

Экзосомальные протеины – потенциальные маркеры для диагностики множественной миеломы

В.Е. Шевченко¹, А.С. Брюховецкий², М.В. Филатов³, В.С. Бурдаков³, З.Н. Никифорова⁴,
И.С. Брюховецкий^{5,6}, Ю.Д. Василец⁷, Т.И. Кушнир⁷, Н.Е. Арноцкая¹

¹НИИ канцерогенеза ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России; Россия, 115478 Москва, Каширское шоссе, 24;

²ЗАО «Клиника восстановительной и интервенционной неврологии и терапии «НейроВита»; Россия, 115478 Москва, Каширское шоссе, 23;

³Национальный исследовательский центр «Курчатовский институт», ФГБУ «Петербургский институт ядерной физики им. Б.П. Константинова»; Россия, 188300 Ленинградская обл., Гатчина, мкр. Орлова роща, 1;

⁴ФГБУ «Всероссийский государственный центр качества и стандартизации лекарственных средств для животных и кормов»; Россия, 123022 Москва, Звенигородское шоссе, 5;

⁵Школа биомедицины ФГАОУ ВО «Дальневосточный федеральный университет»; Россия, 690091 Владивосток, ул. Суханова, 8;

⁶ФГБУН «Национальный научный центр морской биологии» Дальневосточного отделения РАН; Россия, 690059 Владивосток, ул. Пальчевского, 17;

⁷ФГБОУ ВО «Московская государственная академия ветеринарной медицины и биотехнологии – МВА им. К.И. Скрябина»; Россия, 109472 Москва, ул. Академика Скрябина, 23

Контакты: Валерий Евгеньевич Шевченко vshev2015@yandex.ru

Введение. Множественная миелома (ММ) – злокачественная гематологическая опухоль из плазматических клеток. Микроокружение играет ключевую роль в выживании клеток ММ и их резистентности к лекарственным препаратам путем выделения растворимых факторов, повышения экспрессии молекул адгезии и высвобождения экзосом (ЭС). Роль, которую ЭС, секретлируемые клетками ММ, играют в межклеточных взаимодействиях и передаче сигнальной информации в костном мозге, в настоящее время неизвестна. ЭС как источник маркеров для диагностики ММ также не исследованы.

Цель исследования – использование протеомного профилирования ЭС в качестве инструмента для идентификации маркеров опухолевого роста у пациентов с ММ.

Результаты. Впервые изучен протеомный состав ЭС, полученных из плазмы крови пациентов с ММ и рассеянным склерозом. С помощью метода нано-высокоэффективной жидкостной хроматографии – тандемной масс-спектрометрии (нано-ВЭЖХ-МС/МС) идентифицированы в целом 332 белка в ЭС обеих групп больных и установлена близость их качественного состава. Впервые обнаружены 12 дифференциально экспрессированных белков, уровни которых значительно повышены в ЭС больных ММ, что позволило рассматривать их в качестве потенциальных маркеров заболевания.

Заключение. Протеомный анализ ЭС, полученных из плазмы крови больных ММ, является важным методом для поиска маркеров заболевания.

Ключевые слова: экзосома, плазма крови, протеом, масс-спектрометрия, множественная миелома, рассеянный склероз

Для цитирования: Шевченко В.Е., Брюховецкий А.С., Филатов М.В. и др. Экзосомальные протеины – потенциальные маркеры для диагностики множественной миеломы. Успехи молекулярной онкологии 2018;5(1):60–9.

DOI: 10.17650/2313-805X-2018-5-1-60-69

Exosomal proteins as potential markers of multiple myeloma diagnostics

V.E. Shevchenko¹, A.S. Bryukhovetskiy², M.V. Filatov³, V.S. Burdakov³, Z.N. Nikiforova⁴, I.S. Bryukhovetskiy^{5,6},
Yu. D. Vasilets⁷, T.I. Kushnir⁷, N.E. Arnotskaya¹

¹Research Institute of Carcinogenesis, N.N. Blokhin National Medical Research Center of Oncology, Ministry of Health of Russia; 24 Kashirskoe Shosse, Moscow 115478, Russia;

²NeuroVita Clinic of Interventional and Restorative Neurology and Therapy; 23 Kashirskoe Shosse, Moscow 115478, Russia;

³National Research Center “Kurchatov Institute”, B.P. Konstantinov Petersburg Nuclear Physics Institute; 1 Orlova Roshcha microdistrict, Gatchina, Leningrad Region 188300, Russia;

⁴All-Russian State Center for Quality and Standardization of Veterinary Drugs and Feed; 5 Zvenigorodskoe Shosse, Moscow 123022, Russia;

⁵School of Biomedicine, Far Eastern Federal University; 8 Sukhanova St., Vladivostok 690091, Russia;

⁶National Scientific Center of Marine Biology, Far Eastern Branch of the Russian Academy of Sciences; 17 Pal'chevskogo St., Vladivostok 690059, Russia;

⁷K.I. Skryabin Moscow State Academy of Veterinary Medicine and Biotechnology; 23 Akademika Skryabina St., Moscow 109472, Russia

Background. Multiple myeloma (MM) is a hematologic malignancy of plasma cells. The microenvironment plays a key role in MM cell survival and drug resistance through release of soluble factors, expression of adhesion molecules and release of exosomes (EXs). The role that EXs, released by MM cells have in cell-to-cell communication and signaling in the bone marrow is currently unknown. EXs as a source of markers for MM diagnostics are also not studied.

Objective: to use proteomic profiling of EXs as a tool to identify circulating tumor associated markers in MM patients.

Results. The proteome composition of EXs obtained from plasma of patients with MM and multiple sclerosis was studied for the first time. nano-HPLC-MS/MS analysis identified a total of 332 proteins in the EXs of both groups of patients and determined the proximity of their qualitative composition. For the first time, 12 differentially expressed proteins were detected, the levels of which were significantly increased in EXs from patients with MM. This allowed us to consider them as potential markers of the disease.

Conclusion. Proteomic analysis of EXs obtained from plasma of patients with MM is an important method for finding disease markers.

Key words: exosome, blood plasma, proteome, mass-spectrometry, multiple myeloma, multiple sclerosis

For citation: Shevchenko V.E., Bryukhovetskiy A.S., Filatov M.V. et al. Exosomal proteins as potential markers of multiple myeloma diagnostics. *Uspekhi molekulyarnoy onkologii = Advances in Molecular Oncology* 2018;5(1):60–9.

