

©Коллектив авторов

ЭКЗОСОМЫ ЗЛОКАЧЕСТВЕННЫХ ОПУХОЛЕЙ: ПЕРСПЕКТИВЫ ОМИКСНОЙ ДИАГНОСТИКИ

Н.А. Шушкова, С.Е. Новикова, В.Г. Згода*

НИИ биомедицинской химии имени В.Н. Ореховича,
119121, Москва, ул. Погодинская, 10; *эл. почта: n.shushkova@yandex.ru

Главными проблемами в диагностике и лечении опухолей являются раннее выявление заболевания, а также прогнозирование течения заболевания и ответа на терапию. Их решение может быть связано с выявлением круга биомаркеров, секретируемых опухолевыми клетками в составе внеклеточных везикул, в частности экзосом. Исследование белков экзосом заслуживает особого внимания, поскольку их молекулярный состав может нести информацию об опухолевой идентичности, а также представлять собой набор сигнальных молекул, регулирующих процессы опухолевой прогрессии и роста. Кроме того, анализ секретируемых во внеклеточное пространство экзосом соответствует перспективной концепции жидкой биопсии. В данном обзоре мы обобщили современный опыт молекулярного исследования экзосом при различных типах злокачественных опухолей, в том числе при колоректальном раке, раке лёгкого, яичника, предстательной и молочной желёз, с особым акцентом на омиксных методах и изложили перспективы их применения в диагностике.

Ключевые слова: экзосомы; омиксная диагностика; протеомика; транскриптомика; злокачественные опухоли

DOI: 10.18097/PBMC20196506457

ВВЕДЕНИЕ

Экзосомы обнаруживаются почти во всех биологических жидкостях человека: кровь, моча, слюна, амниотическая и спинномозговая жидкость, желчь, слезы, грудное молоко и семенная жидкость. Функции экзосом до конца не изучены, но последние исследования указывают на их роль в межклеточных взаимодействиях и регуляции функций иммунной системы. Более того, экзосомы играют важную роль в биологии опухолей и вовлечены в процессы малигнизации, опухолевого роста, развития лекарственной устойчивости опухолевых клеток, ангиогенеза и метастазирования [1-3]. Почти все типы клеток могут продуцировать экзосомы, содержащие специфические белки, липиды, РНК и ДНК [4]. Поскольку состав экзосом зависит от происхождения клетки и отражает её физиологическое и патологическое состояние, анализ молекулярного груза экзосом представляет привлекательный подход для поиска новых диагностических, прогностических и предиктивных маркеров.

1. ИСТОРИЯ ИЗУЧЕНИЯ, БИОГЕНЕЗ, ХАРАКТЕРНЫЙ МОЛЕКУЛЯРНЫЙ СОСТАВ

Исследование экзосом является относительно молодым направлением биологической науки. Термин “экзосомы” первоначально применялся к мембранным везикулам, полученным из биологических жидкостей при исследовании дифференцировки

ретикулоцитов [5, 6]. Поначалу экзосомами называли везикулы размером 40-100 нм, секретируемые исключительно клетками ретикулоцитов во время дифференцировки; позднее было обнаружено, что В-лимфоциты и дендритные клетки также секретируют экзосомы [7, 8]. Кроме того, было продемонстрировано, что гематопоезические клетки, цитотоксические Т-лимфоциты, тромбоциты, нейрональные и тучные клетки также высвобождают экзосомы путём слияния внутриклеточных мультивезикулярных эндосом с плазматической мембраной [9, 10].

В первых исследованиях процесс высвобождения экзосом из ретикулоцитов рассматривали как один из механизмов удаления “отходов” из клеток [11]. Затем стало понятно, что экзосомы вовлечены в межклеточные взаимодействия и в сложную систему регуляции функций иммунной системы. В 2013 году Randy Schekman, James Rothman и Thomas Südhof были удостоены Нобелевской премии по физиологии и медицине за открытие везикулярного транспорта – главной транспортной системы клетки. Дальнейшее изучение и повышение осведомленности о роли и функциях экзосом привлекло внимание исследователей во всём мире, которые обнаружили, что везикулы играют важную роль во многих физиологических и патологических процессах.

Различные типы клеток млекопитающих выделяют экзосомы во внеклеточную среду путём слияния внутриклеточных мультивезикул с клеточной мембраной [5, 12]. Отличительной

Принятые сокращения: CEA – раково-эмбриональный антиген (Cancer Embryonic Antigen); EGFR – рецептор эпидермального фактора роста (Growth Factor Receptor); ESCRT – эндосомальный комплекс сортировки; MRM – мониторинг множественных реакций; nSMase – сфингомиелиназа; PSA – простатический специфический антиген (Prostate Specific Antigen); SILAC – изотопное мечение белков в культуре клеток (Stable Isotope Labeling with Amino acids in Cell culture); ВЭЖХ-МС/МС – высокоэффективная жидкостная хроматография сопряжённая с тандемной масс-спектрометрией; ИФА – иммуноферментный анализ; KPP – колоректальный рак; MB – микровезикулы; HNPCL – немелкоклеточный рак лёгкого; ПЕГ – полиэтиленгликоль; РПЖ – рак предстательной железы.

особенностью формирования экзосом является слияние мультивезикулярных телец (эндосом по своей сути) и плазматической мембраны в противоположность прямому отпочковыванию плазматической мембраны. Образование экзосом может протекать как по классическому пути с вовлечением ESCRT, так и по ESCRT-независимому механизму (рис. 1).

Процесс образования экзосом по классическому пути начинается с формирования инвагинаций мембраны, покрытых клатрином. Затем, благодаря участию различных компонентов комплекса сортировки ESCRT (ESCRT-0, -1, -2, -3), инвагинированные вакуоли развиваются в ранние эндосомы, нагруженные убиквитинилированными продуктами. Следующим шагом является вторичная инвагинация стенок ранних эндосом, что ведёт к образованию интралюминальных везикул, накапливающихся и созревающих внутри ранних эндосом. Последующее закисление внутреннего содержимого эндосом за счёт переноса протонов V-АТФазой приводит к их созреванию в поздние эндосомы [13]. Поздние эндосомы с интралюминальными везикулами называют мультивезикулярными тельцами. В дальнейшем мультивезикулярные тельца либо остаются в цитоплазме и, сливаясь с лизосомами, участвуют в деградации белков, либо сливаются с плазматической мембраной и секретируются во внеклеточное пространство в виде экзосом [14].

В образовании экзосом по ESCRT-независимому механизму на этапе формирования инвагинированных вакуолей задействована nSMase, расщепляющая сфингомиелин до церамида; кроме того, важная роль в биогенезе отводится тетраспанинам CD63, CD9 и CD81 [15]. Детальный механизм образования экзосом по ESCRT-независимому механизму до конца неясен.

Мембранная структура экзосом обеспечивает защиту внутреннего содержимого, в результате чего экзосомальный транспорт является эффективным способом воздействия не только на окружающие клетки, но и на более отдалённые клетки-мишени.

Экзосомы, секретируемые клеткой, могут транспортировать в клетки-мишени многие биологические компоненты, такие как мРНК, микроРНК, фрагменты ДНК, липиды и белки [16, 17].

В состав специфического протеома экзосом входит ряд белков, ассоциированных только с тем типом клеток, которые их секретируют, а также белки, встречающиеся в большинстве экзосом независимо от источника происхождения. В целом, в экзосомах чаще встречаются белки плазматической мембраны, эндосом и цитозоля, тогда как белки ядра, митохондрий, эндоплазматической сети и аппарата Гольджи представлены в меньшей степени.

