

На правах рукописи



Сваровский Дмитрий Андреевич

**ХАРАКТЕРИСТИКА И ПРОГНОСТИЧЕСКОЕ ЗНАЧЕНИЕ ВНЕКЛЕТОЧНЫХ
ВЕЗИКУЛ АДИПОЦИТАРНОГО ПРОИСХОЖДЕНИЯ У БОЛЬНЫХ
КОЛОРЕКТАЛЬНЫМ РАКОМ**

3.1.6. Онкология, лучевая терапия

АВТОРЕФЕРАТ
диссертации на соискание ученой степени
кандидата медицинских наук

Томск – 2026

Работа выполнена в Федеральном государственном бюджетном научном учреждении «Томский национальный исследовательский медицинский центр Российской академии наук»

Научный руководитель:

доктор медицинских наук, доцент

Юнусова Наталья Валерьевна

Официальные оппоненты:

Малек Анастасия

Валерьевна

доктор медицинских наук, Федеральное государственное бюджетное учреждение «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии имени Н.Н. Петрова» Министерства здравоохранения Российской Федерации, научный отдел биологии опухолевого роста, научная лаборатория субклеточных технологий, заведующая

Фурсов Сергей

Александрович

доктор медицинских наук, профессор Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Новосибирский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации, кафедра онкологии лечебного факультета, заведующий

Ведущая организация: Федеральное государственное бюджетное учреждение «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии имени Н.Н. Блохина» Министерства здравоохранения Российской Федерации

Защита состоится «___» _____ 2026 года в ___ часов на заседании диссертационного совета 24.1.215.06 на базе Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Томский национальный исследовательский медицинский центр Российской академии наук» по адресу г. Томск, пер. Кооперативный, 5.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке и на сайте Федерального государственного бюджетного научного учреждения Томский национальный исследовательский медицинский центр Российской академии наук», адрес сайта <http://tnimc.ru>

Автореферат разослан «___» _____ 2026 года.

Ученый секретарь диссертационного совета,
доктор медицинских наук



Медведева А. А.

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы исследования

Циркулирующие внеклеточные везикулы (ВВ) являются важными участниками формирования микроокружения опухоли путем модуляции воспалительного ответа в опухоли, влияния на дифференцировку фибробластов и мезенхимных клеток в миофибробласты, запуска ангиогенного процесса и стимулирования эпителиально-мезенхимальной трансформации. Также они участвуют в формировании опухолевых преметастатических ниш. Таким образом, изучение везикул-опосредованной передачи сигналов между опухолью и их микроокружением и выявление факторов, влияющих на такую связь, является критическим для улучшения эффективности противоопухолевой терапии.

Эффективность химиолучевого лечения у больных раком прямой кишки (РПК) по данным разных авторов снижалась при наличии метаболического синдрома или изолированного ожирения (Anderson B. J., 2016, Sun Y., 2017). Ожирение было связано с менее выраженным снижением стадии Т и степенью регрессии РПК, и, следовательно, с плохим локальным контролем после неoadъювантного химиолучевого лечения у азиатских пациентов (Sun Y., 2017). Общая и безрецидивная выживаемость больных КРР с ожирением и высоким индексом массы тела ранних стадий сопоставима или выше по сравнению с больными без метаболических нарушений, при III стадии – снижается (Jeon J. Y., 2013, Димча А. А., 2020). У большинства больных КРР, в том числе и у больных РПК, опухоль развивается на фоне “метаболически здорового ожирения” или метаболического синдрома (более чем у 60% больных), ключевым патогенетическим моментом которого является развивающаяся гиперинсулинемия (Fei Han et al. 2021). Метаболические изменения также характерны для больных с аденомами толстой кишки (АТК), которые, в настоящее время рассматриваются как наиболее значимые предраковые заболевания. Это обусловило необходимость выявления как факторов прогноза онкологического риска у больных АТК с ожирением, так и необходимостью иметь клинически доступные маркеры, предикторы эффективности терморadioхимиотерапии (ТРХТ) лечения у больных РПК с метаболическими нарушениями.

Известно, что жировая ткань имеет сложный клеточный состав, и везикулы с разной функциональностью могут секретироваться как адипоцитами, так и стромальными клетками. Среди резидентных иммунных клеток жировой ткани макрофаги являются наиболее распространенными. Их количество может достигать 50% от общего числа клеток жировой ткани (Weisberg SP., 2003). Предлагаемые кандидаты-маркеры везикул адипоцитарного происхождения (PPAR гамма, FABP-4, PREF-1, перилипин, адипонектин) не являются строго специфичными для клеток жировой ткани, синтезируются также некоторыми иммунными клетками, в том числе макрофагами (Furuhashi M. 2019; Eguchi A. 2016). FABP4 является часто используемым маркером ВВ адипоцитарного происхождения. Он имеет определенные преимущества перед другими кандидатными маркерами такие как, высокая концентрация маркера на поверхности ВВ, известный механизм секреции в составе ВВ (Kralisch S, 2014; Hubal M. J. et al. 2017; Gustafson C. M., 2015). На клеточных культурах показано, что фракции малых ВВ (экзосом) адипоцитарного происхождения специфически обогащены белками внеклеточного матрикса, матриксными металлопротеиназами (MMPs), шаперонами, а также некоторыми метаболическими ферментами, участвующими в синтезе липидов и

углеводов (Durcin M., 2018), что и послужило причиной выбора везикулярных маркеров в нашем исследовании. Адипоциты продуцируют MMP2 и MMP9, которые играют значительную роль в адипогенезе, ангиогенезе и ремоделировании внеклеточного матрикса, что, безусловно, может ускорить метастатический каскад (Wang J., 2017).

Роль ионизирующего излучения как модулирующего фактора секреции ВВ недостаточно изучена. Показано, что рентгеновское облучение индуцирует секрецию малых ВВ (экзосом) различными типами опухолевых клеток (MCF-7, FaDu, BHY (Jabbari N., 2017). Определенная противоопухолевая активность экзосом, происходящих от опухолевых и неопухолевых клеток, подвергшихся гипертермии, гипертермии в сочетании с химиотерапией показана во многих исследованиях (Yang Y., 2015; Altanerova U., 2017), однако большинство исследований носят экспериментальный характер. Механизмы такой активности изучены достаточно плохо. Есть данные, что они ассоциированы со способностью ВВ в таких условиях накапливать и транспортировать до опухолевых клеток цитостатики, комплекс хемокинов, HSPs, микроРНК, способствующие апоптозу, индуцирующие перераспределение фракций лимфоцитов. Мембрана ВВ наряду с тетраспанинами и интегринами содержит комплекс протеаз (ADAM-протеазы, MMPs). Гиперэкспрессия желатиназ MMP2/MMP9 после инкубации опухолевых клеток-реципиентов с ВВ от облученных клеток-доноров рассматривается в качестве одного из основных механизмов немишенного эффекта радиотерапии (Matthews A. L., 2017; Gutwein P., 2005; Buzás E. I., 2018; Shimoda M., 2017). Роль MMPs, их индукторов и тканевых ингибиторов (TIMPs) в процессах инвазии, метастазирования, эпителиально-мезенхимального перехода хорошо известна, однако роль MMPs и их регуляторов во ВВ в динамике терапии рака с терморadiотерапией, а также в качестве предикторов этого вида лечения не изучалась.

В механизмах радиорезистентности и эффективности радиотерапии и гипертермии обсуждают роль везикулярных и мембранных форм белков теплового шока, которые представлены членами высококонсервативного семейства HSPs (HSP90, HSP70, HSP60, HSP27, кристаллином и др.). Физиологическое значение везикулярных форм HSPs недостаточно понятно, даже в контексте нормальных клеток (Малек А. В., 2021). Показано, что HSPs на поверхности ВВ могут распознаваться CD91+ опухолевыми клетками, CD91+ фибробластами, CD91+SREC1+TLR+ антигенпрезентирующими клетками и CD94+ цитолитическими иммунными клетками, обсуждается как иммуностимулирующая, так и иммуносупрессивная роль экстраклеточных HSPs (Taha E. A., 2019; Lv L. H., 2012). В работе Bavisotto C. C. et al (2019) показано, что профиль HSPs в ткани папиллярного рака щитовидной железы и соответствующих циркулирующих экзосомах идентичен, преобладают HSP27 и HSP60, в то время как HSP90 и HSP70 слабоэкспрессированы. Общий уровень HSP27, HSP60 и HSP90 в экзосомах существенно снижался после удаления опухоли и был сравним с уровнем этих белков у больных с доброкачественными узловыми образованиями, что делает эти белки перспективными для контроля противоопухолевого лечения. В работе А. В. Малек с соавт. (2021) было показано, что тепловой стресс стимулирует секрецию клетками колоректальной карциномы специфической популяции везикул с повышенным содержанием HSP70 на мембране и измененным составом микроРНК и эти изменения коррелируют с выживаемостью клеток. Таким образом, HSPs-содержащие циркулирующие ВВ (как тотальный пул, так и опухолевые ВВ) достаточно перспективны как предикторы эффективности терморadiотерапии.