Введение

Множественная миелома (ММ), генерализованная плазмоцитома — злокачественная гематологическая опухоль из плазматических клеток (дифференцированных В-лимфоцитов, продуцирующих антитела) с преимущественной локализацией в костном мозге. ММ занимает 18 % в структуре смертности от гематологических опухолей, от нее ежегодно умирают порядка 80 тыс. больных во всем мире [1]. Внедрение новых противоопухолевых препаратов, включая ингибиторы протеасом и иммуномодулирующие препараты, увеличило медиану 5-летней выживаемости пациентов с ММ [2]. Показано, что клетки ММ зависят от состояния их микроокружения в костном мозге (например, стромальных клеток костного мозга, макрофагов и т. д.) и активно взаимодействуют с ним [3]. Этот процесс играет ключевую роль в регуляции роста и выживаемости клеток ММ, а также их резистентности к лекарственным препаратам. Межклеточные взаимодействия осуществляются путем прямого контакта через адгезивные молекулы или растворимые факторы, включая цитокины (интерлейкины 6, 8 и фактор роста эндотелия сосудов), а также реализацию экстраклеточных везикул (ЭВ) [4]. Последние, в том числе экзосомы (ЭС), секретируются почти всеми типами клеток и являются важнейшими элементами бесконтактной коммуникации между клетками [5]. Недавно обнаружено, что ЭС индуцируют выживаемость и резистентность к лекарственным препаратам клеток ММ человека *in vitro* [6]. Использование белкового содержимого ЭС в качестве источника биомаркеров для диагностики начала заболевания, его прогрессирования и лекарственной резистентности недостаточно изучено. Таким образом, идентификация новых белков в ЭС, продуцируемых клетками ММ, поможет в выяснении молекулярных механизмов патогенеза этого опасного заболевания, его ранней диагностике и лечении.

Цель исследования — разработка анализа методом нано-высокоэффективной жидкостной хроматографии — тандемной масс-спектрометрии (нано-ВЭЖХ-МС/МС) протеома ЭС плазмы крови человека для поиска маркеров опухолевого роста.

Материалы и методы

Реактивы. Для всех процедур использовали дистиллированную воду, очищенную и обессоленную с помощью Milli-Q (Millipore Corporation, США). Ацетонитрил (ACN) HPLC gradient grade был получен из Prolabo (США); 98–100 % муравьиная кислота (FA) — из Merck (США); дитиотреитол, этилендиаминтетрауксусная кислота (ЭДТА), трис-(2-карбокситетил)фосфин (ТСЕР), трифторуксусная кислота (ТФА) и мочевины — из Fluka (США); фосфатный буферный раствор (ФБР), 99,7 % уксусная кислота, 99,5 % 2,2,2-трифторэтанол (ТФЕ), иодацетамид и трипсин, метилированный по лизинам, — из Sigma Aldrich (США); соляная кислота (чистая) — из «Химмед» (Россия). Для процедур типирования и определения количественного содержания ЭС с учетом экспрессии тетраспанинов CD63 и CD81 в качестве маркеров ЭС использовали коммерческие наборы (System Biosciences (SBI), США): CD63 EchoELISA (каталожный номер # EXOEL-CD63A-1), CD81 EchoELISA (каталожный номер # EXOEL-CD81A-1).

Выделение ЭС из плазмы крови человека. Образцы плазмы крови (по 100 мл) без тромбоцитов и эритроцитов получены от 3 больных с клиническим диагнозом ММ (НИИ клинической онкологии ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н. Н. Блохина» Минздрава России) и 3 пациентов с рассеянным склерозом (РС), не имеющих других онкологических заболеваний (Клиника восстановительной и интервенционной неврологии и терапии «НейроВита»). РС был выбран нами в качестве контроля, так как является системным хроническим аутоиммунным заболеванием неонкологической природы, при котором также поражается миелиновая оболочка нервных волокон.

Опытные образцы ЭС получали следующим образом.

1. Плазму крови разводили раствором ФБР/ЭДТА (20 мМ) в соотношении 1:1 и помещали по 50 мл каждого образца в 4 полипропиленовые пробирки для дифференциального центрифугирования.
2. Первое центрифугирование проводили при 1300g в течение 15 мин при температуре +4 °С на центрифуге MF20-R (угловой ротор AMF-20-8) (Awel,

Франция). Надосадочную жидкость переносили в новые полипропиленовые центрифужные пробирки. Второе центрифугирование выполняли при 15 000g в течение 30 мин при температуре +4 °С на той же центрифуге.

3. Последующую фильтрацию полученной надосадочной жидкости проводили шприцом через фильтры Millipore Millex-HV 0,45 мкм и Millipore Sterivex 0,22 мкм.
 - Полученный фильтрат (200 мл) от каждого образца больных ММ и РС распределяли в 6 пробирок для ультрацентрифуги CP 80NX (Hitachi, Япония) по 34 мл и проводили 3 последовательных ультрацентрифугирования при 100 000g (28 000 rpm) в течение 2 ч на ультрацентрифуге CP 80NX (ротор P28S) (Hitachi, Япония) для выделения и промывки ЭС. После первого ультрацентрифугирования надосадочную жидкость удаляли, к осадку в каждый флакон добавляли по 100 мкл ФБР/ЭДТА (20 мМ) и тщательно пипетировали.
 - Затем пробы объединяли из 6 флаконов в 1 флакон для каждого больного (объем проб составлял 1000 мкл). Перед каждой отмывкой ЭС объем образцов доводили до 34 мл, добавляя 33 мл ФБР/ЭДТА (20 мМ), и тщательно пипетировали.
4. После каждой отмывки проводили измерение содержания белка с помощью спектрофотометра NanoDrop ND-1000 (США).
5. После 3-го ультрацентрифугирования общий объем осадка доводили до 200 мкл dH₂O и содержимое разделяли на 2 части по 100 мкл. Одну часть образца использовали для масс-спектрометрического анализа, а во вторую часть с образцом добавляли 400 мкл буфера, связывающего ЭС (exosome binding buffer ELISA, System Biosciences, США), для постановки иммуноферментного анализа «сэндвич»-типа (ELISA). Образцы хранили в холодильнике при температуре +4 °С.

Определение и визуализация ЭС. Размер изолированных ЭВ определяли с помощью анализатора частиц Microtrac S3500 (Microtrac Inc., США) в соответствии с инструкцией производителя. Для визуализации ЭС использовали атомно-силовую микроскопию [7]. Фиксированные образцы сканировали на воздухе полуконтактным методом с помощью сканирующего микроскопа серии Solver BIO (NT-MDT, Россия). Полученные образцы содержали сферические микровезикулы размером 30–130 нм, что соответствовало фракции ЭС.

Типирование и количественное определение ЭС методом иммуноферментного анализа (ELISA) проводили по методике производителя (System Biosciences (SBI), США). Иммуноферментный анализ и обработку результатов выполняли с помощью прибора Bio-Rad 680. При построении линейной калибровочной кривой осуществляли регрессионный анализ.

