

*А.К. Сомов¹, Н.В. Юнусова², Т.А. Штам^{3,4}, К.В. Проскура^{1,5}, Е.А. Замбалова²,
П.П. Лактионов¹, С.Н. Тамкович^{1,6}*

ADAM-10 на поверхности экзосом крови больных раком молочной железы: новые механизмы опухолевой диссеминации

¹Институт химической биологии и фундаментальной медицины Сибирского отделения Российской академии наук, Новосибирск,

²Томский НИИ онкологии, Томск,

³«НМИЦ онкологии им. Н.Н. Петрова» Минздрава РФ, Санкт-Петербург,

⁴НИЦ «Курчатовский институт»-ПИЯФ, Гатчина,

⁵Новосибирский областной онкологический диспансер, Новосибирск,

⁶Новосибирский государственный университет, Новосибирск

Экзосомы участвуют в развитии новообразований, в том числе путем увеличения подвижности опухолевых клеток и повышения их инвазивного потенциала. Поскольку не ясно, насколько вовлечены экзосомы, ассоциированные с поверхностью форменных элементов, в диссеминацию опухолевого процесса, данная работа посвящена оценке уровня тетраспанин-ассоциированной металлопротеиназы ADAM-10 на поверхности экзосом плазмы и суммарных экзосом крови здоровых женщин (n=30), больных с мастопатией (n=28) и раком молочной железы (РМЖ, n=32). Микровезикулы из образцов крови и культуральной среды MCF-7 были выделены методом ультрафильтрации и ультрацентрифугирования. При помощи проточной цитофлуориметрии с антителами против универсальных экзосомальных маркеров обнаружено, что в препаратах микровезикул из крови здоровых женщин и онкологических больных преобладают CD9- и CD24-положительные субпопуляции экзосом. Сравнительный анализ уровня ADAM-10 на поверхности экзосом плазмы и суммарных экзосом в крови здоровых женщин и онкологических больных показал отсутствие достоверных отличий в обеих субпопуляциях экзосом, за исключением больных РМЖ люминального типа. В последнем случае на поверхности CD9-положительных экзосом плазмы выявлено достоверное повышение уровня шеддазы и снижение — на поверхности суммарных экзосом, коррелирующее с увеличением доли свободно циркулирующих экзосом в плазме крови. Полученные данные позволяют предположить, что при развитии рака молочной железы увеличение уровня ADAM-10 на поверхности экзосом снижает возможность связывания везикул с формен-

ными элементами крови, повышая тем самым их концентрацию в крови, что, в свою очередь, позволяет экзосомам выполнять роль посредников в обеспечении межклеточной коммуникации, влияя на развитие как первичного новообразования, так и отдаленных метастазов. Кроме того, повышенный уровень ADAM-10 на поверхности экзосом больных раком молочной железы может в значительной степени определять опухолевый рост и диссеминацию, модифицируя локальное микроокружение и делая доступными заключенные в матрикс ростовые факторы, с одной стороны, и растворяя компоненты внеклеточного матрикса и повышая миграционную и инвазивную активность опухолевых клеток, с другой.

Ключевые слова: экзосомы, ADAM-10, кровь, рак молочной железы

Злокачественные новообразования на протяжении многих лет занимают лидирующие позиции по показателям заболеваемости и смертности среди населения [1]. Онкологические больные с распространенным процессом имеют низкую эффективность лечения и высокую смертность [6]. В связи с этим, актуальной задачей молекулярной онкологии является выяснение механизмов развития опухоли, в частности, факторов, влияющих на увеличение подвижности раковых клеток и повышение их инвазивного потенциала, приводящие к метастазированию новообразования.

