

DOI: 10.24287/1726-1708-2021-20-1-207-217

Анализ тромбоцитарной РНК: неинвазивный метод изучения экспрессии опухолевых генов

И.П. Тесаков¹, А.А. Мартыанов^{2,3}, А.Е. Друй², А.Н. Свешникова^{2,3}¹ФГБОУ ВО «Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова», Москва²ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр детской гематологии, онкологии и иммунологии им. Дмитрия Рогачева» Минздрава России, Москва³ФГБУН «Центр теоретических проблем физико-химической фармакологии» РАН, Москва

В настоящее время много внимания уделяется неинвазивным методам диагностики и мониторинга онкологических заболеваний. Одним из перспективных методов является секвенирование РНК тромбоцитов, «обученных» опухоли (tumor-educated platelets), в которых, как было ранее установлено, изменяется мРНК-репертуар при различных онкологических заболеваниях. Таким образом, тромбоциты могут содержать информацию о молекулярно-генетических характеристиках опухоли. В настоящем обзоре собраны современные представления о механизмах взаимодействия между опухолевыми клетками и тромбоцитами, а также рассмотрены возможности применения методов анализа транскриптома тромбоцитов для диагностики и оценки динамики состояния опухоли, в частности ответа на проводимую терапию, а также существующие на сегодняшний день ограничения для широкого внедрения этого метода в клиническую практику.

Ключевые слова: транскриптом тромбоцита, транскриптом опухоли, секвенирование РНК, жидкостные биопсии

Тесаков И.П. и соавт. Вопросы гематологии/онкологии и иммунопатологии в педиатрии. 2021; 20 (1): 207–217. DOI: 10.24287/1726-1708-2021-20-1-207-217

Analysis of platelet RNA: a non-invasive method for studying the expression of tumor genes

I.P. Tesakov¹, A.A. Martyanov^{2,3}, A.E. Druy², A.N. Sveshnikova^{2,3}¹Lomonosov Moscow State University, Moscow²Dmitry Rogachev National Medical Research Center of Pediatric Hematology, Oncology and Immunology, Ministry of Healthcare of the Russian Federation, Moscow³Center for Theoretical Problems of Physicochemical Pharmacology, RAS, Moscow

Nowadays much attention is paid to non-invasive methods of cancer diagnostics and monitoring. One of the promising methods is the sequencing of platelet RNA (tumor-educated platelets), in which, as it was previously established, the mRNA repertoire changes in various oncological diseases. Thus, platelets can contain information about the molecular genetic characteristics of tumor. This review summarizes the current understanding of the mechanisms of interaction between tumor cells and platelets, and also discusses the possibilities of using platelet transcriptome analysis methods for diagnosing and assessing the dynamics of the tumor state, in particular, in response to therapy, as well as the current limitations for a wide range of introduction of this method into clinical practice.

Key words: platelet transcriptome, tumor transcriptome, RNA sequencing, fluid biopsies

Tesakov I.P., et al. Pediatric Hematology/Oncology and Immunopathology. 2021; 20 (1): 207–217. DOI: 10.24287/1726-1708-2021-20-1-207-217

Онкологические заболевания на сегодняшний день являются ведущей причиной смертности в мире. «Золотым стандартом» молекулярно-генетического анализа солидных опухолей является изучение материала тканевых биопсий [1]. Однако эта инвазивная процедура сопряжена с рядом ограничений [2, 3], что сдерживает применение метода для мониторинга состояния опухоли [4]. В частности, существенным ограничением тканевой биопсии является возможность получить молекулярно-генетическую информацию лишь об ограниченном участке опухоли или метастаза, в то время как для ряда злокачественных новообразований, например для рака простаты [5], молочной железы [6] и др. [7], установлена генетическая неоднородность не только между

первичным очагом и метастазами, но и между клетками, ограниченными одной локализацией.

Обойти некоторые из ограничений тканевой биопсии могут так называемые жидкостные биопсии [8], когда из жидкостей организма проводится выделение различных опухолевых маркеров, таких как специфические белки, циркулирующие опухолевые клетки (ЦОК), циркулирующие нуклеиновые кислоты (цДНК и цРНК) и внеклеточные везикулы, вместе составляющие «циркулом» [9].

Одной из составляющих «циркулома» является РНК, содержащаяся в тромбоцитах крови [10]. Тромбоциты – безъядерные клеточные фрагменты, производящиеся в костном мозге из мегакариоцитов и живущие в кровотоке не более 7 дней [11]. Несмотря

© 2021 ФГБУ «НМИЦ ДГОИ им. Дмитрия Рогачева» Минздрава России

Поступила 25.01.2021

Принята к печати 26.02.2021

Контактная информация:

Анастасия Никитична Свешникова, заведующая лабораторией внутриклеточной сигнализации и системной биологии ФГБУН «Центр теоретических проблем физико-химической фармакологии» РАН
Адрес: 109029, Москва, ул. Средняя Калитниковская, 30
E-mail: a.sveshnikova@physics.msu.ru

© 2021 by «D. Rogachev NMRCPhO»

Received 25.01.2021

Accepted 26.02.2021

Correspondence:

Anastasia N. Sveshnikova, head of the Intracellular signalling and systems biology laboratory, Center for Theoretical Problems of Physicochemical Pharmacology, RAS
Address: 30 Srednyaya Kalitnikovskaya st., 109029 Moscow, Russia
E-mail: a.sveshnikova@physics.msu.ru

на отсутствие ядра, еще в 1966 г. Warshaw и соавт. впервые высказали предположение [12], а в 1967–1968 гг. Booyse и соавт. установили, что в тромбоцитах присутствует матричная (мРНК) и имеет место процесс трансляции [13, 14]. Через 20 лет было доказано участие мРНК в синтезе белков в тромбоцитах [15], а в 2005 г. Denis и соавт. показали, что в тромбоцитах присутствуют функциональные сплайсосомы, состоящие из малых ядерных РНК, белков сплайсинга и эндогенных пре-мРНК [16]. Сплайсосома может под воздействием различных стимулов запускать процесс сплайсинга пре-мРНК. Интересно, что в тромбоцитах присутствует более 8000 транскриптов, при этом как созревание пре-мРНК, так и трансляция зависят от активации тромбоцита [17].

Считается, что тромбоциты сохраняют цитоплазматическую пре-мРНК мегакариоцитов, при этом некоторые из мегакариоцитарных пре-мРНК превращаются в зрелые мРНК и участвуют в белковом синтезе [18]. Однако в белковый состав тромбоцита также могут входить «захваченные» из внешней среды белки, и белки, транскрипция которых происходит с мРНК, появившихся в цитоплазме тромбоцитов вследствие эндоцитоза [19]. Ранее было установлено [20, 21], что присутствующая в тромбоцитах РНК различается по своему составу у здоровых доноров и пациентов с онкологическими заболеваниями. Одновременно были сделаны предположения о том, что опухолевые клетки способны взаимодействовать с тромбоцитами посредством различных молекулярных механизмов [21]. Перенос секретируемых опухолью молекул, преимущественно РНК, в тромбоциты, приводящий к трансформации наивных тромбоцитов в проонкогенные, был назван «обучением» тромбоцитов [22]. Предположение о том, что «обученные» опухолью тромбоциты (tumor-educated platelets [22]) содержат опухолевую РНК [21], делает возможным рассмотрение анализа тромбоцитарной РНК в качестве нового минимально инвазивного, безболезненного и быстрого способа исследования, позволяющего получить интегративные данные о гетерогенных субпопуляциях опухолевых клеток в первичном очаге и в метастазах [23]. Однако недостаточная изученность механизмов взаимодействия тромбоцитов и клеток опухоли [24] и процессов попадания опухолевой РНК в тромбоциты [10] ставит под сомнение получаемую таким методом информацию [25]. В настоящем обзоре мы рассматриваем потенциальные достоинства и недостатки диагностики онкологических заболеваний на основе анализа тромбоцитарной РНК.

Механизмы взаимодействия тромбоцитов с опухолевыми клетками. Роль тромбоцитов в пролиферации и метастазировании опухолей

Известно, что функции тромбоцитов не сводятся к системе гемостаза [26]. Некоторые авторы называют

тромбоциты «дозорными» иммунной системы, так как они играют важную роль в обнаружении бактерий в циркулирующей крови, а также частично регулируют экстравазацию иммунных клеток в ответ на внешние и внутренние стимулы [10, 27, 28]. Также тромбоциты способны взаимодействовать с опухолевыми клетками [26, 29, 30]. Установлено, что тромбоциты играют важную роль в эпителиально-мезенхимальной трансформации опухолевых клеток [31], миграции их в кровеносные сосуды [32], создании окружения для опухолевых клеток [33] и защите их от клеток иммунной системы [34], что в конечном счете способствует метастазированию опухоли из первичного очага [35, 36].

