

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ НАУЧНОЕ  
УЧРЕЖДЕНИЕ «ТОМСКИЙ НАЦИОНАЛЬНЫЙ ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ  
МЕДИЦИНСКИЙ ЦЕНТР РОССИЙСКОЙ АКАДЕМИИ НАУК»

*На правах рукописи*



Сваровский Дмитрий Андреевич

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

3.1.6. Онкология, лучевая терапия

Диссертация на соискание ученой степени  
кандидата медицинских наук

Научный руководитель:  
доктор медицинских наук, доцент,  
Наталья Валерьевна Юнусова

Томск – 2026

## ОГЛАВЛЕНИЕ

|                                                                                                                                                                                        |    |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| ВВЕДЕНИЕ .....                                                                                                                                                                         | 5  |
| ГЛАВА 1 ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ .....                                                                                                                                                         | 18 |
| 1.1 Проблема идентификации циркулирующих ВВ адипоцитарного происхождения. Поиск наиболее оптимального адипоцитарного маркера                                                           | 18 |
| 1.2 Взаимосвязь состава циркулирующих ВВ с характером метаболических нарушений в условиях инсулинорезистентности, ожирения и злокачественного роста.....                               | 19 |
| 1.3 Возможность использования адипоцитарных внеклеточных везикул для прогнозирования онкологического риска у больных с предраковыми заболеваниями толстой кишки.....                   | 21 |
| 1.4 Особенности противоопухолевого эффекта сочетанного применения локальной гипертермии и радиотерапии у больных злокачественными новообразованиями с метаболическими нарушениями..... | 24 |
| 1.4.1 Особенности системы репарации ДНК в опухоли при ожирении                                                                                                                         | 24 |
| 1.4.2 Значение стволовых клеток жировой ткани в модификации терморадитерапии.....                                                                                                      | 27 |
| 1.4.3 Секретируемые жировой тканью гормоны как модификаторы эффективности терморадитерапии .....                                                                                       | 28 |
| 1.4.4 Состав циркулирующих внеклеточных везикул: связь с ответом опухоли на локальную гипертермию и терморадитерапию.....                                                              | 29 |
| 1.4.5 Воспалительное опухолевое окружение на фоне метаболических изменений: связь с эффектами терморадитерапии.....                                                                    | 33 |
| 1.5 Роль ионизирующего излучения и гипертермии как модулирующего фактора секреции ВВ.....                                                                                              | 34 |
| 1.6 Современные подходы к лечению больных с РПК ниже- и среднеампулярного отдела: поиск эффективных предикторов эффективности терморадитерапии.....                                    | 36 |
| ГЛАВА 2 МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ .....                                                                                                                                          | 38 |
| 2.1 Материал исследования.....                                                                                                                                                         | 38 |