Важную роль в прогрессировании злокачественных новообразований играют экзосомы — мембранные микровезикулы, размером 30-100 нм, высвобождающиеся во внеклеточную среду в процессе слияния мультивезикулярных тел с плазматической мембраной [17]. Наиболее часто встречающимися конститутивными белками экзосом являются тетраспанины [17]. Тетраспа-

нин-ассоциированные экзосомальные протеиназы (ADAM-протеиназы, матричные металлопротеазы, дезинтегрин) вовлечены в процессы клеточной подвижности, миграции, инвазии и формирование метастазов [11]. ADAM-10 — наиболее распространенная экзосомальная металлопротеиназа с широкой субстратной специфичностью [12]. Эта шеддаза участвует в эктодоменном гидролизе различных субстратов, включая рецепторы факторов роста, рецепторы адгезии и кадгеринов, что в результате приводит к повышению мобильности клеток и увеличивает метастатический потенциал опухолевых клеток [11].

Поскольку ранее было показано, что экзосомы способны связываться с поверхностью клеток, стимулируя их адгезию [9], мы предположили, что экзосомы могут быть связаны и с форменными элементами крови. Действительно, в пилотном исследовании нами были получены данные о наличии экзосом на поверхности форменных элементов крови [2]. Однако на сегодня не выяснен целый ряд важных вопросов, касающихся природы, функций и диагностической значимости ассоциированных с клеточной поверхностью экзосом.

Целью представленной работы являлась сравнительная оценка уровня тетраспанин-ассоциированной металлопротеиназы ADAM-10 на поверхности экзосом плазмы и суммарных экзосом (фракция содержит экзосомы плазмы и экзосомы, ассоциированные с форменными элементами) в крови клинически здоровых женщин, больных мастопатией и раком молочной железы, что впервые позволит оценить роль экзосом, ассоциированных с форменными элементами, в клеточной подвижности.

Материалы и методы

Образцы крови здоровых женщин ($n = 30$, средний возраст 44 ± 4 года) были получены из Центральной клинической больницы СО РАН, больных с диффузной мастопатией ($n = 28$, средний возраст 42 ± 3 года) и первичных больных раком молочной железы (табл. 1) — из Новосибирского областного онкологического диспансера. Работу проводили с соблюдением принципов добровольности и конфиденциальности в соответствии с Основами законодательства РФ об охране здоровья граждан. Стадию заболевания определяли по TNM-классификации. Образцы крови (9 мл) после забора путем венопункции в вакутейнеры, содержащие K_3 -EDTA, хранили при 4°C и обрабатывали в ближайший час.

Экзосомы выделяли из культуральной среды клеток карциномы молочной железы MCF-7, из плазмы и супернатантов, содержащих суммарную фракцию путем ультрафильтрации с последующим ультрацентрифугированием [2]. В частности, образец крови делили на две равные части и из одной части получали экзосомы плазмы, а из другой — суммарные экзосомы (фракция содержит экзосомы плазмы и экзосомы, ассоциированные с форменными элементами). Для этого из образца крови объемом 4.5 мл осаждали форменные элементы центрифугированием в течение 20 мин

при 290 g и 4°C , супернатант повторно центрифугировали в течение 20 мин при $1\ 200 \text{ g}$ и 4°C . Для удаления клеточного дебриса образцы плазмы центрифугировали при $17\ 000 \text{ g}$ 4°C в течение 20 мин. Для удаления везикул более 100 nm , супернатант разводили в 5 раз фосфатно-солевым буфером (10 mM фосфатный буфер, 0.15 M NaCl , $\text{pH } 7.5$) (ФБ) и фильтровали через фильтр с диаметром пор 100 nm (Minisart high flow, 16553-K, Sartorius). Экзосомы плазмы осаждали ультрацентрифугированием ($100\ 000 \text{ g}$, 90 min , 4°C), осадок ресуспендировали в 10 ml ФБ и дважды ультрацентрифугировали при тех же условиях. Экзосомы плазмы ресуспендировали в 200 mcl ФБ, замораживали в жидком азоте и хранили при -80°C .

