

DOI: <https://doi.org/10.17816/gc609563>

# Мультиплексный анализ раковых клеток после обработки индуцированными мембранными везикулами мезенхимальных стволовых клеток

С.К. Клетухина, М.О. Гомзикова

Казанский (Приволжский) федеральный университет, Казань, Россия

## АННОТАЦИЯ

**Обоснование.** Внеклеточные везикулы (ВВ) представляют собой везикулы мембранного происхождения, выделяемые клетками во внеклеточное пространство и играющие важную роль в межклеточной коммуникации путём участия в регуляции ряда биологических процессов. Везикулы обнаруживаются в ткани опухоли, где выполняют роль посредника в передаче сигналов между опухолевыми клетками и клетками микроокружения. Подобно родительским мезенхимальным стволовым клеткам (МСК), ВВ оказывают двойственное влияние на развитие опухолей. Исследования показывают, что ВВ МСК способствуют росту опухоли, с другой стороны, в нескольких работах продемонстрирована их ингибирующая роль.

**Цель исследования** — оценить эффект воздействия мембранных везикул МСК на молекулярный состав раковых клеток.

**Материалы и методы.** Индуцированные мембранные везикулы (иМВ) получали из МСК, предварительно выделенных из жировой ткани, с помощью обработки их цитохалазином В. С целью моделирования межклеточной коммуникации между опухолевыми клетками и МСК наносили иМВ в различной концентрации белка на клетки-реципиенты (SH-SY5Y, PC3, MCF7). Для измерения концентрации тотального белка, выделенного из клеток/иМВ человека, использовали метод с бидинхониновой кислотой. Затем проводили анализ молекулярного состава клеток-реципиентов после нанесения на них иМВ МСК с помощью мультиплексного анализа.

**Результаты.** Мы определили, что после нанесения мембранных везикул МСК на раковые клетки происходят значительные изменения в экспрессии многих биологически активных молекул, включая цитокины, хемокины и факторы роста. В частности, обнаружено увеличение концентрации фактора роста FGF-2, цитокинов G-CSF, Fractalkine, IL-12p40, IL-9, IL-4, IL-6, IL-8, хемокинов IP-10, MCP-1 и других. Анализ также выявил, что большинство из этих молекул связаны с пролиферацией клеток, миграцией и иммунным ответом.

**Заключение.** Мембранные везикулы МСК способны изменять молекулярный профиль раковых клеток, увеличивая концентрацию молекул, связанных с выживаемостью и миграцией клеток.

**Ключевые слова:** мембранные везикулы; индуцированные цитохалазином В мембранные везикулы; мезенхимальные стволовые клетки; мультипотентные стромальные клетки.

## Как цитировать:

Клетухина С.К., Гомзикова М.О. Мультиплексный анализ раковых клеток после обработки индуцированными мембранными везикулами мезенхимальных стволовых клеток // Гены и клетки. 2024. Т. 19, № 4. С. 441–452. DOI: <https://doi.org/10.17816/gc609563>

DOI: <https://doi.org/10.17816/gc609563>

# Multiplex analysis of cancer cells treated with induced mesenchymal stem cell membrane vesicles

Sevindzh K. Kletukhina, Marina O. Gomzikova

Kazan Federal University, Kazan, Russia

## ABSTRACT

**BACKGROUND:** Extracellular vesicles (EVs) are membrane-derived vesicles secreted by cells into the extracellular space. They play an important role in intercellular communication and regulate various biological processes. Vesicles are found in tumor tissue where they mediate signaling between tumor cells and surrounding cells in the microenvironment. Like parental mesenchymal stem cells (MSCs), EVs exert dual effects on tumorigenesis. Some studies have shown that MSC-EVs promote tumor growth, while others have demonstrated their inhibitory role.

**AIM:** The aim of the study was to evaluate the effect of MSC membrane vesicles (MVs) on the molecular composition of cancer cells.

**MATERIALS AND METHODS:** Induced membrane vesicles (iMVs) were obtained from MSCs previously isolated from adipose tissue by treatment with cytochalasin B. To simulate intercellular communication between tumor cells and MSCs, iMVs with different protein concentrations were applied to recipient cells (SH-SY5Y, PC3, MCF7). A bicinchoninic acid technique was used to measure total protein isolated from human cells/iMVs. The molecular composition of the recipient cells was then analyzed by multiplex analysis. The cells were pre-treated with MSC iMVs.

**RESULTS:** Applying MSC MVs to cancer cells induces significant changes in the expression of many biologically active molecules, including cytokines, chemokines, and growth factors. For example, increased levels of the growth factor FGF-2, cytokines G-CSF, fractalkine, IL-12p40, IL-9, IL-4, IL-6, IL-8, chemokines IP-10, MCP-1, and others were detected. In addition, the majority of these molecules are found to be associated with cell proliferation, migration and immune response.

**CONCLUSION:** MSC MVs are able to alter the molecular profile of cancer cells, increasing the levels of molecules associated with cell survival and migration.

**Keywords:** membrane vesicles; cytochalasin B-induced membrane vesicles; mesenchymal stem cells; multipotent stromal cells.

## To cite this article:

Kletukhina SK, Gomzikova MO. Multiplex analysis of cancer cells treated with induced mesenchymal stem cell membrane vesicles. *Genes & cells*. 2024;19(4):441–452. DOI: <https://doi.org/10.17816/gc609563>

Received: 16.10.2023

Accepted: 02.05.2024

Published online: 31.10.2024

## ВВЕДЕНИЕ

Внеклеточные везикулы (ВВ) — это окружённые цитоплазматической мембраной округлые структуры размером 50–2000 нм, в которых находится цитоплазматическое содержимое родительской клетки [1]. Обнаружено, что практически все клетки организма человека высвобождают ВВ. В настоящее время общепризнано, что везикулы участвуют в межклеточной коммуникации, доставляя биологически активные молекулы к клеткам-мишеням и/или запуская рецептор-опосредованный клеточный сигналинг [2].

Внеклеточные везикулы проявляют свойства родительских клеток. Было показано, что ВВ мезенхимальных стволовых клеток (МСК), подобно родительским клеткам, стимулируют ангиогенез и регенерацию тканей на различных моделях, таких как инфаркт миокарда, черепно-мозговая травма, кожные раны [3–6]. Кроме того, ВВ МСК оказывают иммуносупрессивное действие на макрофаги, В-клетки, Т-клетки и дендритные клетки, а также сохраняют противовоспалительные свойства родительских клеток [7, 8]. Эти свойства связаны с тем, что ВВ в процессе образования вбирают в себя цитоплазматическое содержимое родительских клеток, в том числе различные факторы роста, цитокины и хемокины. Известно, что ВВ высвобождается относительно мало и процедура их выделения — сложная и трудоёмкая, поэтому разрабатываются способы индукции высвобождения везикул из клеток человека [9]. Н. Pick с соавт. предложили индуцировать высвобождение мембранных везикул от клеток человека с помощью цитохалазина В [10]. Это возможно, так как применение веществ, нарушающих связь гликопротеинов цитоплазматической мембраны с цитоскелетом (например, дибукаин) [11] и также нарушающих актиновый цитоскелет клеток человека (например, цитохалазин, латрункулин А) [12, 13], приводит к увеличению количества высвобождающихся везикул.

Существует проблема ограниченного выхода ВВ [14]. Ранее мы выделили мембранные везикулы с помощью цитохалазина В (далее — индуцированные мембранные везикулы, иМВ) из клеток нейробластомы SH-SY5Y, клеток предстательной железы PC3 [15] и МСК человека [16] и показали, что размер иМВ колеблется от 100 до 2600 нм, при этом размер большинства иМВ (89,36%) — в пределах от 100 до 1200 нм [16]. Нашей группой был проведён сравнительный анализ, который показал, что после каждого этапа центрифугирования (2300×g, 10 000×g и 100 000×g) количество иМВ значительно превышало количество естественных ВВ — до 5, 9 и 20 раз соответственно [17]. Кроме того, мы обнаружили, что иМВ МСК сохраняют молекулярный состав, иммунофенотип и ангиогенную активность родительских МСК [16], однако мало что известно о влиянии иМВ на молекулярный состав клеток-мишеней.