В ряде исследований, а также в ходе оценки эффективности варианта термохимолучевого лечения, предлагаемого в нашей работе, было показано, что в результате предоперационной химиолучевой терапии с использованием фторпиримидинов у 50–60 % больных отмечается уменьшение опухоли, в 8–30% случаев подтверждается полный патоморфологический ответ опухоли на проводимую терапию (Афанасьев С. Г., 2016; Ferrari L. 2015; Rödel C. 2015). Несмотря на определенные достижения в лечении РПК, в результате курса предоперационной химиорадиотерапии было выявлено повышение частоты поздних лучевых осложнений, которые существенно снижали качество жизни больных РПК (Malik Y., 2024; Liang Z., 2022; Sipaviciute A., 2020). В связи с этим, поиск доступных молекулярных маркеров – предикторов эффективности термохимиорадиотерапии – крайне важен для персонализации лечения больных РПК. Кроме того, результаты по составу ВВ плазмы крови адипоцитарного происхождения имеют перспективы использования в качестве маркеров для уточнения онкологического риска у больных с АТК с метаболическими нарушениями.

Степень разработанности темы

Метаболический синдром и ожирение являются независимыми факторами риска развития КРР и его предраковых форм, включая АТК; ключевыми патогенетическими механизмами рассматриваются гиперинсулинемия, инсулинорезистентность и хроническое воспаление (Lu B., 2023). Показано, что наличие метаболических нарушений ассоциировано с повышенным риском малигнизации АТК и неблагоприятным течением КРР, однако применяемые в клинической практике подходы к стратификации риска у больных АТК по-прежнему основаны преимущественно на морфологических характеристиках аденом (размер, гистологический тип, степень дисплазии) и не учитывают системные молекулярные и метаболические факторы канцерогенеза (Park J. et al., 2014).

В последние годы ВВ рассматриваются как перспективный источник циркулирующих маркеров КРР, отражающих биологические свойства опухоли и опухолевого микроокружения; показано, что ВВ содержат MMPs, HSPs и регуляторные микроРНК, ассоциированные с инвазией и прогрессированием опухоли (Ogata-Kawata H. et al., 2014). При этом большинство исследований посвящено опухоль-ассоциированным ВВ и выполнено без учёта метаболического синдрома. Роль циркулирующих ВВ адипоцитарного происхождения при КРР и АТК на фоне метаболических нарушений остаётся недостаточно изученной, а везикулярные маркеры онкологического риска и прогноза у данной категории больных в настоящее время отсутствуют.

Цель исследования

Изучить циркулирующие внеклеточные везикулы адипоцитарного происхождения, выявить ассоциированные с внеклеточными везикулами маркеры онкологического риска у больных с аденомами толстой кишки, а также предикторы эффективности терморadioхимиотерапии у больных раком прямой кишки с ожирением.

Задачи

1. Изучить FABP4-позитивные и «истинно адипоцитарные» внеклеточные везикулы плазмы крови с использованием подхода с удалением из плазмы внеклеточных везикул моноцитарно-макрофагального происхождения.

2. Определить уровни матриксных металлопротеиназ (MMPs) и белков теплового шока (HSPs) на CD9-позитивных внеклеточных везикул и FABP4-позитивных внеклеточных везикул плазмы крови у больных с аденомами толстой кишки и раком ободочной кишки во взаимосвязи с метаболическими нарушениями.

3. Выявить ассоциированные с адипоцитарными внеклеточными везикулами маркеры повышенного онкологического риска у больных с аденомами толстой кишки с метаболическими нарушениями.

4. Изучить состав CD9-позитивных и FABP4-позитивных циркулирующих внеклеточных везикул на основе сочетания основных матриксных металлопротеиназ, TIMP1 и HSPs, а также экспрессию микроРНК-124 и микроРНК-506 в составе внеклеточных везикул плазмы крови у больных раком прямой кишки с ожирением на этапах терморadioхимиотерапии в динамике.

5. Сопоставить фенотипы циркулирующих внеклеточных везикул до лечения с непосредственной эффективностью курса терморadioхимиотерапии с радиомодификатором капецитабином в комбинированном лечении раком прямой кишки.

6. Выявить везикулярные предикторы эффективности терморadioхимиотерапии у больных раком прямой кишки с метаболическими нарушениями.

Научная новизна

Впервые изучен состав истинно адипоцитарных циркулирующих внеклеточных везикул у больных с предраковой патологией и раком ободочной кишки, имеющих метаболические нарушения и без метаболических нарушений. Впервые проведена сравнительная оценка кандидатных маркеров циркулирующих адипоцитарных внеклеточных везикул, показано, что FABP4 обеспечивает наиболее оптимальную идентификацию исследуемой фракции внеклеточных везикул.

Впервые изучены уровни MMP2, MMP9, TIMP1 и HSP90/60/27 на поверхности как общего пула (CD9-позитивных), так и адипоцитарных (FABP4-позитивных) внеклеточных везикул у пациентов с аденомами толстой кишки и раком ободочной кишки во взаимосвязи с наличием у них метаболического синдрома или метаболически здорового ожирения. Данные о составе циркулирующих внеклеточных везикул, в том числе адипоцитарных, использованы для прогнозирования онкологического риска у больных с аденомами толстой кишки с ожирением/метаболическим синдромом.

Впервые изучен состав циркулирующих внеклеточных везикул при раке прямой кишки на этапах комбинированного лечения с локальной гипертермией.

Впервые выявлены везикулярные предикторы эффективности терморadioхимиотерапии у больных раком прямой кишки. Установлено, что уже до начала лечения у пациентов, впоследствии продемонстрировавших опухолевый ответ по данным морфологической оценки резецированной опухоли, имеются характерные отличия в составе циркулирующих внеклеточных везикул по сравнению с пациентами, опухоли которых оказались резистентны к лечению.

Теоретическая значимость работы

Результаты исследования углубляют фундаментальные знания о содержании и функциях адипоцитарных внеклеточных в крови онкологических больных. Показана принципиальная зависимость фенотипа циркулирующих внеклеточных везикул от

метаболического статуса пациента, что подтверждает концепцию тесной связи опухолевого процесса с системными нарушениями.

Обоснована возможность прогноза эффективности терморadioхимиотерапии на основании состава циркулирующих внеклеточных везикул у больных раком прямой кишки с ожирением, что позволяет персонализировать данную терапию.

Получены оригинальные данные о динамике содержания MMPs и HSPs на CD9-позитивных и FABP4-позитивных везикулах плазмы крови при проведении терморadioхимиотерапии. Показано изменение профиля везикул после терморadioхимиотерапии, что расширяет фундаментальные представления о реакциях опухоли и его окружения (жировая ткань) на терапию.

Практическая значимость работы

Практическая значимость работы представлена предложенным способом детекции и идентификации фракции «истинно» адипоцитарных везикул в супернатанте после иммунопреципитации у больных раком ободочной кишки и аденомами толстой кишки с использованием подхода с удалением внеклеточных везикул моноцитарно-макрофагального происхождения.

Созданы две оригинальные модели – прогнозирования онкологического риска у больных аденомами толстой кишки, а также прогнозирования исхода терморadioхимиотерапией у больных раком прямой кишки. Модели включают преимущественно везикулярные показатели.

Методология и методы исследования

Методологической основой данной работы послужили современные теоретические представления о роли внеклеточных везикул в патогенезе опухоли, как об одном из ключевых факторов взаимодействия опухоли с клетками собственного микроокружения, а также способности внеклеточных везикул осуществлять коммуникацию между опухолью и другими, более отдаленными от основной локализации, тканями, в частности с жировой тканью. В качестве ключевого методического подхода использована модель «жидкой биопсии» – комплексный анализ циркулирующих биомаркеров опухоли в образцах крови пациентов минимально инвазивным способом.

Работа выполнялась с использованием комплекса современных методик, соответствующих международным стандартам исследования внеклеточных везикул (MISEV 2023), получение внеклеточных везикул методом последовательной ультрафильтрации и ультрацентрифугирования, последовательная верификация везикулярной природы выделенных частиц с помощью комбинации молекулярного фенотипирования, трансмиссионной электронной микроскопии и анализа траекторий наночастиц. Использован комплексный подход для анализа морфологии и фенотипа ВВ (высокочувствительная проточная цитофлуориметрия, иммунопреципитация с Вестерн-блоттингом, ПЦР в реальном времени). Для исследования везикулярных микроРНК был проведен биоинформатический поиск.

Исследования были выполнены с использованием оборудования Центра коллективного пользования «Медицинская геномика» Томского НИМЦ, зарегистрированном на сайте <https://ckp-rf.ru>

Основные положения, выносимые на защиту

1. FABP4 является одним из наиболее оптимальных маркеров «истинно» адипоцитарных везикул, так как он гиперэкспрессирован на поверхности внеклеточных везикул адипоцитарного происхождения как у больных с колоректальным раком, так и с аденомами толстой кишки, как с метаболическими нарушениями, так и без них.
2. Онкологический риск у больных с аденомами толстой кишки ассоциирован с фенотипами циркулирующих CD9-положительных и FABP4-положительных везикул, экспрессирующих HSPs и MMPs.
3. Эффективность терморadioхимиотерапии при раке прямой кишки связана с фенотипами циркулирующих CD9-положительных и FABP4-положительных везикул, экспрессирующих HSPs и MMPs, а также с уровнем везикулярной микроРНК-506.

