



На правах рукописи

ГАРАЕВА

Луиза Абдул-Азизовна

**АКТИВАЦИЯ ПРОТИВООПУХОЛЕВОГО ИММУНИТЕТА ШАПЕРОНОМ
HSP70, ВВЕДЕННЫМ В СОСТАВ ВЕЗИКУЛ РАСТИТЕЛЬНОГО
ПРОИСХОЖДЕНИЯ**

1.5.3. Молекулярная биология

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание учёной степени

кандидата биологических наук

Гатчина

2025

Работа выполнена в федеральном государственном бюджетном учреждении «Петербургский институт ядерной физики им. Б. П. Константинова Национального исследовательского центра «Курчатовский институт».

Научный руководитель:

кандидат биологических наук Штам Татьяна Александровна.

Официальные оппоненты:

доктор биологических наук Чевкина Елена Максимовна, федеральное государственное бюджетное учреждение «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии имени Н.Н. Блохина» Министерства здравоохранения Российской Федерации, заведующий лабораторией регуляции клеточных и вирусных онкогенов, г. Москва;

доктор медицинских наук Головкин Алексей Сергеевич, федеральное государственное бюджетное учреждение «Национальный медицинский исследовательский центр имени В.А. Алмазова» Министерства здравоохранения Российской Федерации, заведующий лабораторией микровезикулярного сигналинга, г. Санкт-Петербург.

Ведущая организация: федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования «Новосибирский национальный исследовательский государственный университет», г. Новосибирск.

Защита состоится « 27 » июня 2025 г. в 10:00 на заседании диссертационного совета У.1.5.3.23 федерального государственного автономного образовательного учреждения высшего образования «Санкт-Петербургский политехнический университет Петра Великого» (ФГАОУ ВО СПбПУ) (195251, г. Санкт-Петербург, ул. Политехническая, 29) по адресу: г. Санкт-Петербург, ул. Хлопина 11, корп. 1, Высшая школа биомедицинских систем и технологий, ауд. 209.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке и на сайте <https://www.spbstu.ru/science/the-department-of-doctoral-studies/independent-award-academic-degrees/defences-calendar/> ФГАОУ ВО СПбПУ.

Автореферат разослан: « ____ » _____ 2025 г.

Учёный секретарь диссертационного совета,
кандидат физико-математических наук



Забродская Яна Александровна

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы исследования. Опухолевые новообразования представляют собой заболевания, возникающие в результате трансформации нормальных тканей и появления бесконтрольно делящихся клеток, предрасположенных к инвазии и метастазированию [De Visser и др., 2023]. Актуальной остается задача разработки методов борьбы с онкологическими заболеваниями, среди которых относительно новыми и перспективными считаются методы иммунотерапии, возвращающие иммунным клеткам организма способность распознавать и уничтожать опухолевые клетки [Abbott и др., 2019]. Один из множества возможных способов активации противоопухолевого иммунного ответа – доставка к опухолевым очагам экзогенных белков теплового шока (HSPs), в частности HSP70 [Guzhova и др., 2016; Vostakolaei и др., 2021].

Белки семейства HSP70 играют ведущую роль в поддержании белкового гомеостаза, в том числе особое место им отводят в развитии и подавлении роста опухоли. Молекулярный механизм активации противоопухолевого иммунного ответа через шаперон HSP70 обусловлен прежде всего его способностью связывать специфические опухолевые пептиды с образованием комплексов HSP70-пептид, появление которых во внеклеточном пространстве приводит к активации CD8+T-лимфоцитов [Shevtsov и др., 2014], а их появление на поверхности опухолевых клеток приводит к стимуляции натуральных киллеров (NK-клеток) [Albakov и др., 2020].

На сегодняшний день разработан ряд противоопухолевых вакцин на основе HSP70, которые не были одобрены для клинической практики, несмотря на эффективные показатели в ходе лабораторных исследований *in vivo* и *in vitro* [Vostakolaei и др., 2021; Shevtsov и др., 2014]. Ограничение использования рекомбинантного HSP70 связано с недостаточно эффективными показателями вызванного иммунного ответа, что свидетельствует об актуальности усовершенствования существующих препаратов. Повысить эффективность иммунотерапевтического подхода на основе рекомбинантного HSP70 возможно за счет повышения его биодоступности для опухолевых клеток. Одним из способов увеличения количества терапевтического шаперона, доходящего до места его действия в организме человека или животных, рассматривается его инкапсулирование в наночастицы различной природы, в том числе в экстраклеточные везикулы.

Экстраклеточные везикулы (ЭВ), в частности экзосомы, представляют собой окруженные липидным бислоем нановезикулы, секретируемые многими клетками. ЭВ рассматривают в качестве доставщиков терапевтических бимолекул в силу их способности переносить нуклеиновые кислоты и белки, сохраняя их стабильность, а также их естественного механизма проникновения в клетки-реципиенты [Sil и др., 2020]. Альтернативой экзосомам биожидкостей, имеющим ограничения для использования в клинической практике, могут стать растительные экстраклеточные везикулы (PEVs), которые, так же как и экзосомы, имеют естественное

происхождение и способны сохранять стабильность биомолекул при доставке [Feng и др., 2024]. В том числе PEVs могли бы стать эффективными доставщиками HSP70 при реализации метода активации противоопухолевого иммунного ответа.

В целом, актуальность разработок систем доставки HSP70 в опухоль не вызывает сомнений, а рассмотрение везикул растительного происхождения в качестве таких систем является перспективным направлением исследований.

Степень разработанности темы исследования. Растительные везикулы – наноразмерные частицы с липидным бислоем, секретируемые растительными клетками в ответ на биотический и абиотический стресс. Липидный бислой и способность переносить белки и нуклеиновые кислоты без деградации сделали PEVs объектом научного интереса с точки зрения использования в качестве доставщиков терапевтических биомолекул [Feng и др., 2024].

В немногочисленных работах была подтверждена возможность использования интактных PEVs для доставки биомолекул [Li и др., 2018; Yang и др., 2021]. Кроме того, идет набор на клиническое испытание I фазы, задача которого оценить возможность и эффективность использования PEVs для доставки противоопухолевого агента (NCT01294072). Таким образом, понятно, что PEVs имеют большой потенциал для создания на их основе систем доставки различных биомолекул, в том числе для терапии опухолевых заболеваний.

Терапия злокачественных новообразований иммуностимулирующей стратегией на основе белков теплового шока, в том числе HSP70, берет свое начало в 1990-х годах, когда было проведено первое клиническое испытание HSP-пептидного комплекса 96 (HSPPC-96; Oncophage; Antigenics Inc., Лексингтон, Массачусетс, США). Ряд лабораторных исследований указывает на перспективность применения вакцин на основе HSP70 [Li и др., 2005; Li и др., 2009]. В настоящее время более 150 медицинских учреждений проводят фундаментальные и клинические исследования в области вакцин на основе HSP70, но при этом ни одна из них не была одобрена для клинической практики [Vostakolaei и др., 2021]. В данной работе исследована новая возможность доставки HSP70, повышающая его биологическую доступность и открывающая новую перспективу его использования в противоопухолевой иммунотерапии.

Цель исследования. Оценка противоопухолевого иммуномодулирующего потенциала рекомбинантного белка HSP70, доставляемого в клетки опухоли с использованием везикул, выделенных из плодов грейпфрута (GEVs).

Задачи исследования

- 1) Отработать методику получения и нагрузки экзогенными белками GEVs с последующей характеристикой их физических параметров;
- 2) Оценить эффективность накопления и функциональную активность рекомбинантного HSP70, доставляемого при помощи GEVs в клетки человека *in vitro*;

3) Оценить влияние HSP70, введённого в GEVs, на развитие опухолевого узла на мышинной модели карциномы толстой кишки и меланомы кожи;

4) Оценить способность к активации противоопухолевого иммунного ответа рекомбинантным белком HSP70, доставленным при помощи GEVs, на клеточных моделях и мышинной модели карциномы толстой кишки.

Научная новизна. В представленной работе впервые проведены исследования по использованию растительных везикул для иммуномодуляции при сформированных патологиях карциномы толстой кишки и меланомы кожи. Убедительно показана возможность активации противоопухолевого иммунитета при помощи GEVs с введённым в их состав рекомбинантным белком HSP70.

Получены и визуализированы малоизученные макромолекулы, внеклеточные органеллы, представляющие собой наноразмерные везикулы, секретируемые растительной клеткой. Впервые проведен подробный анализ морфологии нативных GEVs методом криоэлектронной микроскопии (крио-ЭМ) и получены данные о толщине их липидного бислоя, а также изучено влияние ультразвука на морфологию и целостность липидного бислоя растительных везикул на примере GEVs.

