



Оригинальная статья

Связь белков экзосом с эффективностью терморadioхимиотерапии у больных с избыточной массой тела и раком прямой кишки: пилотное проспективное когортное исследование

Юнусова Н.В.¹ • Сваровский Д.А.¹ • Коновалов А.И.¹ • Костромицкий Д.Н.² • Кондакова И.В.² • Усова А.В.² • Фролова И.Г.² • Сиденко Е.А.² • Какурина Г.В.² • Гердт Л.В.² • Григорьева А.Е.³ • Старцева Ж.А.²

Обоснование. Избыточная масса тела и особенно ожирение ассоциированы с риском развития и прогрессией колоректального рака. Можно предположить наличие многоплановых взаимодействий между опухолью и жировой тканью в процессе противоопухолевой терапии. Раковые клетки выделяют экзосомы – внеклеточные везикулы, которые влияют на микроокружение опухоли и способствуют ее прогрессии или регрессии. Присутствие факторов транскрипции / трансляции / фолдинга (белков теплового шока (HSPs), матричных металлопротеиназ (MMPs) и их ингибиторов (TIMPs) в составе экзосом, секретлируемых облученными клетками и клетками, подвергшимися гипертермии, отражает адаптацию клеток к условиям теплового и радиационного стресса.

Цель – проанализировать уровень MMPs, TIMP1 и HSPs на CD9-позитивных (CD9⁺) экзосомах и экзосомах адипоцитарного происхождения (FABP4⁺) у больных с избыточной массой тела / ожирением и раком прямой кишки (РПК) на фоне терморadioхимиотерапии (ТРХТ) во взаимосвязи с ее непосредственной эффективностью.

Материал и методы. В пилотном проспективном когортном исследовании с 2021 г. участвуют 20 пациентов (из них 8 мужчин; медиана возраста – 59,0 [52,0; 63,0] лет, индекса массы тела – 29,6 [28,5; 33,1] кг/м²) с морфологически верифицированным РПК (стадии Т3-4N0M0 и Т3-4N1M0, степень дифференцировки опухоли G1–G3).

Больные получали ТРХТ: дистанционную гамма-терапию (разовая очаговая доза – 2 Гр, 1 фракция/сут, 5 раз/нед, суммарная очаговая доза – 54 Гр) и химиотерапию капецитабином (825 мг/м², 2 раза/сут) в сочетании с локальной гипертермией (42–44 °С, 60 мин., 3 раза/нед, 10 сеансов). Эффективность ТРХТ оценивали по критериям RECIST 1.1 и ESGAR. Забор крови для получения экзосом у больных РПК проводили до начала лечения (точка 1), в середине курса ТРХТ (точка 2), через 6–10 нед. после окончания ТРХТ (точка 3) и через 6 мес. после точки 1 (точка 4). Малые внеклеточные везикулы из плазмы крови больных выделяли методом ультрафильтрации с двойным ультрацентрифугированием. Для характеристики изолированных экзосом использовали трансмиссионную электронную микроскопию, анализ траектории наночастиц (NTA) и проточную цитометрию.

Результаты. После ТРХТ у 13 из 20 больных РПК зарегистрирована полная регрессия, у 7 – частичная регрессия или стабилизация процесса. Выявлены 4 субпопуляции CD9⁺ и FABP4⁺ экзосом, ассоциированных с эффективностью ТРХТ: CD9⁺MMP2⁺, CD9⁺MMP2⁺9⁺TIMP1⁺, CD9⁺MMP2⁺9⁺TIMP1⁻, FABP4⁺MMP2⁺9⁺TIMP1⁺. По сравнению с экзосомами CD9⁺, адипоцитарные везикулы (FABP4⁺) экспрессировали статистически значимо больше MMP2 (p = 0,026), однако среди них практически не было везикул с сочетанной экспрессией желатиназа MMP2 и MMP9.

Экспрессия HSPs на циркулирующих экзосомах на этапах ТРХТ не ассоциировалась с типом везикул и непосредственной эффективностью терапии.

Заключение. Экспрессия MMPs и TIMP1 на экзосомах CD9⁺ и FABP4⁺ ассоциируется с эффективностью ТРХТ. В перспективе везикулярные маркеры могут быть использованы для построения прогностических моделей, выявления группы больных с неблагоприятным прогнозом, персонализации подходов к лечению и динамическому наблюдению.

Ключевые слова: экзосомы опухолевых клеток, адипоцитарные внеклеточные везикулы, ожирение и избыточная масса тела, рак прямой кишки (РПК), терморadioхимиотерапия, ответ опухоли, предикторы эффективности терапии

Для цитирования: Юнусова НВ, Сваровский ДА, Коновалов АИ, Костромицкий ДН, Кондакова ИВ, Усова АВ, Фролова ИГ, Сиденко ЕА, Какурина ГВ, Гердт ЛВ, Григорьева АЕ, Старцева ЖА. Связь белков экзосом с эффективностью терморadioхимиотерапии у больных с избыточной массой тела и раком прямой кишки: пилотное проспективное когортное исследование. Альманах клинической медицины. 2024;52. doi: 10.18786/2072-0505-2024-52-013.

Поступила 31.01.2024; доработана 06.05.2024; принята к публикации 05.06.2024; опубликована онлайн 05.07.2024



Юнусова Наталья Валерьевна – д-р мед. наук, профессор кафедры биохимии и молекулярной биологии с курсом клинической лабораторной диагностики¹; ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-4595-4177>. E-mail: BochkarevaNV@oncology.tomsk.ru

Сваровский Дмитрий Андреевич – ассистент кафедры биохимии и молекулярной биологии¹; ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-8985-009X>
✉ 634050, г. Томск, Московский тракт, 2, Российская Федерация. E-mail: svarovsky.d.a@gmail.com

Коновалов Артем Игоревич – канд. мед. наук, ассистент кафедры хирургии с курсом мобилизационной подготовки и медицины катастроф¹; ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-1269-9421>. E-mail: oncology-group@yandex.ru

Костромский Дмитрий Николаевич – канд. мед. наук, науч. сотр. отделения абдоминальной онкологии²; ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-5691-2349>. E-mail: d.n.kostromitsky@gmail.com

Кондакова Ирина Викторовна – д-р мед. наук, профессор, зав. лабораторией биохимии опухолей²; ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-0947-8778>. E-mail: kondakova@oncology.tomsk.ru

Усова Анна Владимировна – канд. мед. наук, ст. науч. сотр. отделения лучевой диагностики²; ORCID: <http://orcid.org/0000-0003-1679-010X>. E-mail: afina.tsk@gmail.com

Фролова Ирина Георгиевна – д-р мед. наук, профессор, зав. отделением лучевой диагностики²; ORCID: <http://orcid.org/0000-0001-5227-006X>. E-mail: FrolovaIG@oncology.tomsk.ru

Сиденко Евгения Александровна – канд. мед. наук, мл. науч. сотр. лаборатории биохимии опухолей²; ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-5838-9459>. E-mail: sidenkoevgeniyaaleksandrovna@gmail.com

Какурина Гелена Валерьевна – канд. мед. наук, ст. науч. сотр. лаборатории биохимии опухолей²;

ORCID: <http://orcid.org/0000-0002-4506-9429>. E-mail: kakurinagv@oncology.tomsk.ru

Гердт Любовь Викторовна – канд. мед. наук, врач клинической лабораторной диагностики лаборатории молекулярной онкологии и иммунологии²; ORCID: <https://orcid.org/0009-0006-3394-9185>. E-mail: lyu-gerdt@yandex.ru

Григорьева Алина Евгеньевна – канд. биол. наук, мл. науч. сотр. группы микроскопических исследований³; ORCID: <http://orcid.org/0000-0001-9853-223X>. E-mail: feabelit@mail.ru

Старцева Жанна Александровна – д-р мед. наук, зав. отделением радиотерапии²; ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-4345-7719>. E-mail: zhanna.alex@rambler.ru

¹ ФГБОУ ВО «Сибирский государственный медицинский университет» Минздрава России; 634050, г. Томск, Московский тракт, 2, Российская Федерация

² Научно-исследовательский институт онкологии – филиал ФГБНУ «Томский национальный исследовательский медицинский центр Российской академии наук»; 634009, г. Томск, Кооперативный пер., 5, Российская Федерация

³ ФГБУН «Институт химической биологии и фундаментальной медицины» Сибирского отделения Российской академии наук (ИХБФМ СО РАН); 630090, г. Новосибирск, пр-т Ак. Лаврентьева, 8, Российская Федерация

Одним из возможных подходов к решению проблемы повышения эффективности и расширению и/или изменению показаний к применению терморadioтерапии и гипертермии в комплексной терапии злокачественных новообразований может быть поиск молекулярных маркеров, связанных с ответом опухоли на лечение. В формировании микроокружения опухоли участвуют циркулирующие внеклеточные везикулы (ВВ), которые могут интернализировать (поглощать) широкий спектр клеток: моноцитарно-макрофагального ряда, лимфоциты, фибробласты, эндотелиоциты, адипоциты, стволовые, прогениторные, опухолевые клетки. Тем самым в опухоли модулируется воспалительный ответ, запускается дифференцировка стволовых и прогениторных клеток, формируются преме-тастатические ниши. Под воздействием рентгеновского облучения различные типы опухолевых клеток секретируют малые везикулы (экзосомы) [1, 2]. Присутствие факторов транскрипции, трансляции, фолдинга (например, белков теплового шока (HSPs) и убиквитин-зависимой деградации белков, матриксных металлопротеиназ (MMPs) и их тканевого ингибитора 1-го типа (TIMP1) в составе экзосом, секретируемых как облученными клетками, так и подвергшимися гипертермии, отражает адаптацию клеток к условиям теплового и радиационного стресса [3, 4]. Важность идентификации

таких маркеров обусловлена данными о том, что экзосомы вовлечены в реализацию так называемого эффекта свидетеля, когда радиационные повреждения находят в клетках, которые не подвергались облучению [5]. На примерах многих опухолевых клеточных культур показано, что некоторые экзосомальные некодирующие РНК (miR-95-5p, circ-METRN, miR-199-5p, miR-124, miR-506) и белки (Beclin-1, LC3B, HSP70) вовлечены в различные механизмы радиорезистентности и терморadioрезистентности [4, 5]. Однако список экзосомальных и сывороточных маркеров, использующихся в клинической практике или имеющих перспективы клинического применения для оценки радиорезистентности опухоли, весьма ограничен (исследование экспрессии матричной РНК и протеина LRP-1, копияности генов *H2AX* и *RBBP8*, циркулирующей ДНК), а предлагаемые методы сложны и маловоспроизводимы [6, 7].

