются соответствующие производные сублинии, экспрессирующие shGFP в составе вектора pLKO.1, для сублиний с гиперэкспрессией исследуемых генов – сублинии, экспрессирующие «пустой» вектор pVabe (на рисунке обозначено как «К-»). В качестве контроля нанесения белка использованы антитела к β-актину (А) и везикулярному маркеру CD9 (Б). Приведены относительные значения экспрессии

белков (изменения в разгах относительно контрольных сублиний, которые в каждом случае были взяты за единицу) по данным денситометрического анализа. Для анализа кавеолина-1 в ВВ, секретируемых клетками Н1975, использовали более чувствительные антитела, детектирующие 2 формы кавеолина-1 – Cav-1 α и Cav-1 β , соответствующие двум полосам на мембране.

Сравнительный анализ РОБ в лизатах клеток полученных сублиний и секретируемых ими ВВ впервые обнаружил наличие выраженной регуляторной взаимосвязи, подтверждаемой как при нокдауне, так и при гиперэкспрессии исследуемых РОБ. Механизм регуляции носит иерархический характер, при котором флотиллин-2 является вышестоящим негативным регулятором двух других исследуемых РОБ. Так, подавление флотиллина-2 приводило к повышению уровней стоматина и кавеолина-1, причем как в клетках, так и в ВВ. И наоборот, гиперэкспрессия флотиллина-2 привела к снижению внутриклеточного и везикулярного уровней стоматина и кавеолина-1. При этом влияния на экспрессию флотиллина-2 со стороны стоматина и кавеолина-1 обнаружено не было, что свидетельствует об одностороннем характере флотиллин-2-зависимой регуляции стоматина и кавеолина-1. Помимо этого для обеих клеточных линий нами обнаружена негативная регуляторная связь между стоматином и кавеолином-1. Так, подавление экспрессии одного из этих белков приводило к снижению продукции другого, причем как в клетках, так и в ВВ, а гиперэкспрессия кавеолина-1 в обеих линиях ожидаемо оказывала противоположный эффект – снижение внутриклеточного уровня стоматина и его представленности в ВВ. Вместе с тем гиперэкспрессия стоматина не оказала существенного влияния на кавеолин-1 ни в одной из линий. Можно предположить, что стоматин-зависимая негативная регуляция кавеолина, в отличие от кавеолин-зависимой регуляции стоматина, происходит более опосредованно и требует участия дополнительных факторов.

Выводы

1. Впервые проведенный анализ морфологии внеклеточных везикул (ВВ) из маточных аспириатов и желудочного сока обнаружил присутствие везикул атипичной морфологии, различающихся по форме, электронной плотности и количеству окружающих мембран. ВВ желудочного сока характеризуются максимальной морфологической гетерогенностью, доля атипичных везикул составляет более половины всех ВВ.

2. На основании сравнения методов подсчета ВВ сделаны следующие рекомендации: выбор метода зависит от биологического источника везикул; для анализа ВВ из кондиционированной среды клеток могут быть использованы как анализ траекторий наночастиц, так и анализ концентрации белка и активности ацетилхолинэстеразы; для ВВ из плазмы крови, маточных аспириатов и асцитической жидкости, в отличие от желудочного

сока, анализ концентрации белка не рекомендован в качестве основного метода подсчета концентрации.

3. Впервые обнаружено присутствие белка липидных рафтов стоматина в ВВ, секретлируемых как опухолевыми, так и нормальными клетками. На основании ряда критериев – универсальности представленности в ВВ всех исследуемых БЖ, обогащения в ВВ по сравнению с клетками-продуцентами, корреляции с уровнем экзосомального маркера CD9, а также увеличения содержания во фракции малых ВВ, соответствующих экзосомам, – стоматин предложен в качестве нового высоко специфичного экзосомального маркера.

4. Показано, что присутствие и уровень представленности в везикулах флотиллинов и кавеолина-1, используемых в качестве экзосомальных маркеров, сильно варьирует в зависимости от источника ВВ и клинического статуса доноров, и не соответствует критериям экзосомальных маркеров. В то же время бóльшая представленность этих белков в ВВ БЖ онкологических больных открывает перспективы их исследования в качестве потенциальных везикулярных маркеров злокачественных новообразований.

5. С использованием двух экспериментальных моделей впервые обнаружено влияние флотиллина-2, стоматина и кавеолина-1 на пролиферацию и миграционную активность клеток немелкоклеточного рака легкого (НМРЛ), свидетельствующее об их участии в регуляции злокачественного фенотипа опухолевых клеток.

6. Впервые показано, что подавление экспрессии каждого из рафтовых белков: стоматина, кавеолина-1 и флотиллина-2, стимулирует секрецию ВВ клетками НМРЛ, при этом нокдаун стоматина также изменяет размерное распределение везикул, увеличивая долю везикул размеров больше 100 нм.