Взаимодействие тромбоцитов с клетками опухоли обеспечивается посредством растворимых активаторов и мембранных белков

Одним из первых механизмов активации тромбоцитов является генерация клетками опухоли растворимых активаторов тромбоцитов – аденозиндифосфата (АДФ) и тромбоксана А₂ (ТХА₂), а в некоторых случаях и тромбина [37]. В частности, Boukerche и соавт. показали, что клетки линии меланомы M₃Da вызывают необратимую агрегацию тромбоцитов *in vitro* за счет присутствующего в среде (вероятно, секретируемого клетками) АДФ [38]. В этом же исследовании клетки меланомы M₁Do вызывали медленную обратимую агрегацию, а клетки M₄Be не вызывали агрегацию тромбоцитов вовсе. В супернатанте клеток M₁Do наблюдался меньший уровень АДФ, чем у M₃Da, а в супернатанте M₄Be АДФ не определялся вовсе [38]. В исследовании Hainmüller и соавт. [39], напротив, агрегация тромбоцитов в ответ на клетки разных линий рака ингибировалась гирудином (ингибитор тромбина), но не изменялась в ответ на апиразу (ингибитор АДФ). Дальнейшие эксперименты показали зависимость процесса агрегации тромбоцитов от генерации тромбина в системе [39].

В клетках колоректального рака [40], рака легкого [41], папиллярного рака щитовидной железы [42] и остеосаркомы [43] наблюдается высокая экспрессия гена тромбоксан-синтазы, синтезирующей активатор тромбоцитов ТХА₂ [44]. Установлено, что в клетках колоректального рака продукция ТХА₂ необходима для их пролиферации [40]. De Leval и соавт. показали, что фармакологическое ингибирование как тромбоксан-синтазы, так и рецепторов к тромбоксану полностью подавляет агрегацию тромбоцитов в присутствии клеток остеосаркомы линии MG-63 [43]. В исследовании *in vivo* было показано, что ингибирование синтеза ТХА₂ приводит к снижению метастазирования рака легкого [45].

Упомянутая выше генерация тромбина в присутствии опухолевых клеток [37] связана с экспрессией ими тканевого фактора (ТФ) – трансмембранного

гликопротеина, экспрессируемого в норме клетками практически всех тканей организма (за исключением эндотелия и клеток крови) [46]. Контакт ТФ, которым богаты некоторые опухоли, с плазмой крови приводит к образованию комплекса внешней теназы [47], генерации тромбина [48], агрегации тромбоцитов и в конечном итоге к тромбозам у онкологических больных [49]. Liu и соавт. установили на мышинной модели рака молочной железы, что повышение экспрессии ТФ опухолевыми клетками является критически важным для прогрессирования опухоли [50].

Агрегация тромбоцитов как в норме, так и при патологии происходит через специфические тромбоцитарные гликопротеины IIb/IIIa (GPIIb/IIIa, интегрин $\alpha_{IIb}\beta_3$), связывающиеся с белком плазмы – фибриногеном [51]. *In vitro* было показано, что блокирование интегрина $\alpha_{IIb}\beta_3$ снижает адгезию тромбоцитов к клеткам колоректального рака линий CT26 и HCT8 [52]. Эксперименты *in vivo* на мышинных моделях показали, что антитела против фактора фон Виллебранда (лиганд тромбоцитарного рецептора GPIIb и интегрина $\alpha_{IIb}\beta_3$) предотвращают развитие легочных метастазов на 53–64% и 45% случаев соответственно [52].

Другим адгезионным для тромбоцитов белком на поверхности опухоли является подопланин [53]. Обычно подопланин считается специфическим маркером лимфатических сосудов [54]. Известно, что для некоторых типов злокачественных опухолей (плоскоклеточные карциномы [55], саркомы [56], ряд опухолей головного мозга [57]) характерна высокая экспрессия подопланина на поверхности клеток. Подопланин способен напрямую связываться с лектин-подобным рецептором C-типа 2 (CLEC-2), который экспрессируется на поверхности миелоидных клеток, NK-клеток, а также тромбоцитов [58]. Связывание CLEC-2 с подопланином приводит к активации тромбоцитов, включающей секрецию АДФ и синтез TXA_2 [59, 60]. Такаги и соавт. установили, что взаимодействие между подопланином, экспрессируемым на поверхности клеток рака легкого, и CLEC-2 тромбоцитов обеспечивает пролиферацию опухолевых клеток *in vitro*, а также способствует метастазированию в мышинной модели [61]. Антитела к подопланину продемонстрировали эффективность в предотвращении развития метастазов рака легкого у мышей [61].

Способность тромбоцитов поглощать опухолевую мРНК в составе микровезикул

Внеклеточные везикулы – общий термин, используемый для обозначения трех типов везикул: микрочастиц, экзосом и апоптотических телец [37]. Микровезикулы представляют собой небольшие (диаметром от 50 до 1000 нм) мембранные пузырьки, которые отделяются от клеток под действием различных стимулов во время апоптоза или вследствие опухолевой трансформации [37]. Одной из

главных функций микровезикул является обеспечение межклеточной коммуникации [62]. Внеклеточные везикулы могут содержать различные биологические молекулы, включая все известные на сегодняшний день типы РНК, различные белки и липиды [62].

Nilsson и соавт. [21] описали прямой захват РНК тромбоцитами, коинкубированными с микровезикулами опухолевых клеток. Микровезикулы клеток глиобластомы и рака предстательной железы (клеточные линии U87/U87-EGFRvIII и 22Rv1 соответственно) были выделены с помощью дифференцированного центрифугирования по методике, описанной Skog и соавт. [63], мечены красителем PKH67 и коинкубированы с тромбоцитами, выделенными из крови здоровых доноров. После этого тромбоциты были обработаны РНКазой в целях деградации всей РНК, не захваченной тромбоцитами. Захват опухолевых микровезикул тромбоцитами был установлен с помощью конфокальной микроскопии. Результаты были подтверждены полимеразной цепной реакцией (ПЦР) с обратной транскрипцией: в тромбоцитах здоровых доноров после инкубации с микровезикулами клеток глиобластомы была обнаружена мРНК мутантного EGFRvIII (мутантный вариант гена мембранного рецептора эпидермального фактора роста (EGFR), который наблюдается при глиобластоме [64]) [21].

Тромбоциты способствуют эпителиально-мезенхимальному переходу и метастазированию опухолевых клеток

Эпителиально-мезенхимальный переход (ЭМП) – приобретение эпителиальными клетками опухоли мезенхимального фенотипа путем подавления экспрессии генов эпителиальных маркеров (например, E-кадгерин), увеличения экспрессии генов, ответственных за мезенхимальный фенотип (виментин, фибронектин), усиления клеточной подвижности за счет реорганизации цитоскелета [65]. Тромбоциты могут индуцировать ЭМП в опухолевых клетках путем высвобождения ряда медиаторов, таких как PDGF [31], трансформирующий фактор роста бета (TGF- β) [66], PGE_2 [67].

Ранее было установлено, что при активации тромбоциты способны секретировать TGF- β 1 [68]. Labelle и соавт. на мышинных моделях рака толстой кишки и молочной железы показали, что TGF- β 1, секретруемый тромбоцитами, способствует запуску в опухолевых клетках сигнальных путей TGF β /Smad и NF- κ B, что, в свою очередь, приводит к изменению их фенотипа и увеличению метастатического потенциала [31]. Cho и соавт. на культуре клеток рака яичника продемонстрировали, что пролиферация опухолевых клеток в присутствии тромбоцитов подавляется после инкубации последних с блокирующими антителами против TGF- β 1, а также после подавления экспрессии рецептора TGF- β 1 на опухолевых клетках [69].

Zhang и соавт. установили роль белка TBK1 (TANK-связывающей киназы 1) в качестве медиатора тромбоцит-индуцированного ЭМП [70]. Будучи киназой, способной фосфорилировать NF-κB, в здоровой ткани этот белок играет роль в регуляции клеточной пролиферации и апоптоза [71]. Установлено, что в опухолевых клетках TBK1 участвует в регуляции ангиогенеза [72], а также обеспечивает проведение антиапоптотических сигналов путем активации NF-κB [73]. Zhang и соавт. показали, что инкубация клеток рака молочной железы линий Ер5 и MCF10A с тромбоцитами приводит к запуску ЭМП в опухолевых клетках путем активации TBK1 и p56 (транскрипционного фактора семейства NF-κB). Инактивация TBK1 с помощью малой интерферирующей РНК в значительной степени тормозит тромбоцит-индуцированный ЭМП и активацию p56 в обеих клеточных линиях [70].

Radziwon-Balicka и соавт. с помощью метода маркировки стабильных изотопов аминокислотами (SILAC) показали, что во время инкубации тромбоцитов с клетками колоректального рака линий Сасо-2 и HT29 происходит секреция тромбоспондина-1 преимущественно тромбоцитами и кластерина – как тромбоцитами, так и опухолевыми клетками. Авторы установили, что тромбоспондин-1 и кластерин обеспечивают увеличение инвазивного потенциала опухолевых клеток за счет повышения активности MMP-9 через сигнальный путь p38 MAPK [74].