Впервые апробирована и успешно применена методика нагрузки экзогенными белками нативных растительных везикул на примере GEVs, а также впервые показано прижизненное распределение в тканях организма мышей при внутривенном введении экзогенного белка, инкапсулированного в GEVs.

На системе межбелкового взаимодействия HSP70 с каспазами, участвующими в каспазо-зависимом апоптозе, впервые показана возможность доставки с помощью GEVs экзогенного рекомбинантного HSP70 в клетки человека *in vitro* с сохранением его функциональной активности.

Впервые показана более эффективная пенетрация растительных везикул в культивируемые клетки человека относительно экзосом биожидкостей.

Впервые показано, что доставка экзогенных белков растительными везикулами на примере GEVs способствует их более эффективному накоплению в клетках, в том числе при помощи визуализации живых клеток в режиме реального времени.

В исследовании впервые проведена оценка возможности использования GEVs для доставки экзогенного HSP70 к опухолевым клеткам, оценена эффективность нагрузки и пенетрации везикул в клетки млекопитающих *in vitro*. На животных и клеточных моделях впервые продемонстрировано значительное повышение эффективности накопления функционально активного HSP70 в опухолевых клетках при его доставке в составе GEVs. Более

того, продемонстрирована эффективность терапии нагруженными HSP70 GEVs на животной модели меланомы кожи.

Впервые изучена возможность активации противоопухолевого иммунитета при помощи сконструированного препарата, представляющего собой билипидные макромолекулярные комплексы - GEVs, и рекомбинантный белок HSP70. Изучено влияние предложенной конструкции на цитокиновый профиль и появление CD8+T-клеток при индуцированной патологии карциномы толстой кишки и меланомы кожи на животной модели.

Теоретическая и практическая значимость работы. В представленной работе предложена новая технология создания лекарственной формы на основе рекомбинантного белка HSP70 человека и билипидных структур – растительных везикул, для терапии опухолевых заболеваний.

Полученные в ходе работы результаты расширяют фундаментальное знание в области дизайна систем молекула-носитель и вносят вклад в развитие межвидовой доставки экзогенных терапевтических белков. Более того, в проведенном исследовании подтверждены и дополнены данные о морфологии растительных везикул, охарактеризована толщина их липидного бислоя и влияние ультразвука на его целостность.

Представленные в данной работе результаты убедительно свидетельствуют о возможности использования растительных везикул для доставки экзогенных белков к опухолевым клеткам. Несмотря на то, что PEVs привлекают все больше интереса как объект исследования, единичные работы посвящены практическому подтверждению возможности использования нативных PEVs для эффективной доставки терапевтических биомолекул, а также отсутствуют сообщения об эффективной нагрузке нативных PEVs экзогенными белками.

Продемонстрированная способность GEVs сохранять функциональную активность доставляемого HSP70 и увеличивать эффективность его накопления в цитоплазме клеток-реципиентов является необходимым условием для разработки систем доставки препаратов. Полученные данные могут способствовать дальнейшим исследованиям в области использования PEVs разных продуцентов для создания альтернативных биогенных межвидовых векторных систем доставки терапевтических белков с последующим выбором более эффективного, биотехнологически и экономически выгодного доставщика/продуцента.

Проведенные в работе исследования на животных и клеточных моделях позволили продемонстрировать более чем на порядок эффективное накопление экзогенного HSP70, доставляемого GEVs, по сравнению со свободным белком, что может не только значительно удешевить использование HSP70 в качестве иммуномодулятора при опухолевых новообразованиях, но и сделать его применение возможным в клинической практике, преодолев одно из ограничений – недостаточно эффективную иммуногенность при допустимых к использованию дозах.

В представленном исследовании продемонстрировано на мышинной модели индуцированной патологии карциномы толстой кишки, что введение HSP70 в составе растительных везикул в опухолевые клетки приводит к активации молекулярных программ клеточного иммунитета, обусловленных восстановлением цитотоксической активности Т-лимфоцитов и ремодуляцией цитокинового профиля, являющегося функциональным маркером молекулярных сдвигов в сторону ослабления иммуносупрессивной среды. Полученные результаты в совокупности с данными об эффективности терапии введенным в состав GEVs рекомбинантным HSP70 на мышинной модели индуцированной патологии меланомы кожи расширяют понимание об иммуномодулирующей возможности шаперона HSP70 при опухолевых патологиях, а также вносят вклад в создание альтернативных способов доставки HSP70 в опухолевые клетки, как часть иммунотерапевтических подходов для лечения злокачественных новообразований.

Таким образом, полученные в работе данные могут внести вклад в развитие сразу двух областей: с одной стороны, в разработку нанофармакологических систем доставки препаратов различной природы на основе растительных везикул, а с другой стороны, в усовершенствование иммунотерапии на основе белков теплового шока.

Методология и методы исследования. GEVs были экстрагированы из сока грейпфрута (*Citrus paradisi*) методом ультрацентрифугирования, после чего охарактеризованы по размеру и концентрации методом анализа траектории наночастиц и визуализированы в нативном состоянии при помощи крио-ЭМ.

Для инкапсуляции рекомбинантного HSP70 в GEVs использовали метод соинкубации и обработки ультразвуком. Для оценки эффективности загрузки растительных везикул рекомбинантным белком HSP70 были использованы методы флуорометрии и вестерн-блоттинга. Для оценки эффективности доставки белков при помощи GEVs к клеткам человека *in vitro* был применен метод проточной цитометрии. Накопление доставляемых GEVs флуоресцентно меченных белков в цитоплазме клеток-реципиентов было подтверждено при помощи конфокальной микроскопии. Оценка функциональности HSP70, доставляемого при помощи GEVs к клеткам человека, была произведена *in vitro* при помощи сравнительного анализа пролиферативной активности клеток на системе xCELLigence RTCA DP System.

Оценка биораспределения везикул грейпфрута была осуществлена *in vivo* на CD-1 IGS линии мышей при помощи введения грызунам везикул, нагруженных радиоактивно-меченным белком бычьего сывороточного альбумина с последующим гамма-подсчетом радиоактивного сигнала в органах *ex vivo*.

Для оценки активации противоопухолевого иммунитета на животных моделях использовали самцов линии BALB/c. Мышам подкожно прививали клетки карциномы толстой

кишки мыши СТ-26 или меланомы кожи мыши В16. Влияние на развитие опухоли нагруженных HSP70 GEVs анализировали на основе прямых замеров опухолевых образований и/или биовизуализации экспериментальных животных на системе доклинической визуализации флуоресценции и люминесценции IVIS (PerkinElmer).

Для оценки специфической цитотоксической активности из селезенки экспериментальных групп мышей были выделены общая фракция лимфоцитов и фракция CD8+T-клеток, которые использовали в качестве эффекторных клеток при добавлении к клеткам СТ-26, с последующим анализом их жизнеспособности на системе xCELLigence. Для анализа уровня интерлейкина 10 и трансформирующего фактора роста бета 1 в плазме крови экспериментальных животных был применен метод иммуноферментного анализа. Статистическая обработка и визуализация данных осуществлена в ПО SPSS22.0 и GraphPrism9.0.

Положения, выносимые на защиту

- 1) Везикулы грейпфрута эффективны для доставки к клеткам млекопитающих экзогенных белков;
- 2) Доставленный при помощи везикул грейпфрута рекомбинантный HSP70 сохраняет свою функциональную активность в клетках млекопитающих;
- 3) Везикулы грейпфрута с введенным в их состав HSP70 активируют опухоль-специфический иммунный ответ *in vitro* и *in vivo*.

Личное участие автора в получении результатов, изложенных в диссертационном исследовании. Автором самостоятельно в ходе работы осуществлялось: 1) ведение клеточных культур; 2) отработка методики экстракции и последующая наработка GEVs; 3) отработка методики нагрузки экзогенными белками GEVs и последующая ее реализация во всех экспериментах *in vitro* и *in vivo*; 4) оценка концентрации и размера получаемых интактных и нагруженных белком HSP70 GEVs; 5) оценка эффективности нагрузки GEVs экзогенными белками; 6) оценка эффективности доставки экзогенных белков при помощи GEVs в клетки человека *in vitro*; 7) статистическая обработка всех полученных экспериментальных данных; 8) пробоподготовка для крио-ЭМ; 9) описание исследований и анализ результатов.