Получение лизатов ЭС. Готовили 1 мл лизирующего буфера (Sigma Aldrich, США) по методике производителя. Все процедуры выполняли при температуре

+4 °С. В пробирки, содержащие 250 мкл суспензии ЭС в ФБР, добавляли 100 мкл лизирующего буфера, инкубировали в течение 15 мин в охлаждаемом шейкере Thermomixer Comfort (Eppendorf, Германия) и центрифугировали в течение 15 мин при температуре +4 °С в охлаждаемой центрифуге Centrifuge 5415F (Eppendorf, Германия) при 13 000 об/мин. Супернатанты отбирали и очищали от низкомолекулярных соединений с помощью Agilent Spin Concentrators for Proteins 5 кДа (США) по методике производителя. В пробах измеряли концентрацию белка и объединяли по 3 образца для каждой группы больных (ММ и РС) для дальнейшего исследования.

Подготовку образцов для протеомного картирования, анализ нано-ВЭЖХ-МС/МС и обработку полученных данных проводили по методикам, описанным ранее [8].

Результаты

ЭС выделяли путем последовательного центрифугирования плазмы крови, обедненной тромбоцитами и эритроцитами, которое состояло из нескольких этапов. Вначале проводили центрифугирование плазмы крови на малой (1500g) скорости для удаления мертвых клеток и крупных продуктов апоптоза, а затем центрифугировали на более высоких (15000g) скоростях, что позволяло удалять большие везикулы и продукты клеточного распада. Введенная нами дополнительно процедура фильтрования плазмы крови через 0,22 мкм фильтр избавляла от внеклеточных везикул с размером частиц >100 мкм и позволяла получать более чистые фракции ЭС. Фильтрат подвергали ультрацентрифугированию при 100 000g в течение 2 ч. Первая промывка снижала концентрацию высокопредставленных белков плазмы крови в образцах ЭС в ~50 раз. Двукратная промывка уменьшала уровни белков плазмы крови в ~140 раз по сравнению с исходным уровнем.

Типирование ЭС проводили по маркерам CD63 и CD81. Согласно полученным данным по маркеру CD63 количество ЭС, например, в пробах больного миеломой и больного РС составило 4,08Е9 и 5,42Е9 частиц/мл соответственно. По маркеру CD81 – 2,59Е9 и 5,83Е9 частиц/мл, что указывает на хорошее согласование данных по 2 маркерам.

Идентификацию белков в лизатах ЭС плазмы крови проводили с использованием label-free количественного протеомного анализа нано-ВЭЖХ-МС/МС. Разработанная нами методика позволила получить 2574 спектра МС/МС. С помощью программного пакета MaxQuant были просеквенированы 332 протеина по 2363 (1464 уникальным) пептидам при сравнении с данными базы SwissProt_human и ложным уровнем обнаружения (false discovery rate) 1 % для тройных повторений одного вида образцов. Диапазон молекулярного веса масс-протеинов изменялся от 2,58 до 964,83 кДа, из них 116 имели молекулярный вес до 30 кДа, 165 – 30–100 кДа, 43 – 100–300 кДа, 3 – 300–500 кДа, 5 – более 500 кДа. Процент покрытия анализируемых

белков варьировался от 0,2 до 86,4 %, из них 215 белков с покрытием до 20 %, 65 – 20–40 %, 42 – 40–60 %, 10 – 60,0–86,4 %.

Для идентификации белков, ранее обнаруженных во внеклеточных микровезикулах, анализировали базу данных везикулярных белков Vesiclepedia (версия 3 от 9.01.2015; microvesicles.org/download). Полученные результаты показали, что из 332 белков 100 ранее были найдены непосредственно в ЭС, секретируемых разными клетками, 46 – во внеклеточных частицах плазмы крови человека, а 62 – в микрочастицах крови. В микрочастицах, продуцируемых клетками различных видов рака, обнаружен 231 протеин. Анализ базы данных показал, что среди идентифицированных в ЭС протеинов часть выявлена ранее в микровезикулах, секретируемых лимфоцитами (126 протеинов), моноцитами (74 протеина), дендритными клетками (165 протеинов), нейтрофилами (116 протеинов), мезенхимальными стволовыми клетками (164 протеина), нейральными стволовыми клетками (2 протеина).

Таблица 1. Протеины, обычно представленные в экстраклеточных везикулах и идентифицированные в экзосомах плазмы крови больных множественной миеломой и рассеянным склерозом

Table 1. Proteins usually present in extracellular vesicles and identified in plasma exosomes of patients with multiple myeloma and multiple sclerosis

Количество идентифицированных пептидов Number of peptides identified	Молекулярный вес, кДа Molecular weight, kDa	Название протеина Protein name	Индекс гена Gene index
13	38,579	Актин, альфа скелетальный Actin alpha skeletal	<i>ACTA1</i>
24	41,792	Актин, цитоплазматический 2 Actin, cytoplasmic 2	<i>ACTB</i>
3	15,906	Тетраспанин; CD9 антиген Tetraspanin; CD9 antigen	<i>CD9</i>
2	14,265	Тетраспанин; CD63 антиген Tetraspanin; CD63 antigen	<i>CD63</i>
3	17,963	Тетраспанин; CD81 антиген Tetraspanin; CD81 antigen	<i>CD81</i>
3	29,643	Тетраспанин; CD82 антиген Tetraspanin; CD82 antigen	<i>CD82</i>
2	20,564	Тетраспанин 2 Tetraspanin 2	<i>TSPAN2</i>

2	23,918	Тетраспанин 14 Tetraspanin 14	<i>TSPAN14</i>
5	16,811	Кофилин 1 Cofilin 1	<i>CFL1</i>
7	36,053	Глицеральдегид-3-фосфат-дегидрогеназа Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase	<i>GAPDH</i>
5	129,29	Интегрин альфа 2 Integrin alpha 2	<i>ITGA2</i>
11	126,6	Интегрин альфа 6 Integrin alpha 6	<i>ITGA6</i>
32	113,38	Интегрин альфа IIb Integrin alpha IIb	<i>ITGA2B</i>
2	128,77	Интегрин альфа L Integrin alpha L	<i>ITGAL</i>
2	127,18	Интегрин альфа M Integrin alpha M	<i>ITGAM</i>
8	88,414	Интегрин бета 1 Integrin beta 1	<i>ITGB1</i>
5	77,354	Интегрин бета 2 Integrin beta 2	<i>ITGB2</i>
29	87,057	Интегрин бета 3 Integrin beta 3	<i>ITGB3</i>
18	67,819	Моэзин Moesin	<i>MSN</i>
9	15,054	Профилин 1 Profilin 1	<i>PFN1</i>
6	49,897	Пируваткиназа Pyruvate kinase	<i>PKM</i>
2	27,307	Тубулин бета n Tubulin beta n	<i>TUBB</i>
2	50,326	Тубулин бета 1 Tubulin beta 1	<i>TUBB1</i>
1	45,696	Тубулин бета 8 Tubulin beta 8	<i>TUBB8</i>

Разработанный метод позволил обнаружить известные маркерные белки мембран ЭС (табл. 1), такие как тетраспанины CD9, CD63, CD81, CD82 и др., что дополнительно подтвердило чистоту популяции ЭС, полученных нашим методом.