Dovizio и соавт. продемонстрировали, что инкубация тромбоцитов с клетками колоректального рака линии HT29 приводит к увеличению в последних уровня мРНК ЦОГ-2 и что для синтеза белка ЦОГ-2 в опухолевых клетках необходима секреция тромбоцитами PDGF. ЦОГ-2-зависимый синтез простагландина E2 в клетках HT29 приводит к изменениям, связанным с ЭМП: снижение экспрессии белка p21 и увеличение циклина B1. Кроме того, авторы показали, что к увеличению экспрессии ЦОГ-2 клетками HT29 приводит непосредственное взаимодействие галектина-3 (белка, содержащего коллаген-подобный домен и экспрессируемого на поверхности клеток HT29) и гликопротеина VI (тромбоцитарного рецептора к коллагену) [67]. Полученные результаты позволили сделать предположение о потенциальной эффективности ингибиторов галектина-3 в предотвращении метастазирования колоректального рака [67].

Тромбоциты обеспечивают защиту опухолевых клеток от иммунной системы и выживание их в кровотоке

Выживание ЦОК в кровотоке имеет решающее значение для метастазирования [75]. Установлено, что тромбоциты, окружая ЦОК, способны их защитить от иммунной системы [76–78]. Известно, что на поверхности многих опухолевых клеток снижена

экспрессия главного комплекса гистосовместимости (МНС) I класса [79], что позволяет им избежать уничтожения цитотоксичными Т-лимфоцитами [78]. Placke и соавт. установили *in vitro*, что при коинкубации тромбоцитов с клетками различных опухолей происходит перенос молекул МНС I класса на поверхность опухолевых клеток [34]. Этот перенос был также подтвержден с помощью электронной микроскопии [78]. Таким образом, было установлено, что благодаря взаимодействию с тромбоцитами опухолевые клетки способны приобретать «псевдонормальный» фенотип, экспрессировать на своей поверхности МНС I класса и тем самым «ускользнуть» от распознавания NK-клетками.

Кроме того, установлена роль секретируемого тромбоцитами TGF-β в ингибировании противоопухолевой активности NK-клеток [80]. Корр и соавт. продемонстрировали, что инкубация NK-клеток с TGF-β, секретируемым тромбоцитами как после взаимодействия с опухолевыми клетками линии HCT116 (колоректальный рак), так и после стимуляции тромбоцитов «классическими» активаторами (коллагеном и тромбином), способствует снижению цитотоксичности NK-клеток, уменьшению продукции интерферона-альфа и мобилизации гранул [80]. Полученные результаты подтверждают способность тромбоцитов способствовать метастазированию опухолевых клеток путем подавления иммунного ответа.

Таким образом, данные, полученные *in vitro* и *in vivo*, свидетельствуют о том, что взаимодействие тромбоцитов с опухолевыми клетками играет важную роль в развитии и прогрессировании онкологических заболеваний. На сегодняшний день описаны различные молекулярные механизмы, обеспечивающие эти взаимодействия (рисунки 1), однако часть из них только предстоит выяснить.

Опухолевая РНК: диагностическое значение и существующие ограничения

Ранее было установлено, что тромбоциты способны поглощать опухолевую РНК и что, по крайней мере, часть тромбоцитарной РНК имеет опухолевую природу [20, 21, 23, 81–83]. В контексте диагностики онкологических заболеваний основной особенностью опухолевой РНК является то, что ее репертуар отражает экспрессию генов в живых клетках опухоли и их функциональную активность [84]. О том, что внеклеточная РНК может быть обнаружена в кровотоке, впервые сообщили Stroun и соавт. в 1978 г. [85], а первое предположение о возможности использовать циркулирующую опухолевую РНК в качестве маркера злокачественных заболеваний было высказано несколько лет спустя Wiczorek и соавт. [86].

Рисунок 1

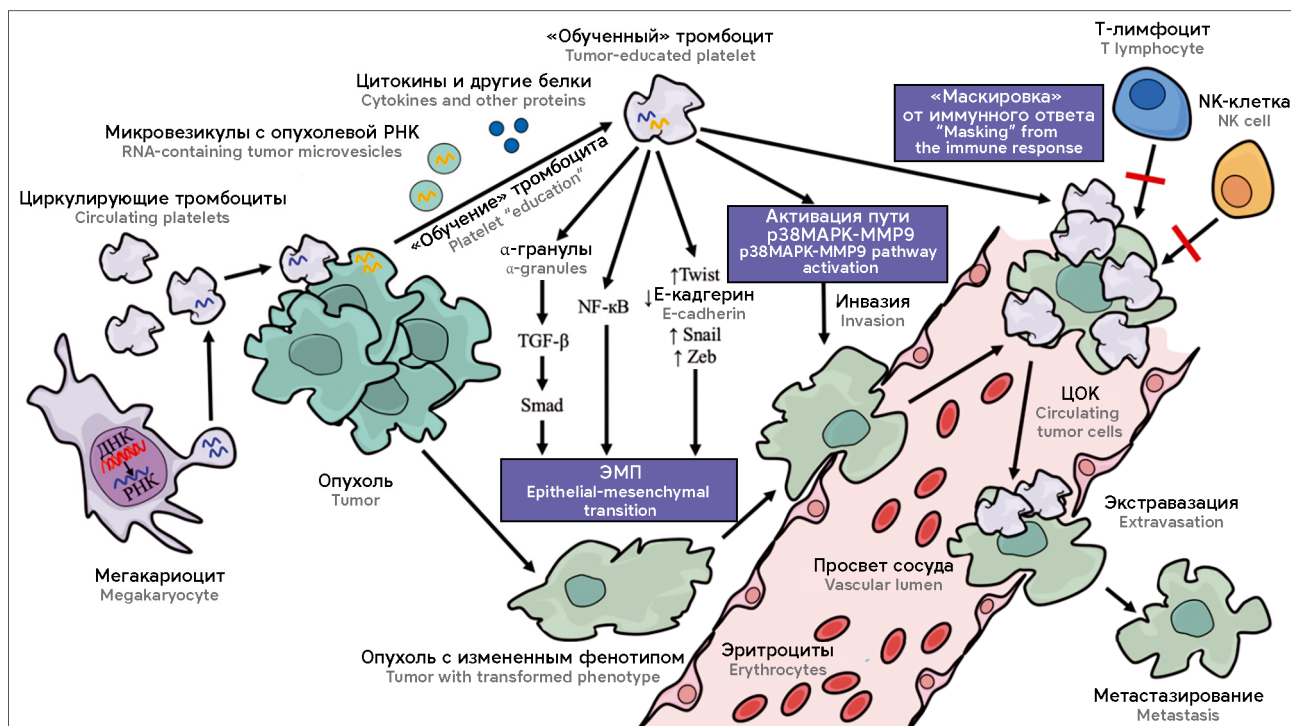
Роль тромбоцитов в пролиферации и метастазировании опухолей

Взаимодействие тромбоцитов с опухолевыми клетками обеспечивается с помощью различных механизмов. Поглощение тромбоцитами секретируемых опухолью молекул (в том числе РНК) приводит к их «обучению». «Обученные» тромбоциты способствуют ЭМП в опухолевых клетках и увеличению их инвазивного потенциала. После инвазии в кровеносный сосуд тромбоциты обеспечивают защиту ЦОК от элиминации клетками иммунной системы, обеспечивают их выживание в кровотоке и тем самым способствуют метастазированию

Figure 1

Role of platelets in tumor proliferation and metastasis

Interactions between platelets and cancer cells rely on various mechanisms. The absorption of tumor-secreted molecules (including RNA) by platelets leads to their "education". Tumor-educated platelets promote epithelial-mesenchymal transition in tumor cells and an increase in their invasiveness. After intravasation, platelets protect circulating tumor cells from being eliminated by immune cells, promote their survival in the bloodstream, and thus promote metastasis



На сегодняшний день в кровотоке обнаружены все известные классы РНК [87]. Наиболее важными классами циркулирующих опухолевых РНК являются мРНК, микроРНК и длинные некодирующие РНК (днкРНК) [8]. цРНК является сравнительно нестабильной молекулой: период ее полураспада в плазме крови составляет около 15 с [88]. Стабильность цРНК усиливается за счет ассоциации ее с белками плазмы [89], протеолипидными комплексами [86] и внеклеточными везикулами [90].

Установлено, что циркулирующая экзосомная (везикулярная) РНК может быть использована для определения мутационного статуса генов RAS-каскада *KRAS* и *BRAF* у пациентов с колоректальным раком [91], а выявление экзосомной мРНК EGFRvIII обладает потенциалом для диагностики EGFRvIII-позитивных глиобластом [92]. Также показано, что выявление в экзосомной РНК пациентов с раком предстательной железы одного из вариантов альтернативного сплайсинга андрогенных рецепторов AR-V7 с помощью цифровой капельной ПЦР ассоциировано с резистентностью к гормональной терапии [93].