При активном участии автора были осуществлены: 1) эксперименты на животных с коллегами из ФГБУН института цитологии РАН Гужовой И. В., Маргулисом Б.А. и Комаровой Е.Ю., а также с сотрудниками НИЦ «Курчатовский институт»-ПИЯФ Емельяновой С.С., Бурдаковым В.С. и Верловым Н.А.; 2) эксперименты с использованием метода конфокальной микроскопии совместно с сотрудником НИЦ «Курчатовский институт» - ПИЯФ, Варфоломеевой Е.Ю. Эксперименты по крио-ЭМ были выполнены соавтором Камышинским Р.А. на оборудовании Ресурсного центра зондовой и электронной микроскопии (Курчатовский комплекс НБИКС-технологий, НИЦ «Курчатовский институт», Москва).

Все материалы и результаты, представленные в данном исследовании, обсуждались совместно с соавторами и научным руководителем.

Степень достоверности и апробация результатов. Представленные в работе результаты получены с использованием комплекса современных взаимодополняющих молекулярно-биологических, биофизических и статистических методов, адекватных поставленной задаче. Полученные результаты были проанализированы в соответствии с имеющимися на данный момент литературными источниками. Достоверность результатов подтверждается мнением рецензентов международных научных журналов и ученых, которые многократно ссылались на эти результаты в своих исследованиях.

Основные результаты диссертационной работы были представлены на следующих конференциях: 1) Международная конференция «Future of Biomedicine conference 2019» (г. Владивосток, 2019 год); 2) Всероссийский молодежный научный форум OpenScience (г. Гатчина, 2019-2023 год); 3) 8th international conference on radiation in various of research (Черногория, г. Херцег-Нови, 2020 год); 4) The 1st international electronic conference on Biomedicine (online, Швейцария, 2021 год); 5) Международный конгресс «Биотехнология: состояние и перспективы развития» (г. Москва, 2021 год); 6) XXI ежегодной молодежной конференции с международным участием ИБХФ РАН-вузы (г. Москва, 2021 год); 7) III Объединенный научный форум физиологов, биохимиков и молекулярных биологов (г. Сочи, 2022 год); 8) Всероссийская конференция «Синтетическая биология и биофармацевтика» (г. Новосибирск, 2022 год); 9) Курчатовская междисциплинарная молодежная научная школа (г. Москва, 2023 год); 10) 26-ая Пущинская школа-конференция молодых ученых с международным участием «Биология – наука XXI века» (г. Пущино, 2023 год); 11) XXIV Зимняя молодежная школа по биофизике и молекулярной биологии (г. Санкт-Петербург, 2024 год); 12) Всероссийская конференция по молекулярной онкологии (г. Москва, 2023-2024 год).

Публикации. По теме диссертации опубликовано 15 печатных работ, из них 3 научные статьи, индексируемые в международных базах данных, и 12 тезисов докладов на конференциях международного и всероссийского уровня.

Структура и объем диссертации. Диссертация изложена на 158 страницах машинописного текста, иллюстрирована 28 рисунками, содержит 1 таблицу и состоит из следующих разделов: введение, обзор литературы, материалы и методы, результаты, обсуждение, заключение, список сокращений и условных обозначений, список литературы, включающий 225 научных источников (9 – на русском языке и 216 – на английском языке).

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

1. Характеристика intactных и нагруженных белком теплового шока 70 везикул грейпфрута: морфология, размер, концентрация и эффективность нагрузки

Экстрагированные везикулы из сока грейпфрута (*Citrus paradisi*) (GEVs) нагружали экзогенными белками, в том числе белком теплового шока 70 (HSP70) человека. Введение экзогенных белков в состав GEVs осуществляли методом сочетания пассивной нагрузки и обработки ультразвуком с последующей очисткой от излишнего белка при помощи ультрафильтрации через 100 кДа фильтры (Рисунок 1В). Препараты GEVs после каждого цикла нагрузки белком HSP70 (GEV-HSP70) оценивали по размеру и концентрации при помощи анализа траектории наночастиц (НТА). Наиболее часто встречающиеся intactные везикулы имели размер 58 ± 7 нм, концентрация получаемых препаратов составила 4×10^{13} ч/мл. Существенных изменений медианного размера GEVs после нагрузки не происходит - GEV-HSP70 имели размер 56 ± 6 нм, но концентрация препаратов уменьшалась в 1.5-2 раза.

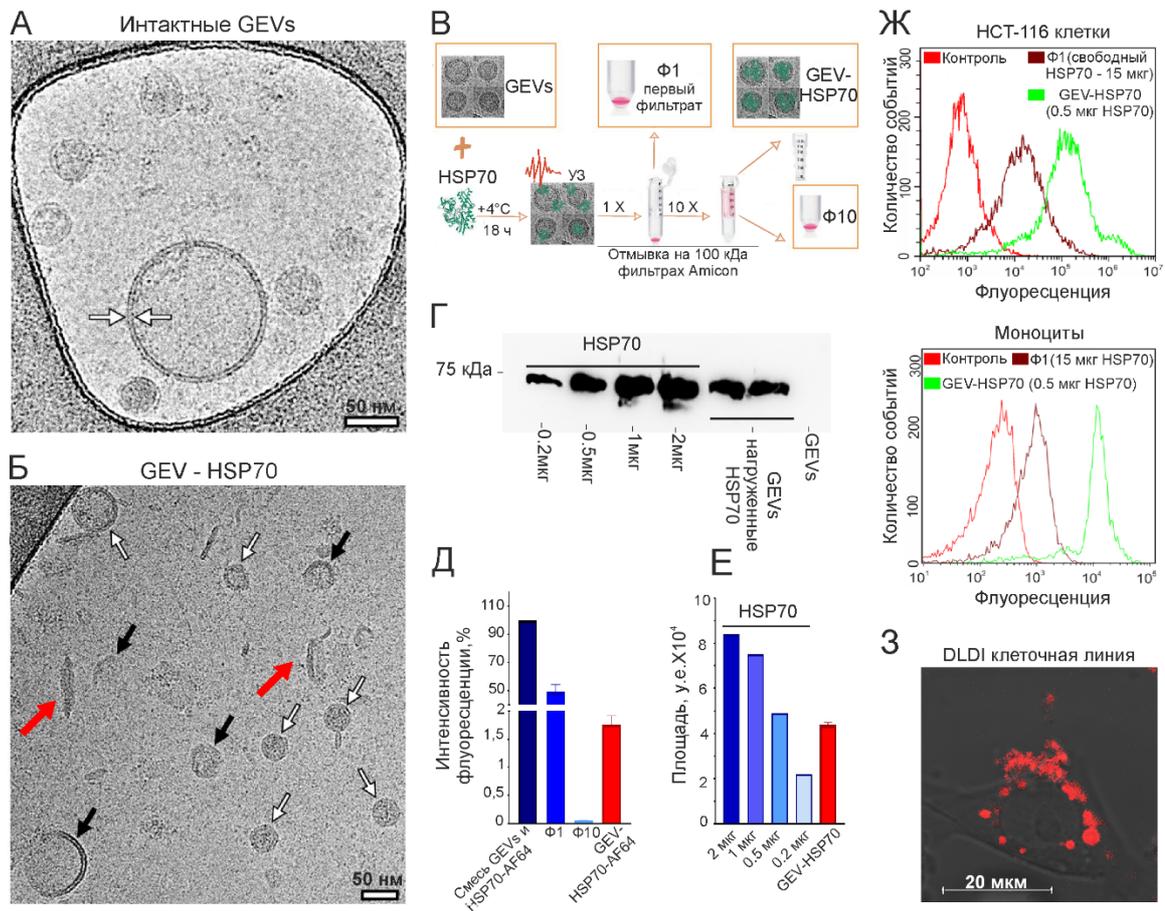


Рисунок 1 – Анализ intactных и нагруженных HSP70 GEVs. Крио-ЭМ-изображения (А) intactных GEVs и (Б) GEV-HSP70; (В) Схема процедуры нагрузки экзогенными белками GEVs; (Г) Пример определения эффективности нагрузки HSP70 в GEVs методом вестерн-блоттинга; Оценка эффективности нагрузки HSP70 в GEVs методом флуориметрии или (Е) вестерн-блоттинга; (Ж) Оценка эффективности пенетрации GEV-HSP70 в культивируемые клетки HCT-116 и моноциты крови человека; (З) Оценка накопления, флуоресцентно меченного HSP70 в цитоплазме клеток DLD1 при его доставке в составе GEVs

Морфология GEVs была охарактеризована с помощью крио-ЭМ (Рисунок 1А). Большинство частиц имели сферическую форму, средний размер 41 ± 13 нм и характерный липидный бислой толщиной 5.3 ± 0.8 нм. Единично встречались частицы с нарушенной целостностью. Крио-ЭМ анализ GEV-HSP70 (Рисунок 1Б) показал появление в образце загрязнений, обломков (красные стрелки), незначительное увеличение количества везикул с нарушенной целостностью (черные стрелки). Средний размер анализируемых частиц не изменился и составил 43 ± 15 нм.