Среди мембранных белков в экзосомах широко представлены тетраспанины CD9, CD37, CD53, CD63, CD81 и CD82 [18]. Белки CD9, CD63, и CD81 чаще всего используют для подтверждения эффективности выделения экзосом методом иммуноблоттинга.

Ряд наиболее универсальных для экзосом белков задействован в их биогенезе и характерен для эндосом. Такие белки, как TSG101, клатрин и ALIX/PDCD6IP (белок, взаимодействующий с белком программируемой клеточной гибели 6), ассоциированы с комплексом сортировки ESCRT [19]. Ряд белков экзосом является маркерами их происхождения из поздних (CD63, ассоциированные с лизосомами белки LAMP1 и LAMP2, комплекс гистосовместимости класса II и RAB7) или ранних (белки RAB4, RAB5, RAB11 и RAB35) эндосом [15].

Везикулы, выделенные из различных биологических жидкостей, содержат белки, связанные с липидными рафтами мембраны, такие как иммобилизованный белок гликозилирования фосфатидилинозитола, флотиллины и GPI-заякоренные белки [20].

Среди различных типов РНК особенно выделяется микроРНК, которая транспортируется экзосомами и может влиять на экспрессию генов в отдалённых клетках.

С точки зрения липидного состава, по сравнению с клеточной мембраной, экзосомы богаты холестерином, фосфатидилсерином и сфингомиелином.

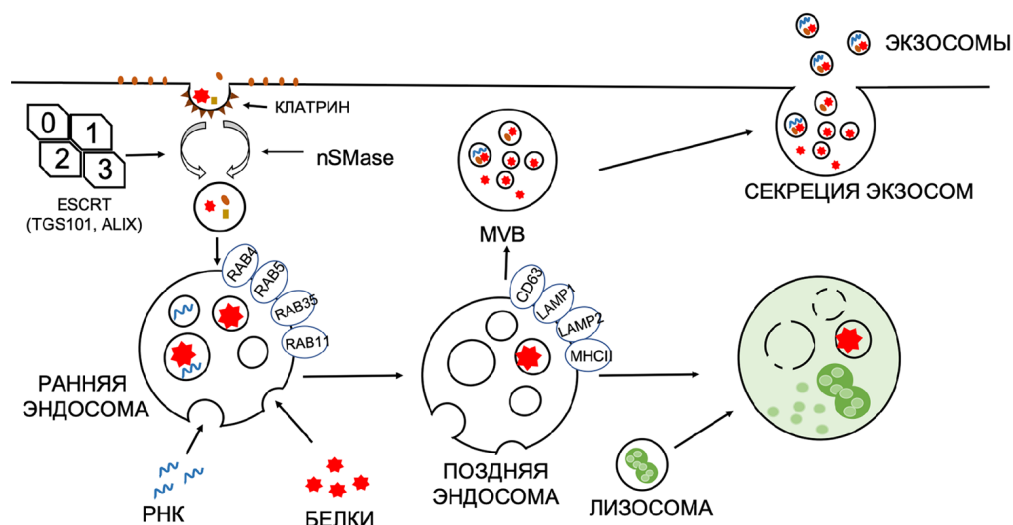


Рисунок 1. Схема биогенеза экзосом. 0, 1, 2, 3 ESCRT – компоненты комплекса сортировки, nSMase – сфингомиелиназа, MVB – мультивезикулярное тельце. Пояснения даны в тексте.

При поиске маркеров экзосом нужно учитывать экспериментальные условия, поскольку множество факторов, включая провоспалительные сигналы, гипоксию, экспрессию онкогенов и низкие значения pH среды культивирования, сильно меняют качественный состав молекул экзосом [15]. Кроме того, качественное определение маркеров экзосом, однозначно отличающих их от других внеклеточных везикул, затруднено в силу гетерогенного характера самого биогенеза и низкой специфичности методов выделения экзосом, таких как ультрацентрифугирование и преципитация. Перспективным может стать количественное определение маркерных белков: так, в нашей лаборатории был разработан метод для определения содержания маркерных белков CD63, CD82 и HSPA8 в экзосомах плазмы крови с помощью количественной таргетной масс-спектрометрии [21].

1.1. *In-silico* источники для поиска маркерных белков экзосом

Потенциал использования молекулярного груза экзосом в качестве диагностических маркеров диктует потребность в тщательном анализе этих частиц и представлении результатов в удобном для научного сообщества формате. Учитывая ценность уже полученных данных и вероятный рост таких исследований в будущем, в 2009 году был создан открытый веб-ресурс ExoCarta (<http://exocarta.ludwig.edu.au>). Этот портал представляет собой базу данных, которая каталогизирует молекулы, идентифицированные в составе экзосом в последние годы, а также содержит информацию о методах выделения экзосом, процедурах очистки, используемых образцах и данные об исследователе [22].

Среди 100 наиболее часто встречающихся в экзосомах молекул (вне зависимости от источника их происхождения) фигурируют белки, задействованные в передаче сигнала, такие как тетраспанины (CD9, CD63, CD81), интегрины (ITB1, ITA6), факторы обмена нуклеотидов и GTP-связывающие белки (GNAI2, GNAS1, GNAS2, и ARF1), адапторные белки (белки 14-3-3 альфа/бета, гамма, зета/дельта, эта и тэта) и аннексыны 2, 5, 6 и 11. В то же время в базе данных ExoCarta среди 100 наиболее часто встречающихся в экзосомах молекул оказывается достаточное количество неспецифических белков, таких как, например, актин, альфа-2-макроглобулин или сывороточный альбумин, возможно, являющихся артефактами выделения экзосом из биологических жидкостей и сред культивирования клеток.

Материал базы данных ExoCarta может быть полезен при планировании целевого исследования молекулярного состава экзосом, например, при разработке метода мониторинга множественных реакций (MRM) для анализа белков.

База данных ExoCarta является частью ресурса Vesiclepedia, обобщающего современные знания и экспериментальные данные для различных типов внеклеточных везикул. Помимо ExoCarta, информацию о молекулярном составе различных внеклеточных везикул, включая экзосомы, содержит крупная база данных EVpedia (<http://evpedia.info>).

2. РОЛЬ ЭКЗОСОМ В БИОЛОГИИ ОПУХОЛЕЙ КАК ПОСРЕДНИКА МЕТАСТАЗИРОВАНИЯ

Экзосомы являются частью обширной транспортной сети, посредством которой клетки обмениваются друг с другом информацией за счёт переноса ДНК, РНК, белков и мембраносвязанных факторов. Как следствие, экзосомы, выделяемые опухолевыми клетками, оказывают влияние на непосредственное микроокружение опухоли, а также, благодаря их распространению через кровь и лимфу, затрагивают отдалённые участки ткани, создавая в них премеастатическую нишу, способствующую метастазированию, которую Tung и соавт. назвали макроокружением опухоли [23]. Считается, что основным механизмом действия экзосом является иммуносупрессия. Сигнал иммунологической толерантности, передаваемый опухолевыми экзосомами, приводит к ингибированию пролиферации иммунных клеток, нарушению дифференцировки моноцитов, а также к апоптозу активированных CD8⁺ Т-лимфоцитов и к стимуляции регуляторных Т-клеток, паракринно вызывающих иммунную супрессию [24].