|                                                                                                                                                                                                                                                 |    |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| 2.1.1 Описание клинических групп.....                                                                                                                                                                                                           | 38 |
| 2.1.2 Критерии метаболического синдрома и метаболически.....                                                                                                                                                                                    | 42 |
| здорового ожирения.....                                                                                                                                                                                                                         | 42 |
| 2.2 Методы исследования.....                                                                                                                                                                                                                    | 43 |
| 2.2.1 Выделение внеклеточных везикул.....                                                                                                                                                                                                       | 43 |
| 2.2.2 Типирование внеклеточных везикул.....                                                                                                                                                                                                     | 44 |
| 2.2.3 Оценка белка внеклеточных везикул.....                                                                                                                                                                                                    | 45 |
| 2.2.4 Анализ HSPs и MMPs на поверхности CD9 и FABP4 везикул<br>методом проточной цитофлуориметрии.....                                                                                                                                          | 45 |
| 2.2.5 Иммунопреципитация и Вестерн-блоттинг.....                                                                                                                                                                                                | 46 |
| 2.2.6 Выделение и количественный анализ микроРНК.....                                                                                                                                                                                           | 47 |
| внеклеточных везикул.....                                                                                                                                                                                                                       | 47 |
| 2.2.7 Биоинформационный анализ.....                                                                                                                                                                                                             | 50 |
| 2.2.8 Статистическая обработка данных.....                                                                                                                                                                                                      | 51 |
| ГЛАВА 3 РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ.....                                                                                                                                                                                                            | 53 |
| 3.1 Характеристика FABP4-позитивных и «истинно-адипоцитарных» ВВ<br>в плазме крови больных с аденомами толстой кишки, а также у больных<br>РОК. Выявление наиболее приемлемого маркера для характеристики<br>адипоцитарных ВВ в циркуляции..... | 53 |
| 3.2 Уровень матриксных металлопротеиназ (MMPs) и белков теплового<br>шока (HSPs) на CD9-позитивных ВВ и FABP4-позитивных ВВ плазмы<br>крови у больных с АТК и РОК во взаимосвязи с метаболическими<br>нарушениями.....                          | 58 |
| 3.3 Ассоциированные с адипоцитарными ВВ маркеры повышенного<br>онкологического риска у больных с аденомами толстой кишки<br>с ожирением.....                                                                                                    | 62 |
| 3.4 Состав CD9-позитивных и FABP4-позитивных циркулирующих ВВ на<br>этапах комбинированного лечения с термохимиорадикотерапией.....                                                                                                             | 66 |
| 3.4.1 Изменение фенотипа циркулирующих ВВ в процессе проведения<br>ТРХТ.....                                                                                                                                                                    | 66 |

|                                                                                                                                                                                           |    |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| 3.4.2 Изменения состава циркулирующих ВВ на этапах ТРХТ во взаимосвязи с эффективностью терапии.....                                                                                      | 68 |
| 3.4.3 Биоинформатический поиск ассоциированных с термо- и радиочувствительностью микроРНК.....                                                                                            | 69 |
| 3.4.4 Экспрессия микроРНК-124 и микроРНК-506 в составе ВВ плазмы крови у больных РПК с ожирением на этапах терморadioхимиотерапии.....                                                    | 71 |
| 3.4.5 Построение математической модели для прогнозирования эффективности терморadioхимиотерапии у больных раком прямой кишки с оценкой показателей чувствительности и специфичности ..... | 72 |
| ГЛАВА 4 ОБСУЖДЕНИЕ СОБСТВЕННЫХ РЕЗУЛЬТАТОВ                                                                                                                                                |    |
| ИССЛЕДОВАНИЯ.....                                                                                                                                                                         | 75 |
| ЗАКЛЮЧЕНИЕ .....                                                                                                                                                                          | 84 |
| ВЫВОДЫ.....                                                                                                                                                                               | 85 |
| ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ.....                                                                                                                                                            | 87 |
| СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ.....                                                                                                                                                                    | 89 |
| СПИСОК ИСПОЛЬЗУЕМОЙ ЛИТЕРАТУРЫ .....                                                                                                                                                      | 91 |

## **ВВЕДЕНИЕ**

### **Актуальность исследования**

Циркулирующие внеклеточные везикулы (ВВ) являются важными участниками формирования микроокружения опухоли путем (а) модуляции воспалительного ответа в опухоли, (б) влияния на дифференцировку фибробластов и мезенхимных клеток в миофибробласты, (в) запуск ангиогенного процесса и (г) стимулирования эпителиально-мезенхимальной трансформации, (д) формирования опухолевых преметастатических ниш. Следовательно, понимание везикул-опосредованной передачи сигналов между опухолью и их микроокружением и выявление факторов, влияющих на такую связь, является критическим для улучшения эффективности противоопухолевой терапии.