**Цель исследования** — оценить эффект воздействия мембранных везикул МСК на цитокиновый профиль раковых клеток.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

### Культуры клеток человека

В работе использовали коммерческие клеточные линии SH-SY5Y (ATCC CRL-2266, клеточная линия нейробластомы человека), PC3 (ATCC CRL1435, линия клеток рака простаты человека), MCF7 (ATCC HTB-22, клеточная линия аденокарциномы).

SH-SY5Y исходно клонирована из линии клеток SK-N-SH, полученных путём биопсии костного мозга пациентки с нейробластомой и представляющих собой незрелые опухолевые клетки нервной ткани [18].

MCF7 представляет собой линию клеток рака молочной железы человека с рецепторами эстрогена, прогестерона и глюкокортикоидов [19]. Данная клеточная линия была получена из плеврального выпота метастатического рака молочной железы (аденокарциномы) [20].

Клеточная линия PC3 состоит из клеток рака предстательной железы человека, первоначально выделена от пациента с метастазами в кости, обладает высоким канцерогенным и метастатическим потенциалом [21].

### Выделение мезенхимальных стволовых клеток

Мезенхимальные стволовые клетки выделяли из липоаспирата жировой ткани, полученного от здоровых доноров во время выполнения плановой липосакции в Научно-клиническом центре прецизионной и регенеративной медицины Института фундаментальной медицины и биологии ФГАОУ ВО «Казанский (Приволжский) федеральный университет». Забор биоматериала и дальнейшие исследования осуществляли в соответствии с протоколом эксперимента № 30 от 28 июня 2021 г., утверждённым локальным этическим комитетом вышеуказанного университета. Согласно требованию статьи 20 Федерального закона 323-ФЗ, от всех доноров были получены подписанное информированное согласие и сведения об отсутствии венерических, онкологических, хронических и генетических заболеваний, а также инфекций и врождённых аномалий. Выделение стволовых клеток из жировой ткани человека осуществляли путём стандартной ферментативной обработки 0,2% раствором коллагеназы II («Диаэм», Россия). Инкубацию ткани проводили при 37 °C на шейкере в режиме 120 об./мин в течение часа. Клетки трижды промывали фосфатно-солевым буфером (ФСБ). Полученный клеточный осадок ресуспендировали в среде  $\alpha$ -MEM, с добавлением 10% сыворотки крови плодов коровы (Sigma-Aldrich, США), 2 mM L-глутамин («ПанЭко», Россия). С целью подтверждения факта, что выделенные клетки являются мезенхимальными стволовыми клетками, проведено иммунофенотипирование клеток с применением моноклональных антител к CD90 (Thy1) — PE/Cy5 (328112), CD29 — APC (303008), CD44 — APC/Cy7 (103028)

и CD73 — Alexa Fluor 647 (127208). Использовали анти-тела производства компании BioLegend (США). Экспрессию маркёров CD анализировали с помощью проточного цитофлуориметра BD FACS Aria III (BD Bioscience, США) методом проточной цитометрии. Установлено, что клетки экспрессируют следующий иммунофенотип: CD90 (Thy1)<sup>+</sup>, CD29<sup>+</sup>, CD44<sup>+</sup>, CD73<sup>+</sup>, характерный для человеческих МСК, а также CD45<sup>-</sup> в качестве отрицательного контроля.

Клеточные линии и МСК поддерживали на среде DMEM (Dulbecco's modified Eagle's medium) производства Sigma-Aldrich (США), к которой были добавлены 10% сыворотки крови плодов коровы (Sigma-Aldrich, США), 2 мМ L-глутамин (Sigma-Aldrich, США) и смесь антибиотиков пенициллина (10 ед./мл) и стрептомицина (100 ед./мл) («ПанЭко», Россия). Культуры клеток культивировали в инкубаторе MCO-15AC (SANYO Electric Co., Ltd., Япония) при 37 °С во влажной атмосфере, содержащей 5% CO<sub>2</sub>.

### Получение индуцированных мембранных везикул

Получение иМВ из культуры клеток МСК осуществляли согласно работе Н. Pick с соавт. [10] с модификациями. При достижении культурой клеток плотности монослоя 90% отбирали питательную среду, дважды промывали культуру с помощью ФСБ от остатков среды. Клетки открепляли, используя 0,25% раствор трипсина-ЭДТА («ПанЭко», Россия), затем отмывали их с помощью ФСБ. Инкубировали клетки в среде DMEM без сыворотки крови, содержащей 10 мкг/мл цитохалазина В (Sigma-Aldrich, США) в течение 30 мин при 37 °С во влажной атмосфере, содержащей 5% CO<sub>2</sub>, далее подвергали активному перемешиванию в течение 30 с. Затем осуществляли серию последовательных центрифугирований — супернатант отбирали и центрифугировали: 700 об./мин в течение 10 мин, 700 об./мин в течение 20 мин, 3000 об./мин в течение 25 мин. Осадок, содержащий иМВ, отмывали большим количеством ФСБ, центрифугировали при 3000 об./мин в течение 25 мин. Полученный осадок иМВ использовали далее в работе.

### Мультиплексный анализ

Исследование молекулярного состава клеток-реципиентов (PC3, SH-SY5Y, MCF7) человека осуществляли с использованием панели Human Cytokine 27-Plex (Bio-Rad, США) в соответствии с инструкцией фирмы-производителя. Образцы инкубировали с флуоресцентными частицами в течение 1 ч без доступа света. Далее частицы дважды отмывали ФСБ с помощью прибора Bio-Plex Pro Wash Station (Bio-Rad, США). Инкубировали с фикоэритрином, конъюгированным со стрептавидином, в течение 10 мин. Далее частицы трижды отмывали ФСБ с помощью прибора Bio-Plex Pro Wash Station (Bio-Rad, США). Анализ осуществляли с использованием прибора Bio-Plex® 200 Systems (Bio-Rad, США).

### Измерение концентрации белка методом с бичинхоиновой кислотой

Для измерения концентрации тотального белка, выделенного из клеток/иМВ человека, использовали метод с бичинхоиновой кислотой. Реакцию проводили с помощью коммерческого набора для анализа белка Pierce™ BCA (Thermo Fisher Scientific, США). Для приготовления рабочего раствора смешивали реагент А (раствор, содержащий бичинхоиновую кислоту, карбонат натрия, тартрат натрия, бикарбонат натрия в 0,1н NaOH, pH 11,25) и реагент Б (4% CuSO<sub>4</sub>·xH<sub>2</sub>O) в соотношении 50:1. Далее смешивали 25 мкл исследуемого образца и 200 мкл рабочего раствора. Смесь инкубировали при 37 °С в течение 30 мин. Через 30 мин вынимали образец из термостата, дожидались, когда температура образца сравняется с комнатной, и измеряли уровень абсорбции при 562 нм. Для определения концентрации белка в исследуемых образцах строили калибровочную кривую на основании разведения белка бычьего сывороточного альбумина с известной концентрацией белка.

### Нанесение индуцированных мембранных везикул мезенхимальных стволовых клеток на клетки-реципиенты

С целью моделирования межклеточной коммуникации между опухолевыми клетками и МСК наносили иМВ МСК в концентрации белка 50 мкг/мл на клетки-реципиенты (SH-SY5Y, PC3, MCF7), которые предварительно за 24 ч до нанесения были посеяны на 96-луночный планшет в количестве 10 000 клеток на лунку.

Через 24 ч инкубирования иМВ с клетками-реципиентами отмывали клетки-реципиенты в ФСБ трижды с целью удаления неслившихся с ними иМВ. Далее для снятия клеток с поверхности планшета в каждую лунку добавляли 0,25% раствор трипсина-ЭДТА в объёме, достаточном для покрытия монослоя клеток. Инкубировали культуральный флакон в инкубаторе MCO-15AC при 37 °С во влажной атмосфере, содержащей 5% CO<sub>2</sub>, в течение 5 мин. Далее инактивировали трипсин путём добавления полной питательной среды в соотношении 1:2. Для избавления от остатков трипсина центрифугировали клетки при 1400 об./мин в течение 5 мин. Далее повторно отмывали клетки-реципиенты в ФСБ трижды с целью удаления неслившихся с ними иМВ. Осадок клеток-реципиентов замораживали и хранили при -80 °С в низкотемпературном морозильнике DW-86L388 (Haier, Китай) для последующего мультиплексного анализа.