Также экзосомы способствуют метастазированию за счёт метаболического перепрограммирования, в результате которого происходит переход клеток от использования окислительного фосфорилирования в качестве основного источника энергии к гликолизу и увеличивается закисление внеклеточного матрикса, способствующее опухолевому росту [25].

Более того, экзосомы способны активировать онкогены в клетках органа-мишени метастазирования за счёт переноса в них онкогенных белков из первичной опухоли. Например, было показано, что рецептор эпидермального фактора роста (EGFR) из клеток желудка транспортируется раковыми экзосомами в стромальные клетки печени и запускает в них экспрессию онкогенного фактора роста гепатоцитов [26]. В случае колоректального рака, при котором часто встречаются мутации в гене *KRAS*, было показано, что экзосомы опухолевых клеток переносят онкогенные белки – мутантную форму *KRAS*, *EGFR*, и интегрины – в клетки опухоли, несущие ген *KRAS* дикого типа, способствуя метастазированию и прогрессии заболевания [27].

Учитывая такой мощный и разносторонний вклад экзосом в метастазирование, их молекулярный состав представляет собой богатый источник прогностических маркеров, отражающих степень агрессивности злокачественного новообразования.

3. ПРИМЕНЕНИЕ ОМИКСНЫХ ПОДХОДОВ ДЛЯ ПОИСКА БИОЛОГИЧЕСКИХ МАРКЕРОВ ЗЛОКАЧЕСТВЕННЫХ ОПУХОЛЕЙ В ЭКЗОСОМАХ

По данным ВОЗ, онкологические заболевания занимают второе место в списке основных причин смерти после заболеваний сердечно-сосудистой системы. В 2018 г. от злокачественных новообразований умерли 9,6 млн. человек. При этом по распространённости лидируют рак лёгкого,

рак молочной железы и колоректальный рак, в то время как по частоте смертельных исходов в первую тройку входят рак лёгкого, колоректальный рак и рак желудка (рис. 2), которые и будут рассмотрены ниже.

Хорошо известно, что разница между показателями смертности пациентов, которым диагноз был поставлен на начальных и последних стадиях, очень существенна. Современные методы терапии позволяют излечивать или продлевать жизнь пациентам с начальными формами многих онкологических заболеваний, это значит, что снижение смертности от онкологических заболеваний можно достичь путём внедрения методов ранней диагностики. Более того, предиктивные и прогностические маркеры позволяют предсказать ответ на лечение и тяжесть заболевания у различных пациентов, обеспечивая таким образом индивидуальный подход к больному, что удовлетворяет целям персонализированной медицины.

В настоящее время поиск онкомаркеров, анализ которых можно использовать для создания новых методов лабораторной диагностики, является одним из приоритетных направлений фундаментальной онкологии. За последние несколько лет доказана перспективность разработки методов диагностики онкологических заболеваний на основе анализа циркулирующих экзосом, как факторов, участвующих в локальном росте опухоли и в генерализации опухолевого процесса [29]. Основным преимуществом этого подхода является неинвазивный характер исследования, что позволяет избежать рисков, связанных с взятием биопсии, и частично решить проблему гетерогенности опухоли.

Бурное развитие геномных и протеомных методов предоставило для научного сообщества мощные технологические платформы, такие как полногеномное секвенирование, полногеномный транскриптомный анализ, панорамный и таргетный масс-спектрометрический анализ. Подобные методы отличаются высокой чувствительностью, точностью, специфичностью и высокой производительностью. Как видно из таблицы, исследователи экзосом в контексте онкологических заболеваний не преминули воспользоваться новыми возможностями, предоставляемыми омиксными подходами.

Ниже более подробно рассмотрены примеры исследований опухолевых экзосом, доказывающих перспективы использования этих микровезикул в качестве источника биомаркеров.

3.1. Рак лёгкого

Рак лёгкого занимает первое место среди причин смерти от онкологических заболеваний (официальные данные ВОЗ [28]). Высокую смертность отчасти объясняет тот факт, что, по данным Американской ассоциации пульмонологов, локализованная опухоль на ранней стадии диагностируется только у 16% пациентов (<https://www.lung.org/lung-health-and-diseases/lung-disease-lookup/lung-cancer/resource-library/lung-cancer-fact-sheet.html>). В связи с этим разработка скрининговых методик является первоочередной задачей в диагностике рака лёгкого. Исследование молекулярного состава экзосом, выделяемых клетками рака лёгкого, представляет особый интерес для научного сообщества с точки зрения диагностики [30, 31].

Одним из омиксных направлений является анализ микроРНК, представляющих собой класс малых некодирующих РНК с аномальной экспрессией при нескольких типах рака, что указывает на их ключевую роль в патогенезе этих заболеваний [32]. МикроРНК связываются с 3'-нетранслируемой областью (3'-UTR) целевой мРНК, что приводит к изменению экспрессии соответствующего гена. Хотя профилирование микроРНК показало многообещающий результат, в настоящее время его применение ограничено биопсией тканей. Поскольку специфические для опухоли микроРНК, ассоциированные с прогнозом заболевания, включая терапевтическую резистентность, идентифицированы, их присутствие в опухолевых экзосомах также может использоваться в качестве прогностического индикатора.

Научная группа под руководством Rabinowits выделила экзосомы из крови пациентов с аденокарциномой лёгкого и здоровых доноров, применив сочетание эксклюзионной хроматографии и иммуноаффинного осаждения экзосом с использованием EpCAM [33]. Исследователи определили повышенный уровень содержания для 12 специфических экзосомальных микроРНК (miR-17-3p, miR-21, miR-106a, miR-146, miR-155, miR-191, miR-192, miR-203, miR-205, miR-210, miR-212 и miR-214) у пациентов с аденокарциномой лёгкого по сравнению с контролем. Таким образом, была получена молекулярная сигнатура, которую исследователи сопоставляли со стадией заболевания [33]. Кроме того, результаты показали, что содержание экзосомальных микроРНК и

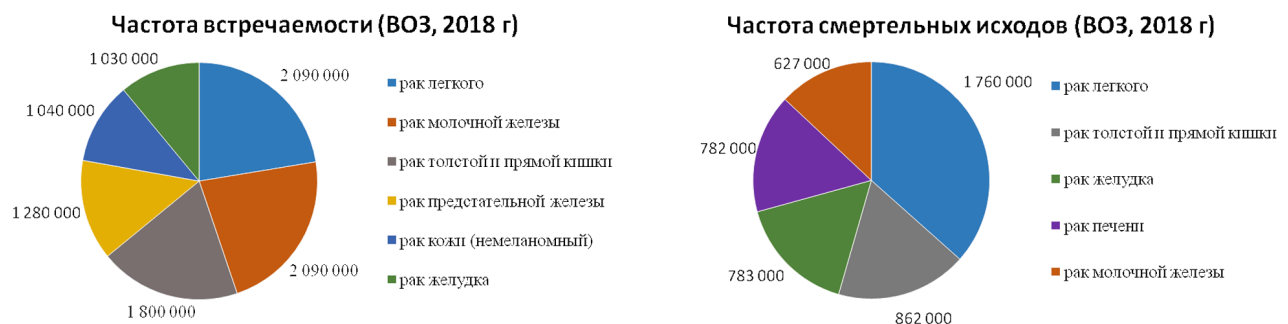


Рисунок 2. Распространённость и частота смертельных исходов для основных типов злокачественных опухолей [28].