У большинства больных КРР, в том числе и у больных раком прямой кишки, опухоль развивается на фоне метаболически здорового ожирения или метаболического синдрома (более чем у 60% больных), ключевым патогенетическим моментом которого является развивающаяся гиперинсулинемия [103]. Метаболические изменения также характерны для больных с полипами толстой кишки (ПТК), которые, в настоящее время рассматриваются как наиболее значимые предраковые заболевания. Это в целом обусловило необходимость выявления как факторов прогноза онкологического риска у больных с полипами с ожирением, так и необходимость иметь клинически доступные маркеры, предикторы эффективности терморадииотерапии/химолучевого 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 в жировой ткани иммунных клеток макрофаги являются наиболее распространенным

типом клеток, их концентрация в жировой ткани может достигать 50% от общего числа клеток [86]. Кандидатные маркеры везикул адипоцитарного происхождения (PPAR- $\gamma$ , FABP4, PREF-1, перилипипин-1, адипонектин) не являются строго специфичными для клеток жировой ткани, синтезируются также некоторыми иммунными клетками, в том числе макрофагами [31, 53]. Кроме того, в исследовании DeClercq V. et al. (2015) было показано, что адипонектин в экзосомах составляет лишь небольшую часть от общего количества адипонектина, секретируемого адипоцитами 3T3-L1, и, поэтому, не может быть надежным маркером ВВ плазмы [42]. FABP4 является популярным и часто используемым маркером ВВ адипоцитарного происхождения, имеющим определенные преимущества перед другими кандидатными маркерами, а именно: высокая концентрация маркера на поверхности ВВ, известный механизм секреции маркера в составе ВВ [7, 16, 30].

На клеточных культурах показано, что фракции малых ВВ (экзосом) адипоцитарного происхождения специфически обогащены белками внеклеточного матрикса (включая MMPs), шаперонами, а также некоторыми метаболическими ферментами, участвующими в синтезе липидов и углеводов, что и послужило причиной выбора везикулярных маркеров в текущей работе [28]. Адипоциты продуцируют MMP-2 и MMP-9, которые играют значительную роль в адипогенезе, ангиогенезе и ремоделировании внеклеточного матрикса, что, безусловно, может ускорить метастатический каскад [8, 28].

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). Общий уровень экзосомального белка размер и zeta-потенциал экзосом от облученных клеток возрастал ( $p < 0.05$ ) по сравнению с необлученными клетками [69]. Наиболее полную картину изменения протеинового ансамбля ВВ опухолевых клеток после воздействия

ионизирующего излучения дают протеомные исследования. Из наиболее сверхэкспрессируемых везикулярных белков из облученных клеток (клеточные культуры HPV-негативного плоскоклеточного рака головы и шеи (HNSCC) – FaDu) были отмечены белки, вовлеченные в процессы транскрипции, трансляции, клеточного деления, фолдинг белков (шапероны), белки протеасомного комплекса. Присутствие факторов транскрипции/трансляции/фолдинга и убиквитин-зависимой деградации белков в грузе экзосом, секретируемых из облученных клеток, может отражать динамическую адаптацию клеток к условиям, вызванным стрессом. Возможно, через секрецию ВВ клетки пытаются удалить избыточные/ненужные компоненты [70].

Определенная противоопухолевая активность экзосом, происходящих от опухолевых и неопухолевых клеток, подвергшихся гипертермии, гипертермии в сочетании с химиотерапией показана во многих исследованиях, однако большинство исследований носят экспериментальный характер. Механизмы такой активности изучены достаточно плохо [29, 59, 66, 67]. 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 и т.д. [29, 59, 67].

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 [34, 81, 94, 98]. 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 терморадитерапией, а также в качестве предикторов этого вида лечения не изучалась.