Избыточная масса тела и особенно ожирение – доказанные факторы риска развития колоректального рака. Наличие ожирения, часто в сочетании с другими метаболическими нарушениями (гиперинсулинемия, гипертриглицеридемия, сахарный диабет 2-го типа), ассоциировано не только с риском, но и с прогрессией опухолей данной локализации [8, 9]. Так как жировая ткань человека состоит из адипоцитов и стромы сложного клеточного состава, эти клетки могут секретировать



в межклеточное пространство, а затем и в кровь везикулы различного происхождения. К маркерным мембранным белкам экзосом относят тетраспанины CD63, CD9, CD81 и CD82. Их экспрессируют мажорные фракции циркулирующих экзосом тромбоцитарного, эритроцитарного, лейкоцитарного и эндотелиального происхождения. Методы проточной цитометрии высокого разрешения, иммунопреципитации в сочетании с вестерн-блоттингом позволяют охарактеризовать не только общую фракцию циркулирующих везикул, но и минорные субпопуляции, включая популяцию везикул адипоцитарного происхождения [10]. В качестве маркеров таких везикул ряд авторов предлагает PPAR-гамма, FABP4 (белок, связывающий жирные кислоты 4), PLIN1 (перилипид-1), PREF-1 (преадипоцитарный фактор-1) [10–12]. Эти белки не являются строго специфичными для клеток жировой ткани, поскольку их могут синтезировать также некоторые иммунные клетки (в частности, макрофаги). Однако протеин FABP4 – популярный и часто используемый маркер адипоцитарных везикул [10–12].

Цель исследования – проанализировать уровень MMPs, TIMP1 и HSPs на CD9-позитивных (CD9⁺) экзосомах и экзосомах адипоцитарного происхождения (FABP4⁺) у больных с избыточной массой тела / ожирением и раком прямой кишки (РПК) на фоне терморadioхимиотерапии (ТРХТ) во взаимосвязи с ее непосредственной эффективностью.

Материал и методы

На базе Научно-исследовательского института онкологии (НИИ онкологии) – филиала ФГБНУ «Томский национальный исследовательский медицинский центр Российской академии наук» (ТНИМЦ) и ФГБОУ ВО «Сибирский государственный медицинский университет» Минздрава России (СибГМУ) в период с 2021 года по настоящее время проводится пилотное проспективное когортное исследование для изучения возможности использования экспрессии MMPs и HSPs на экзосомах плазмы крови в качестве перспективных предикторов эффективности ТРХТ у больных РПК с избыточной массой тела и ожирением. В исследование включены 20 больных (медиана возраста – 59,0 [52,0; 63,0] лет; 8 мужчин и 12 женщин) с морфологически верифицированным раком средне- и нижеампулярного отдела прямой кишки, которые до начала лечения имели избыточную массу тела / ожирение (медиана индекса массы тела составила 29,6 [28,5; 33,1]; расчет по формуле Кетле). Диагноз заболевания устанавливали по данным эндоскопического исследования

(фиброколоноскопия) с биопсией и последующим морфологическим исследованием материала, магнитно-резонансной томографии (МРТ) таза. Четыре пациента имели стадию заболевания T3–4N0M0, 16 – T3–4N1M0; по степени дифференцировки опухоли было следующее распределение: G1 – 4 пациента, G2 – 9, G3 – 7.

Все пациенты получали дистанционную гамма-терапию на аппарате Theratron Equinox (Best Theratronics Ltd., Канада) с энергией падающего фотона 1,25 МэВ, в стандартном режиме фракционирования (разовая очаговая доза – 2 Гр, 1 фракция/сут, 5 раз/нед, суммарная очаговая доза – 54 Гр). Курс дистанционной лучевой терапии проводили на фоне повышения чувствительности опухолевых тканей к ионизирующему излучению (радиомодификация) капецитабином (825 мг/м², 2 раза/сут с 12-часовым интервалом) в сочетании с локальной гипертермией (3 раза/нед, за 30 мин. до сеанса лучевой терапии, в диапазоне 42–44 °С в течение 60 мин., всего 10 сеансов) с использованием аппарата Celsius TCS (Celsius42 GmbH, Германия). Эффективность лечения оценивали через 6–10 нед. после завершения ТРХТ с использованием критериев RECIST 1.1 (англ. Response Evaluation Criteria in Solid Tumors – критерии оценки ответа солидных опухолей) и ESGAR (англ. European Society of Gastrointestinal and Abdominal Radiology – Европейское общество желудочно-кишечной и абдоминальной радиологии). В интервале между завершением курса ТРХТ и контрольным обследованием больные получали 3 курса консолидирующей химиотерапии по схеме XELOX (оксалиплатин и капецитабин).

Для оценки объективного ответа на ТРХТ проводили комплексное инструментальное обследование. При эндоскопическом исследовании прямой кишки определяли изменение расстояния дистального полюса опухоли от Z-линии, протяженности опухолевого процесса, объема экзофитного компонента опухоли, степени выраженности лучевой ректопатии. С помощью МРТ оценивали динамику линейных размеров опухоли, объема экзофитного компонента, степени инвазии опухоли в стенку кишки (компонент pT), вовлеченности в опухолевый процесс смежных с прямой кишкой органов и тканей, размеров и количества измененных лимфатических узлов. Как полный ответ на лечение по данным МРТ трактовали отсутствие измеримых опухолей, наличие фиброза в ложе опухоли без зон средней интенсивности МР-сигнала на T2-взвешенных изображениях (mrTRG), без повышения сигнала на диффузионно-взвешенных изображениях (DWI) и без патологического

ограничения диффузии на картах измеряемого коэффициента диффузии (ADC). У пациентов с частичным ответом или стабилизацией определялась остаточная опухолевая ткань, участки фиброза и участки с высоким сигналом на DWI, соответствующие зоне низкого сигнала на картах ADC. При полной клинико-морфологической регрессии первичной опухоли пациентам не проводили хирургического лечения и они находились под динамическим наблюдением. При частичной регрессии или стабилизации первичной опухоли операцию выполняли через 6–10 нед. после окончания химиолучевой терапии.

Забор крови для получения экзосом у больных РПК выполняли в четырех точках: точка 1 – до начала лечения, 2 – в середине курса ТРХТ, 3 – через 6–10 нед. после окончания ТРХТ, 4 – через 6 мес. после точки 1. Введение контрольной точки 3 представляется целесообразным, поскольку в этот срок полностью реализуется эффект от проведенного курса ТРХТ и достигаются максимальные показатели непосредственной эффективности лечения. Кроме того, согласно действующим клиническим рекомендациям Минздрава России по РПК, с целью своевременной диагностики прогрессирования заболевания в первые 1–2 года после лечения контрольное обследование следует проводить каждые 3–6 мес¹. В нашем исследовании точка 4 укладывалась в рекомендованные сроки обследования, при этом нами было получено подтверждение полной клинико-морфологической регрессии РПК.

Малые ВВ из плазмы крови больных выделяли методом ультрафильтрации с двойным ультрацентрифугированием на ультрацентрифуге Optima MAX-XP (Beckman Coulter, США) [13]. В соответствии с рекомендациями ISEV (англ. International Society for Extracellular Vesicles – Международное общество по изучению внеклеточных везикул) от 2018 г. для подтверждения везикулярной морфологии выполняли трансмиссионную электронную микроскопию на электронном микроскопе JEM-1400 (JEOL Ltd., Япония) [14]. Размер и концентрацию экзосом в препаратах оценивали с использованием трекового анализа (англ. nanoparticle tracking analysis, NTA) на приборе NanoSight 393 NS300 (Malvern, США), а уровень мажорных тетраспанинов CD63, CD81 и CD9 – методом проточной цитометрии. Анализ сочетания экспрессии HSP60, HSP27, HSP90 и MMPs на поверхности экзосом CD9⁺ и FABP4⁺ осуществляли на проточном цитофлуориметре высокого разрешения CytoFLEX (Beckman Coulter, США). Аликвоты экзосом (около 30 мкг белка) инкубировали с 3×10^5 анти-CD9 или

анти-FABP4 латексными частицами в 150 мкл фосфатно-буферного солевого раствора (PBS) при 4 °С в течение ночи при осторожном перемешивании (400 об/мин) и затем блокировали в 0,2 М глицерине в течение 30 мин. После отмывки комплексов PBS для блокирования неспецифического связывания использовали human BD Fc Block (564219, BD, США). Далее в течение 20 мин. при комнатной температуре комплексы окрашивали антителами анти-HSP60-PE (2 мкл на тест, FAA822Hu41, Cloud-Clone Corp., Китай), анти-HSP27-FITC (2 мкл на тест, FAA693Hu81, Cloud-Clone Corp., Китай) и анти-HSP90-APCF (2 мкл на тест, FAA863Hu51, Cloud-Clone Corp.). Анализ субпопуляций MMP9/MMP2/TIMP1 на везикулах выполняли аналогично. Использовали антитела анти-TIMP1-APC (2 мкл на тест, FAA522Hu51, Cloud-Clone Corp., Китай), анти-MMP2-PE (2 мкл на тест, FAA100Hu41, Cloud-Clone Corp., Китай) и анти-MMP9-FITC (2 мкл на тест, FAA553Hu81, Cloud-Clone Corp., Китай). Полученные данные проанализировали с помощью программы CytExpert 2.0 Software. Уровень белка в выделенных везикулах оценивали флуориметрическим методом [15] в собственной модификации. Для определения белка смешивали 10 мкл препаратов везикул с 3 мкл лизис-буфера (0,25 М Tris-HCl, 8% SDS, 0,2 М DTT, pH 6,8) на льду (10 мин.), кипятили при 95 °С в течение 10 мин. После краткого центрифугирования при 12 000 g в течение 10 мин. весь надосадок смешивали с 3 мкл раствора флуорескамина (3 мг/мл, CAS 38183, BLD Pharm, Китай) в диметилсульфоксиде. Измерение проводили на ридере для визуализации клеток Agilent BioTek Cytation 1 Cell Imaging Multimode Reader (Biotek, США), длина волны возбуждения 365 нм, длина волны испускания 470 нм. Предварительно строили калибровку с использованием водных стандартов трипсина (кристаллический порошок лиофилизированный, 10 мг фл).

Исследование одобрено этическим комитетом НИИ онкологии Томского НИМЦ (протокол № 5 от 10.02.2019). Информированное согласие получено от всех пациентов, участвовавших в исследовании. В работе соблюдались положения Хельсинкской декларации.

Статистический анализ проводили с использованием программного обеспечения Statistica 10.0 (TIBCO Software Inc., США). Для всех видов анализа статистически значимыми приняли различия при уровне $p < 0,05$. Для проверки нормальности распределения исследуемых выборок применяли критерий Шапиро – Уилка. Данные представляли в виде медианы и интерквартильного размаха



(Me [Q1; Q3]). Для оценки статистической значимости вариаций признака (популяций везикул) в динамике измерений использовали непараметрический критерий Фридмана для связанных выборок. Для решения задачи выявления субпопуляций везикул, изменения которых в динамике ТРХТ были ассоциированы с непосредственным ответом опухоли на лечение, применяли дискриминантный анализ. На рисунках показан уровень значимости (p) критерия лямбда Уилкса для дискриминантной модели.