Степень достоверности результатов

Достоверность и обоснованность полученных в работе результатов обеспечивается репрезентативностью выборки, адекватностью, контролируемостью и воспроизводимостью примененных методов. Использовались международные рекомендации по дефиниции критериев метаболического синдрома и метаболически здорового ожирения. Все ключевые эксперименты выполнялись на нескольких независимых сериях образцов с внутренним контролем качества. Примененные методы выделения и анализа ВВ соответствуют международным стандартам (MISEV, 2023) и проходят проверку на каждом этапе: морфологическая и иммунная валидация ВВ подтверждала чистоту и специфичность изоляции частиц. Методы статистической обработки полученных данных подобраны корректно с учетом как типов данных, так и их объемов.

Соответствие диссертации паспорту научной специальности

Диссертация соответствует паспорту научной специальности 3.1.6. Онкология, лучевая терапия, а именно пунктам п.2 «Исследования на молекулярном, клеточном и органном уровнях этиологии и патогенеза злокачественных опухолей, основанные на современных достижениях ряда естественных наук (генетики, молекулярной биологии, морфологии, иммунологии, биохимии, биофизики и др.)» и п.3 «Разработка и совершенствование программ скрининга и ранней диагностики онкологических заболеваний».

Личный вклад автора

Соискатель самостоятельно осуществлял формирование групп исследования, сбор материалов и пробоподготовку, выполнял проточную цитометрию, биоинформационный анализ, выделение и амплификацию везикулярных микроРНК, анализировал научную литературу. Соискателем проводилась статистическая обработка, обобщение полученных данных и интерпретация результатов, подготовка научных публикаций.

Апробация материалов диссертации

Материалы диссертации изложены и обсуждены на III международной конференции «Генетические технологии в трансляционной медицине» (Томск, 2025), на конференции с международным участием «Биохимия человека» (Москва, 2024), на Всероссийском

молодежном фестивале «Трамплин в науку» (Красноярск, 2024), на Международном Молодежном Медицинском Конгрессе (Санкт-Петербург, 2022).

Публикации материалов исследования

По теме опубликовано 11 научных работ, в том числе 6 статей в журналах, рекомендованных Высшей аттестационной комиссией Министерства образования и науки Российской Федерации. Получен 1 патент РФ.

Внедрение результатов исследования

Полученные результаты исследования используются в процессе обучения студентов на кафедре биохимии и молекулярной биологии с курсом клинической лабораторной диагностики ФГБОУ ВО «Сибирский государственный медицинский университет» Минздрава России и используется для лечения больных РПК в отделении радиотерапии НИИ онкологии Томского НИМЦ.

По материалам диссертационного исследования было опубликовано учебное пособие: Практикум по визуализации внеклеточных везикул методом проточной цитометрии : учебное пособие: [Электронный ресурс] / Н. В. Юнусова, Д. А. Сваровский, М. Р. Патышева. – Москва : Знание-М, 2023. – 43 с.

Структура и объем диссертации

Диссертационная работа изложена на 103 страницах машинописного текста и состоит из введения, четырех глав (аналитического обзора литературы, описания материала и методов исследования, результатов собственных исследований и их обсуждения), выводов, практических рекомендаций, списка условных сокращений и указателя литературы, включающего 104 источника, из них 3 отечественных и 101 иностранных. Работа содержит 10 таблиц и 12 рисунков.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Пациенты: В когортном проспективном исследовании сформированы следующие группы по двум ключевым направлениям исследовательской работы:

1. Оценка онкологического риска и характеристика FАВР4-положительных и «истинно-адипоцитарных» везикул:

- Группа пациентов с аденомами толстой кишки (АТК). В группу вошли 20 человек (11 мужчин и 9 женщин, средний возраст $54,2 \pm 2,20$ лет), из них у 15 человек были верифицированы тубулярные аденомы, а у 5 – тубулярно-ворсинчатые аденомы с дисплазией low-grade во всех случаях;

- Клиническая группа больных РОК (рак ободочной кишки) $T_{2-4}N_{0-2}M_0$, в которую вошли 40 человек (средний возраст $59,6 \pm 1,6$ лет), проходивших лечение в торакоабдоминальном отделении НИИ онкологии Томского НИМЦ в 2022-2025 годах.

У всех пациентов диагностирован либо метаболический синдром (МС) в соответствии с критериями IDF (2005), либо так называемое «метаболически здоровое ожирение» (МЗО).

Также была сформирована дополнительная группа больных РОК без МС/МЗО для характеристики FАВР4-положительных и «истинно-адипоцитарных» везикул:

- Группа больных РОК с нормальной массой тела - 10 человек (5 мужчин и 5 женщин, $T_{2-4}N_{0-2}M_0$, средний возраст $60,6 \pm 1,91$ лет)

Оценка онкологического риска осуществлялась при сравнении первых двух групп, а для описания «истинно-адипоцитарных» везикул использовались все три группы (АТК, РОК с МС/МЗО, РОК без МС/МЗО).

2. Оценка эффективности ТРХТ:

- Группа больных средне- и нижеампулярным РПК ($T_{2-4a}N_{0-2}M_0$) – 40 человек, которым был проведен курс лучевой терапии в стандартном режиме фракционирования на фоне радиосенсибилизации капецитабином и локальной гипертермии. Все больные до начала лечения имели ожирение, определяемое как индекс массы тела ≥ 30 . У части больных был трех-, четырех или пятикомпонентный метаболический синдром.

Исследование одобрено локальным этическим комитетом НИИ онкологии Томского НИМЦ (протокол №21 от 09.11.2023).

Всем больным выполнена магнитно-резонансная томография (МРТ), а также эндоскопическое исследование с взятием материала для гистологического анализа. Каждый пациент, включённый в группу АТК, имел как минимум один фрагмент, классифицированный как тубулярная или тубулярно-ворсинчатая аденома.

Больным РПК на первом этапе проводилась дистанционная гамма-терапия на аппарате Theratron Equinox 1,25 в стандартном режиме фракционирования, разовая очаговая доза 2,0 Гр, 5 фракций в неделю до СОД 54 Гр. Одновременно с началом лучевой терапии была проведена радиомодификация капецитабином, а все лечение проходило на фоне локальной гипертермии. Оценка лечения была проведена по критериям RECIST 1.1 и ESGAR через 6-8 недель после окончания курса ТРХТ при помощи эндоскопического исследования прямой кишки и полученных с помощью МРТ данных динамики опухолевых показателей. Также использовались данные гистологического исследования язвенного содержимого у больных раком прямой кишки после проведения ТРХТ. Степень морфологического ответа опухоли определялась в соответствии с классификацией А. М. Mandard использовалась для оценки выраженности ответа опухоли на проведённую терапию. В интервале между завершением курса ТРХТ и контрольным обследованием проводились курсы консолидирующей химиотерапии по схеме XELOX.

В зависимости от эффективности ТРХТ больные были распределены на 2 группы – с полной регрессией (группа 1) и с остаточной опухолью (группа 2). При полной клинико-морфологической регрессии больные продолжали химиотерапию по схеме XELOX до 6-8 курсов с последующим динамическим наблюдением. При остаточной опухоли через 7-8 недель после окончания ТРХТ больным выполнялась радикальная операция. В послеоперационном периоде больные получали химиотерапию по показаниям.

Дизайн исследования представлен на рисунке 1.



Рисунок 1 – дизайн исследования

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Выделение внеклеточных везикул. Малые ВВ из плазмы крови больных выделены методом ультрафильтрации с двойным ультрацентрифугированием. Фракционирование крови выполнялось на высокоскоростной центрифуге с угловым ротором при 4 °С в течение 20 минут при ускорении 1000g. Полученную при первом центрифугировании плазму повторно центрифугировали при 4°С, 20 минут, 14000g. Супернатант разводили PBS и фильтровали через фильтры с диаметром пор 220 нм, далее фильтрат подвергался ультрацентрифугированию дважды на ультрацентрифуге, 4°С, 90 минут, 100 000g.

Типирование внеклеточных везикул. Для подтверждения морфологии выделенных частиц проводилась трансмиссионная электронная микроскопия на микроскопе Jem1400 (Jeol, Япония). Распределение и концентрация выделенных ВВ изучены с помощью метода анализа траекторий наночастиц с использованием NanoSight LM10 (Malvern Instruments, Великобритания). Анализировались средний диаметр и концентрация везикул. Для дополнительной верификации частиц исследовали уровень тетраспанинов CD9, CD81, CD63 методом проточной цитометрии. Для оценки концентрации белка ВВ использовался флуориметрический метод оценки белка с флуорескаминам.