Для оценки эффективности нагрузки в GEVs меченого флуоресцентной меткой HSP70 (HSP70-AF647) каждый образец, включая конечную суспензию нагруженных везикул, а также первый и десятый фильтраты (Ф1 и Ф10) (Рисунок 1В), были проанализированы на флуориметре (Рисунок 1Д). Ф1 содержал 50% от исходного количества свободного HSP70-AF647, Ф10 - не более 0,05%. Доля HSP70-AF647, нагруженного в GEVs, составляла около 2% от исходного количества (Рисунок 1Д), что эквивалентно 0.6 мкг HSP70-AF647 на 10^{11} везикул. Также была оценена эффективность нагрузки HSP70 в GEVs при помощи вестерн-блоттинга (Рисунок 1Г, Е). На гель были нанесены лизированные GEV-HSP70, а также HSP70 в количестве 0.2–2 мкг. После обработки полученного изображения было вычислено, что 10^{11} частиц содержат 0.5 мкг белка.

Таким образом, было показано, что GEVs представляют собой везикулы преимущественно сферической формы с липидным бислоем. GEVs могут быть нагружены экзогенными белками, при этом эффективность нагрузки составляет 0.5 мкг HSP70 на 10^{11} везикул. Процедура нагрузки существенно не меняет общую морфологию и размер GEVs, но применение ультразвука приводит к снижению числа везикул в препарате.

2. Оценка эффективности доставки экзогенных белков везикулами грейпфрута к клеткам человека *in vitro*

В исследовании была оценена эффективность доставки экзогенного HSP70-AF647 при помощи GEVs к клеткам человека *in vitro*. Нагруженные HSP70-AF647 GEVs со-культивировали с клетками рака толстой кишки человека, HCT-116, DLD1, и мононуклеарными клетками периферической крови человека в количестве 1×10^6 частиц на клетку. Методом проточной цитометрии и конфокальной микроскопии была показана высокая эффективность доставки HSP70 при помощи GEVs для всех исследованных типов клеток (Рисунок 1Ж-З). Интенсивность флуоресценции (ИФ) клеток, со-инкубированных с нагруженными HSP70-AF647 GEVs (~0.5 мкг HSP70) увеличивалась минимум в 100 раз, а при их со-инкубации со свободным HSP70-AF647 (~15 мкг) в 20 раз, что свидетельствуют о более эффективном накоплении экзогенного белка в клетках при его доставке в составе везикул грейпфрута. Подобная тенденция наблюдалась и для макрофагов крови. Послойное сканирование клеток DLD1 с помощью конфокальной

микроскопии позволило визуализировать меченые белки в цитоплазме клеток-реципиентов (Рисунок 13).

Таким образом, GEVs, нагруженные экзогенным белком, эффективно захватываются опухолевыми клетками и мононуклеарными клетками периферической крови человека *in vitro*.

3. Активация противоопухолевого иммунитета при помощи нагруженных рекомбинантным HSP70 везикул грейпфрута на клеточных моделях

Полученные результаты позволили предположить, что GEVs потенциально могут быть эффективными доставщиками HSP70 для активации противоопухолевого иммунного ответа, повышая его биодоступность и стабильность в физиологических условиях. Для проверки предположения была протестирована иммуномодулирующая активность GEV-HSP70 и рекомбинантного HSP70 на клетках СТ-26 (карциномы толстой кишки мыши) и В16 (меланомы мыши). Клетки СТ-26 и В16 предварительно инкубировали с рекомбинантным HSP70 (10 мкг/лунка), а также с GEV-HSP70 (1×10^{11} частиц/лунка; $\sim 0,5$ мкг HSP70), после чего добавляли наивные лимфоциты или натуральные киллеры (NK-клетки) и контролировали пролиферативную активность клеток в режиме реального времени (Рисунок 2).

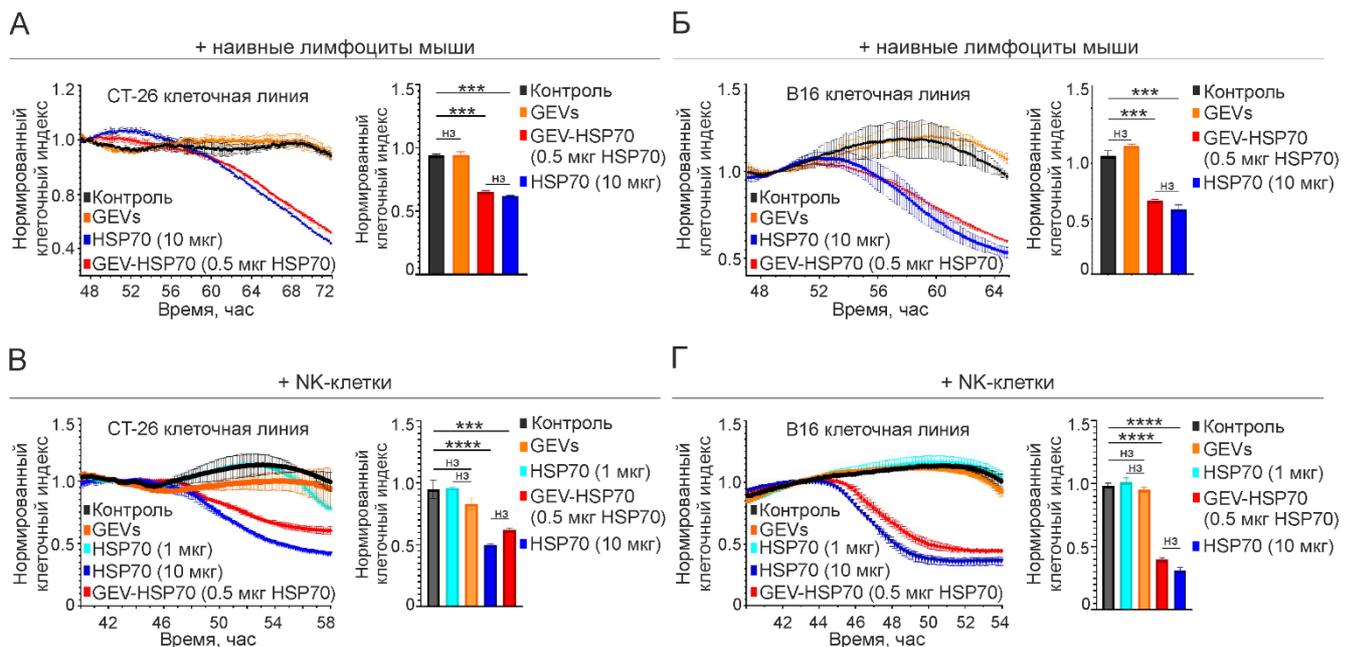


Рисунок 2 – Анализ иммуномодулирующей активности свободного и инкапсулированного в GEVs белка HSP70 *in vitro*. Пролиферативная активность прединкубированных с HSP70 и GEV-HSP70 клеток СТ-26 и В16 при воздействии (А-Б) лимфоцитарной фракции или (В-Г) NK-клеток. На гистограммах представлен сравнительный анализ клеточного индекса в последнюю точку наблюдения

Было показано усиление цитотоксического действия и лимфоцитов (Рисунок 2 А-Б), и NK-клеток (Рисунок 2 В-Г) для обеих клеточных культур при их предварительном инкубировании совместно с HSP70 в свободной форме и в составе GEVs. Наблюдаемый эффект был одинаковым, при этом HSP70 в составе GEVs было в 20 раз меньше, чем свободно добавленного.

Предварительная инкубация клеток со свободным HSP70 в количестве 1 мкг, что приблизительно соответствует его содержанию в образцах GEV-HSP70, не привело к активации NK-клеток, как и соинкубация с интактными GEVs (Рисунок 2 В-Г).

Таким образом, было показано, что добавление HSP70 в свободной форме и в составе GEVs повышает чувствительность клеток CT-26 и B16 к цитотоксическим лимфоцитам мыши и NK-клеткам человека. При этом шаперон HSP70 в составе GEVs накапливается в культивируемых опухолевых клетках более эффективно, обуславливая активацию противоопухолевого иммунитета от количества белка в 20 раз меньшего, чем при его добавлении в свободной форме.