Результаты

Для характеристики изолированных экзосом использовали трансмиссионную электронную микроскопию, анализ траектории наночастиц (NTA) и проточную цитометрию (рис. 1). Электронная микроскопия в препаратах везикул, приготовленных из тканей исследуемых больных РПК, позволила выявить четко структурированные чашеобразные объекты с низкой электронной плотностью и сохраненными мембранами (см. рис. 1А), при этом их морфология не отличалась от таковой у экзосом в препаратах от больных другими видами рака [13]. В препаратах практически не было ВВ крупнее 100 нм (см. рис. 1 Б); везикулы экспрессировали мажорные тетраспанины и CD24 (см. рис. 1 В).

Уровни субпопуляций экзосом CD9⁺ и FABP4⁺ у пациентов с РПК с избыточной массой тела и ожирением в динамике проведения ТРХТ отражены в таблице. В основном изменения субпопуляций везикул имели волнообразный характер, однако для части популяций (CD9⁺MMP9⁺ и HSP60⁺27⁺90⁻) выявлено четкое снижение показателей при проведении ТРХТ. У 13 из 20 больных зарегистрирована полная регрессия, у 7 – частичная регрессия или стабилизация процесса.

При проведении дискриминантного анализа выявлены 4 популяции экзосом (как CD9⁺, так и FABP4⁺), ассоциированные с непосредственной эффективностью ТРХТ у больных РПК (рис. 2). Интересно отметить, что экспрессия HSPs на экзосомах не ассоциировалась с непосредственной эффективностью ТРХТ.

Далее мы провели сравнение экспрессии MMPs, TIMP1 и HSPs на ВВ на этапах ТРХТ отдельно на CD9⁺ и FABP4⁺ везикулах без разделения на группы больных с различным непосредственным эффектом терапии (рис. 3). Адипоцитарные везикулы (FABP4⁺), детектируемые с помощью проточной цитометрии с использованием метода непрямой детекции с сорбцией на латексных частицах, у больных РПК на этапах ТРХТ экспрессируют

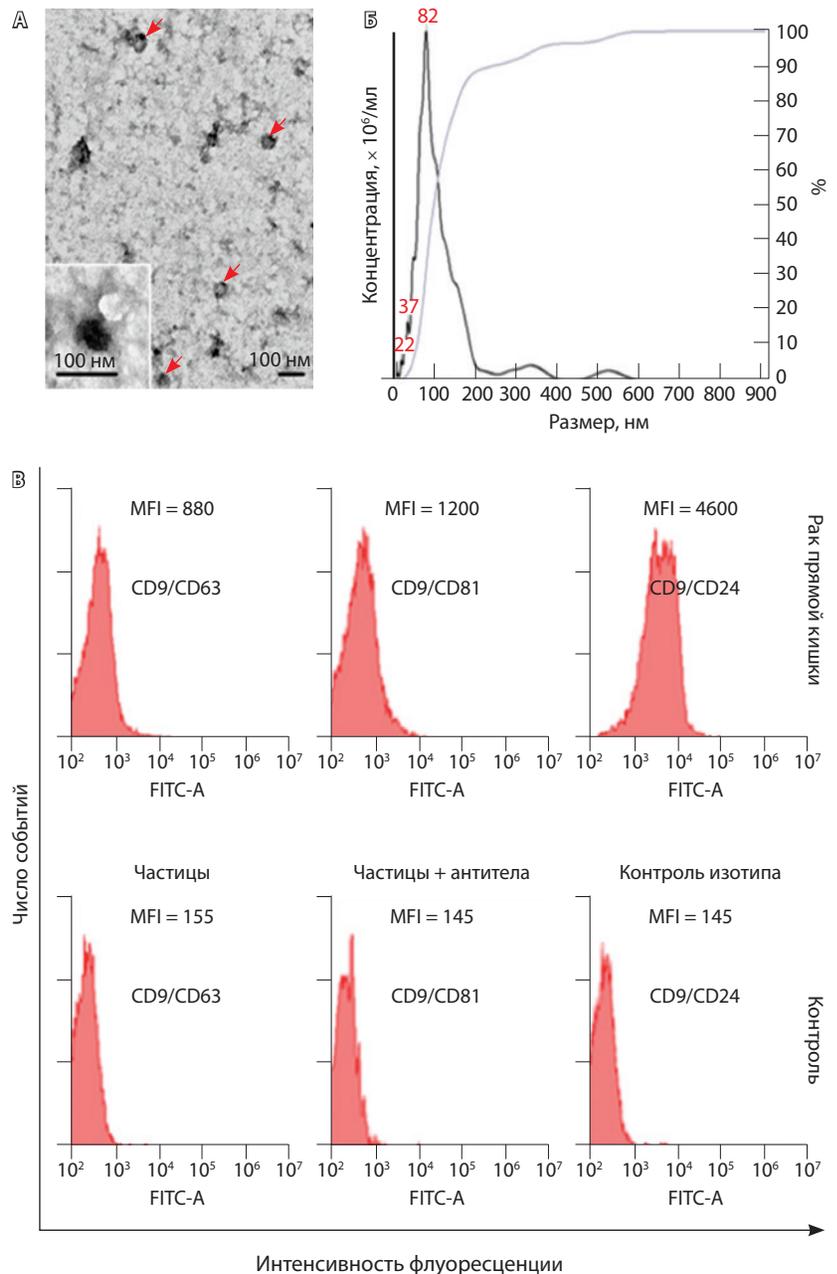


Рис. 1. Идентификация изолированных внеклеточных везикул, выделенных у больных раком прямой кишки: **А** – трансмиссионная электронная микроскопия (ТЕМ): видны везикулы ≤ 100 нм (стрелки), на вставке – малые внеклеточные везикулы; **Б** – анализ траекторий наночастиц (NTA): распределение размеров внеклеточных везикул; **В** – проточная цитометрия: экспрессия тетраспанинов CD63, CD81 и CD24 на CD9-положительных везикулах, репрезентативные значения медианы интенсивности флуоресценции (MFI)

статистически значимо больше MMP2 по сравнению с CD9⁺ везикулами (см. рис. 3А), однако среди адипоцитарных везикул практически не было частиц с сочетанной экспрессией желатиназ MMP2 и MMP9 (см. рис. 3Б).



Динамика содержания маркеров HSPs, MMPs и TIMP-1 на CD9-позитивных и FABP4-позитивных внеклеточных везикулах на разных этапах терморadioхимиотерапии и после нее

Популяция внеклеточных везикул	Содержание (%) маркеров в контрольных точках измерения				P
	1	2	3	4	
CD9⁺					
HSP60 ⁺	22,4 [9,25; 30,7]	13,7 [10,7; 14,6]	25,0 [15,2; 62,0]	10,6 [9,06; 11,5]	0,085
HSP60 ⁺ 27 ⁺ 90 ⁻	15,0 [3,84; 25,7]	19,9 [11,7; 32,1]	2,77 [0,34; 38,8]	17,5 [12,5; 37,5]	0,166
HSP60 ⁺ 27 ⁻ 90 ⁻	84,86 [73,9; 95,8]	74,7 [67,8; 88,2]	96,8 [60,6; 99,6]	82,2 [56,7; 87,1]	0,171
MMP2 ⁺	3,84 [2,71; 4,29]	4,12 [2,46; 6,27]	3,66 [2,55; 5,36]	3,79 [2,00; 5,60]	0,801
MMP2 ⁺ 9 ⁺ TIMP1 ⁺	10,8 [0,54; 17,6]	0,29 [0,14; 16,7]	8,90 [0,35; 15,4]	6,23 [0,89; 15,6]	0,539
MMP2 ⁺ 9 ⁻ TIMP1 ⁻	10,8 [3,14; 17,2]	2,03 [1,45; 14,3]	4,19 [0,97; 15,1]	7,59 [3,475; 16,4]	0,614
MMP2 ⁺ 9 ⁻ TIMP1 ⁺	14,9 [10,3; 16,6]	14,5 [8,54; 19,0]	13,8 [12,9; 22,6]	17,3 [12,4; 21,3]	0,213
MMP9 ⁺	5,52 [4,43; 7,75]	3,00 [2,23; 3,19]	3,08 [2,41; 4,57]	3,59 [3,07; 5,07]	0,045
MMP9 ⁺ 2 ⁺ TIMP1 ⁺	15,9 [6,71; 26,0]	6,82 [4,58; 18,0]	7,13 [5,42; 15,2]	9,36 [6,29; 11,2]	0,048
FABP4⁺					
HSP60 ⁺	26,0 [18,2; 37,5]	31,6 [17,6; 41,3]	38,2 [30,6; 63,0]	22,2 [18,5; 29,9]	0,012
HSP60 ⁺ 27 ⁺ 90 ⁻	13,3 [9,33; 28,5]	10,7 [8,25; 23,0]	7,34 [1,02; 30,2]	6,27 [4,44; 12,5]	0,146
HSP60 ⁺ 27 ⁻ 90 ⁻	86,6 [71,3; 90,1]	89,1 [76,9; 91,4]	92,5 [69,7; 98,9]	93,5 [87,3; 95,5]	0,843
MMP2 ⁺	6,73 [5,01; 17,98]	7,995 [5,275; 15,8]	7,75 [5,69; 16,29]	8,33 [6,12; 8,73]	0,764
MMP2 ⁺ 9 ⁺ TIMP1 ⁺	4,49 [0,23; 5,85]	4,065 [0,095; 5,82]	4,64 [0,29; 6,45]	3,68 [0,17; 3,78]	0,567
MMP2 ⁺ 9 ⁻ TIMP1 ⁻	1,83 [1,27; 2,77]	2,685 [0,73; 4,735]	1,89 [1,18; 4]	1,36 [0,72; 1,96]	0,543
MMP2 ⁺ 9 ⁻ TIMP1 ⁺	21,4 [16,4; 34,7]	21,3 [16,6; 26,5]	24,4 [11,8; 36,4]	22,7 [10,4; 23,2]	0,631
MMP9 ⁺	1,39 [1,06; 7,13]	1,66 [1,255; 5,39]	1,79 [1,38; 6,89]	1,69 [1,5; 3,34]	0,321
MMP9 ⁺ 2 ⁺ TIMP1 ⁺	5,66 [3,65; 8,07]	4,24 [2,87; 6,92]	7,99 [5,71; 9,91]	5,58 [5,34; 6,22]	0,124

Контрольные точки измерений: 1 – до начала лечения, 2 – в середине курса терморadioхимиотерапии (ТРХТ), 3 – через 6–10 нед. после окончания ТРХТ, 4 – через 6 мес. после точки 1

P – уровень статистической значимости вариаций признака по критерию Фридмана

Данные представлены в виде медианы и межквартильного диапазона (Ме [Q1; Q3]) относительных (%) значений

Обсуждение

И радиация, и гипертермия, будучи методами локального воздействия на опухоль, приводят к гиперпродукции экзосом с измененным составом. Определенная противоопухолевая активность малых ВВ (экзосом), происходящих от опухолевых и неопухолевых клеток, подвергшихся гипертермии или гипертермии в сочетании с химиотерапией, показана во многих исследованиях [16–18].