Таблица. Результаты исследований молекулярного груза экзосом при различных типах опухолей с применением омических подходов

Источник экзосом	Молекулы, обнаруженные в экзосомах		Ссылка
Рак лёгкого			
плазма	микроРНК	hsa-miR-17-3p, hsa-miR-21, hsa-miR-106a, hsa-miR-146, hsa-miR- 155, hsa-miR-191, hsa-miR-192, hsa-miR-203, hsa-miR-205, hsa-miR-210, hsa-miR-212 и hsa-miR-214	[32]
биопсия	—	повышенное содержание EGFR	[37]
плазма	белки	NY-ESO-1, EGFR, PLAP, EpCam, Alix	[38]
клеточные линии A549, HCC827, HBE4	белки комплекса ESCRT	STAM1, STAM2, VPS37B, VPS37C, VPS4B, VTA1	[39]
	белки, ассоциированные с биогенезом экзосом	ALIX, TSG101, SDCBP, SDC1	
	белки, участвующие в везикулярном транспорте	VAMP2, VAMP8, SNX2, STX3	
	тетраспанины	CD9, CD63, CD81	
плевральный выпот	белки, связанные с сигнальной трансдукцией, иммунитетом, структурной организацией клеток и транспортом	ABI-1, BSG, CAV1, EGFR, GRB2, семейство белков RAS и SRC	[40]
сыворотка крови	белки	AHSG, ECM1	[41]
Колоректальный рак			
клеточная линия LIM1215	тканеспецифичные белки	CEP55, EPHA2, KRT18, MUC13, MAPK4, MINK1, PCNA, CEA, EpCAM, EGFR, POLD1, PPP2R1B и RUVBL1	[44]
клеточная линия LIM1863	белки, участвующие в пролиферации и инвазии раковых клеток или в сигнальных путях, связанных с канцерогенезом	HGFR, AREG, EFNB1, EFNB2, EPHA2-8, EPHB1-4, CTNNB1, TNK1, CRK, GRB2, CEACAM1 и CEACAM5	[45]
клеточная линия SW480	белки, связанные с адгезией	ILK, ITGA1, ICAM1, CTNNB1, PKP2	[46]
клеточная линия SW620	белки, связанные с прогрессированием рака, возникновение лекарственной устойчивости	AARS, CCDC50, PAK4, ANXA1, LCK, LCP1, AK2, HSPA9	
Рак молочной железы			
клеточные линии MCF10A, MCF7 и MDA-MB-231	микроРНК	miR-21, miR-1246	[47]
плазма	микроРНК	miR-21, miR-1246	
клеточная линия MDA-MB-231	белки, связанные с биогенезом экзосом и регуляцией клеточного цикла	ACTB/G, TBA1C, K1C9, TPM4, FSCN1, TAGL2, PDC6I	[49]
	белки, связанные с регуляцией апоптоза	TERA, ANXA5, HSP71, PRDX2, UBIQ, PDC6I	
	белки, связанные с фокальной адгезией	LAMC1, ACTB/G	
	белки, связанные с сигнальными путями и модуляцией иммунной системы во время прогрессирования опухоли	LG3BP, LAMC1, GBB2, ITA3, ITA6, B2MG	
Рак предстательной железы			
семенная жидкость	белки	ACTB, GAPDH, PHGDH, LGALS3BP и SEMG1, SEMG1, SEMG2, PIP, FN1, ACPP, KLK3	[51]
плазма	белки, связанные с канцерогенезом и опухолевым ростом	DNA2, PIF1, FHL3, GSTO2, MELK, IRX5, MCM5, MTUS1	[52]
Рак яичника			
клеточные линии SKOV3, CAOV3	белки, связанные с ангиогенезом	EBNA1, MTA1	[53]
клеточные линии OVCAR-3 и IGROV1	белки, связанные с канцерогенезом и метастазированием	EpCAM, PCNA, TUBB, EGFR, APOE, CLDN3	[54]
клеточные линии из биопсии	микроРНК	let-7i, miR-16, miR-21 и miR-214	[55]

микроРНК, полученных из клеток опухоли, не имеет значительных отличий, следовательно профиль РНК экзосом представляет собой “зеркальное отражение” молекулярного состава опухоли.

Результаты других исследований позволили связать низкий уровень экзосомальной miR-146a-5p с резистентностью к цисплатину [34], а высокий уровень экспрессии экзосомальных miR-1246 и miR-208-a с резистентностью к радиотерапии у пациентов с аденокарциномой лёгкого [35].

Профилирование различных наборов микроРНК на среднего размера когортах пациентов (n=40–60) с аденокарциномой лёгкого и плоскоклеточной карциномой лёгкого по сравнению со здоровым контролем показало довольно высокие показатели чувствительности (80-97%) и специфичности (60-90%), что указывает на перспективность анализа микроРНК для диагностики и скрининга данного заболевания [36, 37].

На белковом уровне экзосомальные маркеры при раке лёгкого в основном исследуют с помощью методик с использованием антител (иммуноблоттинг, твердофазный ИФА). Таким образом, удалось показать повышенное содержание EGFR в экзосомах при раке лёгкого по сравнению с хроническими воспалительными заболеваниями лёгких [38], а также определить повышенную экспрессию мембраносвязанного белка NY-ESO-1 в качестве неблагоприятного прогностического маркера [39].

На сегодняшний день опубликовано сравнительно немного результатов исследований белкового содержимого экзосом, выделяемых клетками рака лёгкого, с помощью высокопроизводительных протеомных методов.

Пожалуй, наиболее значимая работа была выполнена Clark и соавт. [40]. Исследователи использовали линию клеток нормальной бронхиальной ткани и две линии клеток НМРЛ A549 и HCC827 в качестве модельных объектов. Выделение экзосом из культур клеток проводилось с помощью комбинации методов преципитации с ПЕГ и последующего ультрацентрифугирования в градиенте плотности йодиксанола (OptiPrep™) под контролем электронной микроскопии и иммуноблоттинга для определения экзосомальных маркеров CD63 и ALIX. С помощью масс-спектрометрического профилирования с предварительным изотопным мечением белков в культуре клеток SILAC удалось количественно оценить 721 экзосомальный белок [40]. Экзосомы клеток НМРЛ, по сравнению с нормальными клетками бронхов, были обогащены белками межклеточного матрикса (EDIL3, MFGE8, и HSPG2), протеазами (PAPPA, CTSA и GGT3P), белками клеточной адгезии (DSG2, CD151, CNTN1, EPCAM, MPZL1 и MPZL2), мембранными рецепторами (EGFR, GPRC5A, ITGB1, ITGB6 и TACSTD2), белками, вовлечёнными в пролиферацию (GRB2, RALA) и белками-модуляторами ферментов (GNB1, TOM1L1). Также исследователи обнаружили, что при добавлении экзосом из клеточных линий НМРЛ A549 или HCC827 в линию иммортализованных бронхиальных клеток HBE3 пролиферация клеток значительно

увеличивалась, что указывает на роль белков экзосом в индукции пролиферации в нормальных эпителиальных клетках. Следовательно, обнаруженные дифференциально экспрессирующиеся белки могут рассматриваться в качестве панели маркеров для риска метастазирования [40].