Анализ HSPs и MMPs на поверхности CD9 и FABP4 везикул методом проточной цитофлуориметрии. Аликвоты ВВ инкубировали с анти-CD9 или анти-FABP4 латексными частицами при 4°С в течение 14 часов, шейкер 400 об/мин и затем блокировали в 0,2 М глицине в течение 30 мин. Далее комплексы окрашивали комплексом антител (анти-HSP60-PE (Cloud-Clone Corp., Китай), анти-HSP27-FITC (Clone Corp., Китай) и анти-HSP90-APC (Cloud-Clone Corp.) в течение 20 мин. Анализ субпопуляций MMP9/MMP2/TIMP1 на поверхности ВВ выполнен аналогично. Цитометрия выполнена на приборе Cytotflex (Beckman Coulter, США), полученные данные анализировались с помощью программы CytExpert 2.0 Software.

Иммунопреципитация и Вестерн-блоттинг. Для исследования состава циркулирующих адипоцитарных везикул выполнена иммунопреципитация на латексных частицах, покрытых антителами к FABP4 и CD11b. Пять микролитров 3×10^5 частиц отмывали дважды по 100 мкл 0,1М MES-буфером pH 5,5 и ресуспендировали в 25 мкл MES-буфера. Затем к частицам добавляли по 3 мкг антител против CD11b (Elabscience, USA) или FABP4 (Cloud-Clone Corp., Китай) и инкубировали при комнатной температуре в течение 14 часов при перемешивании. Аликвоты ВВ инкубировали с комплексами антитело-частицы при комнатной температуре в течение 2 часов. Затем их центрифугировали при 600g, 4°C, 15 минут. Фракции и супернатант ВВ после удаления CD11b-позитивных ВВ были лизированы в течение 1,5 часов на льду и подвергнуты обработке ультразвуком. После центрифугирования в течение 15 минут экстракты были нормализованы по белку и использовались для электрофореза по Лемли. После этого белки переносили на PVDF мембрану, окрашивали антителами к CD63, PPAR gamma, перилипину-1 и к FABP4. Далее мембрану инкубировали с системой Affinity ECL (Affinity Biosc., Китай). Визуализацию осуществляли на системе ChemiDoc Touch (Bio-Rad, США). Плотность полос оценивали с помощью программы ImageLab. Результаты стандартизировали по уровню CD63 в ВВ. В качестве стандарта молекулярной массы использовали MagicMark XP Western Protein Standard (Life Technologies, США).

Биоинформационный анализ. Поиск микроРНК проводился по ключевым словам (: radiosensitivity, hyperthermia sensitivity, rectal cancer, colorectal cancer, thermoradiochemotherapy response, radioresistance и др.) в базах данных HMDD 4.0 (Human microRNA Disease Database; Institute of Basic Medical Sciences, Chinese Academy of Medical Sciences, Китай) и mirTarBase (National Cheng Kung University, Тайвань). Из полученных десяти микроРНК выбрали микроРНК-124 и микроРНК-506. Функциональная оценка была выполнена с использованием веб-ресурса DIANA-miRPath v4.0 (University of Thessaly, Греция). Построение сетей взаимодействий микроРНК и белков проводилось в программной среде Cytoscape v3.8.0 (Institute for Systems Biology, США). Интерпретация функций таргетных генов проведена с применением библиотеки PANTHER v8.0 (Protein ANalysis THrough Evolutionary Relationships; National Science Foundation, США), а также по STRING Database (STRING Consortium, Швейцария).

Выделение и количественный анализ микроРНК внеклеточных везикул. Выделение суммарной РНК из ВВ выполняли с использованием коммерческого набора RNA Solo (Евроген, Россия). Протокол выделения модифицировали путем замены стандартного лизис-буфера на буфер собственного состава для повышения эффективности лизиса мембран (125 мМ Tris-HCl, 750 мМ NaCl, 0,5 % SDS, 5 % Triton X-100, pH 7,8). Обработку образцов выполняли в соответствии с протоколом набора RNA Solo. Для амплификации использовали набор OneTube RT-PCR (Евроген, Россия). Детекцию осуществляли с использованием флуоресцентно-меченых олигонуклеотидов. Полученные значения уровня РНК-мишени были нормализованы на микроРНК-16.

Статистическая обработка данных

Результаты исследования были обработаны с помощью специализированного программного обеспечения: STATISTICA 12.0, JASP 0.19.3 и SPSS 28.0.1. Проверка соответствия закону нормального распределения проводилась с помощью критерия Шапиро-Уилка. Были критерии Манна-Уитни и Краскера-Уоллеса для независимых выборок. Для выявления субпопуляций ВВ, изменения которых в динамике TPXT ассоциировались с

непосредственным ответом опухоли на ТРХТ, использовали дискриминантный анализ. Для построения прогностических моделей использовали пошаговую логистическую регрессию. Чувствительность и специфичность моделей оценивалась с помощью ROC-анализа.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ОБСУЖДЕНИЕ

Характеристика FАВР4-позитивных и «истинно-адипоцитарных» ВВ в плазме крови больных с АТК, а также у больных РОК. Выявление наиболее приемлемого маркера для характеристики адипоцитарных ВВ в циркуляции

Выделенные при трансмиссионной электронной микроскопии ВВ визуализировались как округлые мембранные структуры размером не более 220 нм. ВВ экспрессировали CD9, CD81, CD63, CD24. Средняя концентрация циркулирующих ВВ у больных АТК и РОК значимо не отличалась и составила $25,1 \pm 2,33 \times 10^9$ и $24,0 \pm 4,92 \times 10^9$ частиц/мл крови, соответственно. Средний размер везикул у больных АТК составил $95,3 \pm 11,1$ нм, у больных РОК – $96,2 \pm 9,70$ нм (рисунок 2).

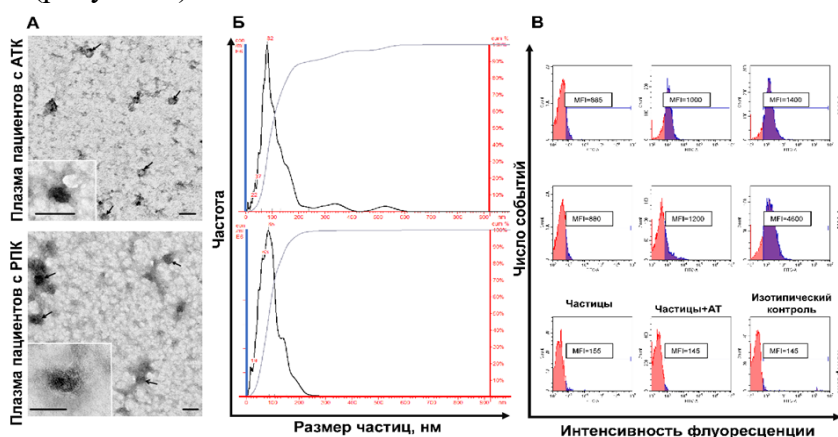


Рисунок 2 – Идентификация изолированных ВВ

Образцы ВВ пяти больных из всех групп были использованы для анализа концентрации, среднего размера везикул и общего белка во фракциях ВВ до иммунопреципитации, в супернатантах после иммунопреципитации на анти-CD11b латексных частицах и после последовательной иммунопреципитации на анти-CD11b и анти-FAVR4 латексных частицах (рисунок 3).

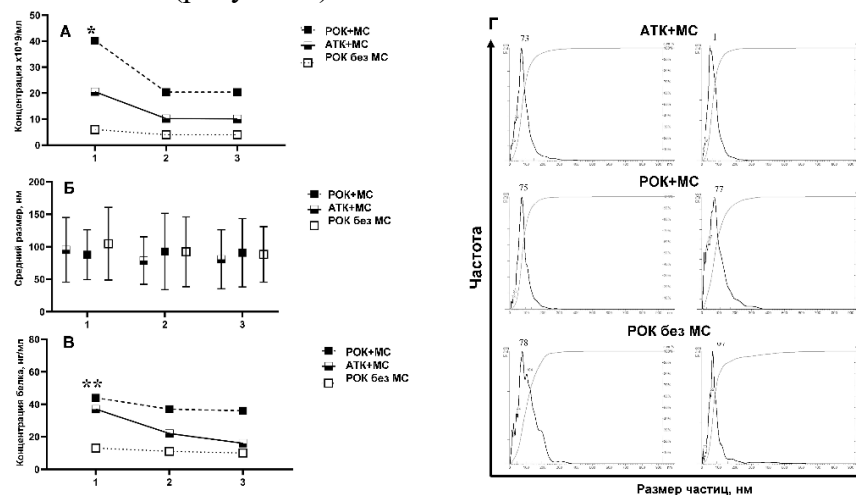


Рисунок 3 – Концентрация, размер ВВ и уровень общего белка во фракциях и супернатанте при иммунопреципитации

Максимальная концентрация ВВ отмечена у больных РОК с метаболическим синдромом. Концентрация ВВ у больных с АТК с метаболическим синдромом практически в 2 раза ниже, а у больных с РОК без метаболических нарушений – в 8 раз ниже по сравнению с больными с РОК с метаболическим синдромом, $p < 0,05$. Во всех группах концентрация ВВ снижалась при удалении ВВ моноцитарно-макрофагального ряда и далее снижалась крайне незначительно после удаления из супернатанта еще и FABP4-позитивных ВВ (иммунопреципитация). Аналогичная динамика выявлена по белку ВВ. После удаления ВВ моноцитарно-макрофагального происхождения фракции по размеру становятся более гомогенными.