Для получения суммарных экзосом к образцу крови объемом 4.5 ml добавляли равный объем буфера, элюирующий экзосомы, ассоциированные с форменными элементами [3] и инкубировали на ротационной мешалке 10 об/мин в течение 5 мин при комнатной температуре. Форменные элементы осаждали центрифугированием в течение 20 мин при 290 g и 4°C . Далее из полученного супернатанта суммарные экзосомы крови выделяли также, как и экзосомы из плазмы крови, за исключением, что супернатант разводили ФБ в 3 раза. Суммарные экзосомы крови ресуспендировали в 200 mcl ФБ, замораживали в жидком азоте и хранили при -80°C .

Для получения экзосом из культуральной среды клеток MCF-7, кондиционированную среду центрифугировали в течение 20 мин при $1\ 200 \text{ g}$ и 4°C , а затем при $17\ 000 \text{ g}$ 4°C в течение 20 мин. Для удаления везикул более 100 nm , супернатант фильтровали через фильтр с диаметром пор 100 nm (Minisart high flow, 16553-K, Sartorius), экзосомы осаждали ультрацентрифугированием ($100\ 000 \text{ g}$, 90 min , 4°C), осадок ресуспендировали в 10 ml ФБ и дважды ультрацентрифугировали при тех же условиях. Экзосомы ресуспендировали в 200 mcl ФБ, замораживали в жидком азоте и хранили при -80°C .

Размер и концентрацию полученных микровезикул оценивали при помощи анализатора частиц NanoSight LM10 (Malvern Instruments Ltd, Великобритания). В частности, образцы экзосом разводили в 100 раз ФБ, фильтрованным через фильтры с диаметром пор 0.1 mkm . Каждый образец измеряли трижды при следующих настройках прибора: чувствительность камеры — 15 усл.ед. , длительность записи — 30 с , пороговый уровень — 5 усл.ед. Не менее 200 треков анализировали на видео. Для анализа полученных данных использовали программное обеспечение NTA analytical software version 2.3 (NanoSight Ltd., Великобритания).

Типирование экзосом на тетраспанины CD 9, CD 24, CD 63, CD 81 и оценку уровня поверхностной шеддазы ADAM-10 проводили методом проточной цитофлуориметрии с иммобилизованными антителами на латексных частицах как описано [4]. Цитофлуориметрия была выполнена на проточном цитофлуориметре FACS Canto II (USA). В выделенной популяции экзосом анализировали медиану интенсивности флюоресценции (MFI) в сравнении с изотипическим контролем (BD bioscience) и отрицательными контролями.

Результаты и обсуждение

Для оценки роли экзосом, ассоциированных с форменными элементами, в клеточной подвижности, были сформированы группы здоровых женщин, больных с диффузной фиброзно-кистозной мастопатией и первичных больных люминальным и трижды-негативным раком молочной железы. Для проведения корректного

сравнительного анализа уровня тетраспанин-ассоциированной металлопротеиназы ADAM-10 на поверхности экзосом плазмы крови и экзосом, ассоциированных с форменными элементами, в норме и при развитии онкологического заболевания, на первом этапе работы необходимо было выделить и охарактеризовать экзосомы.

Для подтверждения экзосомальной природы выделенных микровезикул «Обществом по изучению внеклеточных везикул» рекомендованы оценка размера и выявление экзосомальных мембранных или цитозольных белков методами Вестерн-блоттинга либо проточной цитофлуориметрии [13]. В текущей работе для характеристики различных субпопуляций экзосом, микровезикулы, сорбированные на покрытых антителами к тетраспанинам CD9 или CD24 латексных гранулах, были окрашены антителами к CD9, CD63 или CD81, конъюгированными с флуорофором FITC.

Было показано, что микровезикулы, выделенные из культуральной среды, плазмы и суммарного элюата крови путем ультрафильтрации и ультрацентрифугирования, по общепринятым критериям можно отнести к классу экзосом [13].