4. Нагруженные HSP70 GEVs замедляют рост опухоли на мышинной модели меланомы

В работе была проанализирована терапевтическая эффективность GEV-HSP70 на мышинной модели меланомы кожи *in vivo*. Самцам мышей BALB/c прививали подкожно клетки B16 и спустя 5 дней развития опухолевого узла начинали терапию, заключающуюся в наружной обработке гидрогелем, смешанным с GEV-HSP70 (4×10^{11} частиц/мышь; ~ 2 мкг HSP70), рекомбинантным HSP70 - 50 мкг/доза («HSP70 50 мкг») и 2 мкг/доза («HSP70 2мкг»), а также наносили гидрогель («Контроль») и гидрогель с нагруженными BSA GEVs («GEV-BSA»), чтобы убедиться в специфичности действия белка HSP70.

На 21-й день терапии были вырезаны опухолевые новообразования (Рисунок 3А) и взвешены (Рисунок 3Б). Было показано значительное, более чем в 20 раз, снижение массы опухоли в группах «GEV-HSP70» и «HSP70 50 мкг» относительно группы контроля. В обеих группах наблюдали статистически равный противоопухолевый эффект (Рисунок 3Б), при этом в составе везикул HSP70 в 25 раз меньше, что свидетельствует о более эффективной доставке инкапсулированного в GEVs белка *in vivo*. Снижение в 7 раз массы опухолевого узла наблюдалось в группе «HSP70 2мкг», при этом добавление HSP70 в подобной дозе на клеточной культуре не приводило к цитотоксическим эффектам от лимфоцитов и NK-клеток (Рисунок 2Г). Такое разногласие может быть связано с тем, что в опыте на животной модели меланомы кожи HSP70 в свободной форме или в составе везикул добавляли периодически. Не было показано какого-либо влияния на массу опухоли при терапии GEV-BSA (Рисунок 3Б), что указывает на специфичность наблюдаемых эффектов к HSP70.

В течение 21 дня производили замеры опухоли, после чего анализировали скорость роста опухолевого узла. В группах «HSP70 2мкг», «HSP70 50 мкг» и «GEV-HSP70» значительное снижение размера опухоли было обнаружено уже на 10-й день терапии (Рисунок 3В). Так для группы «HSP70 2мкг» на 10-й, 13-й и 17-й день наблюдения размер опухоли был меньше в 3-4 раза относительно группы «Контроль». Значимые различия были детектированы в группе

«HSP70 50 мкг» - размер опухоли был снижен в 50-75 раз, а в группе «GEV-HSP70» в 53 раза на 10-й день терапии, в 139 раз на 13-й и в 272 раза на 17-й день наблюдения. На 21-й день в группах «HSP70 50 мкг и «GEV-HSP70» объём опухоли соответственно в 56 и 227 раз был меньше относительно контрольной группы. Для группы «GEV-BSA» не было показано значительных отличий в размере опухолевого узла относительно группы «Контроль» (Рисунок 3В).

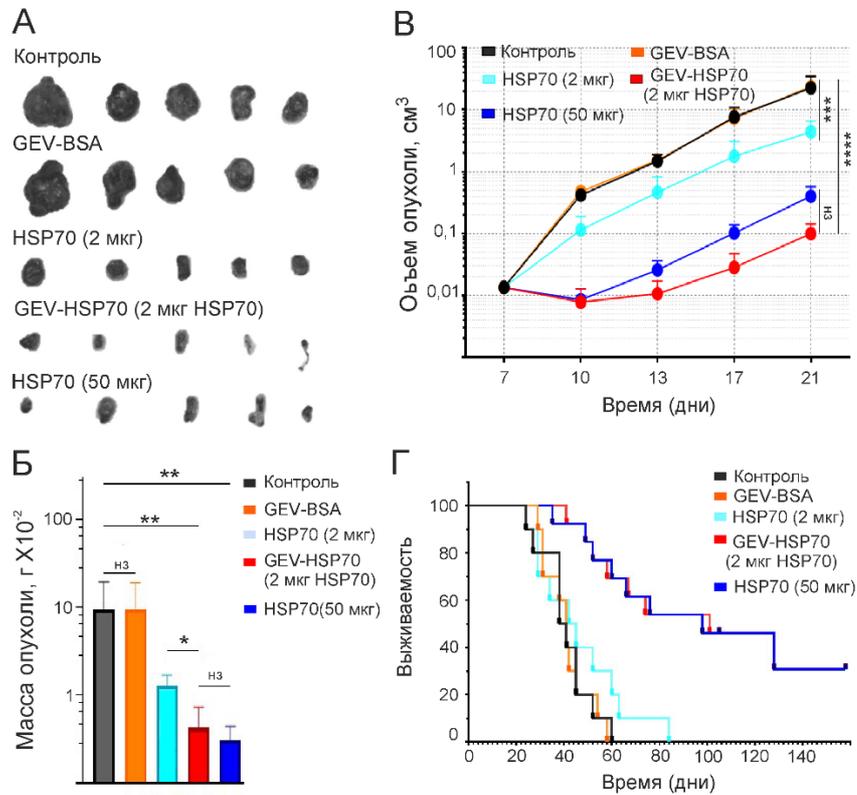


Рисунок 3 – Противоопухолевый эффект HSP70 и GEV-HSP70 на мышинной модели меланомы кожи (индукция патологии - V16 клеточная линия). (А) Фото опухолей; (Б) Сравнительный анализ массы опухолевых новообразований (N=8); (В) Анализ скорости роста опухолевого узла; (Г) Продолжительность жизни животных (N=10)

Задержка роста опухоли в группах, получавших терапию нагруженным в GEVs и свободным HSP70, может приводить к увеличению продолжительности жизни экспериментальных животных (Рисунок 3Г), что было продемонстрировано в течение 160 дней терапии и наблюдения за животными. Гибель мышей, принадлежащих к группам «Контроль» и «GEV-BSA», наступила в течение 24-60 дней (в среднем 41 ± 11 дней) и 29-58 дней (в среднем 41 ± 10 дней), соответственно, тогда как в группе «GEV-HSP70» и «HSP70 50 мкг» смертельный исход был отложен до 41-160-го дня и 35-128-го дня, соответственно (в среднем 71 ± 30 дней) для 8 животных, и две мыши из этих группы прожили еще не менее 2 месяцев (Рисунок 3Г).

Таким образом, было показано, что нагруженные HSP70 GEVs способствовали увеличению продолжительности жизни и снижению скорости развития опухолевого узла на мышинной модели меланомы кожи.

5. Противоопухолевый эффект GEV-HSP70 на мышинной модели карциномы толстой кишки обусловлен активацией специфического иммунного ответа

В работе была оценена противоопухолевая активность GEV-HSP70 и вовлеченность иммунной системы в наблюдаемые эффекты *in vivo* на мышинной модели карциномы толстой кишки. Для этого мышам линии BALB/c подкожно вводили клетки CT26iRFP720-E2A-Luc, экспрессирующие люциферазу (далее CT-26), смешанные с GEV-HSP70 (4×10^{11} ч/мышь; 2 мкг HSP70), или с HSP70 50 мкг/доза («HSP70»), или с интактными GEVs («GEVs»), а также в качестве контроля вводили необработанные клетки («Контроль»). Каждая группа состояла из 18 особей.