Уровни FABP4, перилипина-1 и PPAR- γ во фракциях циркулирующих ВВ у больных с метаболическими нарушениями и без них представлены на рисунке 4.

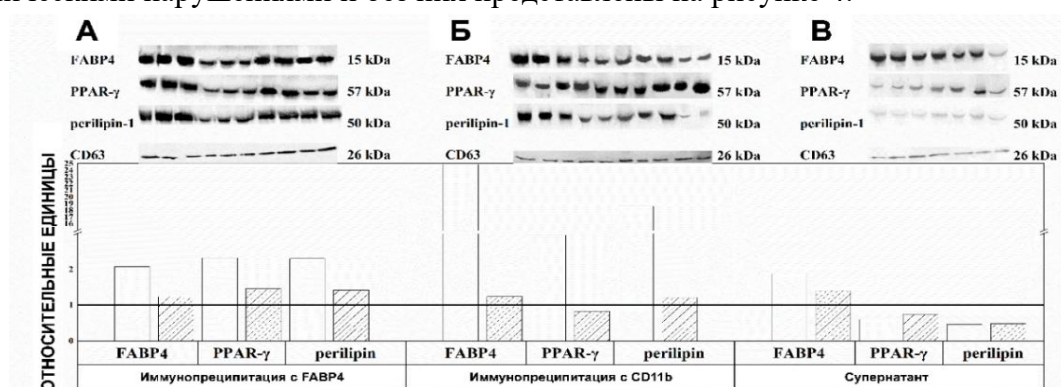


Рисунок 4 – Идентификация изолированных ВВ

Все фракции циркулирующих везикул содержат комплекс адипоцитарных маркеров (FABP4, PPAR- γ и перилипин-1). Преципитированные на CD11b-покрытых частицах ВВ моноцитарно-макрофагального происхождения у больных РОК без ожирения характеризовались гиперэкспрессией FABP4 и перилипина-1. Для больных РОК с метаболическими нарушениями такая гиперэкспрессия была нехарактерна (рисунок 4Б).

«Истинно» адипоцитарные везикулы находятся в препаратах после удаления из них везикул моноцитарно-макрофагального происхождения (рисунок 4В). Эта фракция характеризовалась наличием адипоцитарных маркеров с преимущественной экспрессией в ней FABP4, как у больных с метаболическими нарушениями, так и больных без них.

Уровни матриксных металлопротеиназ (MMPs) и белков теплового шока (HSPs) на CD9-позитивных ВВ и FABP4-позитивных ВВ плазмы крови у больных с АТК и РОК во взаимосвязи с метаболическими нарушениями

Анализ корреляций между поверхностным фенотипом ВВ и метаболическими показателями у больных РОК выявил ряд значимых ассоциаций, отражающих вклад различных субпопуляций ВВ в липидно-метаболическую перестройку организма, особенно на фоне избыточной массы тела (рисунок 5).

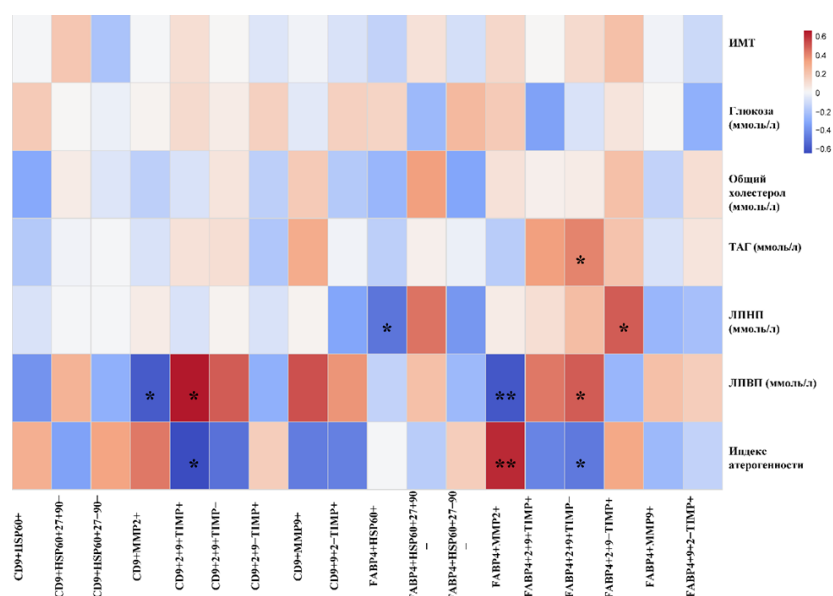


Рисунок 5 – Аннотированная тепловая карта корреляционных связей между метаболическими показателями и экспрессией комбинаций белков на поверхности внеклеточных везикул (ВВ) плазмы крови у больных РОК

Субпопуляции CD9+MMP2+MMP9+TIMP1+ отрицательно коррелировали с уровнем липопротеинов высокой плотности (ЛПВП) и индексом атерогенности. Аналогичная отрицательная корреляция между уровнем CD9+MMP2+ ВВ и концентрацией ЛПВП. Увеличение доли FABP4+HSP60+ ВВ сопровождалось снижением уровня липопротеинов низкой плотности (ЛПНП). Наиболее значимые корреляции ($p < 0,01$) были выявлены для субпопуляции FABP4+MMP2+: положительная связь с индексом атерогенности ($r = +0,6$) и отрицательная - с уровнем ЛПВП ($r = -0,6$). Разнонаправленные связи продемонстрировала субпопуляция FABP4+2+9+TIMP-: отрицательная корреляция с индексом атерогенности и положительные - с ЛПВП и ТАГ. Субпопуляция FABP4+2+9-TIMP+ положительно коррелировала с ЛПНП.

FABP4-ассоциированные ВВ преимущественно связаны с параметрами липидного обмена, формируя атерогенный и воспалительный фенотип при РОК, тогда как CD9-положительные субпопуляции, по-видимому, отражают системный стресс и компенсаторное торможение перестройки внеклеточного матрикса. У больных с АТК с ожирением фенотип ВВ не ассоциировался с возрастом и метаболическими параметрами.

Ассоциированные с адипоцитарными ВВ маркеры повышенного онкологического риска к больным с аденомами толстой кишки с ожирением

Краткая характеристика пациентов с АТК и РОК, включенными в этот раздел исследования представлена в таблице 1.

Таблица 1 – Характеристика больных с АТК и РОК, включенных в исследование для прогнозирования онкологического риска.

Параметры	РОК	АТК	Р
Гистология, n (%)	Аденокарциномы G1-G3, 40 (100 %)	Тубулярные или тубулярно-ворсинчатые аденомы, 20 (100 %)	
Возраст, лет, Mean $\pm$ SD	59,6 $\pm$ 1,61	57,5 $\pm$ 10,55	>0,05
Индекс массы тела, Me (Q1-Q3)	30,7 (25,7; 32,6)	31,1 (28,4; 32,1)	>0,05
Наличие метаболического синдрома, n (%)	12 (30 %)	14 (70 %)	<0,05
Наличие СД2, n (%)	15 (37,5 %)	1 (5 %)	<0,05

Диаграммы размаха экспрессии HSPs и MMPs на поверхности циркулирующих CD9- и FABP4-позитивных ВВ у больных РОК и полипами толстой кишки с метаболическими нарушениями представлены на рисунке 6.

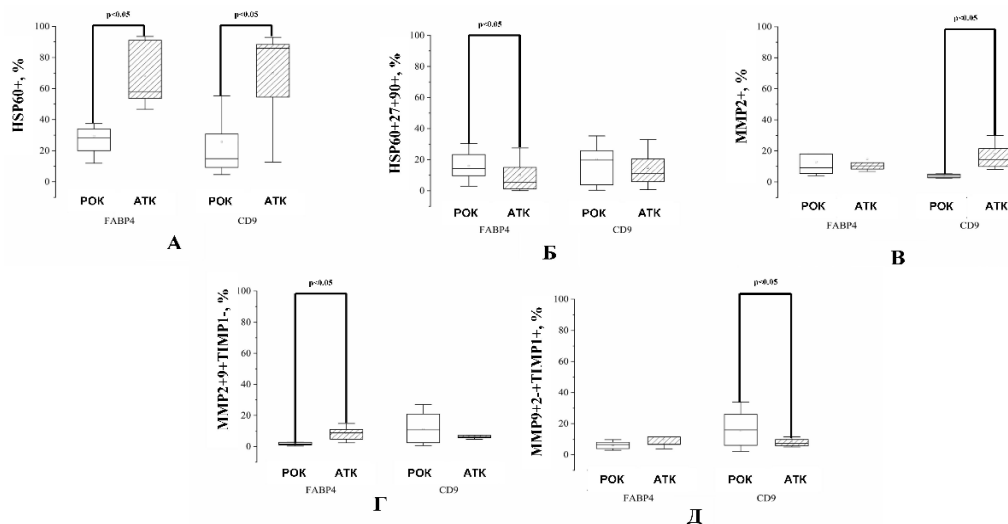


Рисунок 6 – Диаграммы размаха экспрессии HSPs и MMPs на поверхности CD9- и FABP4-позитивных ВВ у пациентов с РОК и АТК

Выявлены статистически значимые различия в экспрессии HSP60 на поверхности как CD9-позитивных, так и FABP4-позитивных ВВ между больными с РОК и АТК, имеющих метаболический синдром. Кроме того, выявлены две популяции CD9-позитивных (MMP2+MMP9-TIMP1+ и MMP2+) ВВ и две популяции FABP4-позитивных (HSP60+HSP27+HSP90- и MMP2+MMP9+TIMP1-) ВВ, уровни которых значимо различались у больных с АТК и РОК.