В частности, по убыванию интенсивности медианы флуоресценции как в плазме, так и в цельной крови здоровых женщин, больных с мастопатией и больных с люминальным и трижды-негативным раком молочной железы были идентифицированы следующие субпопуляции везикул: $CD24/CD9 > CD9/CD81 > CD9/CD63 \approx CD24/CD63$ (табл. 2). Таким образом, вне зависимости от патологического состояния, наиболее часто в крови встречаются экзосомы, несущие CD9 и CD24. Рецептор CD63 удается обнаружить на поверхности наименьшего количества экзосом, причем эти экзосомы экспонируют одновременно и другие рецепторы (CD9, CD24). Выявленная закономерность по представленности тетраспанинов на поверхности экзосом подтверждена также на культуре карциномы молочной железы MCF-7 (табл. 2), что указывает на общие пути генерации микровезикул.

Подобного типирования субпопуляций экзосом при развитии злокачественных заболеваний ранее не проводили, однако известно, что повышенное содержание CD151 в составе экзосом плазмы коррелирует со стадией заболевания и метастазами в лимфоузлы у пациентов с инвазивным протоковым раком молочной железы [7, 16], а CD82 — с плохим прогнозом у пациентов с раком яичников и молочной железы [14].

При помощи анализа траекторий наночастиц было показано, что размер экзосом в

пулированных образцах плазмы крови здоровых женщин и больных мастопатией и трижды негативным подтипом рака молочной железы ниже, чем в суммарном элюате, содержащем экзосомы плазмы и экзосомы, ассоциированные с форменными элементами, в то время как у онкологических больных люминальным подтипом подобной закономерности не было выявлено (табл. 3). Впервые было установлено, что при развитии злокачественного новообразования снижается доля экзосом, ассоциированных с форменными элементами. В частности, в плазме крови здоровых женщин циркулирует 31% экзосом, больных трижды-негативным подтипом рака молочной железы — 39%, больных мастопатией — 55%, больных люминальным подтипом рака молочной железы — 96% от общего количества экзосом в крови (табл. 3). Поскольку большая часть экзосом в крови онкологических больных имеет неопухоловое происхождение, остается неясной причина снижения количества экзосом, элюированных с поверхности форменных элементов крови. Наблюдаемый феномен в крови женщин с новообразованиями молочной железы может быть связан как с повышением аффинности экзосом к клеткам крови, так и отражать истинное снижение уровня экзосом на клеточной мембране.

Одной из причин снижения уровня экзосом на поверхности форменных элементов при развитии рака молочной железы может являться повышенная активность шеддаз, непосредственно взаимодействующих не только с белками внеклеточного матрикса, но и мембранными рецепторами и молекулами клеточной адгезии клеток-мишеней [15].

Поскольку на поверхности экзосом плазмы и суммарных экзосом крови наиболее представлены CD9 и CD24, уровень тетраспанин-ассоциированной металлопротеиназы ADAM-10 был оценен в CD9- и CD24-позитивных экзосомах. Было обнаружено, что уровень поверхностной формы ADAM-10 достоверно возрастает в субпопуляции CD9-положительных экзосом, выделенных как из плазмы, так и из суммарной фракции крови больных люминальным РМЖ по сравнению с нормой (в 1,8 и 1,3 раза, соответственно) и не отличается от уровня этой шеддазы CD9-положительных экзосом из культуральной среды клеток MCF-7, несущих также рецепторы к эстрогенам и прогестинам. В то же время, не было обнаружено достоверного изменения уровня ADAM-10 на поверхности CD24-положительных экзосом (табл. 4). Полученные результаты коррелируют с данными [5], установившими, что включение зрелой формы ADAM-10 в экзосомы и проте-

Таблица 1. Характеристика больных РМЖ

		No (%)
Люминальный подтип		26 (81)
Трижды-негативный подтип		6 (19)
Стадия (TNM)	T1	15 (47)
	T2	17 (53)
	N0	24 (75)
	N1	6 (19)
	N2	1 (3)
	N3	1 (3)
Степень злокачественности	M0	32 (100)
	II	28 (88)
	III	4 (12)
Общее количество пациенток		32 (100%)