### РЕЗУЛЬТАТЫ

С целью оценки молекулярных изменений в клетках-реципиентах, индуцируемых иМВ МСК человека, мы наносили иМВ МСК на клетки (клеточные линии SH-SY5Y, PC3, MCF7) и оценивали концентрацию ряда биологически

активных молекул внутри клеток методом мультиплексного анализа.

В результате исследования молекулярных изменений в клетках-реципиентах SH-SY5Y после добавления иМВ МСК обнаружено увеличение экспрессии всех исследуемых аналитов, однако не все изменения достигли уровня статистической значимости. Статистически значимо и более чем в 1,5 раза была увеличена экспрессия фактора роста FGF-2 (в 2,0 раза), цитокинов G-CSF (в 1,7 раза), Fractalkine (в 1,8 раза), IL-9 (в 1,92 раза), IL-6 (в 10,1 раза), IL-8 (в 3,1 раза), хемокина MCP-1 (в 1,6 раза) (табл. 1). Увеличение экспрессии цитокинов IL-12p40, IL-4 и хемокина IP-10 было статистически не значимым.

В результате исследования молекулярных изменений в клетках-реципиентах PC3 после добавления иМВ МСК обнаружено статистически значимое увеличение экспрессии всех исследуемых аналитов (табл. 2).

В результате исследования молекулярных изменений в клетках-реципиентах MCF7 после добавления иМВ МСК установлено, что концентрация факторов роста EGF и VEGF увеличилась почти в 2,0 и 3,0 раза соответственно, также повысилась концентрация следующих цитокинов: G-CSF — в 3,62 раза, Flt-3L — в 11,67 раза, MCP-3 — в 2,1 раза, IL-12p40 — в 80,41 раза, IL-1RA — в 14,5 раза, IL-1 $\alpha$  — в 3,3 раза, IL-6 — в 8,5 раза соответственно. Концентрация остальных аналитов увеличилась в 1,5 раза, однако статистически значимых различий не выявлено (табл. 3).

Далее нами был проведён литературный поиск для определения молекулярных путей и функций,

в которых задействованы вышеуказанные молекулы (рис. 1). Интересно отметить, что исследованные в клетках факторы SH-SY5Y, PC3 и MCF7 в большей степени участвуют в индукции пролиферации, способствуют хемотаксису и отвечают за провоспалительную способность.

Согласно полученным данным, большая часть индуцированных молекул участвует в стимуляции пролиферации клеток (см. рис. 1). Так, например, EGF, IL-9, IL-4, IL-7, FGF-2, G-CSF/GM-CSF, Flt-3L, TNF- $\beta$ , IL-6 отвечают за пролиферацию клеток. Факторы Eotaxin, TNF- $\alpha$ , IL-8, IP-10, MCP-1, MCP-3 стимулируют хемотаксис; VEGF, Fractalkine, IL-9, G-CSF/GM-CSF, TNF- $\beta$  стимулируют жизнеспособность клеток. Факторы IL-17A, TNF- $\alpha$ , IL-15, IL-6 и IL-12p70, IL-10, IL-12p40, IL-4, IL-1RA индуцируют про- и противовоспалительные функции клеток.

## ОБСУЖДЕНИЕ

Раковые клетки и МСК могут осуществлять взаимную перекрёстную связь на расстоянии путём высвобождения и поглощения ВВ. Непрерывное высвобождение цитокинов/хемокинов в свободном виде и в составе ВВ создаёт среду для временных и стабильных трансформаций как в МСК, так и в раковых клетках [22]. Эти перемены связаны с запуском сигнальных каскадов, что приводит к изменению свойств раковых клеток, например путём индукции программы ретроидифференцировки, которая увеличивает гетерогенность опухоли [22]. Ранее было показано, что ВВ, полученные из МСК, стимулируют миграцию клеток рака молочной железы MCF7, запуская передачу

**Таблица 1.** Концентрация исследуемых аналитов в нативных клетках SH-SY5Y и SH-SY5Y, обработанных индуцированными мембранными везикулами мезенхимальных стволовых клеток, пг/мл

**Table 1.** Concentration of study analytes in native SH-SY5Y cells and SH-SY5Y cells treated with induced mesenchymal stem cell membrane vesicles (pg/mL)

Название аналита Analyte name	Среднее значение концентрации аналита в исследуемых образцах Mean concentration of analyte in studied samples	
	Нативные SH-SY5Y Native SH-SY5Y	SH-SY5Y, обработанные иМВ МСК SH-SY5Y treated with MSC-derived iMVs
FGF-2	10942,10±553,48	22040,07±675,05
G-CSF	2292,81±108,27	3805,23±534,42
Fractalkine	166,78±12,59	304,01±75,25
IL-12p40	21,99±15,41	42,74±8,80
IL-9	165,67±44,41	316,33±34,28
IL-4	7,88±8,47	12,99±7,50
IL-6	5,67±4,0	57,24±7,99
IL-8	34,11±10,42	106,21±18,53
IP-10	7,30±5,98	17,37±6,54
MCP-1	18,34±5,95	30,06±3,14

Примечания: иМВ МСК — индуцированные мембранные везикулы мезенхимальных стволовых клеток; \* статистически значимые различия выделены жирным шрифтом.

Notes: iMVs — induced mesenchymal stem cell membrane vesicles; \* statistically significant differences are highlighted in bold.

**Таблица 2.** Концентрация исследуемых аналитов в нативных клетках PC3 и PC3, обработанных индуцированными мембранными везикулами мезенхимальных стволовых клеток, пг/мл

**Table 2.** Concentration of study analytes in native PC3 cells and PC3 cells treated with induced mesenchymal stem cell membrane vesicles (pg/mL)

Название аналита Analyte name	Среднее значение концентрации аналита в исследуемых образцах Mean concentration of analyte in studied samples	
	Нативные PC3 Native PC3	PC3, обработанные иМВ МСК* PC3 treated with MSC-derived iMVs*
EGF	59,39	107,87
GM-CSF	23,02	1279,48
IL-12p40	3,98	25,70
IL-17A	0,61	2,99
IL-1α	17,97	1091,30
IL-9	4,25	87,69
IL-1β	114,99	3999,47
IL-6	20,26	1963,33
IL-7	14,32	26,67
MCP-1	15,66	673,69
TNF-α	1,69	186,89

\* все различия статистически значимы. иМВ МСК — индуцированные мембранные везикулы мезенхимальных стволовых клеток.

\* all differences are statistically significant. iMВ МСК — induced mesenchymal stem cell membrane vesicles.

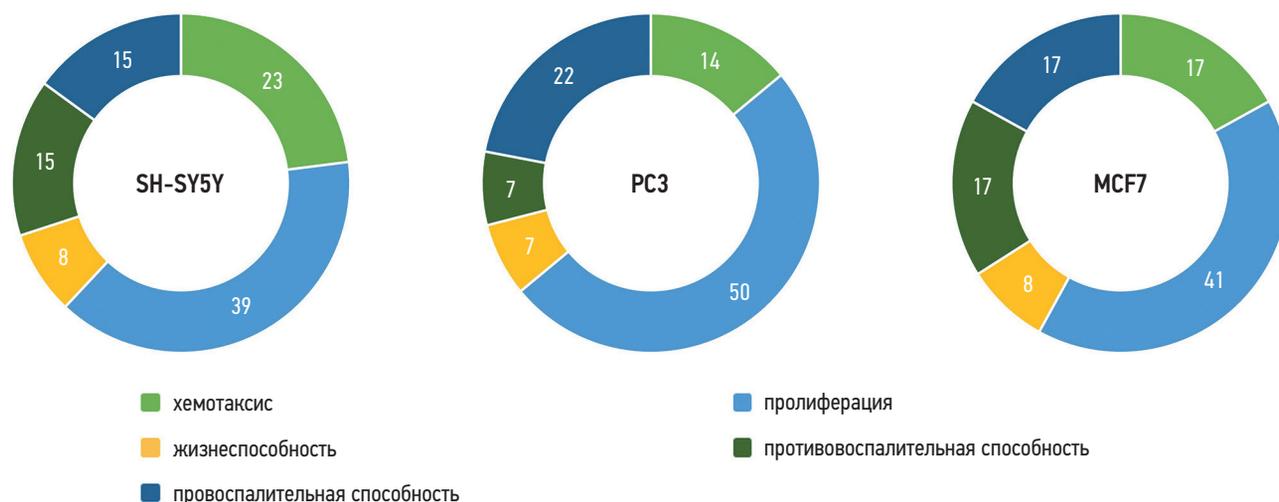
**Таблица 3.** Концентрация исследуемых аналитов в нативных клетках MCF7 и MCF7, обработанных индуцированными мембранными везикулами мезенхимальных стволовых клеток, пг/мл