Определение уровней экзосомных miR-196a и miR-1246 может быть использовано для ранней

диагностики рака поджелудочной железы [94]. Экспрессионный анализ микроРНК также может использоваться для диагностики рака легкого [95] и определения прогноза при этом заболевании [96].

днкРНК также представляют диагностический интерес. Так, было показано, что уровень экзосомной РНК LINC00152 значительно повышен у пациентов с раком желудка по сравнению со здоровыми донорами [97].

Наиболее важным ограничением для внедрения анализа циркулирующей опухолевой РНК в клиническую практику является ее чрезвычайно низкая стабильность в кровотоке [98]. Кроме того, на сегодняшний день нет общепринятого мнения относительно оптимального протокола выделения цРНК из крови [98]. Это не позволяет рассматривать анализ цРНК в качестве полноценного неинвазивного метода получения информации об экспрессии опухолевых генов и стимулирует ученых к поиску новых решений [8]. Одним из них стал анализ тромбоцитарной РНК.

Изменение тромбоцитарного транскриптома при онкологических заболеваниях

Прицельное изучение тромбоцитарной РНК у пациентов с онкологическими заболеваниями с

помощью современных молекулярно-генетических методов началось в 2010 г., когда Calverley и соавт. впервые продемонстрировали статистически значимые различия в профилях экспрессии тромбоцитарной РНК между группами здоровых доноров ($n = 7$) и пациентов с метастатическим раком легкого ($n = 5$). Было установлено, что между тромбоцитами здоровых доноров и пациентов с раком легкого существуют различия в экспрессии 200 генов, уровни мРНК 197 из которых снижены у последних [81].

В 2011 г. Nilsson и соавт. продемонстрировали, что тромбоциты, выделенные из крови пациентов с глиобластомой, содержат мРНК EGFRvIII [21]. Для своего исследования Nilsson и соавт. [21] выделили тромбоциты из цельной крови с помощью двукратного центрифугирования. мРНК EGFRvIII в тромбоцитах была обнаружена с чувствительностью 80% и специфичностью 96%. Также с помощью ДНК-микрочипов Nilsson и соавт. определили ряд генов (*BG*, *WFDC1*, *KREMEN1*, *FKBP5*, *C1QTNF5*, *TP53I3* и др. – всего 30), по различиям уровней тромбоцитарной мРНК которых удалось с высокой точностью разделить группы пациентов с глиобластомой ($n = 8$) и здоровых доноров ($n = 12$) [21].

Дальнейшие исследования Nilsson и соавт. подтвердили поглощение тромбоцитами мРНК опухолевых клеток. С помощью ПЦР с обратной транскрипцией ими было установлено, что в тромбоцитах пациентов с ALK-положительным немелкоклеточным раком легкого (НМКРЛ) обнаруживается мРНК химер-

ного онкогена *EML4-ALK* [82], кодирующего химерную тирозинкиназу, постоянно передающего сигналы через пути PI3K/ERK и RAS/MAPK, что нарушает нормальную дифференцировку и апоптоз клетки [99]. Этот результат является крайне актуальным, так как сегодня обнаружение транслокации *EML4-ALK* при НМКРЛ является принципиальным для назначения таргетной терапии рака легкого ингибитором тирозинкиназы ALK кризотинибом [100].

В 2015 г. Best и соавт. первыми провели анализ тромбоцитарного транскриптома с помощью секвенирования нового поколения (next generation sequencing, NGS). Среди исследованных доноров 55 были здоровыми, а 228 имели ранее установленное онкологическое заболевание. При выделении тромбоцитов авторы наблюдали соотношение от 1 до 5 ядерных клеток на 10 млн тромбоцитов, что было признано ими допустимым. После синтеза, амплификации и создания библиотеки комплементарной ДНК было проведено секвенирование на платформе Hiseq® 2500 (Illumina). Основные этапы выделения и анализа тромбоцитарной РНК по протоколу, использованному в исследовании, проиллюстрированы на рисунке 2 [20].

После анализа результатов секвенирования транскриптома тромбоцитов 283 доноров Best и соавт. установили, что в общей сложности уровни 1453 из 5003 мРНК, доступных для анализа, были повышены и уровни 793 мРНК – снижены в тромбоцитах пациентов с онкологическими заболеваниями

Рисунок 2

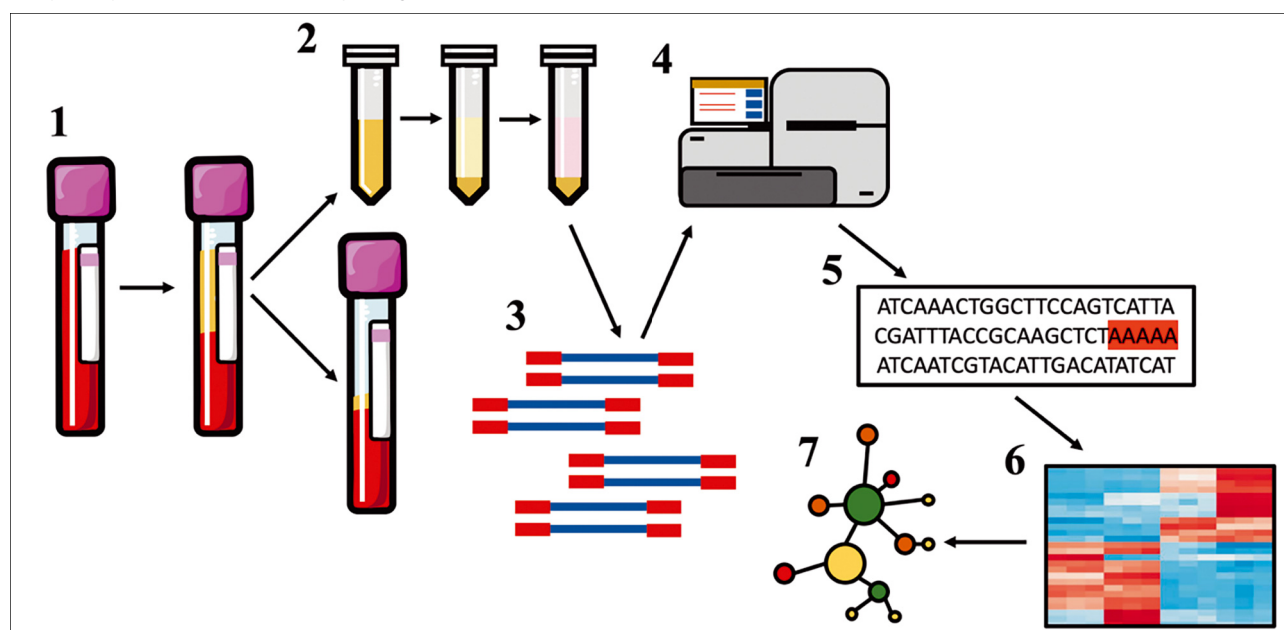
Основные этапы выделения и анализа тромбоцитарной РНК по протоколу Best и соавт. [20]

1 – взятие крови на EDTA, центрифугирование 20 мин при 120g; 2 – отбор плазмы, богатой тромбоцитами, центрифугирование 20 мин при 360g, отбор плазмы, бедной тромбоцитами, добавление к тромбоцитам среды RNeasy; 3 – синтез, амплификация и создание библиотеки комплементарной ДНК; 4 и 5 – секвенирование РНК на платформе Hiseq® 2500 (Illumina); 6 и 7 – анализ результатов секвенирования

Figure 2

The main stages of platelet RNA isolation and analysis according to the protocol by Best et al. [20]

1 – collecting blood in purple-cap EDTA tubes, centrifugation for 20 minutes at 120g; 2 – collecting platelet-rich plasma, centrifugation for 20 minutes at 360g, collecting platelet-poor plasma, adding RNeasy to platelets; 3 – cDNA synthesis and amplification, creation of a cDNA library; 4, 5 – RNA sequencing on the Hiseq® 2500 platform (Illumina); 6, 7 – sequencing data analysis



по сравнению с тромбоцитами здоровых доноров. Авторам удалось с минимальным перекрытием разделить группы здоровых доноров и пациентов. Анализ геномной онтологии (GO-анализ) показал, что в тромбоцитах пациентов с онкологическими заболеваниями были повышены уровни мРНК, кодирующих белки, вовлеченные в процессы везикулярного транспорта, активации тромбоцитов и связывания белков цитоскелета. В то же время было выявлено снижение уровней мРНК, кодирующих белки, вовлеченные в процессинг и сплайсинг РНК.

Создание алгоритма классификации, разработанного с использованием методов машинного обучения, позволило с точностью > 95% устанавливать наличие или отсутствие у пациента онкологического заболевания по результатам секвенирования 1072 тромбоцитарных мРНК. При этом конкретный тип опухоли удавалось определять с точностью > 70% [20].