Таблица 2. Типирование экзосом плазмы и суммарных экзосом крови здоровых женщин и онкологических больных

Источник экзосом CD 63		CD 9-позитивные экзосомы		CD 24-позитивные экзосомы	
		CD 81	CD 9	CD 63	
Здоровые женщины	плазма	513±76	645±97	1048±120	523±75
	суммарная фракция	523±42	698±63	832±81	540±44
Больные мастопатией	плазма	513±84	628±83	703±84	548±81
	суммарная фракция	520±47	689±78	725± 87	550±55
Больные РМЖ люминальный подтип	плазма	464±48	630±67	1078±116	470±56
	суммарная фракция	493±47	689±70	1153±110	494±48
Больные РМЖ трижды негативный подтип	плазма	515±52	688±48	859±85	550±53
	суммарная фракция	543±43	704±49	742±67	527±58
MCF-7	среда	541±38	691±66	2151±205*	560±52

* значимые отклонения по сравнению с нормой. В табл. представлен уровень интенсивности медианы флуоресценции (MFI) ± SEM

Таблица 3. Характеристика экзосом здоровых и больных женщин, а также экзосом культуральной среды опухолевых клеток при помощи трекового анализа

Источник экзосом		Средняя концентрация экзосом и интервал ×10 ⁷ везикул/мл крови	Размеры экзосом, нм
Здоровые женщины	плазма	8 4-10	96 ± 16
	суммарная фракция	26 25-27	130±5
Больные мастопатией	плазма	54 20-88	96 ± 44
	суммарная фракция	99 61-137	140± 124
Больные РМЖ люминальный подтип	плазма	23 5-88	127±7
	суммарная фракция	24 7-92	129±12
Больные РМЖ трижды негативный подтип	плазма	19 9-30	103±72
	суммарная фракция	31 28-63	131±95
MCF-7	среда	29	88±45

Таблица 4. Оценка представленности ADAM-10 на поверхности CD 9- и CD 24-позитивных экзосом крови здоровых и больных женщин, а также экзосом культуральной среды опухолевых клеток

Источник экзосом		CD 9+	CD 24+
Здоровые женщины	плазма	844±99	884±124
	суммарная фракция	804±79	920±91
Больные мастопатией	плазма	-	1031±155
	суммарная фракция	-	962±89
Больные РМЖ люминальный подтип	плазма	1531±162*	926±94
	суммарная фракция	1026±100*	1103±99
Больные РМЖ трижды негативный подтип	плазма	962±88	908±109
	суммарная фракция	862±69	969±106
MCF-7	среда	1607±128*	887±67

*значимые отклонения по сравнению с нормой. В таблице представлен уровень интенсивности медианы флуоресценции (MFI) ± SEM.

олитическая активность данной шеддазы регулируется тетраспанинами CD9, CD81 и CD82. Сравнительный анализ фракций экзосом плазмы и суммарных экзосом в крови здоровых доноров и онкологических больных показал отсутствие достоверных отличий в уровне поверхностной ADAM-10 в обеих субпопуляциях микровезикул, за исключением больных РМЖ люминального типа. В последнем случае выявлено достоверное снижение уровня шеддазы (в 1.5 раза) на поверхности CD9-положительных суммарных экзосом по сравнению с экзосомами плазмы (табл. 4), коррелирующее с увеличением доли свободно циркулирующих экзосом в плазме крови (табл. 3). Полученные данные позволяют предположить, что при развитии рака молочной железы увеличение уровня ADAM-10 на поверхности экзосом снижает возможность их связывания с форменными элементами крови, повышая тем самым концентрацию экзосом в плазме, что в свою очередь позволяет экзосомам выполнять роль посредников в обеспечении межклеточной коммуникации посредством горизонтального переноса РНК и белков [12], влияя на развитие как первичного новообразования, так и отдаленных метастазов. Более того, повышенный уровень ADAM-10 на поверхности экзосом больных раком молочной железы может в значительной степени определять опухолевый рост и диссеминацию, модифицируя локальное микроокружение и делая доступными заключенные в матрикс ростовые факторы, с одной стороны и, растворяя компоненты внеклеточного матрикса и повышая миграционную и инвазивную активность опухолевых клеток, с другой [8, 10].