Данные протеомного картирования белков лизатов ЭС плазмы крови человека подвергали сравнительному биоинформационному анализу. По данным открытых баз, 332 протеинам, идентифицированным в лизатах ЭС, соответствовали 270 генов. Большая часть

белков относилась к ЭС (61,1 %), микровезикулам, продуцируемым форменными элементами крови (25,2 %), протеинам МНС класса I (16,8 %), мембранам фагоцитируемых везикул (18,5 %), интегральным компонентам люминальной стороны мембраны эндоплазматического ретикулаума (17,3 %), мембранам эндосом (18,0 %).

Протеины дополнительно картировали по биологической роли в клетке, молекулярной функции и функциональному классу в соответствии с протеомно-геномной аналитической программой PANTHER (Protein ANalysis THrough Evolutionary Relationships; www.pantherdb.org).

Основная часть идентифицированных протеинов участвует в клеточных (GO: 0009987; 22,8 %) и метаболических (GO: 0008152; 14,5 %) процессах, а также в процессах отклика на стимулы (GO: 0050895; 10,7 %), локализации (GO: 0051179; 10,1 %), иммунных процессах (GO: 0002376; 9,9 %), биологической регуляции (GO: 0065007; 9,0 %). Большая часть белков проявляла каталитическую (GO: 0003824; 31,4 %), связывающую (GO: 0005488; 37,1 %), структурно-молекулярную (GO: 0005198; 12,9 %), транспортную (GO: 0005215; 9,0 %) и рецепторную (GO: 0004872; 6,7 %) активность. Основная часть белков представлена следующими классами: сигнальные молекулы (GO: PC00207; 12,3 %), гидролазы (GO: PC00121; 9,7 %), модуляторы энзимов (GO: PC00095; 10,7 %), рецепторы (GO: PC00197; 9,1 %).

При поиске потенциальных маркеров ММ использовали дифференциально экспрессированные белки (ДЭБ), уровни которых статистически значимо увеличивались более чем в 2 раза в ЭС плазмы крови больных ММ по сравнению с РС. Полученные данные представлены в табл. 2 и включают 12 протеинов, из которых фруктозобисфосфат-альдолаза (ALDOA), басигин (BSG), гомолог протеина 42, контролирующего клеточное деление (CDC42), молекула плотных межклеточных контактов А (JAM-A или F11R) детектировались нашим методом только в ЭС плазмы крови больных миеломой.

Обсуждение

Наиболее распространенными протеинами ЭВ являются белки мембранного транспорта и слитые белки (аннексины, GTPases и флотиллины), тетраспанины, белки теплового шока, белки, участвующие в биогенезе мультивезикулярного комплекса, а также фосфолипазы [9].

Семейство тетраспанинов включает большое количество протеинов, имеющих схожую структуру и экспрессирующихся на поверхности клеток и/или на внутриклеточных везикулах. Как видно из табл. 1, нами обнаружены 6 тетраспанинов.

Роль тетраспанинов отмечена в таких фундаментальных биологических процессах, как дифференцировка, пролиферация, адгезия, миграция, иммунный ответ и др. Тетраспанины участвуют в сортировке содер-

жимого микровезикул, а их набор служит «паролем» для попадания ЭС в определенные типы клеток [10]. Доказана связь этого семейства белков с канцерогенезом. Показано существование фенотипически-геномной корреляции экспрессии CD81 у пациентов с миеломой [11]. По мнению авторов, повышенная экспрессия CD81 в плазматических клетках при миеломе является независимым неблагоприятным прогностическим фактором для пациентов с симптоматической ММ.

Список белков, взаимодействующих с тетраспанинами, многообразен и включает интегрины, которые играют важную роль при межклеточных контактах, контроле миграции клеток, в осуществлении клеточного цикла и апоптозе клеток. Они регулируют эти функции в синергизме с другими сигнальными путями, включая тетраспанины в различных типах клеток человека [12]. Как видно из табл. 1, в ЭС были идентифицированы 8 интегринов, что указывает на важную роль ЭС в переносе этих протеинов для обмена информацией при межклеточном взаимодействии. Интегрины присутствуют на клеточной поверхности и воздействуют на различные компоненты внеклеточного матрикса и сигналы, исходящие от клеток микроокружения. Они формируют интегринзависимый сигналинг для регулирования пролиферации, миграции, инвазии, апоптоза и ангиогенеза [13].

Тетраспанины также активно взаимодействуют с матриксными металлопротеиназами (ММП), образуя комплексы [14]. Мы идентифицировали в ЭС больных склерозом ММП-8 и ММП-9, в то время как в ЭС больных ММ их уровни оказались за пределами чувствительности метода.

В дополнение к названным, в ЭВ повышены уровни цитоскелетных белков (актины, кофилин 1, эзрин/радиксин/мозин, профилин 1 и тубулины), метаболических ферментов (энолазы, глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназа, пероксиредоксины и пируваткиназа), интегринов, рибосомальных белков. Представители этих классов, обнаруженные в ЭС плазмы крови, полученной от больных ММ и РС, представлены в табл. 1.

В последнее время уделяется повышенное внимание внеклеточным везикулам из-за их важной роли в биологии раковых клеток, включая иммунный ответ, резистентность к противоопухолевым препаратам, метастазирование [15, 16]. Везикулярный протеом является перспективным источником для открытия биомаркеров. При разработке методики профилирования белкового состава ЭС плазмы крови человека в качестве объектов исследования были выбраны онкологическая и неонкологическая патологии (ММ и РС). Картирование протеома ЭС выполняли для 3 объединенных образцов от больных ММ и 3 — от больных РС. Предполагалось, что такой выбор патологий приведет к значительному различию в белковом содержимом ЭС, а использование дополнительных критериев отбора позволит идентифицировать ряд ДЭБ, которые потенциально можно рассматривать в качестве маркеров

миеломы. Несмотря на существенное различие в патологиях, анализ показал близость качественного состава ЭС для обеих групп: из 332 идентифицированных белков 261 протеин обнаружен в ЭС как больных ММ, так и РС. Различия зафиксировали для 72 протеинов, 40 из которых были идентифицированы только в ЭС плазмы крови больных ММ, а 32 – при РС. Отбор ДЭБ в качестве потенциальных маркеров ММ осуществляли с учетом выполнения всех нижеперечисленных критериев.