Механизмы такой активности изучены достаточно плохо, однако есть данные, что они ассоциированы с проявляющимся в этих условиях свойством экзосом накапливать и транспортировать до опухолевых клеток комплекс хемокинов, HSPs, микроРНК, которые в свою очередь способствуют апоптозу, индуцируют перераспределение фракций лимфоцитов и пр. [16–18]. Мембрана ВВ наряду с тетраспанинами и интегринами содержит

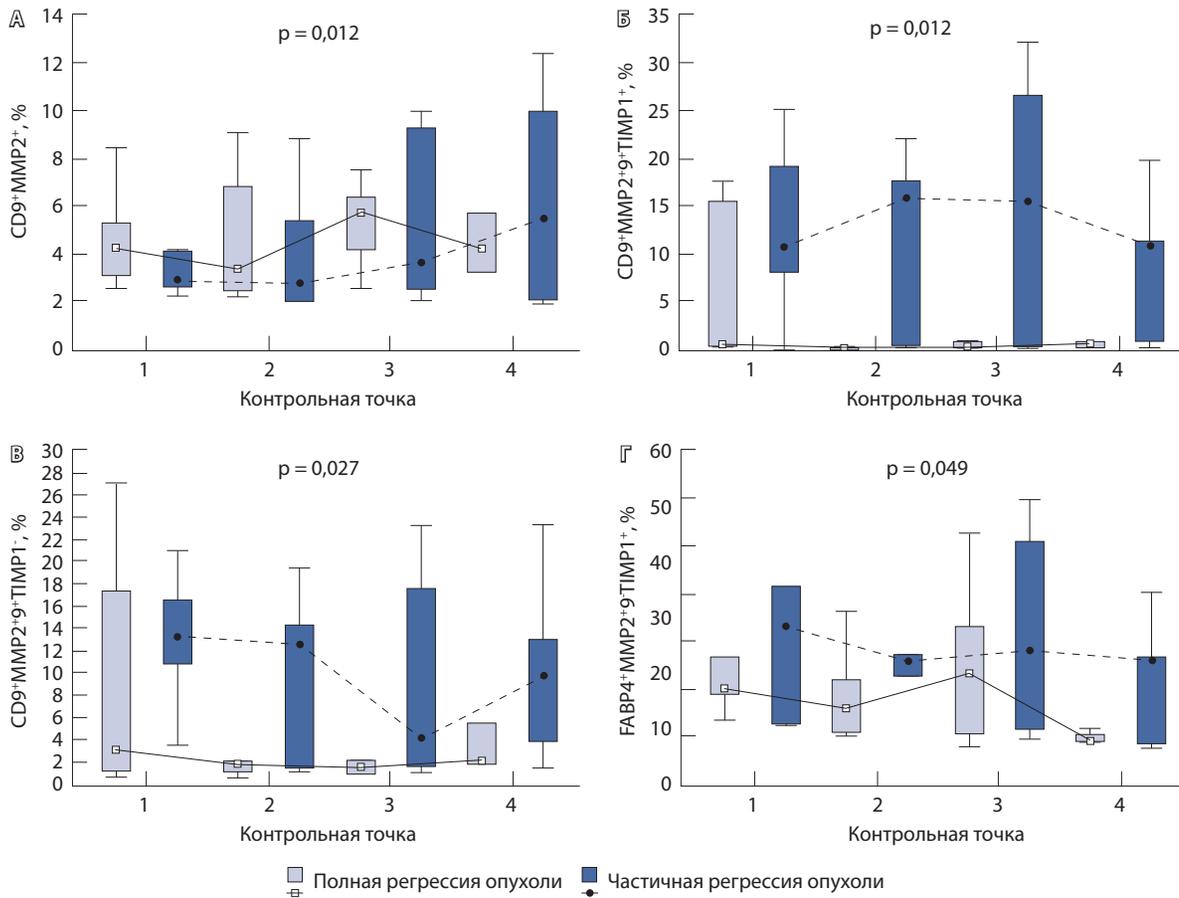


Рис. 2. Экспрессия MMPs и TIMP1 на CD9-положительных (А, Б, В) и FABP4-положительных (Г) везикулах в образцах, взятых у больных раком прямой кишки, в зависимости от эффективности терморadioхимиотерапии (ТРХТ); p – уровень значимости критерия лямбда Уилкса для дискриминантной модели; контрольные точки измерений: 1 – до начала лечения, 2 – в середине курса ТРХТ, 3 – через 6–10 нед. после окончания ТРХТ, 4 – через 6 мес. после точки 1

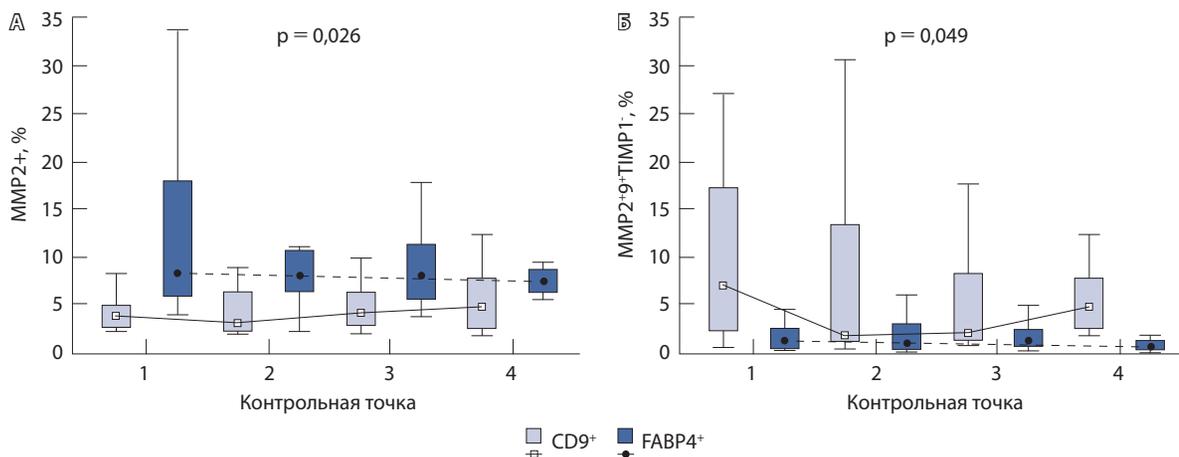


Рис. 3. Экспрессия MMPs и TIMP1 на CD9-положительных и FABP4-положительных экзосомах в образцах, взятых у больных раком прямой кишки, в динамике проведения терморadioхимиотерапии (сумма всех исходов); А – сравнение экспрессии субпопуляций MMP2⁺; Б – сравнение экспрессии субпопуляций MMP2⁺·9·TIMP1⁻; p – уровень значимости критерия лямбда Уилкса для дискриминантной модели; контрольные точки измерений: 1 – до начала лечения, 2 – в середине курса ТРХТ, 3 – через 6–10 нед. после окончания ТРХТ, 4 – через 6 мес. после точки 1

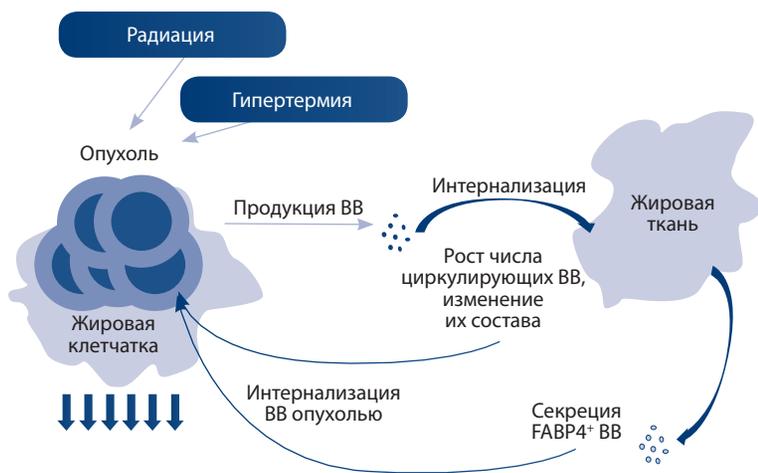


Рис. 4. Схема взаимодействия опухоли и жировой ткани посредством внеклеточных везикул (ВВ) в условиях лучевой терапии и гипертермии; FABP4⁺ – маркер адипоцитарных ВВ

комплекс протеаз: ADAM-протеазы, MMPs. Гиперэкспрессия желатиназ MMP2/MMP9 после инкубации опухолевых клеток-реципиентов с везикулами / экзосомами от облученных клеток-доноров рассматривается в качестве одного из основных механизмов эффекта свидетеля [3, 19]. Проангиогенные белки семейства MMPs, которые экспрессируются на адипоцитарных везикулах, с одной стороны, могут отражать активацию ангиогенеза в опухоли, а с другой – участвуют в ремоделировании стромы опухоли и способствуют опухолевой прогрессии. Гиперэкспрессия TIMP1, ингибитора MMPs, характерна для адипоцитов. Как растворимый белок, секретируемый во внеклеточную среду, TIMP1 обнаруживается в большинстве тканей и жидкостей организма. CD63 также был идентифицирован как рецептор TIMP1 вместе с β 1-интегрином, который формирует супрамолекулярный комплекс, расположенный на поверхности эпителиальных клеток молочной железы человека [20].

Источником везикул CD9⁺, как полагают большинство исследователей, являются практически все клетки организма, поскольку CD9 – универсальный маркер ВВ (наряду с CD63, CD81), тогда как адипоцитарные везикулы представлены преимущественно FABP4⁺. Везикулы, продуцируемые облученными клетками опухоли и параректальной клетчаткой, поглощаются опухолью непосредственно или поступают в кровь и поглощаются адипоцитами и адипоцитарными макрофагами дистанционно. Это, в свою очередь, может вести к измененной секреции FABP4⁺ (адипоцитарных) везикул, которые также могут

интернализироваться опухолью и приводить к ее регрессии [21] (рис. 4).

Доказательства этой гипотезы представлены на уровне *in vitro* и *in vivo* моделей и их сочетания [22–24], однако на клиническом материале эти механизмы не изучены, что послужило одной из задач настоящего исследования. Несмотря на данные литературы о вовлеченности гормонов жировой ткани, адипоцитарных везикул, микроРНК адипоцитарного происхождения в прогрессию опухолей у человека при ожирении [25], невозможно предсказать, какие именно популяции циркулирующих экзосом будут ассоциированы с непосредственной эффективностью ТРХТ у больных РПК. Полученные нами результаты свидетельствуют о четкой взаимосвязи динамики отдельных субпопуляций экзосом, как CD9⁺, так и FABP4⁺, с непосредственной эффективностью ТРХТ у больных РПК с избыточной массой тела и ожирением. В перспективе необходимо построение прогностических моделей для этой группы больных с учетом данных по везикулярным маркерам. Возможно, везикулярные предикторы были бы полезны для выявления группы больных РПК с неблагоприятным общим прогнозом. В целом это позволило бы персонализировать подходы к лечению и динамическому наблюдению больных с местнораспространенным средне- и нижеампулярным РПК.