**Table 3.** Concentration of study analytes in native MCF7 cells and MCF7 cells treated with induced mesenchymal stem cell membrane vesicles (pg/mL)

Название аналита Analyte name	Среднее значение концентрации аналита в исследуемых образцах Mean concentration of analyte in studied samples	
	Нативные MCF7 Native MCF7	MCF7, обработанные иМВ МСК MCF7 treated with MSC-derived iMVs
EGF	9,68±1,46	19,30±2,67
G-CSF	1,99±1,16	7,20±3,65
Flt-3L	0,86	10,04±1,00
GM-CSF	1,67±0,88	2,68±1,46
Fractalkine	21,87	39,57±42,80
IL-10	0,64±0,26	1,24±1,08
MCP-3	6,10	12,80
IL-12p40	0,27	21,71±3,18
IL-12p70	0,85±0,15	2,93±2,63
IL-15	3,26±0,69	5,49±1,16
IL-1RA	0,46	6,65±1,75
IL-1α	1,35	4,42±1,41
IL-1β	0,94±0,27	2,30±1,55
IL-4	1,46	6,04±4,01
IL-6	0,67±0,03	5,68±2,56
MCP-1	4,94±3,22	8,76±2,59
TNF-α	1,27±0,45	1,94±0,77
TNF-β	0,57	1,062±0,93
VEGF	26,22±8,73	75,81±4,45

Примечания: иМВ МСК — индуцированные мембранные везикулы мезенхимальных стволовых клеток; \* статистически значимые различия выделены жирным шрифтом.

Notes: iMВ МСК — induced mesenchymal stem cell membrane vesicles; \* statistically significant differences are highlighted in bold.



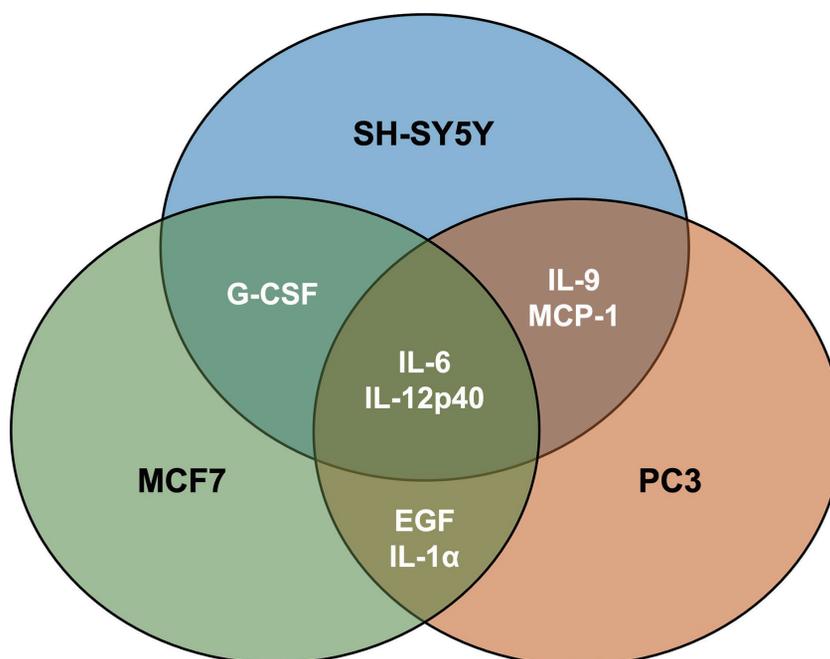
**Рис. 1.** Биологические процессы, в которых участвуют аналиты и концентрация которых увеличилась в клетках-реципиентах SH-SY5Y, PC3, MCF7 после добавления индуцированных мембранных везикул мезенхимальных стволовых клеток, %.

**Fig. 1.** Biological processes involving analytes with increased concentrations in recipient SH-SY5Y, PC3, MCF7 cells after addition of induced mesenchymal stem cell membrane vesicles (%).

сигналов Wnt и тем самым способствуя развитию опухоли [23]. Другие исследователи идентифицировали miR-21 и miR-34a как поддерживающее опухоль содержимое ВВ, усиливающее рост опухоли молочной железы *in vivo* [24]. Совместное введение ВВ МСК и клеточных линий рака желудка или толстой кишки способствовало росту опухоли, ангиогенезу, а также стимулировало инвазивность опухолевых клеток, что свидетельствует о проонкогенных свойствах ВВ МСК [25, 26]. Поэтому мы оценили, какие

молекулярные изменения происходят в раковых клетках под действием мембранных везикул МСК человека.

В результате выявлены универсальные и специфические цитокины, концентрация которых увеличивается под действием иМВ МСК (рис. 2). Согласно полученным нами данным, во всех трёх клеточных линиях отмечено значительное увеличение экспрессии IL-6. После нанесения иМВ МСК на клетки SH-SY5Y, PC3 и MCF7 его значения увеличились в 10,10; 96,91 и 8,50 раза соответственно.



**Рис. 2.** Диаграмма Венна, отражающая пересечения по увеличению концентрации аналитов в клетках-реципиентах SH-SY5Y, PC3, MCF7 после добавления индуцированных мембранных везикул мезенхимальных стволовых клеток.

**Fig. 2.** Venn diagram showing intersections of increasing analyte concentrations in recipient SH-SY5Y, PC3, MCF7 cells after addition of induced mesenchymal stem cell membrane vesicles.

IL-6 играет решающую роль в размножении и дифференцировке опухолевых клеток [22, 27]. Повышенные уровни IL-6 в сыворотке крови и в опухоли продемонстрированы при нескольких видах рака, при этом IL-6 может влиять на все аспекты процесса онкогенеза, регулируя пролиферацию, апоптоз, метаболизм, выживаемость, ангиогенез и метастазирование [28]. Кроме того, IL-6 также способен модулировать терапевтическую устойчивость опухоли, такую как множественная лекарственная устойчивость [29].

Фактором, экспрессия которого увеличилась в двух клеточных линиях (SH-SY5Y, MCF7) в 1,7 и 3,6 раза соответственно, стал G-CSF. В клетках РС3 его экспрессия повысилась значительно — в 55,6 раза. Согласно данным литературы, G-CSF и GM-CSF могут регулировать эпителиально-мезенхимальный переход (ЭМП), который в свою очередь является критическим событием при злокачественной трансформации [30, 31]. G-CSF также описан как опухолевый фактор, который рекрутирует и размножает миелоидные супрессорные клетки. Эти клетки секретируют цитокины, участвующие в индукции регуляторных Т-клеток и способствующие созданию иммуносупрессивного микроокружения опухоли [32]. Введение экзогенного G-CSF способствовало росту опухоли посредством пролиферации клеток, ангиогенеза, рекрутирования макрофагов M2 и усиления ЭМП, а также посредством модуляции микроокружения опухоли [33]. Кроме того, G-CSF в сочетании с другими провоспалительными цитокинами, такими как GM-CSF, IL-8 и MCP-1, которые секретируются высокоагрессивными опухолевыми клетками, индуцирует ЭМП в неагрессивных клетках рака молочной железы [34]. Что касается GM-CSF, многочисленные исследования показывают, что он может обладать как противоопухолевыми, так и проопухолевыми свойствами. Например, введение GM-CSF пациентам с раком повышает количество нейтрофилов до уровня, необходимого для защиты пациента от заражения смертельными инфекциями, включая синдром приобретённого иммунодефицита [35–37]. При этом было обнаружено, что GM-CSF стимулирует пролиферацию, миграцию и инвазию в нескольких линиях опухолевых клеток, а также способствует прогрессированию опухоли и метастазированию в различных опухолях посредством аутокринной стимуляции опухолевых клеток и паракринной активации поддерживающей опухоль стромы [38–41].