Park и соавт. провели протеомное исследование МВ плеврального выпота 3 пациентов с НМРЛ [41]. После дифференциального ультрацентрифугирования в градиенте сахарозы и градиенте плотности йодиксанола (OptiPrep™) полученные МВ оценивали с помощью электронной микроскопии и иммуноблоттинга по маркерам CD63, езрин и бета-актин. Протеомный анализ проводили методом ВЭЖХ-МС/МС с предварительным фракционированием белков в 1D-полиакриламидном геле. Всего исследователи идентифицировали 912 экзосомальных белков. При этом количество белков в протеомном профиле экзосом, связанных с молекулярным транспортом, функциями иммунной системы и подвижностью клеток, было намного выше по сравнению с клетками, из которых эти экзосомы произошли. При дальнейшем сравнении с литературными данными 153 белка, идентифицированных в МВ, оказалась характерны и для плеврального выпота, в то время как 67 белков были ассоциированы с тканью лёгкого. Среди них оказались диагностически значимые белки: ABI-1, базиджин (BSG), кавеолин 1 (CAV1), EGFR, GRB2, белки семейства RAS и SRC, CEACAM5 и цитоплазматическая неорганическая пирофосфатаза (Ppase) – специфичные для плеврального выпота; клаудин 1, аннексин 1, аквапорин 1, CEACAM6 – специфичные для ткани лёгкого. Данный набор белков обладает большим потенциалом для выявления рака лёгкого, однако необходима валидация маркеров в цельной плазме крови или в экзосомах, выделенных из неё.

Совсем недавно группа китайских учёных успешно валидировала маркеры альфа-2HS-гликопротеин (AHSG) и ECM1, отобранные по результатам масс-спектрометрического анализа экзосом, выделенных из сыворотки крови, на когорте из 125 пациентов с раком лёгкого на различных стадиях и 46 здоровых доноров [42]. Примечательно, что при сравнении пациентов с раком лёгкого на ранней стадии и здоровых доноров применение комбинации двух новых биомаркеров AHSG, ECM1 и используемого в клинике CEA позволило достигнуть чувствительности и специфичности теста на уровне 85,7% и 84,4% соответственно [42].

Таким образом, высокопродуктивные протеомные методы и методы анализа микроРНК обладают огромным потенциалом для разработки подходов к скринингу и диагностике рака лёгкого.

3.2. Рак прямой кишки

KPP находится на третьем месте в мире по распространённости и на втором по смертности. Благодаря программам скрининга и новым подходам к терапии за последние двадцать лет уровень

смертности снизился на 35% [43]. При этом основной проблемой остаётся резистентность к терапии в силу гетерогенности опухоли, обусловленной мутациями различных генов, таких как *KRAS*, *NRAS*, *BRAF*, *PIK3CA*, а также плохой прогноз для метастатической формы КРР. Важной задачей является поиск новых прогностических и предиктивных маркеров, в том числе секретируемых в составе экзосом.

По последним данным, образование экзосом клетками КРР необходимо не только для межклеточной коммуникации, но и для удаления из клеток онко-супрессорных микроРНК (miR-193a), что, в свою очередь, стимулирует пролиферацию и рост опухоли [44].

С целью определения специфичных для КРР экзосомальных белков микровезикулы клеток линии LIM1215 выделили с помощью иммуноаффинного осаждения с использованием поверхностного антигена A33. Эффективность выделения экзосом оценивали методом иммуноблоттинга по маркерам A33, TSG101 и HSP70. По результатам масс-спектрометрии высокого разрешения и последующего биоинформатического анализа определили тканеспецифичные белки в экзосомах клеток КРР, такие как антиген A33, кадгерин 17, клаудины 1, 3 и 7, centrosомальный белок 55 кДа (CEP55), эфрины B1 и B2, рецептор эфрина A2 (EPHA2), кератин 18 (KRT18), муцин 13 (MUC13), протеинкиназы MAPK4 и MINK1, ядерный антиген пролиферирующих клеток (PCNA), белки CEA, EpCAM, EGFR, POLD1, PPP2R1B и RUVBL1 [45]. Этот обширный список включает перспективные диагностически значимые молекулы, требующие дальнейшей валидации.

В исследовании Тауго и соавт. экзосомы выделяли из культуры клеток LIM1863 колоректальной карциномы для сравнения морфологических и протеомных профилей экзосом, выделенных тремя различными методами: ультрацентрифугированием, центрифугированием в градиенте плотности с использованием OptiPrep™ и использованием антител EpCAM, связанных с магнитными гранулами [46]. Из 171 уникального белка, идентифицированных в ходе исследования, ряд белков участвует в пролиферации и инвазии раковых клеток, является протоонкогенами или участвует в сигнальных путях, связанных с канцерогенезом: HGFR, AREG, EFNB1, EFNB2, EPHA2-8, EPHB1-4, CTNBNB1, TNF, CRK, GRB2, CEACAM1 и CEACAM5.

Исследователи из Кореи провели сравнительный протеомный анализ экзосом, полученных из первичных клеток КРР человека (SW480) и их метастатических производных (SW620) [47]. Используя количественный протеомный анализ, идентифицировали 803 и 787 белков в линиях EV4 SW480 и EV6 SW620, соответственно. Экзосомы, полученные из клеточной линии SW480, обогащены белками, связанными с адгезией (ILK, ITGA1, ICAM1, CTNBNB1, PKP2 и др.), в то время как белки, идентифицированные в экзосомах клеточной линии SW620, участвуют в прогрессировании рака

и играют роль в возникновении лекарственной устойчивости (AARS, CCDC50, PAK4, ANXA1, LCK, LCP1, AK2, HSPA9 и др.) [47].

3.3. Рак молочной железы

Исследования на клеточных линиях рака молочной железы MCF10A, MCF7 и MDA-MB-231 показали, что экзосомы рака молочной железы обогащены некоторыми видами микроРНК (такими как miR-21 и miR-1246), эти же микроРНК выявляются в плазме у мышей PDX с раком молочной железы и значительно повышены в плазме у пациентов с раком молочной железы [48]. Эти результаты подтверждают утверждение, что микроРНК экзосом могут служить важным дополнительным диагностическим инструментом для рака молочной железы.

Chow и соавт. обнаружили, что экзосомы из клеточной линии MDA-MB-231 и MCF7 рака молочной железы индуцируют активацию NF-κB в макрофагах [49].

В работах итальянских и швейцарских учёных было показано, что экзосомы, секретируемые клетками линии MDA-MB-231 рака молочной железы, играют роль в метастазировании опухоли. В этом исследовании было проведено сравнение протеома выделенных экзосом и цельного лизата клеток рака молочной железы. Протеомный анализ белков позволил выделить молекулы, которые участвуют в биогенезе экзосом и регуляции клеточного цикла (ACTB/G, TBA1C, K1C9, TPM4, FSCN1, TAGL2, PDC6I), регуляции апоптоза (TERA, ANXA5, HSP71, PRDX2, UBIQ, PDC6I), играют важную роль в сигнальных путях и модуляции иммунной системы во время прогрессирования опухоли (LG3BP, LAMC1, GBB2, ITA3, ITA6, B2MG) и фокальной адгезии (LAMC1, ACTB/G) [50].

3.4. Рак предстательной железы

В настоящее время в качестве маркера РПЖ в клинике широко используется PSA. Однако PSA является органоспецифическим маркером, это значит, что его увеличение не всегда означает малигнизацию ткани. Новой тенденцией в исследовании РПЖ является протеомный анализ простасом (специфических экзосом предстательной железы) для поиска новых биомаркеров. В случае с РПЖ простасомы появляются не только в простатической жидкости (как это происходит в норме), но и в других периферических жидкостях: крови, моче, сперме [51].