Ограничения исследования

К ограничениям данного исследования следует отнести небольшой объем выборки, что обусловлено тщательным подбором больных и изучением показателей на экзосомах в динамике ТРХТ. Еще одно ограничение исследования: при построении дискриминантных моделей количественные переменные, характеризующие популяции везикул в разных контрольных точках, включались как независимые переменные. Таким образом, в настоящее время проведенный анализ не учитывает возможное влияние индивидуальной динамики экспрессии белков у пациентов.

Заключение

Одним из подходов к решению проблемы повышения эффективности термордиотерапии / ТРХТ в комплексной терапии злокачественных новообразований может быть поиск молекулярных маркеров, ассоциированных с ее непосредственной эффективностью. В отобранной группе больных РПК с избыточной массой тела и ожирением нами выявлены 4 субпопуляции CD9⁺ и FABP4⁺ экзосом, ассоциированных с эффективностью ТРХТ. Адипоцитарные везикулы на фоне ТРХТ экспрессируют статистически



значимо больше MMP2 по сравнению с везикулами CD9*. При этом среди адипоцитарных везикул практически нет экзосом с сочетанной экспрессией желатиназ MMP2 и MMP9. Экспрессия HSPs на циркулирующих экзосомах на этапах ТРХТ

не ассоциировалась с непосредственной эффективностью лечения и с типом везикул. В перспективе необходимо построение прогностических моделей для группы больных РПК с ожирением с учетом данных по везикулярным маркерам. ©

¹ Министерство здравоохранения Российской Федерации. Клинические рекомендации «Рак прямой кишки». 2022. Пункт 5 «Профилактика и диспансерное наблюдение, медицинские показания и противопоказания к применению методов профилактики» [Интернет]. Доступно на: https://cr.minzdrav.gov.ru/schema/554_3?ysclid=lxsy9lb5wk254881161.

Дополнительная информация

Финансирование

Исследование выполнено за счет средств гранта Российского научного фонда № 23-25-00085.

Конфликт интересов

Авторы заявляют об отсутствии явных и потенциальных конфликтов интересов, связанных с публикацией настоящей статьи.

Участие авторов

Н.В. Юнусова и Ж.А. Старцева – концепция и дизайн исследования, сбор и обработка материалов, анализ полученных данных, написание текста; Д.А. Сваровский, А.И. Коновалов, Д.Н. Костромицкий,

Л.В. Гердт – выполнение проточной цитометрии, курация пациентов на этапах лечения, анализ полученных данных; Г.В. Какурина – статистический анализ полученных данных; Н.В. Юнусова, И.В. Кондакова, И.Г. Фролова – анализ полученных данных; Е.А. Сиденко – определение белка в выделенных везикулах, анализ полученных данных; А.В. Усова – оценка эффективности терапии по RECIST и ESGAR, написание статьи; А.Е. Григорьева – цитологическое исследование препаратов, анализ полученных данных. Все авторы прочли и одобрили финальную версию статьи перед публикацией, согласны нести ответственность за все аспекты работы и гарантируют, что ими надлежащим образом были рассмотрены и решены вопросы, связанные с точностью и добросовестностью всех частей работы.

Список литературы / References

- Jabbari N, Nawaz M, Rezaie J. Ionizing radiation increases the activity of exosomal secretory pathway in MCF-7 human breast cancer cells: A possible way to communicate resistance against radiotherapy. *Int J Mol Sci*. 2019;20(15):3649. doi: 10.3390/ijms20153649.
- Jelonek K, Widlak P, Pietrowska M. The influence of ionizing radiation on exosome composition, secretion and intercellular communication. *Protein Pept Lett*. 2016;23(7):656–663. doi: 10.2174/0929866523666160427105138.
- Mutschelknaus L, Azimzadeh O, Heider T, Winkler K, Vetter M, Kell R, Tapio S, Merl-Pham J, Huber SM, Edalat L, Radulović V, Anastasov N, Atkinson MJ, Moertl S. Radiation alters the cargo of exosomes released from squamous head and neck cancer cells to promote migration of recipient cells. *Sci Rep*. 2017;7(1):12423. doi: 10.1038/s41598-017-12403-6.
- Назарова ИВ, Забегина ЛМ, Никифорова НС, Слюсаренко МА, Сидина ЕИ, Жахов АВ, Ищенко АМ, Маргулис БА, Гужова ИВ, Малек АВ. Тепловой стресс стимулирует секрецию клетками колоректальной карциномы специфической популяции нановезикул с повышенным содержанием БТШ70 и измененным составом микроРНК. *Сибирский онкологический журнал*. 2022;21(1):57–71. doi: 10.21294/1814-4861-2022-21-1-57-71.
- Nazarova IV, Zabegina LM, Nikiforova NS, Slusarenko MA, Sidina EI, Zhakhov AV, Ishchenko AM, Margulis BA, Guzhova IV, Malek AV. [Heat stress stimulates colon cancer cells to secrete specific population of extracellular nanovesicles enriched by HSP70 and microRNAs]. *Siberian Journal of Oncology*. 2022;21(1):57–71. Russian. doi: 10.21294/1814-4861-2022-21-1-57-71.
- Yang Z, Zhong W, Yang L, Wen P, Luo Y, Wu C. The emerging role of exosomes in radiotherapy. *Cell Commun Signal*. 2022;20(1):171.
- Кутилин ДС, Гусарева МА, Кошелева НГ. Уровень копийности генетических локусов и малоинвазивная оценка эффективности лучевой терапии у больных раком прямой кишки. *Российский биотерапевтический журнал*. 2022;21(4):41–49. doi: 10.17650/1726-9784-2022-21-4-41-49.
- Kutulin DS, Gusareva MA, Kosheleva NG. [Genetic locus copy number variation level and minimally invasive assessment of radiation therapy efficiency in rectal cancer patients]. *Rossijskij Bioterapevticeskij Zurnal*. 2022;21(4):41–49. Russian. doi: 10.17650/1726-9784-2022-21-4-41-49.
- Chaudhuri AA, Binkley MS, Osmundson EC, Alizadeh AA, Diehn M. Predicting radiotherapy responses and treatment outcomes through analysis of circulating tumor DNA. *Semin Radiat Oncol*. 2015;4(4):305–12.
- Yunusova NV, Kondakova IV, Kolomiets LA, Afanas'ev SG, Kishkina AY, Spirina LV. The role of metabolic syndrome variant in the malignant tumors progression. *Diabetes Metab Syndr*. 2018;12(5):807–812. doi: 10.1016/j.dsx.2018.04.028.
- Choi Y, Lee YH, Park SK, Cho H, Ahn KJ. Association between obesity and local control of advanced rectal cancer after combined surgery and radiotherapy. *Radiat Oncol J*. 2016;34(2):113–20. doi: 10.3857/roj.2016.01725.
- Connolly KD, Wadey RM, Mathew D, Johnson E, Rees DA, James PE. Evidence for adipocyte-derived extracellular vesicles in the human circulation. *Endocrinology*. 2018;159(9):3259–3267. doi: 10.1210/en.2018-00266.
- Kralisch S, Ebert T, Lossner U, Jessnitzer B, Stumvoll M, Fasshauer M. Adipocyte fatty acid-binding protein is released from adipocytes by a non-conventional mechanism. *Int J Obes (Lond)*. 2014;38(9):1251–4. doi: 10.1038/ijo.2013.232.
- Hubal MJ, Nadler EP, Ferrante SC, Barberio MD, Suh JH, Wang J, Dohm GL, Pories WJ, Mietus-Snyder M, Freishtat RJ. Circulating adipocyte-derived exosomal MicroRNAs associated with decreased insulin resistance after gastric bypass. *Obesity (Silver Spring)*. 2017;25(1):102–110. doi: 10.1002/oby.21709.
- Тамкович СН, Юнусова НВ, Стахеева МН, Сомов АК, Фролова АЕ, Кирюшина НА, Афанасьев СГ, Григорьева АЕ, Лактионов ПП, Кондакова ИВ. Выделение и характеристика экзосом плазмы крови больных раком молочной железы и колоректальным раком. *Биомедицинская химия*. 2017;63(2):165–169. doi: 10.18097/PBMC20176302165.
- Tamkovich SN, Yunusova NV, Stakheeva MN, Somov AK, Frolova AE, Kiryushina NA, Afanas'yev SG, Grigor'eva AE, Laktionov PP, Kondakova IV. Isolation and characterization of exosomes from blood plasma of breast cancer and colorectal cancer patients. *Biochem Mosc Suppl*