В 2017 г. Best и соавт. провели еще одно исследование, посвященное прицельному изучению транскриптома тромбоцитов у пациентов с НМКРЛ. В него были включены 402 пациента с установленным ранее раком легкого и 377 здоровых доноров. Авторам удалось выделить панель генов ($n = 779$), экспрессия которых значительно отличается в тромбоцитах здоровых доноров и пациентов с НМКРЛ. Уровни мРНК одних генов (например, *CFL1*, *ACOT7* и *ARPC1B*) значительно повышены в тромбоцитах пациентов с раком легкого по сравнению со здоровыми донорами, в то время как уровни ряда других (например, *DDX5*, *RPS5* и *EEF1B2*), напротив, значительно снижены. Различия в уровнях тромбоцитарной РНК между донорами с раком легкого и без него не зависят от возраста, статуса курения, наличия воспалительных заболеваний, а также времени хранения крови после забора. Авторам удавалось устанавливать наличие НМКРЛ на поздних стадиях с точностью 88%, и на ранних – с точностью 81% [83].

Метод анализа тромбоцитарной мРНК показал свою эффективность и в качестве контроля противоопухолевой терапии [81]. В 2017 г. были опубликованы результаты клинического исследования, в котором сравнивалась эффективность абиратерона и доцетаксела в лечении резистентного к кастрации рака предстательной железы [23]. Всего в исследование были включены 50 пациентов, получивших в ходе него терапию доцетакселом ($n = 24$) или абиратероном ($n = 26$). Было установлено, что мРНК генов *KLK2*, *KLK3*, *FOLH1* и *NPY* не выявляется в тромбоцитах здоровых доноров, но при этом может быть обнаружена в тромбоцитах пациентов с раком предстательной железы с различной частотой встречаемости (более 37% для *KLK3*, более 32% для *KLK2*, более 25% для *FOLH1* и более 25% для *NPY*). Риск развития резистентности к терапии у пациентов

с обнаруженной в тромбоцитах мРНК *FOLH1* в 3,4 раза выше, чем у больных, в тромбоцитах которых она не обнаруживается. Выявление в тромбоцитах пациентов, получающих терапию абиратероном, мРНК *KLK2*, *KLK3* и *FOLH1* было связано с уменьшением общей выживаемости по сравнению с больными, в тромбоцитах которых мРНК этих генов не определяются. Было установлено, что у пациентов с одновременным обнаружением в тромбоцитах мРНК *KLK3*, *FOLH1* и *NPY* наблюдается увеличение в 4,2 раза риска неэффективности терапии абиратероном ($p < 0,01$). Это свидетельствует о больших предиктивных возможностях одновременного анализа панели из 3 генов для предсказания ответа опухоли на терапию [23].

В таблице приведены основные результаты исследований, посвященных изучению природы тромбоцитарной РНК, а также анализу транскриптома тромбоцитов при онкологических заболеваниях и определению диагностической ценности этого метода (по [10], с изменениями).

Стоит отметить, что существующие методы анализа тромбоцитарной РНК не лишены ограничений. Не до конца ясно, как именно происходит процесс переноса РНК из опухолевой клетки в тромбоцит [101, 102], что накладывает ограничения на однозначную интерпретацию результатов секвенирования тромбоцитарной РНК.

Также необходимо учитывать, что количество РНК в одной ядерной клетке в 10 000 раз превосходит количество РНК в одном тромбоците [103]. Таким образом, контаминация выделенных тромбоцитов ядерными клетками способна оказывать влияние на результаты секвенирования [10]. Наиболее точным методом отделения тромбоцитов от примеси ядерных клеток является использование магнитного сепаратора с частицами, конъюгированными с антителами к CD45 [81], это дорогая и трудоемкая методика.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Анализ транскриптома тромбоцитов представляет собой перспективный метод диагностики онкологических заболеваний и мониторинга ответа опухоли на проводимое лечение. Возможно, в будущем этот метод также позволит проводить скрининг нескольких типов злокачественных заболеваний одновременно, что, неоспоримо, будет давать ему преимущества перед инвазивными методами диагностики.

Тем не менее перед внедрением этого метода в клиническую практику прежде всего необходимо проведение исследований, позволяющих точно установить механизмы взаимодействия между опухолевой клеткой и тромбоцитом и однозначно определить природу тромбоцитарной РНК. Также необходима

Таблица

Изменения транскриптома тромбоцитов у пациентов с онкологическими заболеваниями (по [10], с изменениями)

Table

Changes in platelet transcriptome in patients with different oncological diseases (according to [10], with changes)

Предмет изучения Object of study	Когорта Cohort	Размер когорты, n Cohort size, n	Основные результаты Main results	Ссылка Link	Год Year
Профиль экспрессии мРНК mRNA expression pattern	НМКРЛ NSCLC	5	В тромбоцитах пациентов с НМКРЛ снижена экспрессия мРНК 197 из 200 исследованных генов 197 of 200 studied RNA are downregulated in platelets from patients with NSCLC	[81]	2010
	Здоровые доноры Healthy controls	7			
мРНК EGFRvIII EGFRvIII mRNA	Глиобластома Glioblastoma	31	В тромбоцитах пациентов с глиобластомой обнаруживается мРНК EGFRvIII. Описан механизм поглощения тромбоцитами микровезикул опухолевых клеток, содержащих РНК Platelets from patients with glioblastoma sequester tumor-derived EGFRvIII mRNA. The mechanism of absorption of RNA-containing tumor microvesicles by platelets was described	[21]	2011
	Здоровые доноры Healthy controls	12			
Профиль экспрессии мРНК mRNA expression pattern	НМКРЛ, колоректальный рак, рак молочной железы, глиобластома, рак поджелудочной железы, рак печени NSCLC, colorectal cancer, breast cancer, glioblastoma, pancreatic cancer, liver cancer	60, 41, 39, 35, 14	Алгоритм классификации, разработанный с использованием метода опорных векторов, позволяет устанавливать наличие у пациента 1 из 6 онкологических заболеваний или его отсутствие The classification algorithm developed using the support vector machine allows to establish the presence or absence of one of the 6 studied oncological diseases in a patient	[20]	2015
	Здоровые доноры Healthy controls	55			
мРНК мутантных KRAS, EGFR KRAS, EGFR mutant mRNA	Колоректальный рак, НМКРЛ, рак поджелудочной железы Colorectal cancer, NSCLC, pancreatic cancer	88, 67 (KRAS), 48 (EGFR), 49	В тромбоцитах пациентов с различными заболеваниями обнаруживаются мРНК специфических онкомаркеров In platelets from patients with various diseases specific tumor-associated mRNAs are detected		
мРНК EML4-ALK EML4-ALK mRNA	НМКРЛ NSCLC	77	В тромбоцитах пациентов с НМКРЛ обнаруживается мРНК EML4-ALK EML4-ALK mRNA is detected in platelets of patients with NSCLC	[82]	2016
Профиль экспрессии мРНК mRNA expression pattern	НМКРЛ NSCLC	402	С помощью алгоритмов машинного обучения по результатам секвенирования транскриптома тромбоцитов удалось устанавливать наличие НМКРЛ на поздних стадиях с точностью 88% и на ранних – с точностью 81% Using machine learning algorithms and based on the results of platelet transcriptome sequencing it was possible to determine the presence of NSCLC in the advanced stages with an accuracy of 88%, in early stages – 81%	[83]	2017
	Доноры (с возможным наличием воспалительных заболеваний) Donors (with possible presence of inflammatory diseases)	377			
мРНК KLK2, KLK3, FOLH1 и NPY KLK2, KLK3, FOLH1 and NPY mRNA	Резистентный к кастрации рак предстательной железы Castration-resistant prostate cancer	50	В тромбоцитах пациентов с раком простаты обнаруживаются мРНК KLK2, KLK3, FOLH1 и NPY, которые отсутствуют в тромбоцитах здоровых доноров. Обнаружение мРНК KLK2, KLK3 и FOLH1 может использоваться в качестве предиктора ответа на терапию абиратероном In the platelets from patients with prostate cancer, KLK2, KLK3, FOLH1 and NPY mRNAs are found. These mRNAs are absent in the platelets from healthy donors. Detection of KLK2, KLK3, and FOLH1 mRNAs can be used as a predictor of response to abiraterone therapy	[23]	2017
	Здоровые доноры Healthy controls	15			

Примечание. KLK2 – калликреин-родственная пептидаза 2; KLK3 – калликреин-родственная пептидаза 3; FOLH1 – фолат-гидролаза 1; NPY – нейропептид Y.
Note. NSCLC – non-small cell lung cancer; EGFR – epidermal growth factor receptor; EGFRvIII – EGFR variant III; KRAS – KRAS gene; EML4-ALK – echinoderm microtubule associated protein like 4 – anaplastic lymphoma kinase fusion gene; KLK2 – kallikrein related peptidase 2; KLK3 – kallikrein related peptidase 3; FOLH1 – folate hydrolase 1; NPY – neuropeptide Y.