- Белки были ранее обнаружены в ЭВ линий клеток ММ [17].
- Протеины ранее наблюдали в ЭВ, полученных из костного мозга больных ММ [17].
- Уровни их экспрессии в ЭС больных ММ должны быть статистически значимо >2 по сравнению с РС.

Дополнительно проводили анализ данных других исследователей на предмет участия этих протеинов в канцерогенезе. Как видно из табл. 2, всем 3 критериям отбора удовлетворяли 11 протеинов, исключение составил F11R, который не обнаружен в ЭВ костного мозга больных ММ.

По нашему мнению, этому списку белков необходимо уделить в дальнейшем повышенное внимание, в частности провести их валидацию на большем количестве образцов при сравнении ЭС плазмы крови больных ММ с ЭС от доноров. Ниже представлена краткая аннотация биологической роли этих белков в канцерогенезе.

Фруктозобисфосфат-альдолаза, член семейства гликолитических ферментов, катализирующий обратимую конверсию фруктозо-1,6-бисфосфата в глицеральдегид-3-фосфат и дигидроксиацетонфосфат, представлена изомерами ALDOA, ALDOB и ALDOC. ALDOB участвует как в гликолизе, так и в глюконеогенезе, тогда как ALDOA и ALDOC в основном в гликолизе. Сообщается, что ALDOA активирована в различных типах опухолевых клеток [18]. В нашем опыте ALDOA определялась только в ЭС больных ММ и может рассматриваться как один из потенциальных маркеров ММ.

Аннексины представляют собой высококонсервативные Ca^{2+} -зависимые мембраносвязывающие белки, которые проявляют широкий спектр функций при клеточном развитии и дифференцировке. **Аннексин А2 (ANXA2)** способствует росту клеток миеломы, снижает апоптоз в линиях этих клеток и увеличивает образование остеокластов. ANXA2 экспрессируется клетками миеломы и клетками микросреды костного мозга. Высокая экспрессия ANXA2 в клетках миеломы ассоциируется со значительным снижением общей выживаемости независимо от обычных прогностических факторов [19].

Аннексин А6 (ANXA6) участвует в организации клеточной мембраны и цитоскелета, гомеостазе холестерина, нарушении обмена веществ, клеточной адгезии и трансдукции внутриклеточных сигналов. Уровни экспрессии ANXA6 тесно ассоциируются с многими

видами злокачественных новообразований, включая миелому (повышенная экспрессия). ANXA6 проявляет двойственные функции при раке, действуя либо как супрессор опухоли, либо как промотор в зависимости от типа рака и степени злокачественности [20]. Как видно из табл. 2, содержание ANXA2 и ANXA6 в ЭС больных ММ было выше в 3,4 и 2,6 раза соответственно по сравнению с РС.

Как отмечалось выше, внеклеточные MMP взаимодействуют с тетраспанинами и играют решающую роль в деградации белков. Они также включаются в пролиферацию, миграцию, дифференцировку, ангиогенез и апоптоз. Индуктор MMP (EMMPRIN), также известный как CD147 или **BSG**, представляет собой внутримембранный гликопротеин, продуцируемый в сетчатке, роговице, кератоцитами и нейронами [21]. Сверхэкспрессия BSG обнаружена во многих типах неопластических клеток [22]. Отмечена важная роль клеток миеломы в продукции и высвобождении металлопротеиназ в микроокружение. MMP-9 оказывает заметное влияние на прогрессирование заболевания и образование остеолитических повреждений [23]. Следует отметить, что содержание MMP-8 и MMP-9 в ЭС плазмы крови больных ММ не детектировалось нашим методом. Это указывает на слабую секрецию MMP-8 и MMP-9 клетками ММ в составе ЭВ, что подтверждается данными работы S.W. Harshman и соавт. [17].

Эзрин, член семейства белков-линкеров, действующих как сшивающий агент между мембранами и актиновым цитоскелетом, тем самым регулируя связь клеток с клетками и клеток с внеклеточным матриксом и подвижность клеток. Эзрин участвует в регуляции клеточной морфологии, клеточной адгезии и модуляции внутриклеточных сигнальных путей. Он экспрессируется во многих видах неопластических тканей и в значительно большей степени при злокачественных опухолях мезенхимного происхождения (саркомы) [24]. Уменьшение экспрессии эзрина обращает процесс эпителиально-мезенхимального перехода через изменение экспрессии маркеров эпителиально-мезенхимального перехода и снижение регуляции транскрипционных факторов [25].

ЖАМ-А представляет собой белок суперсемейства иммуноглобулинов, кодируемый геном *F11R*, и экспрессируется на циркулирующих нейтрофилах, моноцитах, лимфоцитах и тромбоцитах. Он регулирует образование плотных межклеточных контактов, трансмиграцию лейкоцитов (прохождение клеток через межэндотелиальные пространства и неповрежденные стенки капилляров и венул), дифференцировку эндотелиальных клеток-предшественников и активацию тромбоцитов [26]. Начинают появляться сообщения о роли ЖАМ-А как важного неблагоприятного прогностического показателя при регуляции опухолевой прогрессии и появления метастазов [27]. Имеются сообщения о высокой экспрессии ЖАМ-А в клетках ММ, ассоциированной с уменьшением выживаемости [28].

Таблица 2. Потенциальные маркеры множественной миеломы, идентифицированные в экзосомах плазмы крови