Семенная плазма является отличным источником биомаркеров, потому что она циркулирует и контактирует с репродуктивной системой. Протеомный анализ может быть использован для поиска биомаркеров бесплодия и РПЖ. В исследовании Yang и соавт. выделение экзосом проводили с помощью ультрацентрифугирования в градиенте плотности сахарозы, с последующим анализом образцов методом вестерн-блота [52]. Размер и концентрацию частиц определяли,

используя метод анализа траекторий наночастиц. Для подтверждения морфологии семенных экзосом использовали трансмиссионный электронный микроскоп. Выделенные белки определяли с помощью ВЭЖХ-МС/МС анализа. Семенную жидкость брали у 12 здоровых доноров и случайным образом делили на две группы для двух биологических повторов. В результате анализа идентифицировали 1474 белка, в том числе перекрывающиеся 354 (из двух групп). В качестве маркеров экзосом использовали ALIX и HSP70, аннексыны и белки, связанные с сигнальным путём Ras-киназы, за отрицательный контроль брали внутриклеточные белки (CNX). В результате исследования в экзосомах, выделенных из семенной жидкости, были обнаружены следующие белки: ACTB, GAPDH, PHGDH, LGALS3BP и SEMG1; а также биомаркеры мужского бесплодия: SEMG1, SEMG2, PIP, FN1, ACP, KLK3.

Turay и соавт. в своем исследовании сравнивали экзосомальные белки из плазмы крови этнически разных пациентов с РПЖ. Для выделения экзосом использовали коммерческий набор ExoQuick ("SBI", США) [53]. Среди полученных белков были такие, которые описаны ранее как связанные с канцерогенезом и опухолевым ростом: DNA2, PIF1, FHL3, GSTO2, MELK, IRX5, MCM5, MTUS1 и др.

3.5. Рак яичника

В работе Yi и соавт. было показано, что инкубация клеток HUVEC с экзосомами клеток линий высокозлокачественной серозной карциномы яичника (SKOV3 и CAOV3) приводит к значительному усилению ангиогенеза, миграции и изменению морфологии клеток. С помощью протеомного анализа исследователи нашли 10 белков экзосом клеточной линии CAOV3, связанных с ангиогенезом, включающие такие как EBNA1 и MTA1 [54]. Liang и соавт. исследовали экзосомальные белки клеток линий OVCAR-3 и IGROV1 рака яичника и обнаружили их связь с сигнальными путями канцерогенеза [55]. Белки, сверхэкспрессированные в ткани рака яичника, включали: EpCAM, PCNA, TUBB, EGFR, APOE, CLDN3. Эти результаты показали, что кроме общих экзосомальных маркеров, везикулы содержат белки, связанные с канцерогенезом и метастазированием.

При изучении сыворотки пациентов с диагнозом серозная папиллярная аденокарцинома и первичных клеточных линий, полученных от пациентов с наследственным раком яичника (UL-1, UL-2, UL-3, UL-6, UL-B, UL-O), и сравнении результатов были обнаружены специфичные для опухоли яичника микроРНК, связанные с опухолевыми тканями (например, let-7i, miR-16, miR-21 и miR-214) [56]. Кроме того, профили экзосомальных микроРНК совпадают с профилями микроРНК опухолевых клеток, что указывает на то, что экзосомальные микроРНК отражают профиль опухоли и могут использоваться без получения биопсии.

4. ПРОТЕОМНЫЕ МУЛЬТИПЛЕКСНЫЕ ПАНЕЛИ МАРКЕРОВ

На сегодняшний день основными проблемами для успешного применения анализа экзосом в диагностике злокачественных новообразований остается недостаток как универсальных маркеров, подтверждающих экзосомальную идентичность, так и опухоль-специфичных маркеров экзосом, отличающих различные типы рака. Одновременный анализ панели биомаркеров позволяет значительно повысить чувствительность и специфичность диагностики. Благодаря возможности одновременного анализа множества белков в сложных биологических матрицах масс-спектрометрический метод представляет собой многообещающую альтернативу методикам, использующим антитела.

Ранее в нашей лаборатории возможности направленной масс-спектрометрии были применены для количественной оценки маркеров CD9, CD63, CD82 и HSPA8 в образцах экзосом, выделенных с помощью дифференциального ультрацентрифугирования, ультрацентрифугирования в градиенте плотности сахарозы или с использованием преципитации [21]. В результате ультрацентрифугирования в градиенте сахарозы оказалось наиболее подходящим подходом выделения экзосом для последующей масс-спектрометрии. Панорамный масс-спектрометрический анализ экзосомальной фракции, выделенной этим методом из плазмы крови здоровых добровольцев, позволил идентифицировать 108 белков. В числе них оказались секретиромые белки кластерин (CLU), эзрин (EZR), галектин-3-связывающий белок (LGALS3BP), белок родственной гаптоглобину (HPR), интегрин-альфа-IIb (ITGA2B), калликреин (KLKB1), тромбоспондин 1 (THBS1) и витамин-К-зависимый белок S (PROS1). Эти белки играют роль в сигнальных путях, связанных с различными заболеваниями, и их можно рассматривать как панель белковых маркеров.

На сегодняшний день большинство исследований внеклеточных везикул, использующих в качестве инструмента протеомные методы, нацелены на сравнительное профилирование белков экзосом у больных раком и у здоровых добровольцев. Несмотря на то, что полученные данные представляют большой интерес с точки зрения поиска диагностических биомаркеров, необходимо также иметь представление о молекулярных особенностях различных форм рака внутри одной нозологической формы.

С целью выявления белков экзосом, различающих между собой отдельные варианты аденокарциномы лёгкого и колоректальной аденокарциномы, мы провели протеомное профилирование экзосом двух клеточных линий аденокарциномы лёгкого (A549 и NCI-H23) и трёх клеточных линий колоректальной аденокарциномы (HT29, HCT-116 и CaCo-2) (Shushkova et al., готовится к публикации). Исследуемые линии клеток отличаются мутационным статусом генов *KRAS*, *BRAF*, *PIK3CA*, *c-MYC* и *p53*, что определяет различную восприимчивость

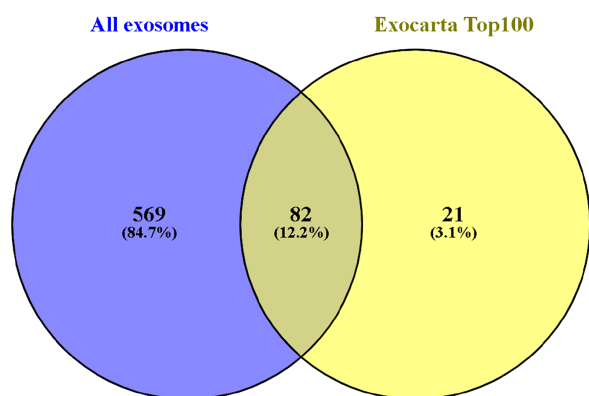


Рисунок 3. Диаграмма Венна для белков, идентифицированных в образцах экзосом аденокарциномы лёгкого и колоректальной аденокарциномы (All exosomes) и для белков, наиболее часто встречающихся в экзосомах (по материалам базы данных ExoCarta) (Exocarta Top100).