7. Впервые обнаружено взаимовлияние флотиллина-2, стоматина и кавеолина-1, регулирующее уровень их представленности как в клетках, так и в ВВ. Показано, что флотиллин-2 является вышестоящим негативным регулятором кавеолина-1 и стоматина, которые, в свою очередь, связаны между собой негативной регуляторной связью.

Практические рекомендации

Рекомендации по количественному анализу ВВ: при исследовании КС и ЖС наряду с НТА можно использовать более доступные методы на основе анализа общей концентрации белка либо активности ацетилхолинэстеразы. Для ВВ, выделенных из плазмы крови, асцитов и аспириатов тесты, основанные на анализе концентрации белка, не рекомендованы к использованию. В качестве нового экзосомального маркера предложен стоматин, обладающий большей универсальностью и специфичностью по сравнению с

классическими маркерами. Обнаруженные регуляторные взаимосвязи между флотиллином-2, кавеолином-1 и стоматином, а также их участие в контроле продукции везикул и злокачественности клеток НМРЛ, открывают перспективы для разработки новых таргетных препаратов и терапевтических стратегий, основанных на направленной регуляции биогенеза ВВ. Разработанные методики выделения и анализа везикул из желудочного сока и маточных аспиратов могут быть использованы для расширения спектра доступных клинических биоматериалов и скрининга маркеров ранней диагностики опухолей желудочно-кишечного тракта и женской репродуктивной системы.

Перспективы дальнейшей разработки темы

Перспективы дальнейшей разработки темы связаны с уточнением молекулярных механизмов участия рафт-образующих белков в биогенезе внеклеточных везикул и их взаимодействия с сигнальными каскадами опухолевых клеток. Важным направлением остаётся совершенствование методик выделения и количественного анализа ВВ из различных биологических жидкостей, включая разработку панелей специфичных маркеров: повышенная представленность флотиллин-содержащих везикул у онкологических пациентов свидетельствует о целесообразности дальнейшего изучения их диагностического потенциала. Практическая перспектива связана с использованием флотиллина, стоматина и кавеолина-1 как мишеней для регуляции продукции ВВ и модификации опухолевого фенотипа, что открывает путь к созданию новых диагностических тестов и терапевтических стратегий.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ**Публикации в изданиях, индексируемых в базах данных Scopus и Web of Science**

1. **Skryabin, G.O.** Stomatin is highly expressed in exosomes of different origin and is a promising candidate as an exosomal marker / G.O. Skryabin, A.V. Komelkov, S.A. Galetsky, et al. // *Journal of Cellular Biochemistry*. — 2021. — Vol. 122, no. 1. — P. jcb.29834. doi: [10.1002/jcb.29834](https://doi.org/10.1002/jcb.29834)
2. Skryabin, G.O. Isolation and characterization of extracellular vesicles from gastric juice / G.O. Skryabin, S.V. Vinokurova, S.A. Galetsky, et al. // *Cancers*. — 2022. — Vol. 14, no. 14. — P. 3314. doi: [10.3390/cancers14143314](https://doi.org/10.3390/cancers14143314)
3. **Skryabin, G.O.** Distinctive features of extracellular vesicles present in the gastric juice of patients with gastric cancer and healthy subjects / G. Skryabin, A. Enikeev, A. Beliaeva, et al. // *International Journal of Molecular Sciences*. — 2025. — Vol. 26, no. 12. — P. 5857. doi: [10.3390/ijms26125857](https://doi.org/10.3390/ijms26125857)
4. **Skryabin, G.O.** Integrated miRNA Profiling of Extracellular Vesicles from Uterine Aspirates, Malignant Ascites and Primary-Cultured Ascites Cells for Ovarian Cancer Screening / G.O. Skryabin, A.V. Komelkov, K.I. Zhordania, et al. // *Pharmaceutics*. — 2024. — Vol. 16, no. 7. — P.902. doi: [10.3390/pharmaceutics16070902](https://doi.org/10.3390/pharmaceutics16070902)
5. **Skryabin, G.O.** Analysis of miRNAs miR-125a-5p, -27a-5p, -193a-5p, -135b-5p, -451a, -495-3p and -136-5p in parental ovarian cancer cells and secreted extracellular vesicles / G.O. Skryabin, A.A. Beliaeva, A.D. Enikeev, et al. // *Успехи молекулярной онкологии*. — 2024. — Vol. 11, no. 1. — P. 113–123. doi: [10.17650/2313-805X-2024-11-1-113-123](https://doi.org/10.17650/2313-805X-2024-11-1-113-123)
6. **Скрябин, Г.О.** Сравнение методов выделения микроРНК из экстраклеточных везикул, присутствующих в асцитической жидкости / Г.О. Скрябин, С.В. Винокурова, Н.В. Елкина и др. // *Биохимия*. — 2022. — Т. 87, № 11. — С. 1667–1682. doi: [10.1134/s0006297922110141](https://doi.org/10.1134/s0006297922110141)
7. **Skryabin, G.O.** Extracellular vesicles from uterine aspirates represent a promising source for screening markers of gynecologic cancers / G.O. Skryabin, A.V. Komelkov, K.I. Zhordania, et al. // *Cells*. — 2022. — Vol. 11, no. 7. — P. 1064. doi: [10.3390/cells11071064](https://doi.org/10.3390/cells11071064)
8. **Скрябин, Г.О.** Влияние нокдауна кавеолина-1 на белковый состав экстраклеточных везикул, секретируемых клетками немелкоклеточного рака легких / Г.О. Скрябин, А.В. Комельков, П.Б. Копнин и др. // *Успехи молекулярной онкологии*. — 2021. — Т.8, №1. — С.41–46. doi: [10.17650/2313-805X2021-8-1-41-46](https://doi.org/10.17650/2313-805X2021-8-1-41-46)
9. Senkovenko, A. Characterization of extracellular vesicles by sulfophosphanillin colorimetric assay and Raman spectroscopy / A. Senkovenko, **G. Skryabin**, E. Parshina, et al. //