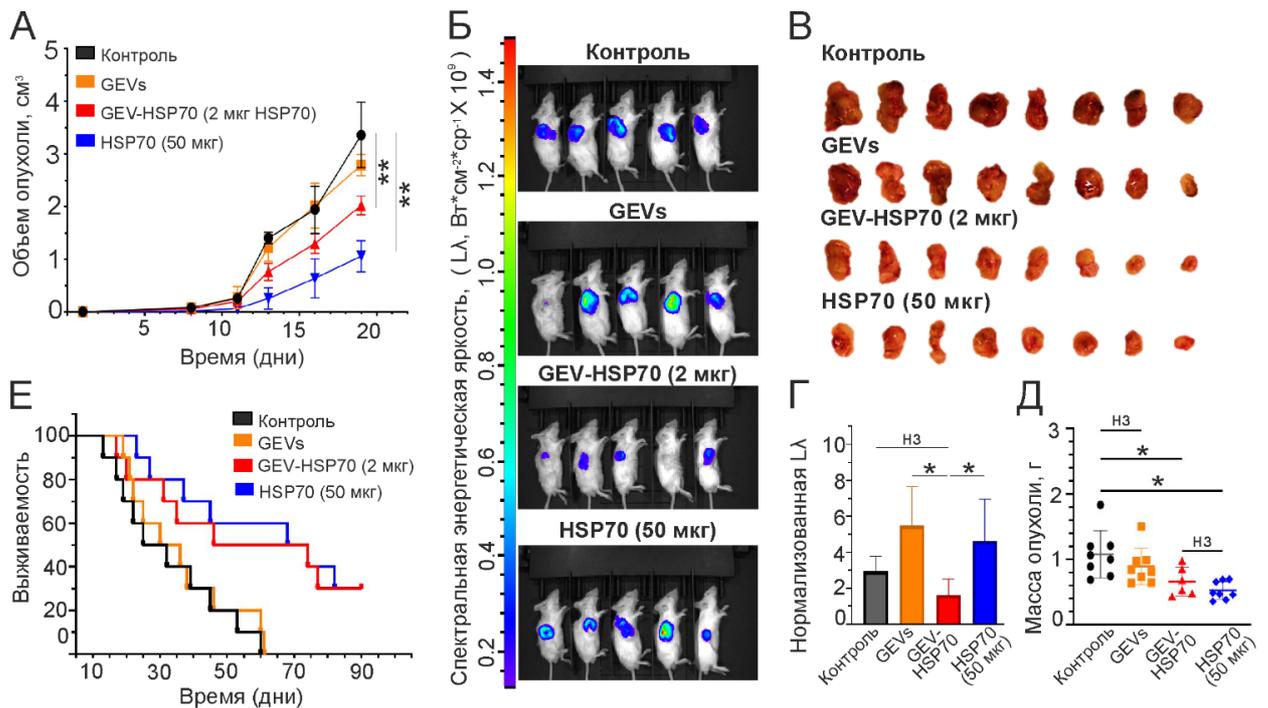


Рисунок 4 – Противоопухолевая активность GEV-HSP70 на мышинной модели карциномы толстого кишечника мыши CT-26. (А) Анализ скорости роста опухолевого узла; (Б) Прижизненная визуализация опухолевых новообразований; (В) Фото опухолевых новообразований; (Г) Анализ размера опухоли по спектральной энергетической яркости, полученной при биовизуализации (N=5); (Д) Анализ массы вырезанных опухолей (N=8); (Е) Продолжительность жизни животных (N=10)

В течение 21 дня после инъекции проводили прямые измерения сформировавшегося опухолевого узла. Была обнаружена задержка роста опухолей в группе «HSP70» с 8-го дня наблюдения и с 19-го в группе «GEV-HSP70» (Рисунок 4А); их объем в последний день измерения был значимо ниже относительно групп «Контроль» или «GEVs» (2.0 ± 0.2 см³ для «GEV-HSP70» или 1.0 ± 0.4 см³ для «HSP70» против 3.4 ± 0.6 см³ и 2.7 ± 0.4 см³, соответственно, для «Контроль» и «GEVs»).

По 8 животных из каждой группы были случайным образом отобраны для измерения размера опухоли (Рисунок 4Б, Г), массы (Рисунок 4В, Д) и оценки их иммунологических

характеристик (Рисунок 5-6). При помощи системы биолюминесцентной визуализации IVIS было показано, что средняя яркость опухолей в группе «GEV-HSP70» в 4 раза меньше, чем в группе «Контроль», и в 5.8 раз меньше, по сравнению с группой «GEVs». Люминесценция опухолей из группы «HSP70» статистически не отличалась от таковой в группе «Контроль» и «GEVs» (Рисунок 4Б, Г). Опухоли были выделены у восьми животных из каждой группы (Рисунок 4В) и взвешены (Рисунок 4Д). Масса опухолей в группе «Контроль» или в группе «GEVs» была в два раза выше, чем в группах «HSP70» и «GEV-HSP70» (0.5 ± 0.3 г и 0.5 ± 0.2 г для «GEV-HSP70» и «HSP70», соответственно, по сравнению с 1.1 ± 0.4 г и 0.9 ± 0.2 г для групп «Контроль» и «GEVs»).

В течение 90 дней наблюдали за выживаемостью мышей, в результате чего было показано двукратное увеличение продолжительности жизни животных в группах «HSP70» и «GEV-HSP70», по сравнению с контрольной группой (Рисунок 4Е), при этом добавление интактных GEVs никак не повлияло на продолжительность жизни.

Таким образом, на мышинной модели карциномы толстого кишечника мыши GEV-HSP70 способствовали торможению роста опухолевого узла по показателям массы и размера опухоли, а также увеличению продолжительности жизни, по сравнению с группами контроля, с такой же эффективностью, как и свободный рекомбинантный HSP70 в большей концентрации.

Чтобы проанализировать, возможно ли стимулирование иммунного ответа у животных при введении HSP70, на 21 день роста опухоли были взяты образцы крови с последующим ИФА-анализом уровней TGFB1 и IL-10. В плазме крови мышей групп «HSP70» и «GEV-HSP70» наблюдалось значительное снижение уровней IL-10 и TGFB1, по сравнению с контрольной группой (Рисунок 5). Также стоит отметить, что в группе «GEVs» наблюдали 2-кратное снижение уровня провоспалительного IL-10 в плазме крови (Рисунок 5Б).

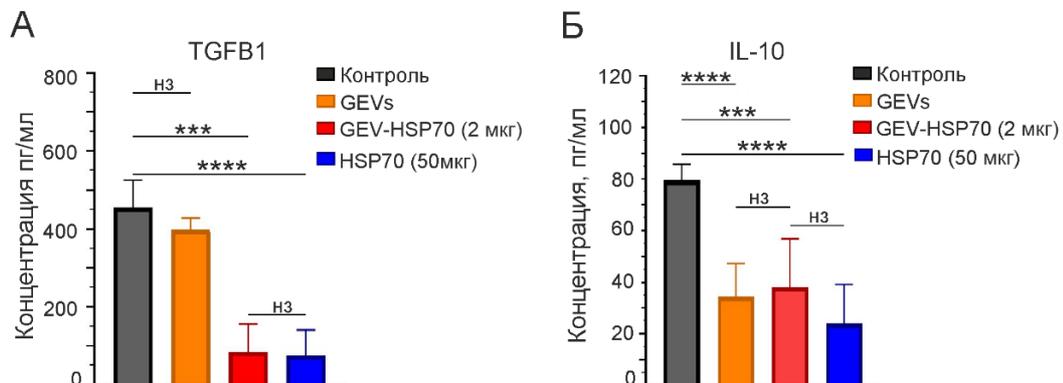


Рисунок 5 – Оценка концентрации цитокинов (А) TGFB1 и (Б) IL-10 в плазме крови мышей экспериментальных и контрольных групп

Также была осуществлена оценка эффективности активации специфического иммунного ответа (Рисунок 6). Для этого к клеткам СТ-26 добавляли общую фракцию лимфоцитов,

полученную из селезенки экспериментальных мышей (Рисунок 6А) и фракцию цитотоксических CD8+Т-лимфоцитов (Рисунок 6В), полученную из общей фракции лимфоцитов, после чего оценивали пролиферативную активность клеток в режиме реального времени. Было показано, что при добавлении общей фракции лимфоцитов или CD8+Т-клеток, полученных от групп мышей «HSP70» и «GEV-HSP70», уровень жизнеспособности клеток снижался соответственно на 30% и 20%. Добавление фракции лимфоцитов, обедненной CD8+Т-клетками не приводило к цитотоксическим эффектам (Рисунок 6Б).