Table 2. Potential markers for multiple myeloma identified in plasma exosomes

Интенсивность сигнала (рассеянный склероз), произвольные единицы Signal intensity (multiple sclerosis), arbitrary units	Интенсивность сигнала (множественная миелома), произвольные единицы Signal intensity (multiple myeloma), arbitrary units	Название протеина Protein name	Индекс гена Gene index	Экстраклеточные везикулы клеток миеломы Extracellular vesicles of myeloma cell	Экстраклеточные везикулы костного мозга при миеломе Extracellular vesicles of bone marrow in myeloma
НД ND	150200	Фруктозобисфосфат-альдолаза Fructosebiphosphate aldolase	<i>ALDOA</i>	+	+
151460	514770	Аннексин А2 Annexin A2	<i>ANXA2</i>	+	+
674980	1526600	Аннексин А6 Annexin A6	<i>ANXA6</i>	+	+
1847600	4090700	Rho GDP ингибитор диссоциации 2 Rho GDP dissociation inhibitor 2	<i>ARHGDI2</i>	+	+
НД	80027	Басигин (EMMPRIN) Basigin (EMMPRIN)	<i>BSG</i>	+	+
НД	130400	Гомолог протеина 42, контролирующего клеточное деление Cell division control protein 42 homolog	<i>CDC42</i>	+	+
156690	902420	Эзрин Ezrin	<i>EZR</i>	+	+
НД	190320	Молекула плотных межклеточных контактов А Tight junction molecule A	<i>F11R</i>	+	+
254010	575720	Rab GDP ингибитор диссоциации бета Rab GDR dissociation inhibitor beta	<i>GDI2</i>	+	+
2729600	5887200	Белок теплового шока 5 Heat shock protein 5	<i>HSPA5</i>	+	+
46668	98995	Пластин 2 Plastin 2	<i>LCP1</i>	+	+
74800	215250	Дисульфид-изомераза А6 Disulfide isomerase A6	<i>PDIA6</i>	+	+

Примечание. НД — не детектируется.

Note. ND — non-detectable.

Rab GDP ингибитор диссоциации бета (GDI2) является членом семейства ингибиторов диссоциации гуанозиндифосфата, контролирующего рециркуляцию Rab GTPases, участвующих в мембранном трафике и необходимых для уменьшения адгезии и увеличения миграции раковых клеток, контролируя таким образом опухолевую прогрессию [29]. GDI2 действует в качестве регулирующего фактора для Rab-белков при развитии

многих опухолей. Результаты протеомного анализа показали, что экспрессия GDI2 в опухолевой ткани рака желудка [30] и рака яичников [31] снижена по сравнению с таковой в нормальной ткани. В нашем эксперименте наблюдалось увеличение в 2,3 раза экспрессии GDI2 в ЭС плазмы крови больных ММ по сравнению с РС.

Активация нарушений фолдинга (сворачивания) белков, названного нефолдинговым белковым ответом,

существенна при солидных опухолях и коррелирует с агрессивными типами рака [32]. Поскольку синтез белка возрастает в быстрорастущих солидных опухолях, раковые клетки нуждаются в усилении функционирования эндоплазматического ретикулума [33]. **Белок теплового шока 5 (HSPA5)**, также известный как GRP78/BiP, является главным шапероном эндоплазматического ретикулума, который отвечает за нефолдинговый белковый ответ и участвует во многих клеточных процессах, которые способствуют правильному фолдингу белков и предотвращают агрегацию вновь синтезированных протеинов [34]. Сверхэкспрессия HSPA5 отмечалась в опухолях различных локализаций, включая легкие, молочную железу, предстательную железу, толстую кишку, желудок и печень [35]. HSPA5 проявляет онкогенную активность, способствуя пролиферации, выживанию, метастазированию и лекарственной устойчивости опухолевых клеток, и его активность ассоциируется со злокачественностью новообразования и плохим прогнозом [36]. Мы также зафиксировали увеличение уровня HSPA5 в ЭС больных ММ в 2,16 раза.

Семейство человеческих пластинов включает 3 белковые изоформы: Т-пластин (PLS3), **Л-пластин (LCP1)** и I-пластин (PLS1), кодируемые различными генами. PLS1 специфически экспрессируется в клетках тонкой кишки и почки. Клеточная специфичность других изоформ (PLS3 и LCP1) регулируется физиологическими условиями. PLS3 экспрессируется в широком спектре клеток, за исключением гемопоэтических. Эктопическая экспрессия пластинов в злокачественных клетках отмечалась во многих исследованиях [37]. Большинство неопластических клеток, полученных из солидных опухолей, также экспрессируют PLS3. В то же время LCP1 экспрессируется в клетках большинства случаев рака человека и линий гемопоэтических клеток [37]. В частности, повышенная экспрессия LCP1 играет значительную роль в пролиферации и инвазии линий клеток рака толстой кишки [38]. Считается, что LCP1 влияет на клеточную адгезию и подвижность через связывание актина [39].

PDIA6 является членом семейства дисульфид-изомераз (PDI) с тиоредоксиноподобным доменом. Члены семейства PDI функционируют как изомеразы и молекулярные шапероны и играют важную роль во многих биологических процессах. Однако точная

функция и молекулярные механизмы участия PDIA6 в канцерогенезе и противоопухолевой лекарственной устойчивости остаются в значительной степени неизвестными. В последние годы результаты многих исследований показали, что PDIA6 сверхэкспрессируется в клетках рака молочной железы и играет важную роль в иммунопрофилактике опухолевого роста. PDIA6 может способствовать развитию рака и резистентности к противоопухолевым препаратам, активируя сигнальный каскад Wnt/ β -катенин. По мнению ряда авторов, PDIA6 может быть потенциальной мишенью при таргетной терапии некоторых злокачественных новообразований [40]. По сравнению с ЭС больных РС уровень PDIA6 у больных ММ возрастает в 2,9 раза.

Заключение

В результате поискового исследования унифицирована и апробирована методика получения ЭС из плазмы крови человека, обедненной тромбоцитами и эритроцитами. Проведено типирование ЭС по маркерам CD63 и CD81, подтвердившее высокий выход ЭС и их чистоту. Разработан метод нано-ВЭЖХ-МС/МС анализа протеома ЭС плазмы крови человека, что позволило впервые идентифицировать 332 белка в образцах ЭС от больных ММ и РС.

Впервые обнаружены ДЭБ, уровни которых заметно повышены в ЭС плазмы пациентов со злокачественным поражением миеломных тканей. Биоинформационный анализ полученных результатов и сравнение их с данными литературы позволили обнаружить 12 пептидов, статистически значимо различающихся в злокачественных неоплазиях и неонкологических поражениях нервной ткани (ММ и РС). Безусловно, это требует дополнительных исследований по валидации каждого из белков с использованием различных контролей, включая доноров. Мы предполагаем, что идентификация таких протеинов в клинических исследованиях позволит предварительно рассматривать их в качестве потенциальных маркеров ММ. Определение валидированных белков в ЭС и других микровезикулах плазмы крови или костном мозге в дальнейшем, по нашему мнению, может явиться очень перспективным тестом при мониторинге и лечении больных ММ с учетом проводимых при лечении последовательных аутологических и/или аллогенных трансплантаций костного мозга.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