Frontiers in Bioscience-Landmark. — 2024. — Vol. 29, no. 10. — P. 366. doi: [10.31083/j.fbl2910366](https://doi.org/10.31083/j.fbl2910366)

10. Bagrov, D.V. AFM-TEM correlation microscopy and its application to lipid nanoparticles / D.V. Bagrov, V.V. Adlerberg, **G.O. Skryabin**, et al. // Microscopy Research and Technique. — 2023. — Vol. 86, no. 7. — P. 781–790. doi: [10.1002/jemt.24336](https://doi.org/10.1002/jemt.24336)

11. Nikishin, I. ScanEV – a neural network-based tool for the automated detection of extracellular vesicles in TEM images / I. Nikishin, R. Dulimov, **G. Skryabin**, et al. // Micron. — 2021. — Vol. 145. — P. 103044. doi: [10.1016/j.micron.2021.103044](https://doi.org/10.1016/j.micron.2021.103044)

Скрябин Глеб Олегович (Российская Федерация)

Состав и функциональное значение белков липидных рафтов в экзосомах и микровезикулах, секретируемых клетками злокачественных опухолей

Диссертация посвящена системному изучению состава и функциональной роли белков липидных рафтов (флотиллина-2, стоматина и кавеолина-1) во внеклеточных везикулах (ВВ), секретируемых клетками злокачественных опухолей. Впервые проведено их сравнительное исследование в ВВ, выделенных из широкого круга биологических жидкостей, включая новые для анализа источники – маточные аспираты и желудочный сок. На основании универсальной представленности и обогащения в малых везикулах белок стоматин предложен в качестве нового высокоспецифичного маркера экзосом. В отличие от него, представленность флотиллинов и кавеолина-1 в ВВ оказалась вариабельной и зависящей от источника везикул и клинического статуса донора. Экспериментально на клеточных моделях НМРЛ установлена роль этих белков в поддержании злокачественного фенотипа. Установлено, что нокдаун исследуемых белков стимулирует секрецию ВВ, а в случае стоматина – также к увеличению их размерного профиля. Впервые выявлена иерархическая регуляторная взаимосвязь между белками, в которой флотиллин-2 выступает вышестоящим негативным регулятором уровней стоматина и кавеолина-1, которые, в свою очередь, образуют петлю отрицательной обратной связи.

Gleb Olegovich Skryabin (Russian Federation)

Composition and Functional Significance of Lipid Raft Proteins in Exosomes and Microvesicles Secreted by Malignant Tumor Cells

This dissertation is devoted to a systematic study of the composition and role of lipid raft proteins (flotillin-2, stomatin, and caveolin-1) in extracellular vesicles (EVs) secreted by malignant tumor cells. For the first time, a comparative study of these proteins was conducted in EVs isolated from a wide range of biological fluids, including sources novel for such analysis – uterine aspirates and gastric juice. Based on its universal presence and enrichment in small vesicles, the protein stomatin is proposed as a new highly specific marker for exosomes. In contrast, the presence of flotillins and caveolin-1 in EVs proved to be variable and dependent on the vesicle source and the donor's clinical status. Experimentally, using NSCLC cellular models, the role of these proteins in maintaining the malignant phenotype was established. It was shown that knockdown of the studied proteins stimulates EV secretion, and in the case of stomatin, also leads to an increase in their size profile. For the first time, a hierarchical regulatory relationship between the proteins was revealed, in which flotillin-2 acts as an upstream negative regulator of the levels of stomatin and caveolin-1, which, in turn, form a negative feedback loop.