- B Biomed Chem. 2017;11:291–295. doi: 10.1134/S1990750817030106.
14. Théry C, Witwer KW, Aikawa E, Alcaraz MJ, Anderson JD, Andriantsitohaina R, Antoniou A, Arab T, Archer F, Atkin-Smith GK, Ayre DC, Bach JM, Bachurski D, Baharvand H, Balaj L, Baldacchino S, Bauer NN, Baxter AA, Bebawy M, Beckham C, Bedina Zavec A, Benmoussa A, Berardi AC, Bergese P, Bielska E, Blenkins C, Bobis-Wozowicz S, Boilard E, Boireau W, Bongiovanni A, Borràs FE, Bosch S, Boulanger CM, Breakefield X, Breglio AM, Brennan MÁ, Brigstock DR, Brisson A, Broekman ML, Bromberg JF, Bryl-Górecka P, Buch S, Buck AH, Burger D, Busatto S, Buschmann D, Bussolati B, Buzás EI, Byrd JB, Camussi G, Carter DR, Caruso S, Chamley LW, Chang YT, Chen C, Chen S, Cheng L, Chin AR, Clayton A, Clerici SP, Cocks A, Cocucci E, Coffey RJ, Cordeiro-da-Silva A, Couch Y, Coumans FA, Coyle B, Crescitelli R, Criado MF, D'Souza-Schorey C, Das S, Datta Chaudhuri A, de Candia P, De Santana EF, De Wever O, Del Portillo HA, Demaret T, Deville S, Devitt A, Dhondt B, Di Vizio D, Dieterich LC, Dolo V, Dominguez Rubio AP, Dominici M, Dourado MR, Driedonks TA, Duarte FV, Duncan HM, Eichenberger RM, Ekström K, El Andaloussi S, Elie-Caille C, Erdbrügger U, Falcón-Pérez JM, Fatima F, Fish JE, Flores-Bellver M, Försonits A, Frelet-Barrand A, Fricke F, Fuhrmann G, Gabrielson S, Gámez-Valero A, Gardiner C, Gärtner K, Gaudin R, Gho YS, Giebel B, Gilbert C, Gimona M, Giusti I, Goberdhan DC, Görgens A, Gorski SM, Greening DW, Gross JC, Gualerzi A, Gupta GN, Gustafson D, Handberg A, Haraszi RA, Harrison P, Hegyesi H, Hendrix A, Hill AF, Hochberg FH, Hoffmann KF, Holder B, Holthofer H, Hosseinkhani B, Hu G, Huang Y, Huber V, Hunt S, Ibrahim AG, Ikezu T, Inal JM, Isin M, Ivanova A, Jackson HK, Jacobsen S, Jay SM, Jayachandran M, Jenster G, Jiang L, Johnson SM, Jones JC, Jong A, Jovanovic-Talisman T, Jung S, Kalluri R, Kano SI, Kaur S, Kawamura Y, Keller ET, Khamari D, Khomyakova E, Khvorova A, Kierulff P, Kim KP, Kislinger T, Klingeborn M, Klinke DJ 2nd, Kornek M, Kosanović MM, Kovács ÁF, Krämer-Albers EM, Krasemann S, Krause M, Kurochkin IV, Kusuma GD, Kuypers S, Laitinen S, Langevin SM, Languino LR, Lannigan J, Lässer C, Laurent LC, Lavieu G, Lázaro-Ibáñez E, Le Lay S, Lee MS, Lee YXF, Lemos DS, Lenassi M, Leszczynska A, Li IT, Liao K, Libregts SF, Ligeti E, Lim R, Lim SK, Liné A, Linnemannstöns K, Llorente A, Lombard CA, Lorenowicz MJ, Lörincz ÁM, Lötvall J, Lovett J, Lowry MC, Loyer X, Lu Q, Lukomska B, Lunavat TR, Maas SL, Malhi H, Marcilla A, Mariani J, Mariscal J, Martens-Uzunova ES, Martin-Jaular L, Martinez MC, Martins VR, Mathieu M, Mathivanan S, Maugeri M, McGinnis LK, McVey MJ, Meckes DG Jr, Meehan KL, Mertens I, Minciaccchi V, Möller A, Møller Jørgensen M, Morales-Kastresana A, Morhayim J, Mullier F, Muraca M, Musante L, Mussack V, Muth DC, Myburgh KH, Najrana T, Nawaz M, Nazarenko I, Nejsum P, Neri C, Neri T, Nieuwland R, Nimrichter L, Nolan JP, Nolte-t Hoen EN, Noren Hooten N, O'Driscoll L, O'Grady T, O'Loughlen A, Ochiya T, Olivier M, Ortiz A, Ortiz LA, Osteikoetxea X, Østergaard O, Ostrowski M, Park J, Pegtel DM, Peinado H, Perut F, Pfaffl MW, Phinney DG, Pieters BC, Pink RC, Pisetsky DS, Pogge von Strandmann E, Polakovicova I, Poon IK, Powell BH, Prada I, Pulliam L, Quesenberry P, Radeghieri A, Raffai RL, Raimondo S, Rak J, Ramirez MI, Raposo G, Rayyan MS, Regev-Rudzki N, Ricklefs FL, Robbins PD, Roberts DD, Rodrigues SC, Rohde E, Rome S, Rouschop KM, Rughetti A, Russell AE, Saá P, Sahoo S, Salas-Huenuleo E, Sánchez C, Saugstad JA, Saul MJ, Schiffelers RM, Schneider R, Schøyen TH, Scott A, Shahaj E, Sharma S, Shatnyeva O, Shekari F, Shelke GV, Shetty AK, Shiba K, Siljander PR, Silva AM, Skowronek A, Snyder OL 2nd, Soares RP, Sódar BW, Soekmadji C, Sotillo J, Stahl PD, Stoorvogel W, Stott SL, Strasser EF, Swift S, Tahara H, Tewari M, Timms K, Tiwari S, Tixeira R, Tkach M, Toh WS, Tomasini R, Torrecilhas AC, Tosar JP, Toxavidis V, Urbanelli L, Vader P, van Balkom BW, van der Grein SG, Van Deun J, van Herwijnen MJ, Van Keuren-Jensen K, van Niel G, van Royen ME, van Wijnen AJ, Vasconcelos MH, Vechetti IJ Jr, Veit TD, Vella LJ, Velot É, Verweij FJ, Vestad B, Viñas JL, Visnovitz T, Vukman KV, Wahlgren J, Watson DC, Wauben MH, Weaver A, Webber JP, Weber V, Wehman AM, Weiss DJ, Welsh JA, Wendt S, Wheelock AM, Wiener Z, Witte L, Wolfram J, Xagorari A, Xander P, Xu J, Yan X, Yáñez-Mó M, Yin H, Yuana Y, Zappulli V, Zarubova J, Žekas V, Zhang JY, Zhao Z, Zheng L, Zheutlin AR, Zickler AM, Zimmermann P, Zivkovic AM, Zocco D, Zuba-Surma EK. Minimal information for studies of extracellular vesicles 2018 (MISEV2018): a position statement of the International Society for Extracellular Vesicles and update of the MISEV2014 guidelines. *J Extracell Vesicles*. 2018;7(1):1535750. doi: 10.1080/20013078.2018.1535750.
15. Jones LJ, Haugland RP, Singer VL. Development and characterization of the NanoOrange protein quantitation assay: A fluorescence-based assay of proteins in solution. *Biotechniques*. 2003;34(4):850–4, 856, 858 passim. doi: 10.2144/03344pt03.
16. Yang Y, Chen Y, Zhang F, Zhao Q, Zhong H. Increased anti-tumour activity by exosomes derived from doxorubicin-treated tumour cells via heat stress. *Int J Hyperthermia*. 2015;31(5):498–506. doi: 10.3109/02656736.2015.1036384.
17. Chen T, Guo J, Yang M, Zhu X, Cao X. Chemokine-containing exosomes are released from heat-stressed tumor cells via lipid raft-dependent pathway and act as efficient tumor vaccine. *J Immunol*. 2011;186(4):2219–28. doi: 10.4049/jimmunol.1002991.
18. Altanerova U, Babincova M, Babinec P, Benejova K, Jakubchova J, Altanerova V, Zduriencikova M, Repiska V, Altaner C. Human mesenchymal stem cell-derived iron oxide exosomes allow targeted ablation of tumor cells via magnetic hyperthermia. *Int J Nanomedicine*. 2017;12:7923–7936. doi: 10.2147/IJN.S145096.
19. Buzás EI, Tóth EÁ, Sódar BW, Szabó-Taylor KÉ. Molecular interactions at the surface of extracellular vesicles. *Semin Immunopathol*. 2018;40(5):453–464. doi: 10.1007/s00281-018-0682-0.
20. Justo BL, Jasiulionis MG. Characteristics of TIMP1, CD63, and β 1-integrin and the functional impact of their interaction in cancer. *Int J Mol Sci*. 2021;22(17):9319. doi: 10.3390/ijms22179319.
21. Юнусова НВ, Дандарова ЕЭ, Сваровский ДА, Денисов НС, Костромицкий ДН, Патышева МР, Черемисина ОВ, Спирина ЛВ. Продукция и интернализация внеклеточных везикул в норме и в условиях гипергликемии и инсулинорезистентности. *Биомедицинская химия*. 2021;67(6):465–474. doi: 10.18097/PBMC20216706465.
- Yunusova NV, Dandarova EE, Svarovsky DA, Denisov NS, Kostromitsky DN, Patysheva MR, Cheremisina OV, Spirina LV. Production and internalization of extracellular vesicles in norm and under conditions of hyperglycemia and insulin resistance. *Biochem Mosc Suppl B Biomed Chem*. 2022;16:104–112. doi: 10.1134/S199075082202010X.
22. Lou G, Song X, Yang F, Wu S, Wang J, Chen Z, Liu Y. Exosomes derived from miR-122-modified adipose tissue-derived MSCs increase chemosensitivity of hepatocellular carcinoma. *J Hematol Oncol*. 2015;8:122. doi: 10.1186/s13045-015-0220-7.
23. Yin H, Qiu X, Shan Y, You B, Xie L, Zhang P, Zhao J, You Y. HIF-1 α downregulation of miR-433-3p in adipocyte-derived exosomes contributes to NPC progression via targeting SCD1. *Cancer Sci*. 2021;112(4):1457–1470. doi: 10.1111/cas.14829.
24. Fan X, Wang J, Qin T, Zhang Y, Liu W, Jiang K, Huang D. Exosome miR-27a-3p secreted from adipocytes targets ICOS to promote antitumor immunity in lung adenocarcinoma. *Thorac Cancer*. 2020;11(6):1453–1464. doi: 10.1111/1759-7714.13411.
25. Юнусова НВ, Сваровский ДА, Коновалов АИ, Сиденко ЕА, Старцева ЖА. Молекулярные механизмы противоопухолевого эффекта терморadioтерапии у больных злокачественными новообразованиями с метаболическими нарушениями. *Вопросы онкологии*. 2023;69(3):373–382. doi: 10.37469/0507-3758-2023-69-3-373-382.
- Yunusova NV, Svarovsky DA, Kononov AI, Sidenko EA, Startseva ZA. [Molecular mechanisms of thermoradiotherapy efficacy in cancer patients with metabolic disorders]. *Voprosy Onkologii*. 2023;69(3):373–382. Russian. doi: 10.37469/0507-3758-2023-69-3-373-382.



The association between exosomal proteins and the efficacy of thermoradiochemotherapy in overweight/obese rectal cancer patients: a pilot prospective cohort study

N.V. Yunusova¹ • D.A. Svarovsky¹ • A.I. Konovalov¹ • D.N. Kostromitsky² • I.V. Kondakova² • A.V. Usova² • I.G. Frolova² • E.A. Sidenko² • G.V. Kakurina² • L.V. Gerdt² • A.E. Grigor'eva³ • Z.A. Startseva²

Background: Overweight and especially obesity are associated with the risk of the development and progression of colorectal cancer. It can be assumed that there are multifaceted interactions between the tumor and adipose tissue during anti-tumor treatment. Cancer cells secrete exosomes, extracellular vesicles affecting the microenvironment of the tumor and promoting its progression or regression. The presence of transcription/translation/folding factors (heat shock proteins (HSPs), matrix metalloproteinases (MMPs) and their tissue inhibitors (TIMPs) in exosomes secreted by irradiated cells and cells exposed to hyperthermia, indicates the cell adaptation to the thermal and radiation stress.

Aim: To analyze the MMPs, TIMP1, and HSPs on CD9-positive (CD9⁺) exosomes, as well as on exosomes of adipocytic origin (FABP4⁺) in rectal cancer patients with overweight/obesity under thermoradiochemotherapy (TRCT) and their association with the immediate treatment efficacy.

Methods: Since 2021, 20 patients (of those 8 men; median age 59.0 [52.0; 63.0] years, median body mass index 29.6 [28.5; 33.1] kg/m²) with morphologically verified rectal cancer (T3-4N0M0 and T3-4N1M0, differentiation grade G1–G3) have been participating in the study. They were treated with TRCT: external gamma therapy (2 Gy, 1 fraction/day, 5 days/week, total focal dose 54 Gy), chemotherapy with capecitabine (825 mg/m² twice daily) combined with local hyperthermia (42–44 °C, 60 min, 3 times/week, 10 sessions). The TRCT efficacy was assessed by RECIST 1.1 and ESGAR criteria. Blood samples for exosomes were taken from the patients at baseline (point 1), in the middle of the treatment course (point 2), at 6 to 10 weeks after the end of TRCT (point 3), and at 6 months after point 1 (point 4). Small extracellular vesicles were isolated from plasma by ultrafiltration with double ultracentrifugation. The isolated exosomes were characterized by

transmission electronic microscopy, flow cytometry and nanoparticle trajectory analysis (NTA).