В механизмах, как радиорезистентности, так и эффективности радиотерапии и гипертермии обсуждают роль внеклеточных, везикулярных и мембранных форм белков теплового шока, которые представлены членами высококонсервативного семейства HSPs (HSP90, HSP70, HSP60, HSP27, кристаллином и др.) х. ВВ несут HSPs, причем как на поверхности везикул, так и внутри. Физиологическое значение везикулярных форм HSPs недостаточно понятно. Показано, что HSPs на поверхности ВВ могут распознаваться CD91+опухолевыми клетками, CD91+фибробластами, CD94+цитолитическими иммунными клетками, обсуждается как иммуностимулирующая, так и иммуносупрессивная роль экстраклеточных HSPs [101]. 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 [50]. 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 [2]. Таким образом, HSPs-содержащие циркулирующие ВВ (как тотальный пул, так и опухолевые ВВ) достаточно перспективны как предикторы эффективности терморадитерапии.

В ряде исследований было показано, что в результате предоперационной химиолучевой терапии с использованием фторпиримидинов у 50-60 % больных отмечается уменьшение опухолевого

процесса, в 8-030 % случаев подтверждается полный патоморфологический ответ опухоли на проводимую терапию [51, 63, 87]. Несмотря на определенные достижения в лечении РПК, в результате курса предоперационной химиорадитерапии было выявлено повышение частоты поздних лучевых осложнений, а именно, было зарегистрировано достоверное увеличение частоты анальной инконтиненции и сексуальных дисфункций, которые существенно снижали качество жизни больных РПК [23, 65]. В связи с этим в настоящее время разрабатываются и апробируются режимы лечения с использованием только предоперационной химиотерапии, без применения лучевого компонента [83]. В связи с чем, поиск доступных молекулярных маркеров – предикторов термoxимиорадитерапии – 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 ПТК с метаболическими нарушениями.

### **Степень разработанности темы исследования**

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 [73]. 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 [85].

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 [32]. 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 терморадиксимиотерапии у больных раком прямой кишки с ожирением.

### **Задачи исследования**

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 везикулах 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 терморадиеохимиотерапии в динамике.

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

6. Выявить везикулярные предикторы эффективности терморадиеохимиотерапии у больных РПК 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 исследования**

Результаты исследования углубляют фундаментальные знания о содержании и функциях адипоцитарных внеклеточных везикул в крови онкологических больных. Показана принципиальная зависимость профиля 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 термолучевого воздействия, что расширяет фундаментальные представления о реакциях опухоли и ее окружения (жировая ткань) на терапию.

### **Практическая значимость исследования**

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 терморadioхимиотерапии 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 идентификации «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), на заседании Областного научно-практического общества онкологов, (Томск, 2024).

### **Публикации материалов исследования**

По теме диссертации опубликовано 11 печатных 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 в практику**

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, семи глав (введения, обзора литературы, материалов и методов исследования, результатов исследования, обсуждения собственных результатов исследования, заключения и выводов), заключения, выводов, практических рекомендаций, списка условных сокращений и списка использованной литературы, включающего 104 источника, из них 3 отечественных и 101 иностранных. Работа содержит 10 таблиц и 12 рисунков.

## ГЛАВА 1 ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

### 1.1 Проблема идентификации циркулирующих ВВ адипоцитарного происхождения. Поиск наиболее оптимального адипоцитарного маркера

У большинства больных колоректальным раком (КРР) опухоль развивается на фоне так называемого “метаболически здорового ожирения” или метаболического синдрома (более чем у 70 больных), ключевым патогенетическим моментом которого является гиперинсулинемия. Сходные метаболические изменения также характерны для больных с полипами толстой кишки, а в случае развития полипов или ворсинчатых аденом толстой кишки такие гистологические находки однозначно трактуются как предраковые изменения [4]. Внеклеточные везикулы (ВВ) представляют собой крайне гетерогенную популяцию мембранных частиц размером менее 1 мкм, секретируемую различными типами клеток. Большинство циркулирующих в крови человека ВВ являются частицами тромбоцитарного, лейкоцитарного, эритроцитарного и эндотелиального происхождения. Доказательства наличия в циркуляции ВВ адипоцитарного происхождения в крайне незначительном количестве у практически здоровых людей представлены в работах С. D. Connolly et al. (2018) и С. М. Gustafson [16, 47], и такие везикулы являются минорным компонентом везикул крови. Состав циркулирующих адипоцитарных ВВ при различных патологических состояниях практически не изучен, а большинство работ выполнены на моделях *in vitro* [47]. Везикулы различного состава могут секретироваться как адипоцитами, так и стромальными клетками жировой ткани, причем состав стромы жировой ткани у людей также достаточно вариабелен.

