

**ИССЛЕДОВАНИЕ ФЛУОРЕСЦЕНТНЫХ СВОЙСТВ ЭКЗОСОМ ПЛАЗМЫ КРОВИ В
ДИАГНОСТИКЕ И ПРОГНОЗЕ КОЛОРЕКТАЛЬНОГО РАКА**

Е.А. Тугутова, А.И. Князькова, А.А. Цыденова

Научный руководитель: д.м.н. Н.В. Юнусова

НИИ онкологии, Томский НИМЦ,

Россия, г.Томск, пер.Кооперативный, 5,634009

E-mail: etugutova@mail.ru

**INVESTIGATION OF FLUORESCENT PROPERTIES OF PLASMA EXOSOMES IN DIAGNOSIS
AND PROGNOSIS OF COLORECTAL CANCER**

E.A. Tugutova, A.I. Knyazkova, A.A. Tsydenova

Scientific Supervisor: Dr. N.V. Yunusova

Cancer Research Institute, Tomsk National Research Medical Center,

Russia, Tomsk, Kooperativni str., 5, 634009

E-mail: etugutova@mail.ru

***Abstract.** Exosomes of blood plasma were studied using multiphoton tomography (two-photon microscopy). Exosomes were isolated in patients with colorectal cancer and in healthy donors. Images of fluorescence of exosomes were obtained at a wavelength of 760 nm and second harmonic generation at a wavelength of 380 nm. As a result of the analysis of the obtained data, qualitative differences were found between samples from patients with colorectal cancer and healthy donors.*

Введение. В структуре онкологической заболеваемости Российской Федерации и смертности от злокачественных новообразований колоректальный рак занимает третье место. Неуклонный рост заболеваемости и смертности населения от колоректального рака, высокий процент местнораспространенных и метастатических форм делает актуальным вопрос диагностики и прогнозирования данного заболевания. Поскольку в крови онкологических больных присутствуют экзосомы (внеклеточные везикулы размером 30-100 нм), секретируемые опухолевыми клетками и несущие в своем составе биополимеры, характерные для родительских клеток, эти везикулы все чаще используют в качестве материала для «жидкой биопсии» опухолей. На данный момент исследование экзосом для диагностики и мониторинга опухолевого роста является перспективным направлением в онкологии. Это важно, как для первичной диагностики, так и для контроля метастатических процессов [1, 2].

Материалы и методы. В исследование включены 15 больных колоректальным раком (T2-4N1-2M1) и 6 здоровых доноров. Материалом для исследования служили образцы крови после забора путем венепункции. Экзосомы из плазмы крови были выделены методом ультрафильтрации с двойным ультрацентрифугированием [3]. Образцы выделенных экзосом были охарактеризованы с помощью трансмиссионной электронной микроскопии и проточной цитометрии [4]. Визуализация флуоресценции экзосом на длине волны 760 нм и генерации второй гармоники на длине волны 380 нм выполнена на мультифотонном томографе MPTflex (JenLab, Germany).

Результаты. Концентрация экзосом и их флуоресценция на длине волны 760 нм существенно отличались для случаев метастатического, местно-распространенного колоректального рака и образцов здоровых доноров (рис. 1). Аналогичная картина наблюдалась при исследовании всех образцов из взятой нами выборки.

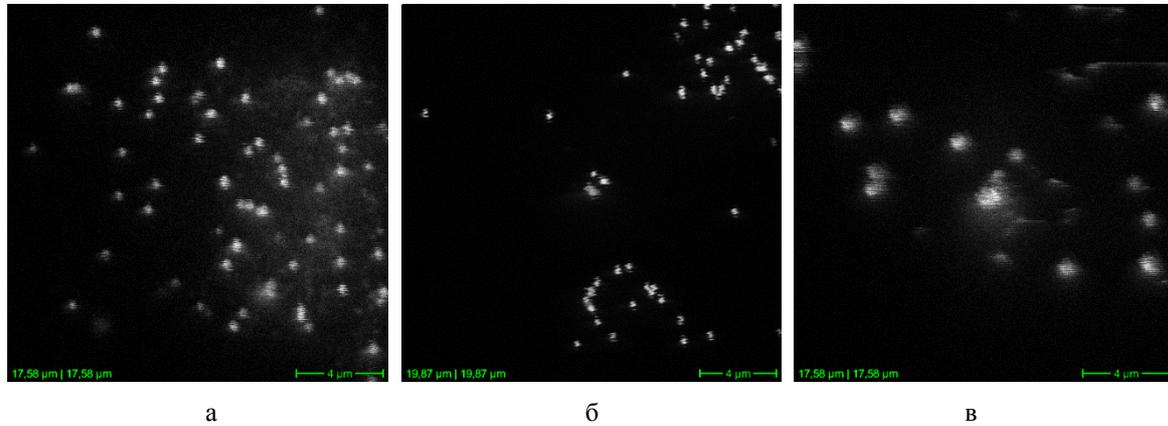


Рис. 1. Флуоресценция экзосом плазмы крови больного метастатическим колоректальным раком (а), местно-распространенным колоректальным раком (б) и здорового донора (в)

Ниже представлены изображения генерации второй гармоники экзосом плазмы крови на длине волны 380 нм для случаев метастатического, местно-распространенного колоректального рака и здорового донора (рис. 2), снятые одновременно с изображениями флуоресценции на длине волны 760 нм в той же области пространства.