разработка протоколов быстрого и малозатратного выделения тромбоцитов, позволяющих однозначно утверждать, что вся используемая для секвенирования РНК имеет тромбоцитарную природу. На настоящий момент эти вопросы остаются нерешенными, и это накладывает существенные ограничения на применение секвенирования тромбоцитарного транскриптома в клинической практике.

БЛАГОДАРНОСТЬ

Авторы выражают благодарность члену-корреспонденту РАН Пантелеву Михаилу Александровичу за поддержку и вдохновение при выполнении данной работы.

ИСТОЧНИК ФИНАНСИРОВАНИЯ

Работа выполнена при финансовой поддержке гранта Российского фонда фундаментальных исследований №17-00-00138.

КОНФИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы статьи подтвердили отсутствие конфликта интересов, о котором необходимо сообщить.

ORCID

Tesakov I.P. ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-9366-3449>

Martyanov A.A. ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-0211-6325>

Druj A.E. ORCID: <http://orcid.org/0000-0003-1308-8622>

Sveshnikova A.N. ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-4720-7319>

Литература

- Best M.G., Wesseling P., Wurdinger T. Tumor-educated platelets as a noninvasive biomarker source for cancer detection and progression monitoring. *Cancer Res* 2018; 78 (13): 3407–12.
- Abel E.J., Carrasco A., Culp S.H., Matin S.F., Tamboli P., Tannir N.M., et al. Limitations of preoperative biopsy in patients with metastatic renal cell carcinoma: Comparison to surgical pathology in 405 cases. *BJU Int* 2012; 110 (11): 1742–6.
- Dhaun N., Bellamy C.O., Cattran D.C., Kluth D.C. Utility of renal biopsy in the clinical management of renal disease. *Kidney Int* 2014; 85 (5): 1039–48.
- Overman M.J., Modak J., Kopetz S., Murthy R., Yao J.C., Hicks M.E., et al. Use of research biopsies in clinical trials: Are risks and benefits adequately discussed? *J Clin Oncol* 2013; 31 (1): 17–22.
- Baca S.C., Prandi D., Lawrence M.S., Mosquera J.M., Romanell A., Drier Y., et al. Punctuated evolution of prostate cancer genomes. *Cell* 2013; 153 (3): 666–77.
- Yates L.R., Gerstung M., Knappskog S., Desmedt C. Europe PMC Funders Group Subclonal diversification of primary breast cancer revealed by multiregion sequencing. *Nat Med* 2016; 21 (7): 751–9.
- Turajlic S., Sottoriva A., Graham T., Swanton C. Resolving genetic heterogeneity in cancer. *Nat Rev Genet* 2019; 20 (7): 404–16.
- De Rubis G., Rajeev Krishnan S., Beba-wy M. Liquid Biopsies in Cancer Diagnosis, Monitoring, and Prognosis. *Trends Pharmacol Sci* 2019; 40 (3): 172–86.
- Kanikarla-Marie P., Lam M., Menter D.G., Kopetz S. Platelets, circulating tumor cells, and the circulome. *Cancer Metastasis Rev* 2017; 36 (2): 235–48.
- Best M.G., Vancura A., Wurdinger T. Platelet RNA as a circulating biomarker trove for cancer diagnostics. *J Thromb Haemost* 2017; 15 (7): 1295–306.
- Leslie M. Beyond clotting: The powers of platelets. *Science* 2010; 328 (5978): 562–4.
- Warshaw A.L., Laster L., Shulman N.R. The stimulation by thrombin of glucose oxidation in human platelets. *J Clin Invest* 1966; 45 (12): 1923–34.
- Booyse F.M., Rafelson M.E. Stable messenger RNA in the synthesis of contractile protein in human platelets. *Biochim Biophys Acta* 1967; 145 (1): 188–90.
- Booyse F.M., Rafelson M.E. Studies on human platelets. I. Synthesis of platelet protein in a cell-free system. *Biochim Biophys Acta* 1968; 166 (3): 689–97.
- Newman P.J., Gorski J., White G.C., Gidwitz S., Cretney C.J., Aster R.H. Enzymatic amplification of platelet-specific messenger RNA using the polymerase chain reaction. *J Clin Invest* 1988; 82 (2): 739–43.
- Denis M.M., Tolley N.D., Bunting M., Schwartz H., Lindemann S., Yost C.C., et al. Signal-Dependent Pre-mRNA Splicing in Anucleate Platelets Melvin. *Cell* 2005; 122 (3): 379–91.
- Nassa G., Giurato G., Cimmino G., Rizzo F., Ravo M., Salvati A., et al. Splicing of platelet resident pre-mRNAs upon activation by physiological stimuli results in functionally relevant proteome modifications. *Sci Rep* 2018; 8 (1): 1–12.
- Bahou W.F., Gnatenko D.V. Platelet transcriptome: The application of microarray analysis to platelets. *Semin Thromb Hemost* 2004; 30 (4): 473–84.
- In 'T Veld S.G.J.G., Wurdinger T. Tumor-educated platelets. *Blood* 2019; 133 (22): 2359–64.
- Best M.G., Sol N., Kooi I., Tannous J., Westerman B.A., Rustenburg F., et al. RNA-Seq of Tumor-Educated Platelets Enables Blood-Based Pan-Cancer, Multiclass, and Molecular Pathway Cancer Diagnostics. *Cancer Cell* 2015; 28 (5): 666–76.
- Nilsson R.J.A., Balaj L., Hulleman E., Van Rijn S., Pegtel D.M., Walraven M., et al. Blood platelets contain tumor-derived RNA biomarkers. *Blood* 2011; 118 (13): 3680–3.
- Kuznetsov H.S., Marsh T., Markens B.A., Castaño Z., Greene-Colozzi A., Hay S.A., et al. Identification of luminal breast cancers that establish a tumor-supportive macroenvironment defined by proangiogenic platelets and bone marrow-derived cells. *Cancer Discov* 2012; 2 (12): 1150–65.
- Tjon-Kon-Fat L.A., Lundholm M., Schröder M., Wurdinger T., Thellenberg-Karlsson C., Widmark A., et al. Platelets harbor prostate cancer biomarkers and the ability to predict therapeutic response to abiraterone in castration resistant patients. *Prostate* 2017; 78 (1): 48–53.
- Wang S., Li Z., Xu R. Human cancer and platelet interaction, a potential therapeutic target. *Int J Mol Sci* 2018; 19 (4): 1–15.
- Tjon-Kon-Fat L.A., Sol N., Wurdinger T., Nilsson R.J.A. Platelet RNA in Cancer Diagnostics. *Semin Thromb Hemost* 2018; 44 (2): 135–41.
- McAllister S.S., Weinberg R.A. The tumour-induced systemic environment as a critical regulator of cancer progression and metastasis. *Nat Cell Biol* 2014; 16 (8): 717–27.
- Lood C., Amisten S., Gullstrand B., Jönsen A., Allhorn M., Truedsson L., et al. Platelet transcriptional profile and protein expression in patients with systemic lupus erythematosus: Up-regulation of the type I interferon system is strongly associated with vascular disease. *Blood* 2010; 116 (11): 1951–7.
- Boilard E., Nigrovic P.A., Larabee K., Watts G.F.M., Coblyn J.S., Weinblatt M.E., et al. Platelets amplify inflammation in arthritis via collagen-dependent microparticle production. *Science* 2010; 327 (5965): 580–3.
- Menter D.G., Hatfield J.S., Harkins C., Sloane B.F., Taylor J.D., Crissman J.C., et al. Tumor cell-platelet interactions *in vitro* and their relationship to *in vivo* arrest of hematogenously circulating tumor cells. *Clin Exp Metastasis* 1987; 5 (1): 65–78.
- Egan K., Crowley D., Smyth P., O'Toole S., Spillane C., Martin C., et al. Platelet adhesion and degranulation induce pro-survival and pro-angiogenic signalling in ovarian cancer cells. *PLoS ONE* 2011; 6 (10).
- Labelle M., Begum S., Hynes R.O. Direct Signaling between Platelets and Cancer Cells Induces an Epithelial-Mesenchymal-Like Transition and Promotes Metastasis. *Cancer Cell* 2011; 20 (5): 576–90.
- Labelle M., Hynes R.O. The initial hours of metastasis: The importance of cooperative host-tumor cell interactions during hematogenous dissemination. *Cancer Discov* 2012; 2 (12): 1091–9.
- Kuznetsov H.S., Marsh T., Markens B.A., Castaño Z., Greene-Colozzi A., Hay S.A., et al. Identification of Luminal Breast Cancers That Establish a Tumor-Supportive Macroenvironment Defined by Proangiogenic Platelets and Bone Marrow-Derived Cells. *Cancer Discov* 2012; 2 (12): 1150–65.
- Placke T., Örgel M., Schaller M., Jung G., Rammensee H.G., Kopp H.G., et al. Platelet-derived MHC class I confers a pseudonormal phenotype to cancer cells that subverts the antitumor reactivity of natural killer immune cells. *Cancer Res* 2012; 72 (2): 440–8.
- Joyce J.A., Pollard J.W. Microenvironmental regulation of metastasis. *Nat Rev Cancer* 2009; 9 (4): 239–52.
- Franco A.T., Corken A., Ware J. Review Article Platelets at the interface of thrombosis, inflammation, and cancer. *Blood* 2016; 126 (5): 582–9.
- Plantureux L., Mège D., Crescence L., Dignat-George F., Dubois C., Panicot-Dubois L. Impacts of cancer on platelet production, activation and education and mechanisms of cancer-associated thrombosis. *Cancers (Basel)* 2018; 10 (11): 1–23.
- Boukerche H., Berthier-Vergnes O., Penin F., Tabone E., Lizard G., Bailly M., et al. Human melanoma cell lines dif-