Экспрессия IL-9 в нашем исследовании была увеличена в 1,9 и 20,6 раза в клеточных линиях SH-SY5Y и РС3 соответственно. Показано, что этот цитокин в основном оказывает проопухолевое действие при гематологических злокачественных новообразованиях. Пролиферативная и антиапоптотическая активность IL-9 заключается в стимуляции накопления неопластических клеток и индукции прогрессирования заболевания [42, 43].

Секреция MCP-1, согласно данным литературы, также ассоциируется с неблагоприятным клиническим прогнозом ввиду индукции инфильтрации макрофагов,

ассоциированных с опухолью, и метастазов в ряде твёрдых опухолей, таких как рак предстательной железы, рак молочной железы, рак яичников и гепатоцеллюлярная карцинома [44–48]. В нашем исследовании экспрессия MCP-1 после нанесения иМВ МСК увеличилась в 1,6 раза в клетках SH-SY5Y и в 43,0 раза — в клетках РС3. Известно, что MCP-1 привлекает моноциты в опухоль (которые затем дифференцируются в ассоциированные с опухолью макрофаги), воздействует на эндотелиальные клетки для продукции факторов роста эндотелия, привлекает фиброциты в опухолевую микроокружающую среду, вызывает иммуносупрессию, тем самым усиливая формирование стромы, стимулируя рост опухоли и ангиогенез [49–51].

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Согласно полученным данным, мембранные везикулы МСК способны изменять концентрацию в раковых клетках цитокинов/хемокинов, которые участвуют в поддержке выживаемости данных клеток, а также передавать им новые свойства. Поэтому применение мембранных везикул МСК требует повышенной осторожности, особенно на фоне наличия онкозаболеваний. В связи с этим необходимо тщательно исследовать безопасность мембранных везикул МСК, как естественных, так и индуцированных, ввиду их способности стимулировать рост и агрессивность опухолевых клеток. К тому же требуется всесторонняя характеристика состава получаемых везикул МСК, идентификация функциональных молекул, переносимых ими. Для последующего применения везикул МСК в клинической практике должны быть стандартизированы процедуры их получения и обнаружения. Кроме того, важным моментом является определение оптимальной дозировки, временных рамок и режима введения везикул для эффективного использования.

## ДОПОЛНИТЕЛЬНАЯ ИНФОРМАЦИЯ

**Источник финансирования.** Исследование выполнено за счёт гранта Российского научного фонда и Академии наук Республики Татарстан по проекту № 23-25-10046.

**Конфликт интересов.** Авторы декларируют отсутствие явных и потенциальных конфликтов интересов, связанных с публикацией настоящей статьи.

**Вклад авторов.** С.К. Клетухина — обзор литературы, сбор и анализ литературных источников, проведение научных исследований, написание текста и редактирование статьи; М.О. Гомзикова — сбор и анализ литературных источников, написание и финальное редактирование статьи. Все авторы подтверждают соответствие своего авторства международным критериям ICMJE (все авторы внесли существенный вклад в разработку концепции, проведение исследования и подготовку статьи, прочли и одобрили финальную версию перед публикацией).

**Благодарность.** Работа выполнена при поддержке Программы стратегического академического лидерства Казанского федерального университета (Приоритет 2030).

## ADDITIONAL INFORMATION

**Funding source.** This work was supported by the Russian Science Foundation and the Cabinet of Ministers of the Republic of Tatarstan within the framework of scientific project N. 23-25-10046

**Competing interests.** The authors declare that they have no competing interests.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Akers J.C., Gonda D., Kim R., et al. Biogenesis of extracellular vesicles (EV): exosomes, microvesicles, retrovirus-like vesicles, and apoptotic bodies // *J Neurooncol.* 2013. Vol. 113, N. 1. P. 1–11. doi: 10.1007/s11060-013-1084-8
2. Akyurekli C., Le Y., Richardson R.B., et al. A systematic review of preclinical studies on the therapeutic potential of mesenchymal stromal cell-derived microvesicles // *Stem Cell Rev Rep.* 2015. Vol. 11, N. 1. P. 150–160. doi: 10.1007/s12015-014-9545-9
3. Teng X., Chen L., Chen W., et al. Mesenchymal stem cell-derived exosomes improve the microenvironment of infarcted myocardium contributing to angiogenesis and anti-inflammation // *Cell Physiol Biochem.* 2015. Vol. 37, N. 6. P. 2415–2424. doi: 10.1159/000438594
4. Zhang Y., Chopp M., Meng Y., et al. Effect of exosomes derived from multipotent mesenchymal stromal cells on functional recovery and neurovascular plasticity in rats after traumatic brain injury // 2015. Vol. 122, N. 4. P. 856–867. doi: 10.3171/2014.11.JNS14770
5. Zhang Y., Xu J., Liu S., et al. Embryonic stem cell-derived extracellular vesicles enhance the therapeutic effect of mesenchymal stem cells // *Theranostics.* 2019. Vol. 9, N. 23. P. 6976–6990. doi: 10.7150/thno.35305
6. Wang N., Chen C., Yang D., et al. Mesenchymal stem cells-derived extracellular vesicles, via miR-210, improve infarcted cardiac function by promotion of angiogenesis // *Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis.* 2017. Vol. 1863, N. 8. P. 2085–2092. doi: 10.1016/j.bbdis.2017.02.023
7. Di Trapani M., Bassi G., Midolo M., et al. Differential and transferable modulatory effects of mesenchymal stromal cell-derived extracellular vesicles on T, B and NK cell functions // *Sci Rep.* 2016. Vol. 6. P. 24120. doi: 10.1038/srep24120
8. Seo Y., Kim H.S., Hong I.S. Stem cell-derived extracellular vesicles as immunomodulatory therapeutics // *Stem Cells Int.* 2019. Vol. 2019. P. 5126156. doi: 10.1155/2019/5126156
9. Syromiatnikova V., Prokopeva A., Gomzikova M. Methods of the large-scale production of extracellular vesicles // *Int J Mol Sci.* 2022. Vol. 23, N. 18. P. 10522. doi: 10.3390/ijms231810522
10. Pick H., Schmid E.L., Tairi A.P., et al. Investigating cellular signaling reactions in single attoliter vesicles // *J Am Chem Soc.* 2005. Vol. 127, N. 9. P. 2908–2912. doi: 10.1021/ja044605x
11. Fox J.E., Austin C.D., Boyles J.K., Steffen P.K. Role of the membrane skeleton in preventing the shedding of procoagulant-rich microvesicles from the platelet plasma membrane // *J Cell Biol.* 1990. Vol. 111, N. 2. P. 483–493. doi: 10.1083/jcb.111.2.483
12. Choi D.S., Yang J.S., Choi E.J., et al. The protein interaction network of extracellular vesicles derived from human colorectal cancer cells // *J Proteome Res.* 2012. Vol. 11, N. 2. P. 1144–1151. doi: 10.1021/pr200842h
13. Atanassoff A.P., Wolfmeier H., Schoenauer R., et al. Microvesicle shedding and lysosomal repair fulfill divergent cellular needs during the repair of streptolysin O-induced plasmalemmal damage // *PLoS One.* 2014. Vol. 9, N. 2. P. e89743. doi: 10.1371/journal.pone.0089743
14. EL Andaloussi S., Mäger I., Breakefield X.O., Wood M.J. Extracellular vesicles: biology and emerging therapeutic opportunities // *Nat Rev Drug Discov.* 2013. Vol. 12, N. 5. P. 347–357. doi: 10.1038/nrd3978
15. Gomzikova M., Kletukhina S., Kurbangaleeva S., Rizvanov A. Evaluation of cytochalasin B-induced membrane vesicles fusion specificity with target cells // *Biomed Res Int.* 2018. Vol. 2018. P. 7053623. doi: 10.1155/2018/7053623
16. Gomzikova M.O., Zhuravleva M.N., Vorobev V.V., et al. Angiogenic activity of cytochalasin b-induced membrane vesicles of human mesenchymal stem cells // *Cells.* 2019. Vol. 9, N. 1. P. 95. doi: 10.3390/cells9010095
17. Kurbangaleeva S.V., Syromiatnikova V.Y., Prokopeva A.E., et al. Increased yield of extracellular vesicles after cytochalasin b treatment and vortexing // *Curr Issues Mol Biol.* 2023. Vol. 45, N. 3. P. 2431–2443. doi: 10.3390/cimb45030158
18. Ciccarone V., Spengler B.A., Meyers M.B., et al. Phenotypic diversification in human neuroblastoma cells: expression of distinct neural crest lineages // *Cancer Res.* 1989. Vol. 49, N. 1. P. 219–225.
19. Horwitz K.B., Costlow M.E., McGuire W.L. MCF-7; a human breast cancer cell line with estrogen, androgen, progesterone, and glucocorticoid receptors // *Steroids.* 1975. Vol. 26, N. 6. P. 785–795. doi: 10.1016/0039-128x(75)90110-5
20. Anait S., Jordan V.C. MCF-7: the first hormone-responsive breast cancer cell line // *Cancer Res.* 1997. Vol. 57, N. 15. P. 3071–3078.
21. Zhang K., Waxman D.J. PC3 prostate tumor-initiating cells with molecular profile FAM65Bhigh/MFI2low/LEF1low increase tumor angiogenesis // *Mol Cancer.* 2010. Vol. 9. P. 319. doi: 10.1186/1476-4598-9-319
22. Grivennikov S., Karin M. Autocrine IL-6 signaling: a key event in tumorigenesis? // *Cancer Cell.* 2008. Vol. 13, N. 1. P. 7–9. doi: 10.1016/j.ccr.2007.12.020
23. Lin R., Wang S., Zhao R.C. Exosomes from human adipose-derived mesenchymal stem cells promote migration through WNT