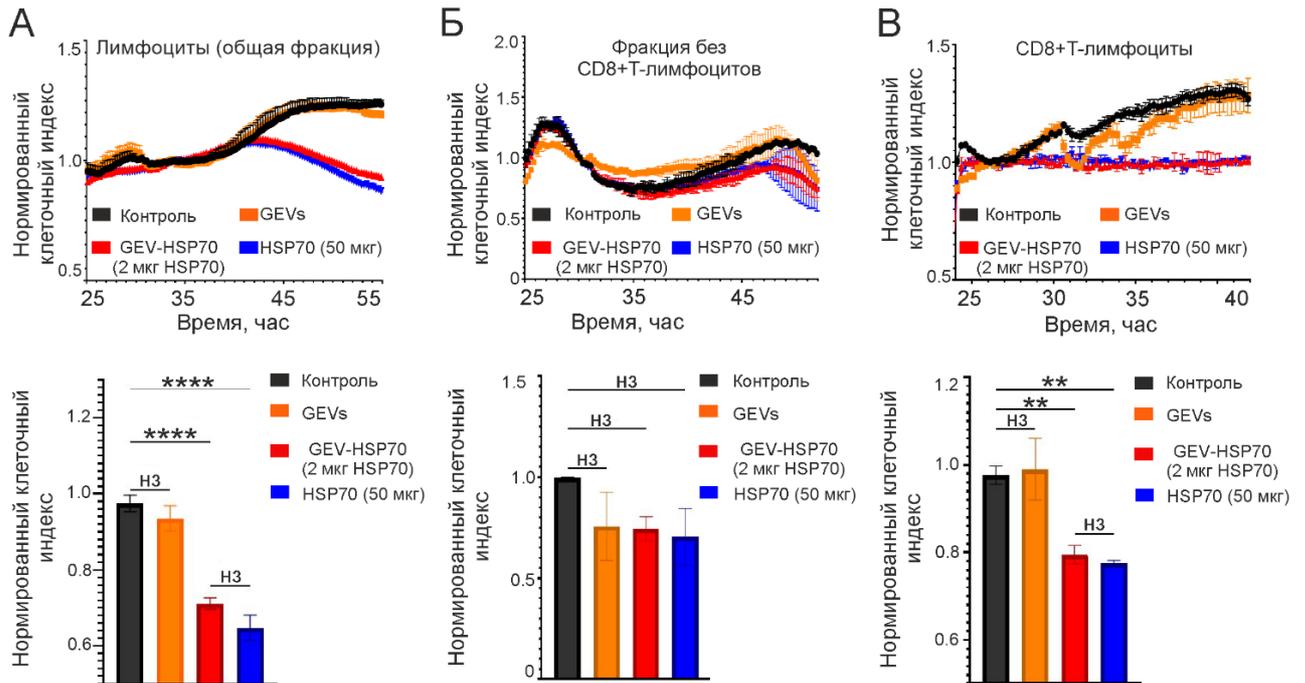


Рисунок 6 – GEV-HSP70 и свободный HSP70 индуцируют специфический противоопухолевый иммунный ответ на мышинной модели колоректальной аденокарциномы. (А) Анализ пролиферативной активности клеток СТ-26 при воздействии общей фракции лимфоцитов, выделенных из селезенки мышей экспериментальных и контрольных групп; (Б) Влияние обедненной CD8+ Т-клетками фракции лимфоцитов на пролиферативную активность клеток СТ-26; (В) Цитостатическое действие CD8+Т-лимфоцитов мышей экспериментальных и контрольных групп на пролиферацию клеток СТ-26 (N=8)

Полученные данные свидетельствуют о том, что доставка HSP70 к опухолевым клеткам СТ-26 в составе везикул грейпфрута приводит к увеличению продолжительности жизни экспериментальных животных, к замедлению скорости роста опухоли, а также к уменьшению массы и размера опухолевого новообразования. При этом противоопухолевые эффекты от нагруженных HSP70 GEVs сравнимы с действием свободного HSP70, количество которого в 25 раз превышает его содержание в GEVs. В наблюдаемых *in vivo* противоопухолевых эффектах участвуют специфические CD8+ Т-лимфоциты.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Для высоко консервативного белка HSP70, играющего ключевую роль в поддержании белкового гомеостаза, описана двойная роль в развитии злокачественных новообразований - повышение его содержания в опухолевых клетках усиливает их защиту от различных цитотоксических факторов, одновременно с этим при сверхэкспрессии HSP70 наблюдается появление шаперона на поверхности клеток и во внеклеточном пространстве, что приводит к сенсбилизации специфического и гуморального иммунного ответа [Guzhova и др., 2016].

Было показано, что введение в опухолевые клетки рекомбинантного HSP70 способствует экстружии внутриклеточного аналога на поверхность клеток и во внеклеточное пространство в свободной форме и в связанной с экзосомами [Komarova и др., 2021]. В ряде лабораторных исследований на клеточных моделях и на экспериментальных животных с индуцированной патологией было показано восстановление цитотоксической активности NK-клеток и Т-лимфоцитов, сопровождающееся смещением цитокинового профиля, характерного для иммуносупрессивной среды [Shevtsov и др., 2014; Udonо и др., 1993; Gastpar и др., 2005; Calderwood и др., 2008; Shevtsov и др., 2019; Shevtsov и др., 2015]. Проведенное клиническое испытание убедительно продемонстрировало возможность использования HSP70 для терапии глиомы, но при этом клинический ответ был ограниченным, что поставило задачу усовершенствования подхода иммунотерапии на основе рекомбинантного HSP70, в том числе за счет увеличения дозы препарата [Shevtsov и др., 2014] или конъюгации с наночастицами [Zhang и др., 2020; Shevtsov и др., 2015].

Экстраклеточные везикулы млекопитающих в последние годы подробно изучены в качестве нанофармакологических систем доставки биомолекул различной природы: белков, RNA, пептидов и низкомолекулярных соединений [Andaloussi и др., 2013; Batrakova E. и др., 2019; Alvarez-Erviti и др., 2011; Chen и др., 2020]. Накапливающиеся экспериментальные данные об успешном использовании экзосом в биомедицине привело к вопросу об их получении в производственных масштабах, что, в свою очередь, стало камнем преткновения для дальнейшей перспективы их использования по нескольким причинам, среди которых очевидны этические ограничения и дороговизна получения в больших количествах.

Необходимость поиска нового источника экзосомоподобных частиц привела к рассмотрению растений в качестве перспективных в производственном ключе продуцентов.

В данной работе предложена новая гипотеза использования рекомбинантного HSP70, введенного в состав растительных везикул на примере GEVs, для активации компонентов иммунного ответа при опухолевых патологиях.

Доставленный при помощи GEVs HSP70 проявлял противоопухолевую иммуномодулирующую активность, сравнимую с введенным в 25 раз большем количестве свободным рекомбинантным HSP70, на мышинной модели карциномы толстой кишки. На мышинной модели меланомы кожи использование инкапсулированного в GEVs рекомбинантного HSP70 приводило к значительно более выраженным противоопухолевым эффектам, чем при его введении в свободной форме в том же количестве. В целом, предложенный способ доставки рекомбинантного HSP70 в составе GEVs способствует более эффективному накоплению белка в цитоплазме клеток человека.

Внеклеточные везикулы растительного происхождения в настоящее время, несмотря на возрастающий интерес, остаются недостаточно изученными. В последние годы удалось предсказать их биогенез и функции, а также получить и охарактеризовать PEVs ряда продуцентов [Xiao и др., 2018]. В представленной работе везикулы сока грейпфрута впервые подробно охарактеризованы при помощи крио-ЭМ в их нативном состоянии по форме, морфологии, наличию липидного бислоя, что позволяет провести аналогию по физическим параметрам с экзосомами млекопитающих.

Последние несколько лет в обзорных работах указывалась перспектива замены экзосом биожидкостей и культуральных сред млекопитающих на экзосомоподобные частицы растений, но на практике такая возможность была протестирована единичными исследовательскими группами, продемонстрировавшими эффективную нагрузку и доставку на животных и клеточных моделях низкомолекулярных соединений и siRNA в основном липосомами, созданными из липидов растительных везикул [Wang и др., 2013; Wang и др., 2015]. Стоит заметить, что конструирование таких липосом удлинит процедуру создания терапевтической формы и повышает ее стоимость, что, несомненно, существенно отразится на производстве. Более того, ранее не сообщалось о возможности доставки экзогенных терапевтических белков в составе растительных везикул. В работе была отработана процедура получения не токсичных препаратов везикул грейпфрута и осуществлена процедура нагрузки именно нативных GEVs с последующей демонстрацией эффективной доставки рекомбинантного белка HSP70, способного активировать врожденный и адаптивный иммунный ответ на клеточных и животных моделях.

Многообразие растительных продуцентов очевидно, и стоит в дальнейшем направить поиски на самого эффективного доставщика, в том числе среди одноклеточных водорослей, которые могли бы стать биотехнологически выгодными, учитывая возможности их выращивания на биореакторах. Поиск же маркера для растительных везикул мог бы удешевить и упростить задачу их экстракции при применении методов, основанных на принципах иммунопреципитации.

Несмотря на осуществляемые в данный момент клинические исследования терапевтических свойств PEVs, недостаточно информации об их производстве согласно системе правил Надлежащей производственной практики (GMP), но уже проведены некоторые доклинические исследования. Хотя для PEVs нет информации о специфическом маркере, такие методы как просвечивающая электронная микроскопия, НТА и SDS-PAGE, используемые для определения характеристик PEVs, аналогичны методам анализа экзосом животного происхождения. Следовательно, разработка везикул растительного происхождения GMP-класса, в частности очистка, может соотноситься с разработками для экзосом [Chen и др., 2020].