Конфликт интересов: авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Финансирование: исследование выполнено при финансовой поддержке РФФИ и Правительства Новосибирской области в рамках научного проекта № 18-415-540012.

Авторы признательны В.И. Пермяковой (Центральная клиническая больница СО РАН, г. Новосибирск), С.Л. Васину (КД-системы и оборудование, г. Санкт-Петербург), В.Е. Войцицкому (Новосибирский областной онкологический диспансер, г. Новосибирск) за содействие в исследованиях.

ЛИТЕРАТУРА

1. Давыдов М. И., Аксель Е.М. Статистика злокачественных новообразований в России и странах СНГ. — М., 2014.
2. Тамкович С.Н., Бакакина Ю.С., Тутанов О.С. и др. Протеомный анализ циркулирующих экзосом крови в норме и при злокачественных новообразованиях молочной железы // Биоорганическая химия. — 2017. — Т. 43. — № 2. — С. 146-156.
3. Тамкович С.Н., Лактионов П.П., Тутанов О.С. и др. Способ получения экзосом из крови. — Патент РФ 2556825 от 18.06.2015.
4. Тамкович С.Н., Юнусова Н.В., Стахеева М.Н. и др. Выделение и характеристика экзосом плазмы крови больных раком молочной железы и колоректальным раком // Биомедицинская химия. — 2017. — Т. 63. — № 2. — С. 165-169.
5. Arduise C., Abache T., Li L. et al. Tetraspanins regulate ADAM10-mediated cleavage of TNF-alpha and epidermal growth factor // J. Immunol. — 2008. — Vol. 181(10). — P. 7002-7013.
6. Ferlay J., Colombet M., Soerjomataram I. et al. Cancer incidence and mortality patterns in Europe: Estimates for 40 countries and 25 major cancers in 2018 // Eur. J. Cancer. — 2018. — Vol. 103. — P. 356-387.
7. Hassuna N., Monk P.N., Moseley G.W. et al. Strategies for targeting tetraspanin proteins: potential therapeutic applications in microbial infections // BioDrugs. — 2009. — Vol. 23. — P. 341-359.
8. Keller S., König A.K., Marmé F. et al. Systemic presence and tumor-growth promoting effect of ovarian carcinoma released exosomes // Cancer Lett. — 2009. — Vol. 278(1). — P. 73-81.
9. Koumangoye R.B., Sakwe A.M., Goodwin JS. et al. Detachment of breast tumor cells induces rapid secretion of exosomes which subsequently mediate cellular adhesion and spreading // PLoS One. — 2011. Vol. 6(9). — P. e24234.
10. Lai R.C., Tan S.S., Teh B.J. et al. Proteolytic Potential of the MSC Exosome Proteome: Implications for an Exosome-Mediated Delivery of Therapeutic Proteasome // Int J Proteomics. — 2012. — Vol. 2012. — P. 971907.
11. Lee S.B., Schramme A., Doberstein K. et al. ADAM10 is upregulated in melanoma metastasis compared with primary melanoma // J. Invest. Dermatol. — 2010. — Vol. 130(3). — P. 763-773.
12. Li W., Li C., Zhou T. et al. Role of exosomal proteins in cancer diagnosis // Mol. Cancer. — 2017. — Vol. 16(1). — P. 145.
13. Lotvall J., Hill A.F., Hochberg F et al. Minimal experimental requirements for definition of extracellular vesicles and their functions: a position statement from the International Society for Extracellular Vesicles // J. Extracell. Vesicles. — 2014. — Vol. 3. — P. 26913.
14. Malla R.R., Pandrangi S., Kumari S. et al. Exosomal tetraspanins as regulators of cancer progression and metastasis and novel diagnostic markers // Asia Pac. J. Clin. Oncol. — 2018. — doi: 10.1111/ajco.12869.
15. Nawaz M., Shah N., Zanetti B.R. Extracellular vesicles and matrix remodeling enzymes: the emerging roles in extracellular matrix remodeling, progression of diseases and tissue repair // Cells. — 2018. — Vol. 7. — P. 167.
16. Sadej R., Grudowska A., Turczyk L. et al. CD151 in cancer progression and metastasis: a complex scenario // Lab. Invest. — 2014. — Vol. 94. — P. 41-51.
17. Yanez-Mo M., Siljander P.R., Andreu Z. et al. Biological properties of extracellular vesicles and their physiological functions // J. Extracell. Vesicles. — 2015. — Т. 4. — P. 27066.