- fer in their capacity to release ADP and aggregate platelets. *Br J Haematol* 1994; 87 (4): 763–72.
39. Heinmüller E., Weinel R.J., Heidtmann H.H., Salge U., Seitz R., Schmitz I., et al. Studies on tumor-cell-induced platelet aggregation in human lung cancer lines. *J Cancer Res Clin Oncol* 1996; 122 (12): 735–44.
 40. Sakai H., Suzuki T., Takahashi Y., Ukai M., Tauchi K., Fujii T., et al. Upregulation of thromboxane synthase in human colorectal carcinoma and the cancer cell proliferation by thromboxane A₂. *FEBS Lett* 2006; 580 (14): 3368–74.
 41. Cathcart M.C., Gately K., Cummins R., Kay E., O'Byrne K.J., Pidgeon G.P. Examination of thromboxane synthase as a prognostic factor and therapeutic target in non-small cell lung cancer. *Mol Cancer* 2011; 10: 1–14.
 42. Kajita S., Ruebel K.H., Casey M.B., Nakamura N., Lloyd R.V. Role of COX-2, thromboxane A₂ synthase, and prostaglandin I₂ synthase in papillary thyroid carcinoma growth. *Mod Pathol* 2005; 18 (2): 221–7.
 43. De Leval X., Benoit V., Delarge J., Julémont F., Masereel B., Pirotte B., et al. Pharmacological evaluation of the novel thromboxane modulator BM-567 (II/II). Effects of BM-567 on osteogenic sarcoma-cell-induced platelet aggregation. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 2003; 68 (1): 55–9.
 44. Ito Y., Katagiri H., Ishii K., Kakita A., Hayashi I., Majima M. Effects of selective cyclooxygenase inhibitors on ischemia/reperfusion-induced hepatic microcirculatory dysfunction in mice. *Eur Surg Res* 2003; 35 (5): 408–16.
 45. Nie D., Lamberti M., Zacharek A., Li L., Szekeres K., Tang K., et al. Thromboxane A₂ regulation of endothelial cell migration, angiogenesis, and tumor metastasis. *Biochem Biophys Res Commun* 2000; 267 (1): 245–51.
 46. Carlsson K., Freskgård P.O., Persson E., Carlsson U., Svensson M. Probing the interface between factor Xa and tissue factor in the quaternary complex tissue factor-factor VIIa-factor Xa-tissue factor pathway inhibitor. *European J Biochem* 2003; 270 (12): 2576–82.
 47. Коваленко Т.А., Пантелеев М.А., Свешникова А.Н. Роль тканевого фактора в метастазировании, неоангиогенезе и гемостазе при онкологических заболеваниях. *Онкогематология* 2019; 14 (2).
 48. MacKman N., Taubman M. Tissue factor: Past, present, and future. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2009; 29 (12): 1986–8.
 49. Ruf W., Yokota N., Schaffner F. Tissue factor in cancer progression and angiogenesis. *Thromb Res* 2010; 125 Suppl: S36–8.
 50. Liu Y., Jiang P., Capkova K., Xue D., Ye L., Sinha S.C., et al. Tissue factor-activated coagulation cascade in the tumor microenvironment is critical for tumor progression and an effective target for therapy. *Cancer Res* 2011; 71 (20): 6492–502.
 51. Calvete J.J. On the Structure and Function of Platelet Integrin $\alpha\text{IIb}\beta_3$, the Fibrinogen Receptor. *Proc Soc Exp Biol Med* 1995; 208 (4): 346–60.
 52. Karpotkin S., Pearlstein E., Ambrogio C., Collier B.S. Role of adhesive proteins in platelet tumor interaction *in vitro* and metastasis formation *in vivo*. *J Clin Invest* 1988; 81 (4): 1012–9.
 53. Zimmer G., Oeffner F., Von Messling V., Tschernig T., Gröne H.J., Klenk H.D., et al. Cloning and characterization of gp36, a human mucin-type glycoprotein preferentially expressed in vascular endothelium. *Biochem J* 1999; 341 (2): 277–84.
 54. Astarita J.L., Acton S.E., Turley S.J. Podoplanin: Emerging functions in development, the immune system, and cancer. *Front Immunol* 2012; 3(SEP): 1–12.
 55. Schacht V., Dadras S.S., Johnson L.A., Jackson D.G., Hong Y.K., Detmar M. Up-regulation of the lymphatic marker podoplanin, a mucin-type transmembrane glycoprotein, in human squamous cell carcinomas and germ cell tumors. *Am J Pathol* 2005; 166 (3): 913–21.
 56. Kato Y., Sasagawa I., Kaneko M., Osawa M., Fujita N., Tsuruo T. Aggrus: A diagnostic marker that distinguishes seminoma from embryonal carcinoma in testicular germ cell tumors. *Oncogene* 2004; 23 (52): 8552–6.
 57. Mishima K., Kato Y., Kaneko M.K., Nakazawa Y., Kunita A., Fujita N., et al. Podoplanin expression in primary central nervous system germ cell tumors: A useful histological marker for the diagnosis of germinoma. *Acta Neuropathol* 2006; 111 (6): 563–8.
 58. Suzuki-Inoue K., Inoue O., Ozaki Y. Novel platelet activation receptor CLEC-2: From discovery to prospects. *J Thromb Haemost* 2011; 9 (1 S): 44–55.
 59. Badolia R., Inamdar V., Manne B.K., Dangelmaier C., Eble J.A., Kunapuli S.P. Gq pathway regulates proximal C-type lectin-like receptor-2 (CLEC-2) signaling in platelets. *J Biol Chem* 2017; 292 (35): 14516–31.
 60. Martyanov A.A., Kaneva V.N., Panteliev M.A., Sveshnikova A.N. Physiological and pathophysiological aspects of blood platelet activation through CLEC-2 receptor. *Oncohematology* 2018; 13 (3): 83–90.
 61. Takagi S., Sato S., Oh-hara T., Takami M., Koike S., Mishima Y., et al. Platelets Promote Tumor Growth and Metastasis via Direct Interaction between Aggrus/Podoplanin and CLEC-2. *PLoS ONE* 2013; 8 (8): 1–11.
 62. Bellingham S.A., Guo B.B., Coleman B.M., Hill A.F. Exosomes: Vehicles for the transfer of toxic proteins associated with neurodegenerative diseases? *Front Physiol* 2012; 3: 124.
 63. Skog J., Wurdinger T., van Rijn S., Meijer D.H., Gainche L., Sena-Esteves M., et al. Glioblastoma microvesicles transport RNA and proteins that promote tumour growth and provide diagnostic biomarkers. *Nat Cell Biol* 2008; 10 (12): 1470–6.
 64. Rutkowska A., Stoczyńska-Fidelus E., Janik K., Włodarczyk A., Rieseke P. EGFRvIII: An Oncogene with Ambiguous Role. *J Oncol* 2019; 2019: 1092587.
 65. Guarino M. Epithelial-mesenchymal transition and tumour invasion. *Int J Biochem Cell Biol* 2007; 39 (12): 2153–60.
 66. Guillem-Llobat P., Dovizio M., Bruno A., Ricciotti E., Cufino V., Sacco A., et al. Aspirin prevents colorectal cancer metastasis in mice by splitting the crosstalk between platelets and tumor cells. *Oncotarget* 2016; 7 (22): 32462–77.
 67. Dovizio M., Maier T.J., Alberti S., Di Francesco L., Marcantoni E., Munch G., et al. Pharmacological inhibition of platelet-tumor cell cross-talk prevents platelet-induced overexpression of cyclooxygenase-2 in HT29 human colon carcinoma cells. *Mol Pharmacol* 2013; 84 (1): 25–40.
 68. Assoian R.K., Sporn M.B. Type B Transforming Growth Factor in Human Platelets. *J Cell Biol* 1986; 102: 1217–23.
 69. Cho M.S., Bottsford-Miller J., Vasquez H.G., Stone R., Zand B., Kroll M.H., et al. Platelets increase the proliferation of ovarian cancer cells. *Blood* 2012; 120 (24): 4869–72.
 70. Zhang Y., Unnithan R.V.M., Hamidi A., Caja L., Saupe F., Moustakas A., et al. TANK-binding kinase 1 is a mediator of platelet-induced EMT in mammary carcinoma cells. *FASEB J* 2019; 33 (7): 7822–32.
 71. Helgason E., Phung Q.T., Dueber E.C. Recent insights into the complexity of Tank-binding kinase 1 signaling networks: The emerging role of cellular localization in the activation and substrate specificity of TBK1. *FEBS Lett* 2013; 587 (8): 1230–7.
 72. Ou Y.H., Torres M., Ram R., Formstecher E., Roland C., Cheng T., et al. TBK1 Directly Engages Akt/PKB Survival Signaling to Support Oncogenic Transformation. *Mol Cell* 2011; 41 (4): 458–70.
 73. Barbie D.A., Tamayo P., Boehm J.S., Kim S.Y., Moody S.E., Dunn I.F., et al. Systematic RNA interference reveals that oncogenic KRAS-driven cancers require TBK1. *Nature* 2009; 462 (7269): 108–12.
 74. Radziwon-Balicka A., Santos-Martinez M.J., Corbalan J.J., O'Sullivan S., Treumann A., Gilmer J.F., et al. Mechanisms of platelet-stimulated colon cancer invasion: Role of clusterin and