Данное исследование демонстрирует нагрузку одного типа молекул – глобулярных белков. Также перспективными в качестве потенциальных терапевтических агентов считаются такие биомолекулы как siRNA и miRNA, но процедуру их нагрузки еще предстоит отработать.

Немаловажным остается момент, затронутый в работе – противоопухолевая терапия. Было показано, что доставленный при помощи GEVs HSP70 способствует замедлению развития опухолевых новообразований и увеличению продолжительности жизни экспериментальных животных, привитых подкожно клетками карциномы толстой кишки и меланомы кожи. Но, если говорить не о модельных объектах, то важно, чтобы везикулы попадали исключительно в опухолевые клетки, то есть, они должны быть направленными. Задача нацеливания PEVs на клетки-мишени дает тему для отдельного большого исследования, решение которой станет важным шагом к готовой лекарственной форме. В данной работе показано на животных моделях, что растительные везикулы могут эффективно накапливаться в печени, почках, селезенке и, что интересно, могут способствовать накоплению экзогенного белка в головном мозге.

Таким образом, представленная работа может явиться основой для дальнейших исследований и усовершенствования разработок нанофармакологических систем доставки на основе растительных везикул, в том числе для противоопухолевой терапии.

На основе полученных данных были сделаны следующие выводы:

1) Разработана методика выделения и нагрузки экзогенными белками везикул плодов грейпфрута. Получены данные о физических и морфологических параметрах GEVs: сферическая форма, липидный бислой, отрицательный Z-потенциал, размер - 50-110 нм.

2) На примере модельного белка BSA и шаперона HSP70 показано, что внеклеточные везикулы грейпфрута могут быть эффективно нагружены экзогенными белками. Такая упаковка повышает биодоступность инкапсулированных белков *in vitro* и *in vivo*, при этом рекомбинантный HSP70 сохраняет свою функциональную активность.

3) Шаперон HSP70, доставленный в опухолевые клетки в составе GEVs, способствует увеличению продолжительности жизни лабораторных животных и снижению скорости роста опухолевого узла на мышинной модели карциномы толстой кишки и меланомы кожи.

4) HSP70, доставленный при помощи GEVs, активирует цитотоксические лимфоциты и NK-клетки *in vitro* и модулирует CD8+Т-клеточный противоопухолевый иммунитет *in vivo*.

СПИСОК ПУБЛИКАЦИЙ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

Список публикаций, индексируемых в базах Scopus/ Web of Science:

1. L. Garaeva, R. Kamyshinsky, Yu. Kil, E. Varfolomeeva, Yu. Garmay, S. Landa, A. Kagansky, I. Vinnikov, A. Myasnikov, V. Burdakov, E. Komarova, I. Guzhova, B. Margulis, A. L. Konevega, T. Shtam. Delivery of functional exogenous proteins by plant vesicles to human cells *in vitro* // Scientific Reports. – 2021. – V.11. – P. 648;
2. A. Kilasoniya, L. Garaeva, T. Shtam, A. Spitsyna, E. Putevich, B. Moreno-Chamba, J. Salazar-Bermeo, E. Komarova, A. Malek, M. Valero. Potential of plant exosome vesicles from grapefruit (*Citrus × paradisi*) and tomato (*Solanum lycopersicum*) juices as functional ingredients and targeted drug delivery vehicles// Antioxidants. – 2023. - V.12. – P. 943;
3. L. Garaeva, E. Komarova, S. Emelianova, E. Putevich, A. Konevega, B. Margulis, I. Guzhova, T. Shtam. Grapefruit-derived vesicles loaded with recombinant HSP70 activate antitumor immunity in colon cancer *in vitro* and *in vivo* // Biomedicines. – 2024. – V.12. – P.:2759.

Список тезисов докладов конференций, индексируемых РИНЦ:

1. Л. Гараева, Н. Верлов, В. Бурдаков, Е. Варфоломеева, С. Ланда, А. Волницкий, В. Егоров, А. Коневега, Т. Штам. Везикулы растительного происхождения как система доставки противоопухолевых препаратов в клетки человека// Сборник аннотации докладов VI Всероссийского молодежного научного форума «Open Science 2019». – 2019. – С. 222-223.
2. Л. Гараева, Р. Камышинский, Е. Варфоломеева, Ю. Гармай, С. Ланда, В. Бурдаков, Ю. Киль, И. Винников, А. Каганский, Е. Комарова, Б. Моргулис, А. Коневега, Т. Штам. Потенциал использования везикул растительного происхождения для доставки биомолекул // Сборник аннотаций докладов VII Всероссийского молодежного научного форума «Open Science 2020». – 2020. – С.110–111.
3. L. Garaeva, R. Kamyshinsky, E. Varfolomeeva, S. Landa, Yu. Kil, E. Komarova, A. Konevega, T. Shtam. Plant-derived vesicles as a drug delivery system to human cells *in vitro*// 8th international conference on radiation in various fields of research. – 2020. – P.13.
4. Л. Гараева, Р. Камышинский, Е. Варфоломеева, С. Ланда, Ю. Киль, Е. Комарова, Е. Путевич, А. Коневега, Т. Штам. Везикулы растительного происхождения как доставщики экзогенных

функциональных биомолекул // Материалы международного конгресса «Биотехнология: состояние и перспективы развития». – 2021. – С. 59–61.

5. Л. Гараева, Е. Путевич, Е. Ястремский, Р. Камышинский, А. Спицына, С. Ланда, А. Коневега, Т. Штам. Везикулы растительного происхождения – перспективные участники систем доставки терапевтических биомолекул // Сборник аннотаций докладов VIII Всероссийского молодежного научного форума «Open Science 2021». – 2021. – С. 231.

6. Л. Гараева, Е. Путевич, Е. Ястремский, Р. Камышинский, С. Ланда, А. Спицына, А. Коневега, Т. Штам. Потенциал использования экзосомоподобных частиц растительного происхождения в системах доставки терапевтических биомолекул// Труды XXI ежегодной молодежной конференции с международным участием ИБХФ РАН-вузы «Биохимическая физика». –2021. – С. 55–57.

7. Л. Гараева, Р. Камышинский, Е. Варфоломеева, С. Ланда, Ю. Киль, Е. Путевич, Е. Комарова, А. Коневега, Т. Штам. Везикулы растительного происхождения – эффективные доставщики функциональных экзогенных биомолекул// Сборник тезисов III Объединенный научный форум физиологов, биохимиков и молекулярных биологов. VII Съезд биохимиков России. X Российский симпозиум «белки и пептиды». – 2021. –С. 275.

8. Л. Гараева, С. Емельянова, Е. Комарова, Е. Путевич, А. Спицына, Т. Штам. Растительные экзосомы – переносчики терапевтического экзогенного белка HSP70 в клетки человека // Материалы всероссийской конференции «Синтетическая биология и биофармацевтика». – 2022. – С.134.

9. Л. Гараева, Е. Комарова, С. Емельянова, И. Гужова, Б. Маргулис, А. Коневега, Т. Штам. Активация противоопухолевого иммунного ответа при помощи нагруженных экзогенным HSP70 везикул растительного происхождения// Сборник тезисов XVII Курчатовской междисциплинарной молодёжной научной школы. – 2023. – С.11.

10. Л. Гараева, Е. Комарова, С. Емельянова, И. Гужова, Б. Маргулис, А. Коневега, Т. Штам. Растительные везикулы – переносчики терапевтического экзогенного белка HSP70// Сборник тезисов 26-ой Пушинской школы-конференции молодых ученых с международным участием «Биология – наука 21 века». – 2023. – С.18.

11. L. Garaeva, N. Verlov, V. Burdakov, E. Varfolomeeva, S. Landa, A. Volnitskiy, V. Egorov, A. Konevega, T. Shtam. Delivery of exogenous RNA or proteins to human cells by plant exosome-like nanovesicles // Future of Biomedicine conference. – 2019. - P.66.

12. L. Garaeva, R. Kamyshinsky, Yu. Kil, E. Varfolomeeva, Yu. Garmay, S. Landa, I. Vinnikov, A. Kagansky, E. Komarova, A. Konevega, T. Shtam. Potential to use plant-derived extracellular vesicles as nanocarriers of exogenous bioactive molecules// 1st International electronic conference on biomedicine. – 2021. – online (<https://ecb2021.sciforum.net>).