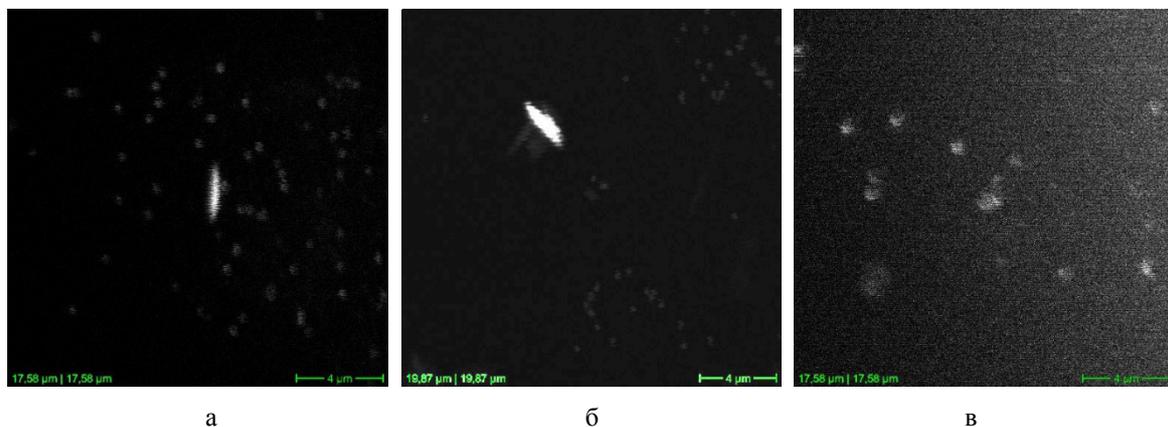


Рис. 2. Генерация второй гармоники экзосом плазмы крови больного метастатическим колоректальным раком (а), местно-распространенным колоректальным раком (б) и здорового донора (в)

При сравнении изображений флуоресценции и генерации второй гармоники выявлено, что не все флуоресцирующие экзосомы видны на изображениях генерации второй гармоники и наоборот. Следовательно, с помощью данных изображений можно различить несколько типов экзосом.

Для хранения выделенных экзосом используется фосфатно-солевой буфер (PBS), поэтому необходимо также проанализировать изображения флуоресценции и генерации второй гармоники для буферной жидкости (рис. 3).

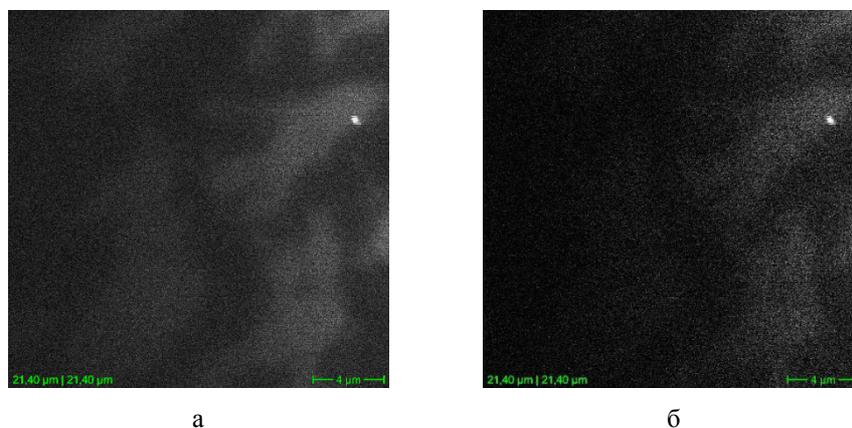


Рис.3. Флуоресценция (а) и генерация второй гармоники (б) фосфатно-солевого буфера (PBS)

При сравнении изображений флуоресценции и генерации второй гармоники с соответствующими изображениями для буферной жидкости выявлено, что экзосомы обладают достаточно сильной флуоресценцией, а также отображаются на изображении генерации второй гармоники.

Выводы. В результате анализа полученных данных обнаружены качественные различия флуоресценции экзосом плазмы крови для случаев метастатического, местно-распространенного колоректального рака и здоровых доноров. Таким образом, двухфотонная микроскопия экзосом плазмы крови является перспективным направлением в диагностике и прогнозе колоректального рака.

Исследование выполнено при финансовой поддержке РФФИ и Томской области в рамках научного проекта №18-415-703006.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Юнусова Н.В., Тамкович С.Н., Кондакова И.В. Экзосомы в различных биологических жидкостях: состав и функции // Молекулярная медицина. – 2017. - Т. 15. - № 4. – С. 14-22.
2. Юнусова Н. В., Кондакова И. В., Коломиец Л. А., Молчанов С. В. Протеасомы и экзосомы при раке яичников: связь с особенностями клинического течения и прогнозом // Сибирский онкологический журнал. – 2014. – № 4. – С. 53-59.
3. Tamkovich, S.N., Yunusova, N.V., Stakheeva, M.N., Somov, A.K., Frolova, A.Y., Kirushina, N.A., Afanasyev, S.G., Grigoryeva, A.E., Laktionov, P.P., Kondakova, I.V. (2017). Isolation and characterization of exosomes from blood plasma of breast cancer and colorectal cancer patients. *Biochemistry. Suppl. Series B: Biomedical Chemistry*, V. 11, no. 3, pp. 291-295.
4. Yunusova, N.V., Tamkovich, S.N., Stakheeva, M.N., Grigor'eva, A.A., Somov, A.K., Tugutova, E.A., Kolomiets, L.A., Molchanov, S.V., Afanas'ev, S.G., Kakurina, G.V., Choinzonov, E.L., Kondakova, I.V. (2017, September). The characterization of exosomes from biological fluids of patients with different types of cancer, V. 1882, Issue 1. Retrived October 10, 2017, from <http://aip.scitation.org/doi/abs/10.1063/1.5001659>