1. Ferlay J., Soerjomataram I., Ervik M. et al. GLOBOCAN 2012 v1.0, Cancer Incidence and Mortality Worldwide. IARC Cancer Base 2012;11:1–10.
2. Kumar S.K., Rajkumar S.V., Dispenzieri A. et al. Improved survival in multiple myeloma and the impact of novel therapies. *Blood* 2008;111(5):2516–20. DOI: 10.1182/blood-2007-10-116129. PMID: 17975015.
3. Roccaro A.M., Sacco A., Maiso P. et al. BM mesenchymal stromal cell-derived exosomes facilitate multiple myeloma progression. *J Clin Invest* 2013;123(4):1542–55. DOI: 10.1172/JCI66517. PMID: 23454749.
4. Damiano J.S., Cress A.E., Hazlehurst L.A. et al. Cell adhesion mediated drug resistance (CAM-DR): role of integrins and resistance to apoptosis in human myeloma cell lines. *Blood* 1999;93(5):1658–67. PMID: 10029595.
5. Thery C. Exosomes: secreted vesicles and intercellular communications. *F1000 Biol*

- Rep 2011;3:15. DOI: 10.3410/B3-15. PMID: 21876726.
6. Wang J., Hendrix A., Hernot S. et al. Bone marrow stromal cell-derived exosomes as communicators in drug resistance in multiple myeloma cells. *Blood* 2014;124(4):555–66. DOI: 10.1182/blood-2014-03-562439. PMID: 24928860.
 7. Samsonov R., Burdakov V., Shtam T. et al. Plasma exosomal miR-21 and miR-181a differentiates follicular from papillary thyroid cancer. *Tumour Biol* 2016;37(9):12011–21. DOI: 10.1007/s13277-016-5065-3. PMID: 27164936.
 8. Bryukhovetskiy I., Shevchenko V. Molecular mechanisms of the effect of TGF- β 1 on U87 human glioblastoma cells. *Oncol Lett* 2016;12(2):1581–90. DOI: 10.3892/ol.2016.4756. PMID: 27446475.
 9. Pocsfalvi G., Stanly C., Vilasi A. et al. Mass spectrometry of extracellular vesicles. *Mass Spectrom Rev* 2015;35(1):3–21. DOI: 10.1002/mas.21457. PMID: 25705034.
 10. Andreu Z., Yanez-Mo M. Tetraspanins in extracellular vesicle formation and function. *Front Immunol* 2014;5:442. DOI: 10.3389/fimmu.2014.00442. PMID: 25278937.
 11. Paiva B., Gutierrez N.C., Chen X. et al. Clinical significance of CD81 expression by clonal plasma cells in high-risk smoldering and symptomatic multiple myeloma patients. *Leukemia* 2012;26(8):1862–9. DOI: 10.1038/leu.2012.42. PMID: 22333880.
 12. Maecker H.T., Todd S.C., Levy S. The tetraspanin superfamily: molecular facilitators. *FASEB J* 1997;11(6):428–42. PMID: 9194523.
 13. Stupack D.G., Cheresh D.A. Integrins and angiogenesis. *Curr Top Dev Biol* 2004;64:207–38. DOI: 10.1016/S0070-2153(04)64009-9. PMID: 15563949.
 14. Schroder H.M., Hoffmann S.C., Hecker M. et al. The tetraspanin network modulates MT1-MMP cell surface trafficking. *Int J Biochem Cell Biol* 2013;45(6):1133–44. DOI: 10.1016/j.biocel.2013.02.020. PMID: 23500527.
 15. Azmi A.S., Bao B., Sarkar F.H. Exosomes in cancer development, metastasis, and drug resistance: a comprehensive review. *Cancer Metast Rev* 2013;32(3–4):623–42. DOI: 10.1007/s10555-013-9441-9. PMID: 23709120.
 16. Kahlert C., Kalluri R. Exosomes in tumor microenvironment influence cancer progression and metastasis. *J Mol Med (Berl)* 2013;91(4):431–7. DOI: 10.1007/s00109-013-1020-6. PMID: 23519402.
 17. Harshman S.W., Canella A., Ciarlariello P.D. et al. Proteomic characterization of circulating extracellular vesicles identifies novel serum myeloma associated markers. *J Proteomics* 2016;136:89–98. DOI: 10.1016/j.jprot.2015.12.016. PMID: 26775013.
 18. Chen X., Yang T.T., Zhou Y. et al. Proteomic profiling of osteosarcoma cells identifies ALDOA and SULT1A3 as negative survival markers of human osteosarcoma. *Mol Carcinog* 2014;53(2):138–44. DOI: 10.1002/mc.21957. PMID: 22949271.
 19. Seckinger A., Meissner T., Moreaux J. et al. Clinical and prognostic role of annexin A2 in multiple myeloma. *Blood* 2012;120(5):1087–94. DOI: 10.1182/blood-2012-03-415588. PMID: 22705595.
 20. Qi H., Liu S., Guo C. et al. Role of annexin A6 in cancer. *Oncol Lett* 2015;10(4):1947–52. DOI: 10.3892/ol.2015.3498. PMID: 26622779.
 21. Yan L., Zucker S., Toole B.P. Roles of the multifunctional glycoprotein, emmprin (basigin; CD147), in tumour progression. *Thromb Haemost* 2005;93(2):199–204. DOI: 10.1160/TH04-08-0536. PMID: 15711733.
 22. Yaccoby S. Advances in the understanding of myeloma bone disease and tumor growth. *Br J Haematol* 2010;149(3):311–21. DOI: 10.1111/j.1365-2141.2010.08141.x. PMID: 20230410.
 23. Zdzisinska B., Walter-Croneck A., Kandefér-Szerszen M. Matrix metalloproteinases-1 and -2, and tissue inhibitor of metalloproteinase-2 production is abnormal in bone marrow stromal cells of multiple myeloma patients. *Leuk Res* 2008;32(11):1763–9. DOI: 10.1016/j.leukres.2008.04.001. PMID: 18472160.
 24. Bruce B., Khanna G., Ren L. et al. Expression of the cytoskeleton linker protein ezrin in human cancers. *Clin Exp Metastasis* 2007;24(2):69–78. DOI: 10.1007/s10585-006-9050-x. PMID: 17370041.
 25. He J., Ma G., Qian J. et al. Interaction between ezrin and cortactin in promoting epithelial to mesenchymal transition in breast cancer cells. *Med Sci Monit* 2017;23:1583–96. PMID: 28364518.
 26. Fraemohs L., Koenen R.R., Ostermann G. et al. The functional interaction of the beta 2 integrin lymphocyte function-associated antigen-1 with junctional adhesion molecule-A is mediated by the I domain. *J Immunol* 2004;173(10):6259–64. PMID: 15528364.
 27. Zhang M., Luo W., Huang B. et al. Overexpression of JAM-A in non-small cell lung cancer correlates with tumor progression. *PLoS One* 2013;8(11):e79173. DOI: 10.1371/journal.pone.0079173. PMID: 24265754.
 28. Kelly K.R., Espitia C.M., Zhao W. et al. Junctional adhesion molecule-A is overexpressed in advanced multiple myeloma and determines response to oncolytic reovirus. *Oncotarget* 2015;6(38):41275–89. DOI: 10.18632/oncotarget.5753. PMID: 26513296.
 29. Subramani D., Alahari S.K. Integrin-mediated function of Rab GTPases in cancer progression. *Mol Cancer* 2010;9:312. DOI: 10.1186/1476-4598-9-312. PMID: 21143914.
 30. Bai Z., Ye Y., Liang B. et al. Proteomics-based identification of a group of apoptosis-related proteins and biomarkers in gastric cancer. *Int J Oncol* 2011;38(2):375–83. DOI: 10.3892/ijo.2010.873. PMID: 21165559.
 31. Lee D.H., Chung K., Song J.A. et al. Proteomic identification of paclitaxel-resistance associated hnRNP A2 and GDI2 proteins in human ovarian cancer cells. *J Proteome Res* 2010;9(11):5668–76. DOI: 10.1021/pr100478u. PMID: 20858016.
 32. Ma Y., Hendershot L.M. The role of the unfolded protein response in tumour development: friend or foe? *Nat Rev Cancer* 2004;4(12):966–77. DOI: 10.1038/nrc1505. PMID: 15573118.
 33. Lee A.S. The glucose-regulated proteins: stress induction and clinical applications. *Trends Biochem Sci* 2001;26(8):504–10. PMID: 11504627.
 34. Ni M., Lee A.S. ER chaperones in mammalian development and human diseases. *FEBS Lett* 2007;581(19):3641–51. DOI: 10.1016/j.febslet.2007.04.045. PMID: 17481612.
 35. Shuda M., Kondoh N., Imazeki N. et al. Activation of the ATF6, XBP1 and grp78 genes in human hepatocellular carcinoma: a possible involvement of the ER stress pathway in hepatocarcinogenesis. *J Hepatol* 2003;38(5):605–14. PMID: 12713871.
 36. Dong D., Stapleton C., Luo B. et al. A critical role for GRP78/BiP in the tumor microenvironment for neovascularization during tumor growth and metastasis. *Cancer Res* 2011;71(8):2848–57. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-10-3151. PMID: 21467168.
 37. Park T., Chen Z.P., Leavitt J. Activation of the leukocyte plastin gene occurs in most human cancer cells. *Cancer Res* 1994;54(7):1775–81. PMID: 8137292.
 38. Foran E., McWilliam P., Kelleher D. et al. The leukocyte protein L-plastin induces proliferation, invasion and loss of E-cadherin expression in colon cancer cells. *Int J Cancer* 2006;118(8):2098–104. DOI: 10.1002/ijc.21593. PMID: 16287074.
 39. Klemke M., Rafael M.T., Wabnitz G.H. et al. Phosphorylation of ectopically expressed L-plastin enhances invasiveness of human melanoma cells. *Int J Cancer* 2007;120(12):2590–9. DOI: 10.1002/ijc.22589. PMID: 17290393.
 40. Gao H., Sun B., Fu H. et al. PDIA6 promotes the proliferation of HeLa cells through activating the Wnt/ β -catenin signaling pathway. *Oncotarget* 2016;7(33):53289–98. DOI: 10.18632/oncotarget.10795. PMID: 27462866.