- signaling pathway in a breast cancer cell model // *Mol Cell Biochem*. 2013. Vol. 383, N. 1-2. P. 13–20. doi: 10.1007/s11010-013-1746-z
- 24.** Vallabhaneni K.C., Penforinis P., Dhule S., et al. Extracellular vesicles from bone marrow mesenchymal stem/stromal cells transport tumor regulatory microRNA, proteins, and metabolites // *Oncotarget*. 2015. Vol. 6, N. 7. P. 4953–4967. doi: 10.18632/oncotarget.3211
- 25.** Zhu W., Huang L., Li Y., et al. Exosomes derived from human bone marrow mesenchymal stem cells promote tumor growth in vivo // *Cancer Lett*. 2012. Vol. 315, N. 1. P. 28–37. doi: 10.1016/j.canlet.2011.10.002
- 26.** Du T., Ju G., Wu S., et al. Microvesicles derived from human wharton's jelly mesenchymal stem cells promote human renal cancer cell growth and aggressiveness through induction of hepatocyte growth factor // *PLoS One*. 2014. Vol. 9, N. 5. P. e96836. doi: 10.1371/journal.pone.0096836
- 27.** Bromberg J., Wang T.C. Inflammation and cancer: IL-6 and STAT3 complete the link // *Cancer Cell*. 2009. Vol. 15, N. 2. P. 79–80. doi: 10.1016/j.ccr.2009.01.009
- 28.** Kumari N., Dwarakanath B.S., Das A., Bhatt A.N. Role of interleukin-6 in cancer progression and therapeutic resistance // *Tumour Biol*. 2016. Vol. 37, N. 9. P. 11553–11572. doi: 10.1007/s13277-016-5098-7
- 29.** Ghandadi M., Sahebkar A. Interleukin-6: a critical cytokine in cancer multidrug resistance // *Curr Pharm Des*. 2016. Vol. 22, N. 5. P. 518–526. doi: 10.2174/1381612822666151124234417
- 30.** Valdembri D., Serini G., Vacca A., Ribatti D., et al. In vivo activation of JAK2/STAT-3 pathway during angiogenesis induced by GM-CSF // *FASEB J*. 2002. Vol. 16, N. 2. P. 225–227. doi: 10.1096/fj.01-0633fje
- 31.** Zgheib A., Lamy S., Annabi B. Epigallocatechin gallate targeting of membrane type 1 matrix metalloproteinase-mediated Src and Janus kinase/signal transducers and activators of transcription 3 signaling inhibits transcription of colony-stimulating factors 2 and 3 in mesenchymal stromal cells // *J Biol Chem*. 2013. Vol. 288, N. 19. P. 13378–13386. doi: 10.1074/jbc.M113.456533
- 32.** Adeegbe D.O., Nishikawa H. Natural and induced T regulatory cells in cancer // *Front Immunol*. 2013. Vol. 4. P. 190. doi: 10.3389/fimmu.2013.00190
- 33.** Hori S., Miyake M., Onishi S., et al. Evaluation of pro- and anti-tumor effects induced by three colony-stimulating factors, G-CSF, GM-CSF and M-CSF, in bladder cancer cells: Is G-CSF a friend of bladder cancer cells // *Int J Oncol*. 2019. Vol. 54, N. 6. P. 2237–2249. doi: 10.3892/ijo.2019.4772
- 34.** Espinoza-Sánchez N.A., Vadillo E., Baladrán J.C., et al. Evidence of lateral transmission of aggressive features between different types of breast cancer cells // *Int J Oncol*. 2017. Vol. 51, N. 5. P. 1482–1496. doi: 10.3892/ijo.2017.4128
- 35.** Lazarus H., Rowe J.M. Clinical use of hematopoietic growth factors in allogeneic bone marrow transplantation // *Blood Rev*. 1994. Vol. 8, N. 3. P. 169–178. doi: 10.1016/0268-960x(94)90078-V
- 36.** Van Pelt L.J., De Craen A.J., Langeveld N.E., Weening R.S. Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF) ameliorates chemotherapy-induced neutropenia in children with solid tumors // *Pediatr Hematol Oncol*. 1997. Vol. 14, N. 6. P. 539–545. doi: 10.3109/08880019709030910
- 37.** Mehta H.M., Malandra M., Corey S.J. G-CSF and GM-CSF in neutropenia // *J Immunol*. 2015. Vol. 195, N. 4. P. 1341–1349. doi: 10.4049/jimmunol.1500861
- 38.** Feleszko W., Giermasz A., Gołab J., et al. Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor accelerates growth of Lewis lung carcinoma in mice // *Cancer Lett*. 1996. Vol. 101, N. 2. P. 193–197. doi: 10.1016/0304-3835(96)04134-1
- 39.** Obermueller E., Vosseler S., Fusenig N.E., Mueller M.M. Cooperative autocrine and paracrine functions of granulocyte colony-stimulating factor and granulocyte-macrophage colony-stimulating factor in the progression of skin carcinoma cells // *Cancer Res*. 2004. Vol. 64, N. 21. P. 7801–7812. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-03-3301
- 40.** Gutschalk C.M., Herold-Mende C.C., Fusenig N.E., Mueller M.M. Granulocyte colony-stimulating factor and granulocyte-macrophage colony-stimulating factor promote malignant growth of cells from head and neck squamous cell carcinomas in vivo // *Cancer Res*. 2006. Vol. 66, N. 16. P. 8026–8036. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-06-0158
- 41.** Gutschalk C.M., Yanamandra A.K., Linde N., et al. GM-CSF enhances tumor invasion by elevated MMP-2, -9, and -26 expression // *Cancer Med*. 2013. Vol. 2, N. 2. P. 117–129. doi: 10.1002/cam4.20
- 42.** Qiu L., Lai R., Lin Q., et al. Autocrine release of interleukin-9 promotes Jak3-dependent survival of ALK+ anaplastic large-cell lymphoma cells // *Blood*. 2006. Vol. 108, N. 7. P. 2407–2415. doi: 10.1182/blood-2006-04-020305
- 43.** Allegra A., Musolino C., Tonacci A., et al. Clinico-biological implications of modified levels of cytokines in chronic lymphocytic leukemia: a possible therapeutic role // *Cancers (Basel)*. 2020. Vol. 12, N. 2. P. 524. doi: 10.3390/cancers12020524
- 44.** Teng K.Y., Han J., Zhang X., et al. Blocking the CCL2–CCR2 axis using CCL2-neutralizing antibody is an effective therapy for hepatocellular cancer in a mouse model // *Molecular Cancer Therapeutics*. 2017. Vol. 16, N. 2. P. 312–322. doi: 10.1158/1535-7163.MCT-16-0124
- 45.** Fridlender Z.G., Kapoor V., Buchlis G., et al. Monocyte chemoattractant protein-1 blockade inhibits lung cancer tumor growth by altering macrophage phenotype and activating CD8+ cells // *Am J Respir Cell Mol Biol*. 2011. Vol. 44, N. 2. P. 230–237. doi: 10.1165/rcmb.2010-00800C
- 46.** Loberg R.D., Ying C., Craig M., et al. CCL2 as an important mediator of prostate cancer growth in vivo through the regulation of macrophage infiltration // *Neoplasia*. 2007. Vol. 9, N. 7. P. 556–562. doi: 10.1593/neo.07307
- 47.** Qian B.Z., Li J., Zhang H., et al. CCL2 recruits inflammatory monocytes to facilitate breast-tumour metastasis // *Nature*. 2011. Vol. 475, N. 7355. P. 222–225. doi: 10.1038/nature10138
- 48.** Sun C., Li X., Guo E., et al. MCP-1/CCR-2 axis in adipocytes and cancer cell respectively facilitates ovarian cancer peritoneal metastasis // *Oncogene*. 2020. Vol. 39, N. 8. P. 1681–1695. doi: 10.1038/s41388-019-1090-1
- 49.** Ueno T., Toi M., Saji H., et al. Significance of macrophage chemoattractant protein-1 in macrophage recruitment, angiogenesis, and survival in human breast cancer // *Clin Cancer Res*. 2000. Vol. 6, N. 8. P. 3282–3289.
- 50.** Kuziel G., Thompson V., D'Amato J.V., Arendt L.M. Stromal CCL2 signaling promotes mammary tumor fibrosis through recruitment of myeloid-lineage cells // *Cancers (Basel)*. 2020. Vol. 12, N. 8. P. 2083. doi: 10.3390/cancers12082083
- 51.** Cho H.R., Kumari N., Thi Vu H., et al. Increased antiangiogenic effect by blocking CCL2-dependent macrophages in a rodent glioblastoma model: correlation study with dynamic susceptibility contrast perfusion MRI // *Sci Rep*. 2019. Vol. 9, N. 1. P. 11085. doi: 10.1038/s41598-019-47438-4