На основании полученных результатов разработана модель логистической регрессии предсказания онкологического риска.

$$F = 0,34218 * [CD9+HSP60+] - 0,1054 * [CD9+MMP2+] - 0,3088 * [CD9+MMP2+MMP9-TIMP1+] - 1,04413 * [FABP4+HSP60+] - 0,8894 * [FABP4+HSP60+HSP27+HSP90-] - 4,38259 * [FABP4+MMP2+MMP2+TIMP1-] + 71,81,$$

где указанные в квадратных скобках популяции циркулирующих ВВ представлены в процентах. Популяции рассчитаны по данным проточной цитометрии. Значение вероятности отсутствия онкологического риска рассчитывалось с учетом значения регрессионной функции F и основания натурального логарифма (e):

$$P = \frac{1}{1+e^{-F}},$$

где P – вероятность развития полной регрессии опухоли, e (основание натурального логарифма) = 2,718, F – значение регрессионной функции.

При значении $P > 0,5$ предполагают наличие онкологического риска, при значении $P \leq 0,5$ – отсутствие онкологического риска. Оценка чувствительности и специфичности данной модели составила 85,4 % и 79,2 %, соответственно. AUROC модели составил 0,84, доверительный интервал – (0,73-0,92).

Изменения состава циркулирующих ВВ на этапах ТРХТ во взаимосвязи с эффективностью терапии

Краткая характеристика пациентов с РПК, включенными в этот раздел исследования представлена в таблице 2.

Таблица 2 – Характеристика больных РПК, включенных в исследование для прогнозирования оценки эффективности ТРХТ

Параметр		Полная регрессия (n = 2)	Остаточная опухоль (n = 18)	Уровень значимости p
Пол	Мужчины, n (%)	12 (54,5 %)	12 (66,7 %)	0,526
	Женщины, n (%)	10 (45,5 %)	6 (33,3 %)	
Возраст, лет (Mean±SD)		59,4 ± 9,0	63,3 ± 10,1	0,211
ИМТ, кг/м ² (Mean±SD)		27,3 ± 4,7	28,7 ± 5,6	0,404
Сахарный диабет, n (%)		5 (22,7 %)	10 (55,6 %)	0,065
Артериальная гипертензия, n (%)		6 (27,3 %)	10 (55,6 %)	0,106
Степень лечебного патоморфоза	Mandard TRG1	22 (100 %)	0	Не оценивается
	Mandard TRG2/TRG3	0	18 (100 %)	
Степень гистологической дифференцировки опухоли (до лечения)	G1/2	16 (72,7 %)	16 (88,9 %)	0,258
	G3	6 (27,3 %)	2 (11,1 %)	

Был проведен анализ состава ВВ во взаимосвязи с эффективностью ТРХТ. Результаты анализа представлены на рисунке 7.

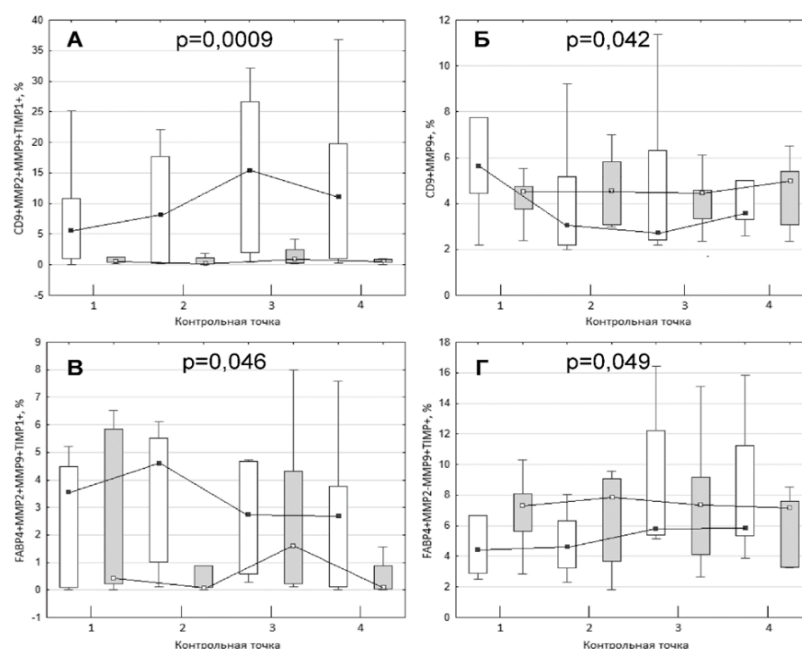


Рисунок 7 - Экспрессия MMPs и TIMP1 на CD9-позитивных (А-Б) и FABP4-позитивных (В-Г) везикулах больных РПК в зависимости от эффективности ТРХТ. Темные боксы – полная регрессия, светлые боксы – остаточная опухоль. По оси у – популяции везикул в %, по оси х – контрольные точки измерения. Р – уровень значимости дискриминантной модели.

Для прогнозирования эффективности ТРХТ был выполнен регрессионный анализ:

Уравнение регрессии имело вид: $F = 0,126 * [\text{ИМТ}] - 1,170 * [\text{CD9+MMP9+}] - 0,387 * [\text{CD9+MMP2+9+TIMP1+}] + 3,041 * [\text{FABP4+MMP2+9+TIMP+}] + 5,689 * [\text{FABP4+MMP2-9+TIMP1+}] - 30,878$, где в качестве переменных в модели используются индекс массы тела, 2 субпопуляции CD9-позитивных и 2 субпопуляции FABP4-позитивных ВВ, содержащие MMPs, значимость вклада динамического изменения которых в исход ТРХТ представлен на рисунке 7. Далее по формуле (1) рассчитывалась Р – вероятность полной клинкоморфологической регрессии опухоли с учетом значения регрессионной функции F. При значении $P \geq 0,5$ предполагают высокую вероятность развития полной регрессии опухоли, при значении $P < 0,5$ – наличие остаточной опухоли. Оценка чувствительности и специфичности данной модели составила 83,3 % и 70 %, соответственно. AUROC модели составил 0,77, доверительный интервал составил (0,65-0,88).

На основании полученных данных была выдвинута оригинальная гипотеза взаимодействий опухоли и жировой ткани при проведении ТРХТ. Локальные виды терапии, такие как радиация и гипертермия, будут приводить к гиперпродукции ВВ с измененным составом. Эти воздействия могут вести к изменению представленности HSPs на поверхности ВВ. Гиперэкспрессия MMP2 и MMP9 после инкубации опухолевых клеток-реципиентов с везикулами от облученных клеток-доноров рассматривается в качестве одного из основных механизмов эффекта свидетеля. Гиперэкспрессия TIMP1, ингибитора MMPs, характерна для адипоцитов. Данные литературы свидетельствуют о наличии изменений в пуле микроРНК в культурах карцином толстого кишечника при гипертермическом или радиационном воздействии. Такие изменения могут отражаться и на пуле микроРНК циркулирующих везикул. CD9 и CD63 являются универсальными маркерами ВВ, в то время как адипоцитарные везикулы представлены преимущественно FABP4+ ВВ. Можно

предположить, что ВВ, продуцируемые облученными клетками опухоли и параректальной клетчаткой могут как непосредственно поглощаться опухолью, так и поступать в кровь и поглощаться адипоцитами и адипоцитарными макрофагами дистанционно. Это может вести к измененной секреции FABP4-позитивных везикул, которые также могут поглощаться опухолью и приводить к ее регрессии (рисунок 8).