к терапии, особенно к таргетным препаратам. По результатам масс-спектрометрического анализа высокого разрешения 651 белок был идентифицирован как минимум по двум пептидам во всех экзосомальных образцах. Среди них оказались 82 белка из 103 наиболее часто встречающихся в экзосомах (по материалам базы данных ExoCarta) (рис. 3).

Благодаря относительному количественному анализу без использования изотопных меток удалось определить тканеспецифические белки и белки, специфичные для каждой линии клеток. В список этих молекул входят белки теплового шока, интегрины, белки, участвующие в биогенезе экзосом, сплайсинге, метаболизме РНК, реорганизации цитоскелета и клеточной адгезии, в регуляции клеточного роста, дифференцировки и апоптоза. Белки экзосом, отличающие выбранные клеточные линии, могут послужить потенциальными предиктивными и прогностическими биомаркерами.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Экзосомы сохраняют свойства клеток-продуцентов и отражают их функции, поэтому изучение состава экзосом является приоритетным направлением для поиска новых малоинвазивных биомаркеров злокачественных опухолей. На сегодняшний день высокопроизводительные омиксные технологии представляют собой мощный инструмент для молекулярного исследования экзосом. Геномные и транскриптомные методы позволяют реплицировать молекулы РНК и ДНК, что даёт возможность получить представление о молекулярном портрете микровезикул с высочайшей чувствительностью. В то же время протеомные методы, в первую очередь, масс-спектрометрический анализ, дают возможность мультиплексного анализа белков, наиболее точно отражающих опухолевый фенотип. В качестве объекта часто выбирают кондиционированную среду, в которой культивируют опухолевые клетки, и для таких моделей получены многообещающие данные на уровне РНК и белка. При этом нужно

учитывать, что валидацию опухолевых маркеров необходимо проводить на биологическом материале от пациентов, к которому, прежде всего, относится кровь и моча, а также плевральный выпот и семенная плазма. Именно эти, сложные по составу биологические среды, а не клетки первичной опухоли, представляют особый интерес как источники малоинвазивных биомаркеров. На разработку новых подходов к точному чувствительному количественному анализу компонентов экзосом сложных биологических матриц должны быть направлены дальнейшие исследования.

БЛАГОДАРНОСТИ

Собственные данные, приведённые в разделе 4, выполнены с использованием оборудования ЦКП "Протеом человека".

ФИНАНСИРОВАНИЕ

Исследование выполнено при поддержке гранта РНФ №19-75-00044.

ЛИТЕРАТУРА

1. Graves L.E., Ariztia E.V., Navari J.R., Matzel H.J., Stack M.S., Fishman D.A. (2004) *Cancer Res.*, **64**(19), 7045-7049.
2. Al-Nedawi K., Meehan B., Kerbel R.S., Allison A.C., Rak J. (2009) *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, **106**(10), 3794-3799.
3. Ichim T.E., Zhong Z., Kaushal S., Zheng X., Ren X., Hao X., Joyce J.A., Hanley H.H., Riordan N.H., Koropatnick J., Bogin V., Mineev B.R., Min W.P., Tullis R.H. (2008) *J. Translat. Med.*, **22**, 6-37.
4. Kosaka N., Yoshioka Y., Fujita Y., Ochiya T. (2016) *J. Clin. Invest.*, **126**(4), 1163-1172.
5. Harding C., Heuser J., Stahl P. (1983) *J. Cell Biol.*, **97**(2), 329-339.
6. Pan B., Johnstone R.M. (1983) *Cell*, **33**(3), 967-978.
7. Raposo G., Nijman H.W., Stoorvogel W., Liejendekker R., Harding C.V., Melief C.J., Geuze H.J. (1996) *J. Exp. Med.*, **183**(3), 1161-1172.
8. Zitvogel L., Regnault A., Lozier A., Wolfers J., Flament C., Tenza D., Ricciardi-Castagnoli P., Raposo G., Amigorena S. (1998) *Nat. Med.*, **4**(5), 594-600.
9. Théry C., Ostrowski M., Segura E. (2009) *Nat. Rev. Immunol.*, **9**(8), 581-593.
10. Simons M., Raposo G. (2009) *Curr. Opin. Cell Biol.*, **21**(4), 575-581.
11. Harding C.V., Heuser J.E., Stahl P.D. (2013) *J. Cell Biol.*, **200**(4), 367-371.
12. Pan B.T., Teng K., Wu C., Adam M., Johnstone R.M. (1985) *J. Cell Biol.*, **101**(3), 942-948.
13. Lafourcade C., Sobo K., Kieffer-Jaquinod S., Garin J., van der Goot F.G. (2008) *PLoS One*, **3**(7), e2758. DOI: 10.1371/journal.pone.0002758.
14. Kalani A., Tyagi A., Tyagi N. (2014) *Molecular Neurobiology*, **49**(1), 590-600.
15. Colombo M., Raposo G., Théry C. (2014) *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.*, **30**(1), 255-289.
16. Ratajczak J., Wysoczynski M., Hayek F., Janowska-Wieczorek A., Ratajczak M.Z. (2006) *Leukemia*, **20**(9), 1487-1495.