## REFERENCES

1. Akers JC, Gonda D, Kim R, et al. Biogenesis of extracellular vesicles (EV): exosomes, microvesicles, retrovirus-like vesicles, and apoptotic bodies. *J Neurooncol.* 2013;113(1):1–11. doi: 10.1007/s11060-013-1084-8
2. Akyurekli C, Le Y, Richardson RB, et al. A systematic review of preclinical studies on the therapeutic potential of mesenchymal stromal cell-derived microvesicles. *Stem Cell Rev and Rep.* 2015;11(1):150–160. doi: 10.1007/s12015-014-9545-9
3. Teng X, Chen L, Chen W, et al. Mesenchymal stem cell-derived exosomes improve the microenvironment of infarcted myocardium contributing to angiogenesis and anti-inflammation. *Cell Physiol Biochem.* 2015;37(6):2415–2424. doi: 10.1159/000438594
4. Zhang Y, Chopp M, Meng Y, et al. Effect of exosomes derived from multipotential mesenchymal stromal cells on functional recovery and neurovascular plasticity in rats after traumatic brain injury. *J Neurosurg.* 2015;122(4):856–867. doi: 10.3171/2014.11.JNS14770
5. Zhang Y, Xu J, Liu S, et al. Embryonic stem cell-derived extracellular vesicles enhance the therapeutic effect of mesenchymal stem cells. *Theranostics.* 2019;9(23):6976–6990. doi: 10.7150/thno.35305
6. Wang N, Chen C, Yang D, et al. Mesenchymal stem cells-derived extracellular vesicles, via miR-210, improve infarcted cardiac function by promotion of angiogenesis. *Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis.* 2017;1863(8):2085–2092. doi: 10.1016/j.bbdis.2017.02.023
7. Di Trapani M, Bassi G, Midolo M, et al. Differential and transferable modulatory effects of mesenchymal stromal cell-derived extracellular vesicles on T, B and NK cell functions. *Sci Rep.* 2016;6:24120. doi: 10.1038/srep24120
8. Seo Y, Kim HS, Hong IS. Stem cell-derived extracellular vesicles as immunomodulatory therapeutics. *Stem Cells Int.* 2019;2019:5126156. doi: 10.1155/2019/5126156
9. Syromiatnikova V, Prokopeva A, Gomzikova M. Methods of the large-scale production of extracellular vesicles. *Int J Mol Sci.* 2022;23(18):10522. doi: 10.3390/ijms231810522
10. Pick H, Schmid EL, Tairi AP, et al. Investigating cellular signaling reactions in single attoliter vesicles. *J Am Chem Soc.* 2005;127(9):2908–2912. doi: 10.1021/ja044605x
11. Fox JE, Austin CD, Boyles JK, Steffen PK. Role of the membrane skeleton in preventing the shedding of procoagulant-rich microvesicles from the platelet plasma membrane. *J Cell Biol.* 1990;111(2):483–493. doi: 10.1083/jcb.111.2.483
12. Choi DS, Yang JS, Choi EJ, et al. The protein interaction network of extracellular vesicles derived from human colorectal cancer cells. *J Proteome Res.* 2012;11(2):1144–1151. doi: 10.1021/pr200842h
13. Atanassoff AP, Wolfmeier H, Schoenauer R, et al. Microvesicle shedding and lysosomal repair fulfill divergent cellular needs during the repair of streptolysin O-induced plasmalemmal damage. *PLoS One.* 2014;9(2):e89743. doi: 10.1371/journal.pone.0089743
14. EL Andaloussi S, Mäger I, Breakefield XO, Wood MJA. Extracellular vesicles: biology and emerging therapeutic opportunities. *Nat Rev Drug Discov.* 2013;12(5):347–357. doi: 10.1038/nrd3978
15. Gomzikova M, Kletukhina S, Kurbangaleeva S, Rizvanov A. Evaluation of cytochalasin b-induced membrane vesicles fusion specificity with target cells. *Biomed Res Int.* 2018;2018:7053623. doi: 10.1155/2018/7053623
16. Gomzikova MO, Zhuravleva MN, Vorobev VV, et al. Angiogenic activity of cytochalasin b-induced membrane vesicles of human mesenchymal stem cells. *Cells.* 2019;9(1):95. doi: 10.3390/cells9010095
17. Kurbangaleeva SV, Syromiatnikova VY, Prokopeva AE, et al. Increased yield of extracellular vesicles after cytochalasin b treatment and vortexing. *Curr Issues Mol Biol.* 2023;45(3):2431–2443. doi: 10.3390/cimb45030158
18. Ciccarone V, Spengler BA, Meyers MB, et al. Phenotypic diversification in human neuroblastoma cells: expression of distinct neural crest lineages. *Cancer Res.* 1989;49(1):219–225.
19. Horwitz KB, Costlow ME, McGuire WL. MCF-7: a human breast cancer cell line with estrogen, progesterone, and glucocorticoid receptors. *Steroids.* 1975;26(6):785–795. doi: 10.1016/0039-128x(75)90110-5
20. Anait S, Jordan VC. MCF-7: the first hormone-responsive breast cancer cell line. *Canc Res.* 1997;57(15):3071–3078.
21. Zhang K, Waxman DJ. PC3 prostate tumor-initiating cells with molecular profile FAM65Bhigh/MFI2low/LEF1low increase tumor angiogenesis. *Mol Cancer.* 2010;29:319. doi: 10.1186/1476-4598-9-319
22. Grivennikov S, Karin M. Autocrine IL-6 signaling: A key event in tumorigenesis? *Cancer Cell.* 2008;13(1):7–9. doi: 10.1016/j.ccr.2007.12.020
23. Lin R, Wang S, Zhao RC. Exosomes from human adipose-derived mesenchymal stem cells promote migration through Wnt signaling pathway in a breast cancer cell model. *Mol Cell Biochem.* 2013;383(1-2):13–20. doi: 10.1007/s11010-013-1746-z
24. Vallabhaneni KC, Penforis P, Dhule S, et al. Extracellular vesicles from bone marrow mesenchymal stem/stromal cells transport tumor regulatory microRNA, proteins, and metabolites. *Oncotarget.* 2015;6(7):4953–4967. doi: 10.18632/oncotarget.3211
25. Zhu W, Huang L, Li Y, et al. Exosomes derived from human bone marrow mesenchymal stem cells promote tumor growth in vivo. *Cancer Lett.* 2012;315(1):28–37. doi: 10.1016/j.canlet.2011.10.002
26. Du T, Ju G, Wu S, et al. Microvesicles derived from human wharton's jelly mesenchymal stem cells promote human renal cancer cell growth and aggressiveness through induction of hepatocyte growth factor. *PLoS One.* 2014;9(5):e96836. doi: 10.1371/journal.pone.0096836
27. Bromberg J, Wang TC. Inflammation and cancer: IL-6 and STAT3 complete the link. *Cancer Cell.* 2009;15(2):79–80. doi: 10.1016/j.ccr.2009.01.009
28. Kumari N, Dwarakanath BS, Das A, Bhatt AN. Role of interleukin-6 in cancer progression and therapeutic resistance. *Tumour Biol.* 2016;37(9):11553–11572. doi: 10.1007/s13277-016-5098-7
29. Ghandadi M, Sahebkar A. Interleukin-6: a critical cytokine in cancer multidrug resistance. *Curr Pharm Des.* 2016;22(5):518–526. doi: 10.2174/1381612822666151124234417
30. Valdembri D, Serini G, Vacca A, et al. In vivo activation of JAK2/STAT-3 pathway during angiogenesis induced by GM-CSF. *FASEB J.* 2002;16(2):225–227. doi: 10.1096/fj.01-0633fj
31. Zgheib A, Lamy S, Annabi B. Epigallocatechin gallate targeting of membrane type 1 matrix metalloproteinase-mediated Src and janus kinase/signal transducers and activators of transcription 3 signaling inhibits transcription of colony-stimulating factors 2 and 3 in