Results: TRCT resulted in complete tumor regression in 13/20 of the rectal cancer patients and partial regression or stabilization in 7/20. Four subpopulations of CD9⁺ and FABP4⁺ exosomes associated with the TRCT efficacy were identified (CD9⁺MMP2⁺, CD9⁺MMP2⁺9⁺TIMP1⁺, CD9⁺MMP2⁺9⁺TIMP1⁻, and FABP4⁺MMP2⁺9⁺TIMP1⁺). Compared to the CD9⁺ exosomes, the adipocytic vesicles had higher MMP2 expression (p = 0.026); however, the adipocyte vesicles subpopulation were virtually free of vesicles with combined MMP2 and MMP9 gelatinase expression. The HSPs expression by circulating exosomes at various TRCT steps was associated neither with direct treatment efficacy nor with the vesicle type.

Conclusion: The expression of MMPs and TIMP1 on CD9⁺ and FABP4⁺ exosomes is associated with TRCT efficacy. In the future, vesicular markers could be used to build prognostic models, to identify patient groups with an unfavorable prognosis, and to personalize treatment and follow-up.

Key words: tumor cell exosomes, adipose-derived extracellular vesicles, obesity, overweight, rectal cancer, thermoradiochemotherapy, tumor response, predictors of treatment efficacy

For citation: Yunusova NV, Svarovsky DA, Konovalov AI, Kostromitsky DN, Kondakova IV, Usova AV, Frolova IG, Sidenko EA, Kakurina GV, Gerdt LV, Grigor'eva AE, Startseva ZA. The association between exosomal proteins and the efficacy of thermoradiochemotherapy in overweight/obese rectal cancer patients: a pilot prospective cohort study. *Almanac of Clinical Medicine*. 2024;52. doi: 10.18786/2072-0505-2024-52-013.

Received 31 January 2024; revised 06 May 2024; accepted 05 June 2024; published online xx June 2024

Natalia V. Yunusova – MD, PhD, Associate Professor, Chair of Biochemistry and Molecular Biology with a Course of Clinical Laboratory Diagnostics¹; ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-4595-4177>. E-mail: BochkarevaNV@oncology.tomsk.ru

Dmitry A. Svarovsky – Assistant, Chair of Biochemistry and Molecular Biology with a Course of Clinical Laboratory Diagnostics¹; ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-8985-009X> ✉ Moskovsky trakt 2, Tomsk, 634050, Russian Federation. E-mail: svarovsky.d.a@gmail.com

Artem I. Konovalov – MD, PhD, Assistant, Chair of Surgery with a Course in Mobilisation Training and Disaster Medicine¹; ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-1269-9421>. E-mail: oncology-group@yandex.ru

Dmitry N. Kostromitsky – MD, PhD, Research Fellow, Department of Abdominal Oncology²; ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-5691-2349>. E-mail: d.n.kostromitsky@gmail.com

Irina V. Kondakova – MD, PhD, Professor, Head of Tumor Biochemistry Laboratory²; ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-0947-8778>. E-mail: kondakova@oncology.tomsk.ru

Anna V. Usova – MD, PhD, Senior Research Fellow, Department of Diagnostic Radiology²; ORCID: <http://orcid.org/0000-0003-1679-010X>. E-mail: afina.tsk@gmail.com

Irina G. Frolova – MD, PhD, Professor, Head of Department of Diagnostic Radiology²; ORCID: <http://orcid.org/0000-0001-5227-006X>. E-mail: FrolovalG@oncology.tomsk.ru

Evgeniya A. Sidenko – MD, PhD, Junior Research Fellow, Tumor Biochemistry Laboratory²; ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-5838-9459>. E-mail: sidenkoevgeniyaaleksandrova@gmail.com

Gelena V. Kakurina – MD, PhD, Senior Research Fellow, Tumor Biochemistry Laboratory²; ORCID: <http://orcid.org/0000-0002-4506-9429>. E-mail: kakurinagv@oncology.tomsk.ru

Lyubov V. Gerdt – MD, PhD, Physician of the Clinical Laboratory Diagnostics, Molecular Oncology and Immunology Laboratory²; ORCID: <https://orcid.org/0009-0006-3394-9185>. E-mail: lyu-gerdt@yandex.ru

Alina E. Grigor'eva – PhD (in Biol.), Junior Research Fellow, Microscopy Group³; ORCID: <http://orcid.org/0000-0001-9853-223X>. E-mail: feabelit@mail.ru

Zhanna A. Startseva – MD, PhD, Head of Department of Radiation Therapy²; ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-4345-7719>. E-mail: zhanna.alex@rambler.ru

Funding

The study was financed from the Russian Science Foundation, grant # 23-25-00085.

Conflict of interests

The authors declare no conflict of interests regarding the publication of this article.

Authors' contribution

N.V. Yunusova and Z.A. Startseva, the study concept and design, data collection and management, analysis of the results, text writing; D.A. Svarovsky, A.I. Konovalov, D.N. Kostromitsky, L.V. Gerdt, flow cytometry, patient management, analysis of the results; G.V. Kakurina, statistical analysis; N.V. Yunusova, I.V. Kondakova, I.G. Frolova, analysis of the results; E.A. Sidenko, protein measurements in the isolated vesicles, analysis of the results; A.V. Usova, assessment of the treatment efficacy by RECIST and ESGAR, text writing; A.E. Grigor'eva, cytological studies, analysis of the results. All the authors have read and approved the final version of the paper before submission, agreed to be responsible for all aspects of the study and ensure that they have properly considered and solved all issues related to the accuracy or integrity of any part of the work.

¹ Siberian State Medical University; Moskovsky trakt 2, Tomsk, 634050, Russian Federation

² Cancer Research Institute, branch of the Tomsk National Research Medical Center of the Russian Academy of Sciences; Kooperativnyi per. 5, Tomsk, 634009, Russian Federation

³ Institute of Chemical Biology and Fundamental Medicine, Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences (ICBFM SB RAS); prospekt Akademika Lavrentyeva 8, Novosibirsk, 630090, Russian Federation

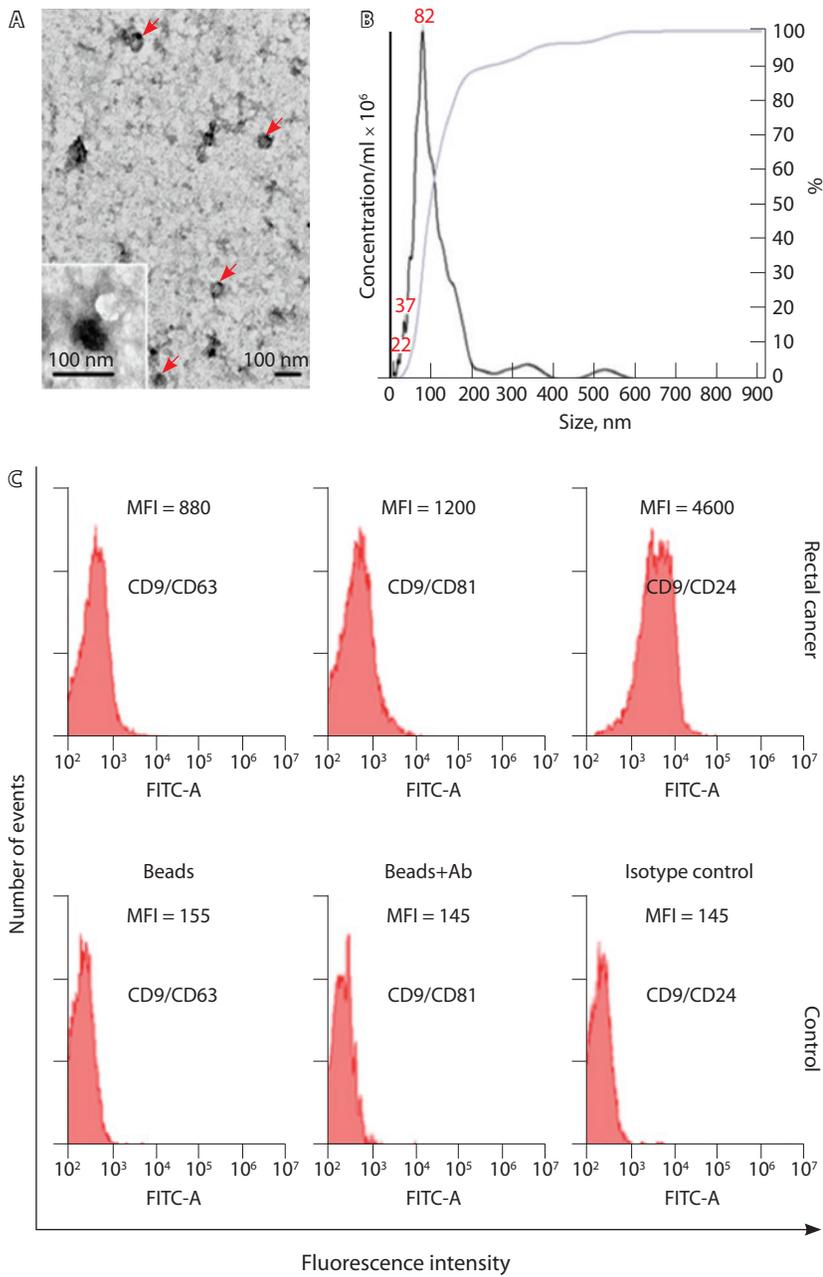


Fig. 1. Identification of the extracellular vesicles isolated from the rectal cancer patients: **A**, transmission electronic microscopy (TEM): vesicles of $\leq 100\text{ nm}$ (arrows), the insertion shows small extracellular vesicles; **B**, nanoparticle trajectory analysis (NTA): the extracellular vesicle size distribution; **C**, flow cytometry: the expression of tetraspanins CD63, CD81 and CD24 by CD9⁺ vesicles; the representative values of the median fluorescence intensity (MFI)

Changes over time in the HSPs, MMPs and TIMP1 marker content on CD9-positive and FABP4-positive extracellular vesicles at various steps of thermoradiochemotherapy and after it