17. Valadi H., Karin E., Apostolos B. (2008) *Lipid Insights*, **1**(6), 27-40.
18. Hemler M.E. (2003) *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.*, **19**, 397-422.
19. Hanson P.I., Cashikar A. (2012) *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.*, **28**(1), 337-362.
20. Wubbolts R., Leckie R.S., Peter T., Veenhuizen M., Schwarzmann G., Möbius W., Hoernschemeyer J., Slot J.W., Geuze H.J., Stoorvogel W. (2003) *J. Biol. Chem.*, **278**, 10963-10972.
21. Шушкова Н.А., Вавилов Н.Е., Новикова С.Е., Фарафонова Т.Е., Тихонова О.В., Ляо П.Ч., Згода В.Г. (2018) *Биомед. химия*, **64**(6), 496-504. [Shushkova N.A., Vavilov N.E., Novikova S.E., Farafonova T.E., Tikhonova O.V., Liao P.C., Zgoda V.G. (2018) *Biomed. khimiya*, **64**(6), 496-504.]
22. Mathivanan S., Simpson R.J. (2009) *Proteomics*, **9**(21), 4997-5000.
23. Tung K., Ernststoff M., Allen C., Shu S. (2019) *J. Immunol. Sci.*, **3**(1), 4-8.
24. Whiteside T.L. (2016) *J. Clin. Invest.*, **126**(4), 1216-1223.
25. Shu S., Yang Y., Allen C.L., Maguire O., Minderman H., Sen A., Ciesielski M.J., Collins K.A., Bush P.J., Singh P., Wang X., Morgan M., Qu J., Bankert R.B., Whiteside T.L., Wu Y., Ernststoff M.S. (2018) *Sci. Rep.*, **8**(1), 12905.
26. Zhang H., Deng T., Liu R., Bai M., Zhou L., Wang X., Li S., Wang X., Yang H., Li J., Ning T., Huang D., Li H., Zhang L., Ying G., Ba Y. (2017) *Nat. Commun.*, **8**, 15016. DOI: 10.1038/ncomms15016.
27. Beckler M.D., Higginbotham J.N., Franklin J.L., Ham A.J., Halvey P.J., Imasuen I.E., Whitwell C., Li M., Liebler D.C., Coffey R.J. (2013) *Mol. Cell. Proteomics*, **12**(2), 343-355.
28. <https://www.who.int/ru/news-room/fact-sheets/detail/cancer>
29. Whiteside T.L. (2015) *Exp. Rev. Mol. Diagn.*, **15**(10), 1293-310.
30. Reclusa P., Taverna S., Pucci M., Durendez E., Calabuig S., Manca P., Serrano M.J., Sober L., Pauwels P., Russo A., Rolfo C. (2017) *J. Thorac. Dis.*, **9**(13), 1373-1382.
31. Alipoor S.D., Mortaz E., Varahram M., Movassaghi M., Kraneveld A.D., Garssen J., Adcock I.M. (2018) *Frontiers Immunol.*, **9**, 819.
32. Lagos-Quintana M., Rauhut R., Lendeckel W., Tuschl T. (2002) *Science*, **294**(5543), 853-858.
33. Rabinowits G., Gerçel-Taylor C., Day J.M., Taylor D.D., Kloecker G.H. (2009) *Clin. Lung Cancer*, **10**(1), 42-46.
34. Yuwen D.L., Sheng B.B., Liu J., Wenyu W., Shu Y.Q. (2017) *Eur. Rev. Med. Pharmacol. Sci.*, **21**(11), 2650-2658.
35. Yuan D., Xu J., Wang J., Pan Y., Fu J., Bai Y., Zhang J., Shao C. (2016) *Oncotarget*, **7**(22), 32707-32722.
36. Cazzoli R., Buttitta F., di Nicola M., Malatesta S., Marchetti A., Rom W.N., Pass H.I. (2013) *J. Thorac. Oncol.*, **8**(9), 1156-1162.
37. Jin X., Chen Y., Chen H., Fei S., Chen D., Cai X., Cai X., Liu L., Lin B., Su H., Zhao L., Su M., Pan H., Shen L., Xie D., Xie C. (2017) *Clin. Cancer Res.*, **23**(17), 5311-5319.
38. Huang S.H., Qin J., Li Y., An J., Zhang J.H., Rong J., Ye S. (2014) *Chinese Pharmacol. Bull.*, **30**(8), 1090-1095.
39. Sandfeld-Paulsen B., Aggerholm-Pedersen N., Baek R., Jakobsen K.R., Meldgaard P., Folkersen B.H., Rasmussen T.R., Varming K., Jørgensen M.M., Sorensen B.S. (2016) *Mol. Oncol.*, **10**(10), 1595-1602.
40. Clark D.J., Fondrie W.E., Yang A., Mao L. (2016) *J. Proteomics*, **133**, 161-169.
41. Park J.O., Choi D.Y., Choi D.S., Kim H.J., Kang J.W., Jung J.H., Lee J.H., Kim J., Freeman M.R., Lee K.Y., Gho Y.S., Kim K.P. (2013) *Proteomics*, **13**(14), 2125-2134.
42. Niu L., Song X., Wang N., Xue L., Song X., Xie L. (2019) *Cancer Sci.*, **110**(1), 433-442.
43. Thanikachalam K., Khan G. (2019) *Nutrients*, **11**(1), e164. DOI: 10.3390/nu11010164.
44. Teng Y., Ren Y., Hu X., Mu J., Samykutty A., Zhuang X., Deng Z., Kumar A., Zhang L., Merchant M.L., Yan J., Miller D.M., Zhang H.G. (2017) *Nat. Commun.*, **8**, 14448. DOI: 10.1038/ncomms14448.
45. Mathivanan S., Lim J.W.E., Tauro B.J., Ji H., Moritz R.L., Simpson R.J. (2010) *Mol. Cell. Proteomics*, **9**(2), 197-208.
46. Tauro B.J., Greening D.W., Mathias R.A., Ji H., Mathivanan S., Scott A.M., Simpson R.J. (2012) *Methods*, **56**(2), 293-304.
47. Choi D.S., Choi D.Y., Hong B., Jang S., Kim D.K., Lee J., Kim Y.K., Kim K.P., Gho Y.S. (2012) *J. Extracell. Vesicles*, **1**(1), 18704. DOI:10.3402/jev.v1i0.18704.
48. Hannafon B.N., Trigos Y.D., Calloway C.L., Zhao Y.D., Lum D.H., Welm A.L., Zhao Z.J., Blick K.E., Dooley W.C., Ding W.Q. (2016) *Breast Cancer Res.*, **18**(1), 90. DOI: 10.1186/s13058-016-0753-x.
49. Chow A., Zhou W., Liu L., Fong M.Y., Champer J., van Haute D., Chin A.R., Ren X., Gugu B.G., Meng Z., Huang W., Ngo V., Kortylewski M., Wang S.E. (2015) *Sci Rep.*, **4**(1), 5750. DOI: 10.1038/srep05750.
50. Palazzolo G., Albanese N.N., di Cara G., Gyga D., Vittorelli M.L., Pucci-Minafra I. (2012) *Anticancer Res.*, **32**(3), 847-860.
51. Brett S.I., Lucien F., Guo C., Williams K.C., Kim Y., Durfee P.N., Brinker C.J., Chin J.I., Yang J., Leong H.S. (2017) *Prostate*, **77**(13), 1335-1343.
52. Yang C., Guo W., Zhang W., Bian J., Yang J., Zhou Q., Chen Y.P., Chen M.K., Peng W., Qi T., Wang C.Y., Liu C.D. (2017) *Andrology*, **5**(5), 1007-1015.
53. Turay D., Khan S., Diaz Osterman C., Curtis M., Khaira B., Neidigh J. (2016) *Cancer Invest.*, **34**(1), 1-11.
54. Yi H., Ye J., Yang X.M., Zhang L.W., Zhang Z.G. (2015) *Int. J. Clin. Exp. Pathol.*, **8**(5), 5062-5070.
55. Liang B., Peng P., Chen S., Li L., Zhang M., Cao D., Yang J., Li H., Gui T., Li X., Shen K. (2013) *J. Proteomics*, **80**, 171-182.
56. Taylor D.D., Gerçel-Taylor C. (2008) *Gynecol. Oncol.*, **110**, 13-21.

Поступила в редакцию: 08. 11. 2019.
После доработки: 25. 11. 2019.
Принята к печати: 27. 11. 2019.

EXOSOMES OF MALIGNANT TUMORS: PROSPECTS OF OMICS DIAGNOSTICS

N.A. Shushkova, S.E. Novikova, V.G. Zgoda*

Institute of Biomedical Chemistry,
10 Pogodinskaya str., Moscow, 119121 Russia; *e-mail: n.shushkova@yandex.ru

The main problems in the diagnostics and treatment of malignant tumors are early detection of the disease, prediction of the course of the disease and response to therapy. The solution may be associated with identification of biomarkers secreted by tumor cells within extracellular vesicles, known as exosomes. The study of exosome proteins attracts special attention, because their molecular composition can have information about tumor identity, and also represent a set of signaling molecules that regulate the processes of tumor progression and growth. In addition, the analysis of exosomes secreted into the extracellular space corresponds to the promising concept of a liquid biopsy. In this review, we have summarized the current experience in the molecular study of exosomes in various types of malignant tumors, including colorectal cancer, lung cancer, ovaries, prostate and breast cancer, with special emphasis on omics methods and outlined the prospects for their use in diagnosis.

Key words: exosomes; omics diagnostics; proteomics; transcriptomics; malignant tumors

Funding. The research was carried out with the support of the Russian Scientific Foundation grant No. 19-75-00044.

Received: 08.11.2019, revised: 25.11.2019, accepted: 27.11.2019.