- mesenchymal stromal cells. *J Biol Chem.* 2013;288(19):13378–13386. doi: 10.1074/jbc.M113.456533
32. Adeegbe DO, Nishikawa H. Natural and induced T regulatory cells in cancer. *Front Immunol.* 2013;4:190. doi: 10.3389/fimmu.2013.00190
33. Hori S, Miyake M, Onishi S, et al. Evaluation of pro- and anti-tumor effects induced by three colony-stimulating factors, G-CSF, GM-CSF and M-CSF, in bladder cancer cells: Is G-CSF a friend of bladder cancer cells? *Int J Oncol.* 2019;54(6):2237–2249. doi: 10.3892/ijo.2019.4772
34. Espinoza-Sánchez NA, Vadillo E, Baladrán JC, et al. Evidence of lateral transmission of aggressive features between different types of breast cancer cells. *Int J Oncol.* 2017;51(5):1482–1496. doi: 10.3892/ijo.2017.4128
35. Lazarus H, Rowe JM. Clinical use of hematopoietic growth factors in allogeneic bone marrow transplantation. *Blood Reviews.* 1994;8(3):169–178. doi: 10.1016/0268-960x(94)90078-v
36. Van Pelt LJ, De Craen AJM, Langeveld NE, Weening RS. Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF) ameliorates chemotherapy-induced neutropenia in children with solid tumors. *Pediatr Hematol Oncol.* 1997;14(6):539–545. doi: 10.3109/08880019709030910
37. Mehta HM, Malandra M, Corey SJ. G-CSF and GM-CSF in neutropenia. *J Immunol.* 2015;195(4):1341–1349. doi: 10.4049/jimmunol.1500861
38. Feleszko W, Giermasz A, Gołatb J, et al. Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor accelerates growth of Lewis lung carcinoma in mice. *Cancer Lett.* 1996;101(2):193–197. doi: 10.1016/0304-3835(96)04134-1
39. Obermueller E, Vosseler S, Fusenig NE, Mueller MM. Cooperative autocrine and paracrine functions of granulocyte colony-stimulating factor and granulocyte-macrophage colony-stimulating factor in the progression of skin carcinoma cells. *Cancer Res.* 2004;64(21):7801–7812. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-03-3301
40. Gutschalk CM, Herold-Mende CC, Fusenig NE, Mueller MM. Granulocyte colony-stimulating factor and granulocyte-macrophage colony-stimulating factor promote malignant growth of cells from head and neck squamous cell carcinomas in vivo. *Cancer Res.* 2006;66(16):8026–8036. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-06-0158
41. Gutschalk CM, Yanamandra AK, Linde N, et al. GM-CSF enhances tumor invasion by elevated MMP-2, -9, and -26 expression. *Cancer Med.* 2013;2(2):117–129. doi: 10.1002/cam4.20
42. Qiu L, Lai R, Lin Q, et al. Autocrine release of interleukin-9 promotes Jak3-dependent survival of ALK+ anaplastic large-cell lymphoma cells. *Blood.* 2006;108(7):2407–2415. doi: 10.1182/blood-2006-04-020305
43. Allegra A, Musolino C, Tonacci A, et al. Clinico-biological implications of modified levels of cytokines in chronic lymphocytic leukemia: a possible therapeutic role. *Cancers (Basel).* 2020;12(2):524. doi: 10.3390/cancers12020524
44. Teng KY, Han J, Zhang X, et al. Blocking the CCL2–CCR2 axis using CCL2-neutralizing antibody is an effective therapy for hepatocellular cancer in a mouse model. *Molecular Cancer Therapeutics.* 2017;16(2):312–322. doi: 10.1158/1535-7163.MCT-16-0124
45. Fridlender ZG, Kapoor V, Buchlis G, et al. Monocyte chemoattractant protein-1 blockade inhibits lung cancer tumor growth by altering macrophage phenotype and activating CD8+ cells. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 2011;44(2):230–237. doi: 10.1165/rcmb.2010-00800C
46. Loberg RD, Ying C, Craig M, et al. CCL2 as an important mediator of prostate cancer growth in vivo through the regulation of macrophage infiltration. *Neoplasia.* 2007;9(7):556–562. doi: 10.1593/neo.07307
47. Qian BZ, Li J, Zhang H, et al. CCL2 recruits inflammatory monocytes to facilitate breast-tumour metastasis. *Nature.* 2011;475(7355):222–225. doi: 10.1038/nature10138
48. Sun C, Li X, Guo E, et al. MCP-1/CCR-2 axis in adipocytes and cancer cell respectively facilitates ovarian cancer peritoneal metastasis. *Oncogene.* 2020;39(8):1681–1695. doi: 10.1038/s41388-019-1090-1
49. Ueno T, Toi M, Saji H, et al. Significance of macrophage chemoattractant protein-1 in macrophage recruitment, angiogenesis, and survival in human breast cancer. *Clin Cancer Res.* 2000;6(8):3282–3289.
50. Kuziel G, Thompson V, D'Amato JV, Arendt LM. Stromal CCL2 signaling promotes mammary tumor fibrosis through recruitment of myeloid-lineage cells. *Cancers (Basel).* 2020;12(8):2083. doi: 10.3390/cancers12082083
51. Cho HR, Kumari N, Thi Vu H, et al. Increased antiangiogenic effect by blocking CCL2-dependent macrophages in a rodent glioblastoma model: correlation study with dynamic susceptibility contrast perfusion MRI. *Sci Rep.* 2019;9(1):11085. doi: 10.1038/s41598-019-47438-4

## ОБ АВТОРАХ

\* **Гомзикова Марина Олеговна**, канд. биол. наук;  
адрес: Россия, 420008, Казань, ул. Кремлевская, д. 18;  
ORCID: 0000-0002-0826-7370;  
eLibrary SPIN: 1084-3707;  
e-mail: MOGomzikova@kpfu.ru

**Клетухина Севиндж Камаловна**;  
ORCID: 0000-0003-1315-4204;  
eLibrary SPIN: 6028-8878;  
e-mail: sevindzh.rasulova.1993@mail.ru

\* Автор, ответственный за переписку / Corresponding author

## AUTHORS' INFO

\* **Marina O. Gomzikova**, Cand. Sci. (Biology);  
address: 18 Kremlevskaya street, 420008 Kazan, Russia;  
ORCID: 0000-0002-0826-7370;  
eLibrary SPIN: 1084-3707;  
e-mail: MOGomzikova@kpfu.ru

**Sevindh K. Kletukhina**;  
ORCID: 0000-0003-1315-4204;  
eLibrary SPIN: 6028-8878;  
e-mail: sevindzh.rasulova.1993@mail.ru