Поступила в редакцию 28.01.2019 г.

*A.K. Somov^{1,#}, N.V. Yunusova^{2,#}, T.A. Shtam^{3,4},
K.V. Proskura^{1,5}, E.A. Zambalova², P.P. Laktionov¹,
S.N. Tamkovich^{1,6}*

**ADAM-10 on the surface of exosomes
from breast cancer patients blood: newly
mechanisms tumor dissemination**

¹Institute of Chemical Biology and Fundamental
Medicine, Siberian Branch of Russian Academy of
Science, Novosibirsk,

²Cancer Research Institute, Tomsk National Research
Medical Center, Russian Academy of Science, Tomsk,

³N.N. Petrov National Medical Research Center of
Oncology, St.-Petersburg

⁴Petersburg Nuclear Physics Institute named
by B.P. Konstantinov of National Research Center,
"Kurchatov Institute", Gatchina,

⁵Department of Mammology, National Novosibirsk
Regional Oncologic Dispensary, Novosibirsk,

⁶Faculty of Natural Science, Novosibirsk State University,
Novosibirsk

Authors contributed equally to this work

It is known that exosomes are involved in the cancer development, including by increasing the motility of tumor cells and increasing their invasive potential. Since it is not clear how involved the exosomes associated with the blood cell surface are in the dissemination of the tumor process, this paper is devoted to assessing the level of tetraspanin-associated metalloproteinase ADAM-10 on the surface of plasma exosomes and total exosomes of blood of clinically healthy women (n = 30), patients with mastopathy (n = 28) and breast cancer (n = 32). Microvesicles from blood samples and culture medium MCF-7 were isolated by ultrafiltration and ultracentrifugation. Using flow cytometry with antibodies against universal exosomal markers, it was found that CD9 and CD24-positive exosome subpopulations predominate in preparations of microvesicles from the blood of healthy women and tumor patients. A comparative analysis of the ADAM-10 level on the surface of plasma exosomes and total exosomes in the blood of healthy women and tumor patients showed the absence of significant differences in both microvesicle subpopulations, except for patients with luminal type breast cancer. In the latter case, on the surface of CD9-positive plasma exosomes, a significant increase in sheddase level and a decrease were found on the surface of total exosomes, correlating with an increase in the proportion of freely circulating exosomes in plasma. The obtained data suggest that an increase in the ADAM-10 level on the exosome surface at breast cancer development reduces the possibility of vesicle attached to blood cells, thus increasing their concentration in the blood, which in turn allows exosomes to act as mediators in ensuring intercellular communication, influencing the development of both primary tumors and distant metastases. In addition, an increased level of ADAM-10 on the surface of exosomes of breast cancer patients can largely determine tumor growth and dissemination, modifying the local microenvironment and making growth factors contained in the matrix available on the one hand and, dissolving the components of the extracellular matrix and increasing migration and invasive activity of tumor cells on the other.

Key words: exosomes, ADAM-10, blood, breast cancer