- thrombospondin 1 in regulation of the P38MAPK-MMP-9 pathway. *Carcinogenesis* 2014; 35 (2): 324–32.
75. Kitamura T., Qian B.Z., Pollard J.W. Immune cell promotion of metastasis. *Nat Rev Immunol* 2015; 15 (2): 73–86.
 76. Gay L.J., Felding-Habermann B. Contribution of platelets to tumour metastasis. *Nat Rev Cancer* 2011; 11 (2): 123–34.
 77. Gruber I.V., Landenberger N., Staebler A., Hahn M., Wallwiener D., Fehm T. Relationship between circulating tumor cells and peripheral T-cells in patients with primary breast cancer. *Anticancer Res* 2013; 33 (5): 2233–8.
 78. Caligiuri M.A. Human natural killer cells. *Blood* 2008; 112 (3): 461–9.
 79. Zitvogel L., Tesniere A., Kroemer G. Cancer despite immunosurveillance: Immunoselection and immunosubversion. *Nat Rev Immunol* 2006; 6 (10): 715–27.
 80. Kopp H.G., Placke T., Salih H.R. Platelet-derived transforming growth factor- β down-regulates NKG2D thereby inhibiting natural killer cell antitumor reactivity. *Cancer Res* 2009; 69 (19): 7775–83.
 81. Calverley D.C., Phang T.L., Choudhury Q.G., Gao B., Oton A.B., Weyant M.J., et al. Significant downregulation of platelet gene expression in metastatic lung cancer. *Clin Transl Sci* 2010; 3 (5): 227–32.
 82. Nilsson R.J.A., Karachaliou N., Berenguer J., Gimenez-Capitan A., Schellen P., Teixeira C., et al. Rearranged EML4-ALK fusion transcripts sequester in circulating blood platelets and enable blood-based crizotinib response monitoring in non-small-cell lung cancer. *Oncotarget* 2016; 7 (1): 1066–75.
 83. Best M.G., Sol N., In 't Veld S.G.J.G., Vancura A., Muller M., Niemeijer A.L.N., et al. Swarm Intelligence-Enhanced Detection of Non-Small-Cell Lung Cancer Using Tumor-Educated Platelets. *Cancer Cell* 2017; 32 (2): 238–252.e9.
 84. Jahr S., Hentze H., Englisch S., Hardt D., Fackelmayer F.O., Hesch R.D., et al. DNA fragments in the blood plasma of cancer patients: Quantitations and evidence for their origin from apoptotic and necrotic cells. *Cancer Res* 2001; 61 (4): 1659–65.
 85. Stroun M., Anker P., Belianski M., Henri J., Lederrey C., Ojha M., et al. Presence of RNA in the Nucleoprotein Complex Spontaneously Released by Human Lymphocytes and Frog Auricles in Culture. *Cancer Res* 1978; 38 (10): 3546–54.
 86. Wieczorek A.J., Sitaramam V., Machleidt W., Rhyner K., Perruchoud A.P., Block L.H. Diagnostic and Prognostic Value of RNA-Proteolipid in Sera of Patients with Malignant Disorders following Therapy: First Clinical Evaluation of a Novel Tumor Marker. *Cancer Res* 1987; 47 (23): 6407–12.
 87. Zaporozhchenko I.A., Ponomaryova A.A., Rykova E.Y., Laktionov P.P. The potential of circulating cell-free RNA as a cancer biomarker: challenges and opportunities. *Exp Rev Mol Diagnost* 2018; 18 (2): 133–45.
 88. Tsui N.B.Y., Ng E.K.O., Lo Y.M.D. Stability of endogenous and added RNA in blood specimens, serum, and plasma. *Clin Chem* 2002; 48 (10): 1647–53.
 89. Arroyo J.D., Chevillet J.R., Kroh E.M., Ruf I.K., Pritchard C.C., Gibson D.F., et al. Argonaute2 complexes carry a population of circulating microRNAs independent of vesicles in human plasma. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2011; 108 (12): 5003–8.
 90. Fleischhacker M., Schmidt B. Circulating nucleic acids (CNAs) and cancer-A survey. *Biochim Biophys Acta* 2007; 1775 (1): 181–232.
 91. Hao Y.X., Li Y.M., Ye M., Guo Y.Y., Li Q.W., Peng X.M., et al. KRAS and BRAF mutations in serum exosomes from patients with colorectal cancer in a Chinese population. *Oncol Lett* 2017; 13 (5): 3608–16.
 92. Manda S.V., Kataria Y., Tatireddy B.R., Ramakrishnan B., Ratnam B.G., Lath R., et al. Exosomes as a biomarker platform for detecting epidermal growth factor receptor-positive high-grade gliomas. *J Neurosurg* 2018; 128 (4): 1091–101.
 93. Del Re M., Biasco E., Crucitta S., Derosa L., Rofi E., Orlandini C., et al. The Detection of Androgen Receptor Splice Variant 7 in Plasma-derived Exosomal RNA Strongly Predicts Resistance to Hormonal Therapy in Metastatic Prostate Cancer Patients. *Eur Urol* 2017; 71 (4): 680–7.
 94. Xu Y.F., Hannafon B.N., Zhao Y.D., Postier R.G., Ding W.Q. Plasma exosome miR-196a and miR-1246 are potential indicators of localized pancreatic cancer. *Oncotarget* 2017; 8 (44): 77028–40.
 95. Jin X., Chen Y., Chen H., Fei S., Chen D., Cai X., et al. Evaluation of tumor-derived exosomal miRNA as potential diagnostic biomarkers for early-stage non-small cell lung cancer using next-generation sequencing. *Clin Cancer Res* 2017; 23 (17): 5311–9.
 96. Liu Q., Yu Z., Yuan S., Xie W., Li C., Hu Z., et al. Circulating exosomal microRNAs as prognostic biomarkers for non-small-cell lung cancer. *Oncotarget* 2017; 8 (8): 13048–58.
 97. Li Q., Shao Y., Zhang X., Zheng T., Miao M., Qin L., et al. Plasma long non-coding RNA protected by exosomes as a potential stable biomarker for gastric cancer. *Tumor Biol* 2015; 36 (3): 2007–12.
 98. Sourvinou I.S., Markou A., Lianidou E.S. Quantification of circulating miRNAs in plasma: Effect of preanalytical and analytical parameters on their isolation and stability. *J Mol Diagnost* 2013; 15 (6): 827–34.
 99. Sabir S.R., Yeoh S., Jackson G., Bayliss R. EML4-ALK variants: Biological and molecular properties, and the implications for patients. *Cancers* 2017; 9 (9).
 100. Christopoulos P., Kirchner M., Endris V., Stenzinger A., Thomas M. EML4-ALK V3, treatment resistance, and survival: Refining the diagnosis of ALK+ NSCLC. *J Thorac Dis* 2018; 10 (9): S1989–91.
 101. Dovizio M., Bruno A., Contursi A., Grande R., Patrignani P. Platelets and extracellular vesicles in cancer: diagnostic and therapeutic implications. *Cancer Metastasis Rev* 2018; 37 (2–3): 455–67.
 102. Liu L., Lin F., Ma X., Chen Z., Yu J. Tumor-educated platelet as liquid biopsy in lung cancer patients. *Crit Rev Oncol Hematol* 2020; 146: 102863.
 103. Sol N., Wurdinger T. Platelet RNA signatures for the detection of cancer. *Cancer Metastasis Rev* 2017; 36 (2): 263–72.