Вклад авторов

В.Е. Шевченко: протеомный анализ экзосом, анализ литературы, написание текста рукописи;
А.С. Брюховецкий: разработка дизайна исследования, забор клинического материала;
М.В. Филатов: определение и визуализация экзосом;
В.С. Бурдаков: определение и визуализация экзосом методом атомно-силовой микроскопии;
З.Н. Никифорова: типирование экзосом методом иммуноферментного анализа;
И.С. Брюховецкий: биоинформационный анализ полученных данных;
Ю.Д. Василец: получение экзосом дифференциальным центрифугированием;
Т.И. Кушнир: очистка экзосом методом ультрафильтрации;
Н.Е. Арноцкая: подготовка образцов экзосом для протеомного анализа.

Authors' contributions

V.E. Shevchenko: proteomic analysis of exosomes, literature analysis, article writing;
A.S. Bryukhovetskiy: study design development, clinical sampling;
M.V. Filatov: identification and visualization of exosomes;
V.S. Burdakov: identification and visualization of exosomes using atomic force microscopy;
Z.N. Nikiforova: exosome typing using ELISA;
I.S. Bryukhovetskiy: bioinformatics of the data;
Yu.D. Vasilets: exosome extraction by differential centrifugation;
T.I. Kushnir: exosome purification using ultrafiltration;
N.E. Arnotskaya: preparation of exosome samples for proteomic analysis.

ORCID авторов

В.Е. Шевченко: <https://orcid.org/0000-0002-0401-9900>
А.С. Брюховецкий: <https://orcid.org/0000-0002-3141-1529>
М.В. Филатов: <https://orcid.org/0000-0003-3908-3061>
В.С. Бурдаков: <https://orcid.org/0000-0001-6025-7367>
З.Н. Никифорова: <https://orcid.org/0000-0001-7657-3735>
И.С. Брюховецкий: <https://orcid.org/0000-0003-3654-3069>
Ю.Д. Василец: <https://orcid.org/0000-0002-6367-3785>
Т.И. Кушнир: <https://orcid.org/0000-0001-9626-6847>
Н.Е. Арноцкая: <https://orcid.org/0000-0002-0154-8604>

ORCID of authors

V.E. Shevchenko: <https://orcid.org/0000-0002-0401-9900>
A.S. Bryukhovetskiy: <https://orcid.org/0000-0002-3141-1529>
M.V. Filatov: <https://orcid.org/0000-0003-3908-3061>
V.S. Burdakov: <https://orcid.org/0000-0001-6025-7367>
Z.N. Nikiforova: <https://orcid.org/0000-0001-7657-3735>
I.S. Bryukhovetskiy: <https://orcid.org/0000-0003-3654-3069>
Yu.D. Vasilets: <https://orcid.org/0000-0002-6367-3785>
T.I. Kushnir: <https://orcid.org/0000-0001-9626-6847>
N.E. Arnotskaya: <https://orcid.org/0000-0002-0154-8604>

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Conflict of interest. The authors declare no conflict of interest.

Финансирование. Исследование проведено без спонсорской поддержки.

Financing. The study was performed without external funding.

Статья поступила: 05.02.2018. **Принята к публикации:** 15.02.2018.

Article received: 05.02.2018. **Accepted for publication:** 15.02.2018.