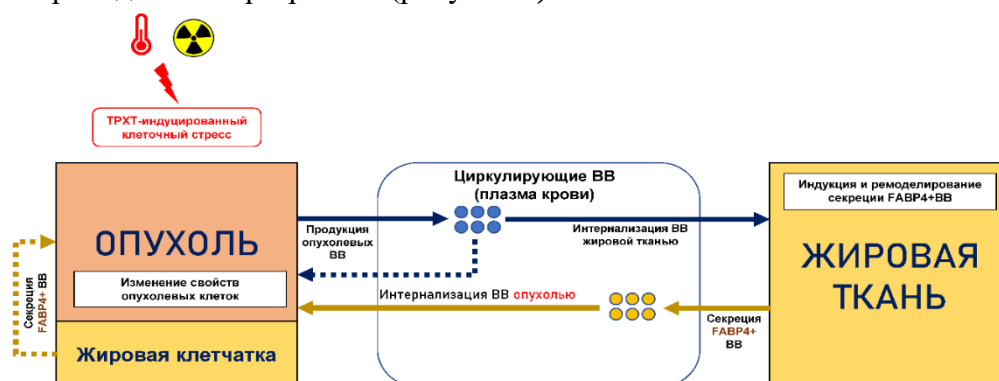


Рисунок 8 – Схема, иллюстрирующая взаимодействие опухоли и жировой ткани с участием ВВ в условиях сочетанного применения радиации и локальной гипертермии

Биоинформатический анализ и последующая идентификация ассоциированных с эффектами ТРХТ микроРНК

Стратегия биоинформатического поиска представлена на рисунке 9.

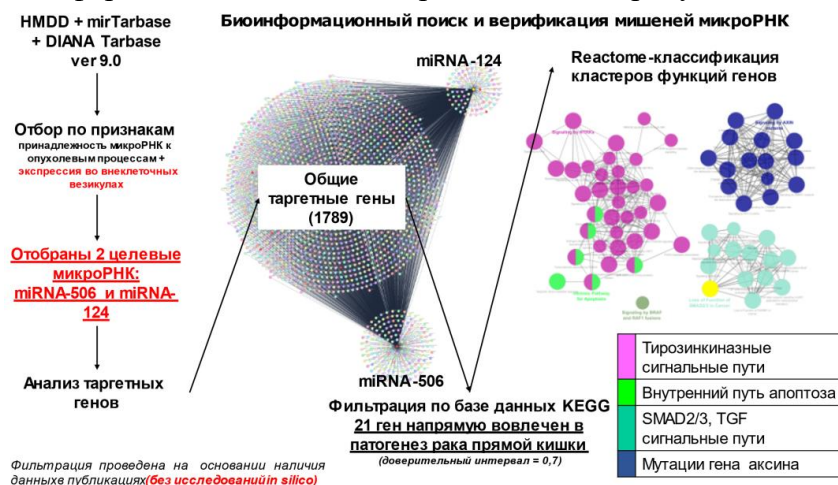


Рисунок 9 – Стратегия биоинформатического поиска и верификации мишеней микроРНК 124 и 506

Из ВВ были выделены и детектированы с помощью ПЦР в реальном времени микроРНК-124 и микроРНК-506. Относительная экспрессия микроРНК-124 во ВВ в динамике ТРХТ имела волнообразный характер ($p = 0,154$). Относительная экспрессия микроРНК-506 в составе ВВ значительно увеличивалась к 3 контрольной точке измерения ($p = 0,006$), оставаясь на таком же уровне в 4 точке (рисунок 10). При этом по данным дискриминантного анализа у пациентов с полной регрессией опухоли после лечения уровень экспрессии везикулярной микроРНК-506 был выше, чем у пациентов с остаточной опухолью ($p = 0,022$).

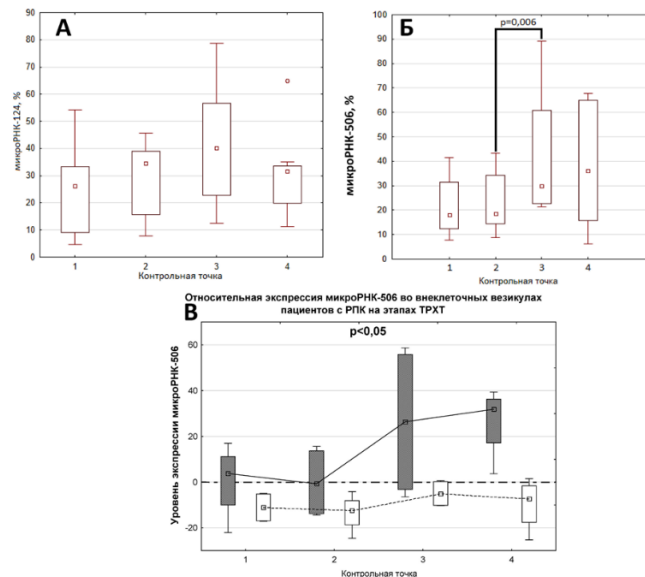


Рисунок 10 – Относительная экспрессия микроРНК-124 и микроРНК-506 в составе ВВ пациентов с РПК на этапах ТРХТ (А и Б). Относительная экспрессия микроРНК-506 во ВВ пациентов с РПК на этапах ТРХТ в зависимости от эффективности лечения (В), темные боксы – полная регрессия, светлые боксы – остаточная опухоль.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Адиipoцитарные внеклеточные везикулы являются важным и, вероятно, ключевым звеном связи между жировой тканью и опухолевыми клетками. Они ассоциированы с наличием метаболических нарушений, как у людей с высоким онкологическим риском рака прямой кишки, так и у людей с уже выявленными новообразованиями. FABP4 является достоверным маркером ВВ адиipoцитарного происхождения, в связи с чем выявление именно FABP4-позитивных субпопуляций представляется наиболее оптимальным для пациентов с метаболическими нарушениями. Стоит отметить, что прогностическую ценность имеет как определение белковых субпопуляций таких ВВ, так и анализ относительной экспрессии везикулярной микроРНК-506. Прогностический потенциал FABP4-позитивных ВВ подтверждается неоднократно выявленными статистически значимыми изменениями, как при анализе онкологического риска у пациентов с АТК, так и при определении динамических изменений везикулярных параметров у больных с РПК на этапах проведения ТРХТ. Продемонстрированы удовлетворительные прогностические характеристики адиipoцитарных везикул при построении прогностической модели эффективности ТРХТ.

ВЫВОДЫ

1. Для везикул адиipoцитарного происхождения, полученных от пациентов с РОК как с метаболическими нарушениями, так и без, а также для больных с АТК с ожирением характерна совместная экспрессия всех трех адиipoцитарных маркеров (перилипина-1, FABP4, PPAR- γ) с преимущественной экспрессией FABP4. Везикулы моноцитарно-макрофагального происхождения у больных РОК без метаболических нарушений характеризуются гиперэкспрессией FABP4 и перилипина-1, тогда как для больных РОК с метаболическим синдромом или ожирением такая гиперэкспрессия нехарактерна.
2. Уровни HSPs и MMPs на поверхности CD9-позитивных и FABP4-позитивных внеклеточных везикул плазмы крови у больных РОК с метаболическими нарушениями

ассоциированы с уровнями ЛПНП, ЛПВП и индексом атерогенности. Наиболее значимые корреляции наблюдались для FABP4+MMP2+ ВВ с ЛПВП ($r = -0,6$, $p < 0,01$) и индексом атерогенности ($r = 0,6$, $p < 0,01$).

3. Установлено, что субпопуляции CD9+HSP60+, CD9+MMP2+, CD9+2+9-TIMP+, FABP4+HSP60+ ВВ ассоциированы с повышенным риском злокачественной трансформации у больных с АТК. Разработан вариант математической модели, учитывающий эти субпопуляции в прогнозировании онкологического риска у больных с АТК, клинические признаки в модель не вошли. Чувствительность модели составила 85,4 %, специфичность составила 79,2 %.

4. Анализ уровней HSPs и MMPs на CD9-позитивных везикулах не выявил статистически значимых изменений при проведении ТРХТ у больных с РПК. Среди FABP4-позитивных везикул уровни FABP4+HSP60+, FABP4+HSP60+27+90-, FABP4+HSP60+27-90- и FABP4+MMP2+9-TIMP1+ субпопуляций значимо изменялись при проведении терапии ($p = 0,006$, $p = 0,005$, $p = 0,005$, $p = 0,022$, соответственно).

5. Относительная экспрессия микроРНК-506 связана с эффективностью ТРХТ у пациентов с РПК. У больных РПК с полной регрессией опухоли уровень везикулярной микроРНК-506 был выше, чем у пациентов с остаточной опухолью ($p = 0,022$).

6. Анализ циркулирующих внеклеточных везикул до лечения показал статистически значимые связи между уровнями их субпопуляций и эффективностью ТРХТ как для общего пула (CD9+MMP2+MMP9+TIMP1+ ($p = 0,0009$), CD9+MMP9+ ($p = 0,042$), так и для везикул адипоцитарного происхождения (FABP4+MMP2+MMP9+TIMP1+ ($p = 0,046$), FABP4+MMP2-MMP9+TIMP1 ($p = 0,049$).

7. Разработана математическая модель прогнозирования эффективности ТРХТ у больных РПК с метаболическими нарушениями на основе анализа фенотипов циркулирующих ВВ и клинико-морфологических характеристик. Значимыми предикторами эффективности ТРХТ у больных РПК явились субпопуляции как CD9-позитивных, так и FABP4-позитивных ВВ, а также индекс массы тела. Чувствительность модели составила 83,3 %, специфичность составила 70 %.

ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

1. Для детекции фракции «истинно» адипоцитарных ВВ в исследовательских или лабораторных целях у больных РОК без метаболических нарушений из общего препаратов везикул необходимо удалить методом иммунопреципитации фракцию CD11b+везикул моноцитарно-макрофагального происхождения, а в супернатанте можно изучать их состав с помощью набора маркеров FABP4, перилипин-1, PPAR- γ . У больных РОК и АПК с метаболическими нарушениями с учетом незначительного объема CD11b+ везикул в пуле FABP4+ВВ для детекции «истинно» адипоцитарных ВВ иммунопреципитация не требуется.
2. Для прогнозирования онкологического риска у больных АТК целесообразно использовать разработанную математическую модель: $F = 0,34218 * [CD9+HSP60+] - 0,1054 * [CD9+MMP2+] - 0,3088 * [CD9+MMP2+MMP9-TIMP1+] - 1,04413 * [FABP4+HSP60+] - 0,8894 * [FABP4+HSP60+HSP27+HSP90-] - 4,38259 * [FABP4+MMP2+MMP2+TIMP1-] + 71,81$. Далее по формуле рассчитывается Р – вероятность полной клинико-морфологической регрессии опухоли с учетом значения регрессионной функции. $P = \frac{1}{1+e^{-F}}$,

где P – вероятность развития полной регрессии опухоли, e (основание натурального логарифма) = 2,718, F – значение регрессионной функции. При значении $P > 0,5$ предполагают наличие онкологического риска, при значении $P \leq 0,5$ – отсутствие онкологического риска.

3. Для прогнозирования эффективности ТРХТ у больных РПК целесообразно использовать разработанную математическую модель, представленную регрессионной функцией: $F = 0,126 * [\text{ИМТ}] - 1,170 * [\text{CD9+MMP9+}] - 0,387 * [\text{CD9+MMP2+9+TIMP1+}] + 3,041 * [\text{FABP4+MMP2+9+TIMP+}] + 5,689 * [\text{FABP4+MMP2-9+TIMP1+}] - 30,878$. Далее по формуле рассчитывается P – вероятность полной клинико-морфологической регрессии опухоли с учетом значения регрессионной функции. $P = \frac{1}{1+e^{-F}}$,

где P – вероятность развития полной регрессии опухоли, e (основание натурального логарифма) = 2,718, F – значение регрессионной функции. При значении $P \geq 0,5$ предполагают высокую вероятность развития полной регрессии опухоли, при значении $P < 0,5$ – вероятность выявления остаточной опухоли.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ

- АТК – аденомы толстой кишки
 ВВ – внеклеточные везикулы
 КРР – колоректальный рак
 МРТ – магнитно-резонансная томография
 РПК – рак прямой кишки
 РОК – рак ободочной кишки
 СД2 – сахарный диабет второго типа
 ТРХТ – терморадиксимиотерапия
 ХС ЛПВП – холестерин липопротеидов высокой плотности
 ХС ЛПНП – холестерин липопротеидов низкой плотности
 CD9, CD63, CD81 – мажорные белки везикул, тетраспанины
 FABP4 – fatty acid binding protein 4; белок, связывающий жирные кислоты 4
 IDF – International Diabet Federation
 HSPs – белки теплового шока
 MMPs – матриксные металлопротеиназы
 NTA – nanoparticle tracking analysis, анализ траектории наночастиц
 PPAR- γ – рецепторы, активируемые пероксисомными пролифераторами, группа рецепторов клеточного ядра, функционирующих в качестве фактора транскрипции, один из адипоцитарных маркеров
 XELOX – схема химиотерапии, включающая кальция фолинат, фторурацил и оксалиплатин

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. Yunusova, N. V. Extracellular Vesicles as a Platform for Predicting Cancer Risk in Patients with Adenomas and Polyps of the Colon with Obesity [Text] / N. V. Yunusova, **D. A. Svarovsky**, O. V. Cheremisina [et al.] // Asian Pacific Journal of Cancer Prevention. – 2025. – Vol. 26, № 9. – P. 3431–3439.

2. Юнусова, Н. В. Концентрация и состав циркулирующих адипоцитарных везикул у больных с полипами толстой кишки и колоректальным раком [Текст] / Н. В. Юнусова, **Д. А. Сваровский**, Е. С. Колегова [и др.] // Журнал эволюционной биохимии и физиологии. – 2024. – Т. 60, № 4. – С. 403–410.
3. Yunusova, N. V. Concentration and Composition of Circulating Adipocyte-Derived Extracellular Vesicles in Patients with Colonic Polyps and Colorectal Cancer [Text] / N. V. Yunusova, **D. A. Svarovsky**, E. S. Kolegova [et al.] // Journal of Evolutionary Biochemistry and Physiology. – 2024. – Vol. 60, № 4. – P. 403–410. – DOI: 10.31857/S0044452924040078.
4. Юнусова, Н. В. Связь белков экзосом с эффективностью терморadioхимиотерапии у больных с избыточной массой тела и раком прямой кишки: пилотное проспективное когортное исследование [Текст] / Н. В. Юнусова, **Д. А. Сваровский**, А. И. Коновалов [и др.] // Альманах клинической медицины. – 2024. – Т. 52, № 2. – С. 66–76.
5. Юнусова, Н. В. Молекулярные механизмы противоопухолевого эффекта терморadioтерапии у больных злокачественными новообразованиями с метаболическими нарушениями [Текст] / Н. В. Юнусова, **Д. А. Сваровский**, А. И. Коновалов [и др.] // Вопросы онкологии. – 2023. – Т. 69, № 3. – С. 373–382.
6. Yunusova, N. V. The Composition of Small Extracellular Vesicles (sEVs) in the Blood Plasma of Colorectal Cancer Patients Reflects the Presence of Metabolic Syndrome and Correlates with Angiogenesis and the Effectiveness of Thermoradiation Therapy [Text] / N. V. Yunusova, **D. A. Svarovsky**, A. I. Konovalov [et al.] // Journal of Personalized Medicine. – 2023. – Vol. 13, № 4. – P. 684.
7. Юнусова, Н. В. Матриксные металлопротеиназы и белки теплового шока на внеклеточных везикулах у больных колоректальным раком: связь с метаболическим статусом [Текст] / Н. В. Юнусова, **Д. А. Сваровский**, Е. Э. Дандарова [и др.] // Успехи молекулярной онкологии. – 2022. – Т. 9, № 3. – С. 38–48.
8. Юнусова, Н. В. Адипоцитарные внеклеточные везикулы у больных полипами и раком толстой кишки: концентрация, состав и экспрессионные характеристики [Текст] / Н. В. Юнусова, **Д. А. Сваровский**, И. В. Кондакова [и др.] // Биохимия человека: материалы Всероссийской конференции с международным участием, 17–19 октября 2024 г. / под общ. ред. В. С. Покровского. – Москва: Е-нот, 2024. – С. 267.
9. **Сваровский, Д. А.** Внеклеточные везикулы как платформа для прогнозирования эффективности терморadioхимиотерапии у больных раком прямой кишки [Текст] / **Д. А. Сваровский**, Н. В. Юнусова, П. А. Панфилова, Ж. А. Старцева, В. В. Великая // Генетические технологии в трансляционной биомедицине : сборник материалов III Международной конференции, Томск, 3–5 июня 2025 г. / под ред. Ю. Г. Кжышковска. – Томск : Изд-во СибГМУ, 2025. – С. 44.
10. **Сваровский, Д. А.** Связь белков внеклеточных везикул с эффективностью терморadioхимиотерапии у больных раком прямой кишки с метаболическим синдромом [Текст] / **Д. А. Сваровский** // Всероссийский молодежный фестиваль «Трамплин в науку»: сборник статей студенческой научно-практической конференции, Красноярск, 15–27 мая 2024 г. / ред. П. А. Шестерня, О. А. Белова, Д. С. Толстихина [и др.]. – Красноярск: Тип. КрасГМУ, 2024. – С. 266.
11. **Сваровский, Д. А.** Матриксные металлопротеиназы и белки теплового шока экзосомального происхождения в оценке эффективности терморadioтерапии у больных раком прямой кишки [Текст] / **Д. А. Сваровский**, П. О. Новожилова, В. Г. Лобсанов, И.

А. Узянбаев // Санкт-Петербургские научные чтения – 2022: сборник тезисов IX Международного молодежного медицинского конгресса, Санкт-Петербург, 07–09 декабря 2022 г. – Санкт-Петербург : Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет им. акад. И. П. Павлова, 2022. – С. 190–191.

Патенты РФ

1. Патент № 2845129 С1 Российская Федерация, МПК G01N 33/574. Способ прогнозирования эффективности терморadioхимиотерапии у больных раком прямой кишки / Н. В. Юнусова, Д. А. Сваровский, А. И. Коновалов, Е. Е. Середа, Г. В. Какурина, Л. В. Спирина ; заявитель Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Томский национальный исследовательский медицинский центр Российской академии наук». – № 2024125401 : заявл. 29.08.2024 : опубл. 13.03.2025.