Extracellular vesicle population	The marker content (%) at control timepoints				P
	1	2	3	4	
CD9⁺					
HSP60 ⁺	22.4 [9.25; 30.7]	13.7 [10.7; 14.6]	25.0 [15.2; 62.0]	10.6 [9.06; 11.5]	0.085
HSP60 ⁺ 27 ⁺ 90 ⁻	15.0 [3.84; 25.7]	19.9 [11.7; 32.1]	2.77 [0.34; 38.8]	17.5 [12.5; 37.5]	0.166
HSP60 ⁺ 27 ⁻ 90 ⁻	84.86 [73.9; 95.8]	74.7 [67.8; 88.2]	96.8 [60.6; 99.6]	82.2 [56.7; 87.1]	0.171
MMP2 ⁺	3.84 [2.71; 4.29]	4.12 [2.46; 6.27]	3.66 [2.55; 5.36]	3,79 [2.0; 5.60]	0.801
MMP2 ⁺ 9 ⁺ TIMP1 ⁺	10.8 [0.54; 17.6]	0.29 [0.14; 16.7]	8.90 [0.35; 15.4]	6,23 [0,89; 15,6]	0.539
MMP2 ⁺ 9 ⁺ TIMP1 ⁻	10.8 [3.14; 17.2]	2.03 [1.45; 14.3]	4.19 [0.97; 15.1]	7,59 [3.475; 16.4]	0.614
MMP2 ⁺ 9 ⁻ TIMP1 ⁺	14.9 [10.3; 16.6]	14.5 [8.54; 19.0]	13.8 [12.9; 22.6]	17,3 [12.4; 21.3]	0.213
MMP9 ⁺	5.52 [4.43; 7.75]	3.00 [2.23; 3.19]	3.08 [2.41; 4.57]	3,59 [3.07; 5.07]	0.045
MMP9 ⁺ 2 ⁻ TIMP1 ⁺	15.9 [6.71; 26.0]	6.82 [4.58; 18.0]	7.13 [5.42; 15.2]	9,36 [6.29; 11.2]	0.048
FABP4⁺					
HSP60 ⁺	26.0 [18.2; 37.5]	31.6 [17.6; 41.3]	38.2 [30.6; 63.0]	22.2 [18.5; 29.9]	0.012
HSP60 ⁺ 27 ⁺ 90 ⁻	13.3 [9.33; 28.5]	10.7 [8.25; 23.0]	7.34 [1.02; 30.2]	6.27 [4.44; 12.5]	0.146
HSP60 ⁺ 27 ⁻ 90 ⁻	86.6 [71.3; 90.1]	89.1 [76.9; 91.4]	92.5 [69.7; 98.9]	93.5 [87.3; 95.5]	0.843
MMP2 ⁺	6.73 [5.01; 17.98]	7.995 [5.275; 15.8]	7.75 [5.69; 16.29]	8.33 [6.12; 8.73]	0.764
MMP2 ⁺ 9 ⁺ TIMP1 ⁺	4.49 [0.23; 5.85]	4.065 [0.095; 5.82]	4.64 [0.29; 6.45]	3.68 [0.17; 3.78]	0.567
MMP2 ⁺ 9 ⁺ TIMP1 ⁻	1.83 [1.27; 2.77]	2.685 [0.73; 4.735]	1.89 [1.18; 4.0]	1.36 [0.72; 1.96]	0.543
MMP2 ⁺ 9 ⁻ TIMP1 ⁺	21.4 [16.4; 34.7]	21.3 [16.6; 26.5]	24.4 [11.8; 36.4]	22.7 [10.4; 23.2]	0.631
MMP9 ⁺	1.39 [1.06; 7.13]	1.66 [1.255; 5.39]	1.79 [1.38; 6.89]	1.69 [1.5; 3.34]	0.321
MMP9 ⁺ 2 ⁻ TIMP1 ⁺	5.66 [3.65; 8.07]	4.24 [2.87; 6.92]	7.99 [5.71; 9.91]	5.58 [5.34; 6.22]	0.124

Control timepoints: 1, at baseline; 2, in the middle of the thermoradiochemotherapy (TRCT) course; 3, at 6 to 10 weeks after the end of TRCT; 4, at 6 months after timepoint 1
P, the significance of the variation by Friedman test

The values are given as medians and interquartile ranges (Me [Q1; Q3]) for proportions (%)

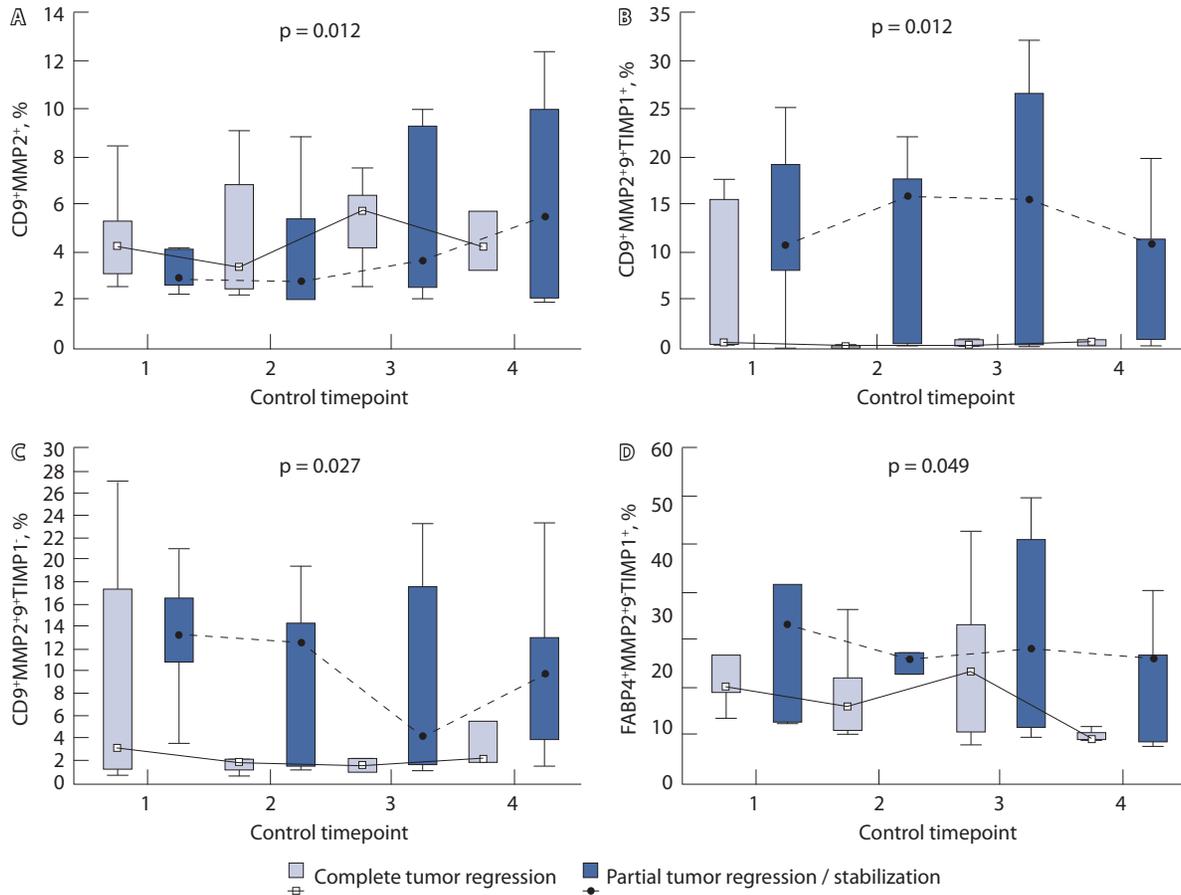


Fig. 2. MMPs and TIMP1 expression by CD9-positive (A, B, C) and FABP4-positive (D) vesicles in the samples taken from the rectal cancer patients, depending on the efficacy of thermoradiochemotherapy (TRCT); p, the significance of the Wilks lambda for discriminative model; control timepoints: 1, at baseline; 2, in the middle of the thermoradiochemotherapy (TRCT) course; 3, at 6 to 10 weeks after the end of TRCT; 4, at 6 months after timepoint 1

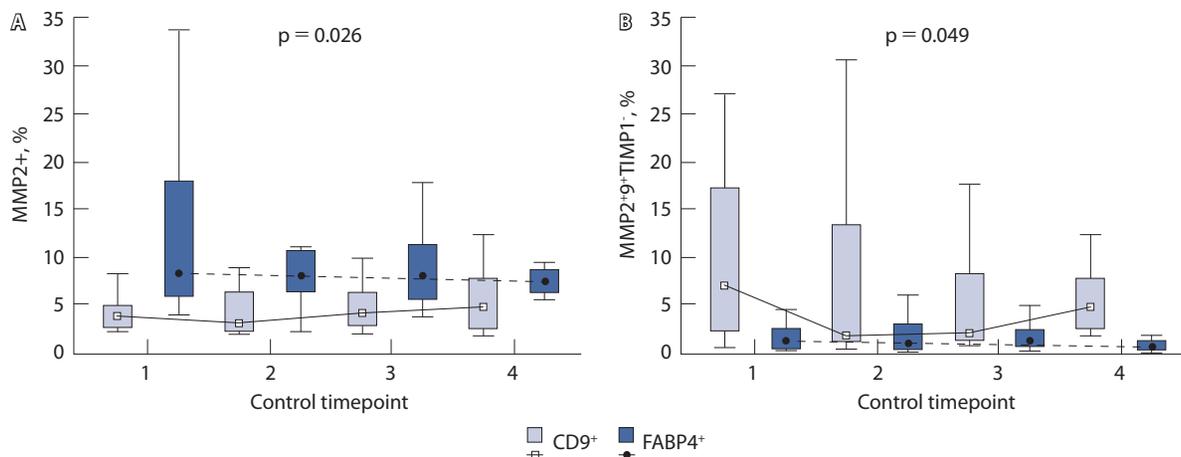


Fig. 3. MMPs and TIMP1 expression by CD9-positive and FABP4-positive exosomes in the samples from the rectal cancer patients: changes over time under thermoradiochemotherapy (TRCT; total outcomes); **A**, comparison of the expression by MMP2⁺ subpopulations; **B**, comparison of the expression by MMP2⁺9⁺TIMP1⁺ subpopulations; p, the significance of the Wilks lambda for discriminative model; control timepoints: 1, at baseline; 2, in the middle of the TRCT course; 3, at 6 to 10 weeks after the end of TRCT; 4, at 6 months after timepoint 1

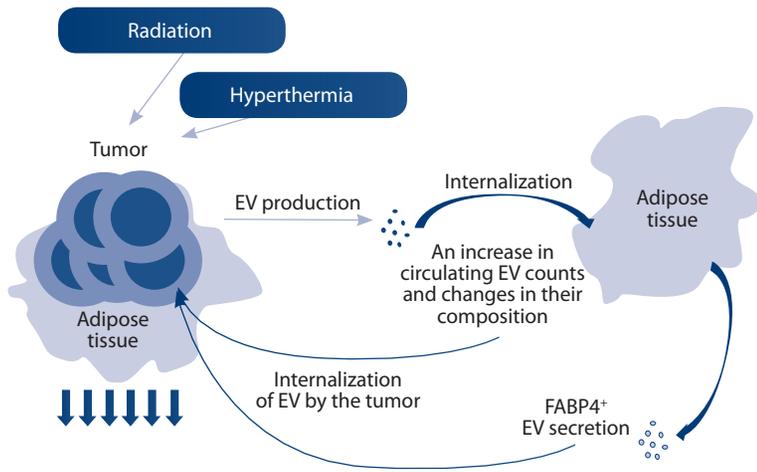


Fig. 4. The proposed scheme of the interplay between the tumor and adipose tissue through the extracellular vesicles (EV) under radiation therapy and hyperthermia; FABP4⁺, the marker for the adipocytic EV