Предлагаемые кандидаты-маркеры везикул адипоцитарного происхождения ( $\gamma$ -рецепторы, активируемые пролифераторами пероксисом (PPAR- $\gamma$ ), белок, связывающий жирные кислоты 4 (FABP4), преадипоцитарный секреторный фактор (PREF1) и перилипин-1 не являются

строго специфичными для клеток жировой ткани, синтезируются также некоторыми иммунными клетками, в том числе макрофагами жировой ткани [31, 42, 47, 53], а использование вышеперечисленных маркеров позволяет обычно выделить смешанную фракцию адипоцитарных и моноцитарно-макрофагальных ВВ.

Фракции малых ВВ адипоцитарного происхождения специфически обогащены белками внеклеточного матрикса, включая матриксные металлопротеиназы (MMPs), шапероны, ферменты, участвующие в синтезе липидов и углеводов [90], что послужило причиной выбора везикулярных маркеров, перспективных для прогнозирования онкологического риска у больных АТК с метаболическими нарушениями, а также для прогнозирования эффективности ТРХТ у больных РПК с ожирением.

## **1.2 Взаимосвязь состава циркулирующих ВВ с характером метаболических нарушений в условиях инсулинорезистентности, ожирения и злокачественного роста**

Хотя свойства ВВ адипоцитарного происхождения стимулировать инсулинорезистентность при со-культивировании с различными клетками представлены в литературе [9, 11-13, 15], данные о количестве, составе и функциональной активности ВВ в контексте сахарного диабета второго типа и ожирения, развивающегося на фоне инсулинорезистентности, ограничены. При сравнении концентрации циркулирующих ВВ в группах больных с СД2, пациентов с нарушением толерантности к глюкозе и у эугликемических пациентов выявлена значительно более высокая концентрация ВВ у лиц с диабетом по сравнению с людьми с эугликемией ( $p = 0,022$ ) [18]. У пациентов с диабетом обнаружены значительно более высокие уровни эритроцитарных ВВ, а также тенденция к повышению CD68-положительных (лейкоцитарных) и CD62p-положительных, продуцируемых тромбоцитам/эндотелиальными клетками ВВ. Уровни ВВ эндотелиального

происхождения были сопоставимы между больными с диабетом и эугликемическими пациентами [18]. Другие данные свидетельствуют об относительном увеличении доли ВВ эндотелиального происхождения в циркуляции у больных с диабетом и инсулинорезистентностью [45].

Ранее было показано, что плохой метаболический контроль у пациентов с СД2 ассоциируется с более высоким уровнем ВВ тромбоцитарного происхождения по сравнению с пациентами, имеющими нормальный уровень гликированного гемоглобина A1 [88]. Кроме того, уровень циркулирующих ВВ тромбоцитарного происхождения коррелировал с уровнем IL-6 в плазме крови, что также свидетельствует о связи чрезмерного выхода этих везикул из тромбоцитов с воспалением [88]. В циркулирующих ВВ идентифицировано большое количество белков, участвующих в реализации инсулинового каскада в клетках, а именно фосфо-p70S6K, рибосомальный белок фосфо-S6RP, фосфо-GSK3b, фосфо-Akt, активированный рецептор инсулина (phospho-IR), активированный субстрат инсулинового рецептора фосфо-IRS1, активированный рецептор инсулинопобного фактора роста I типа (фосфо-IGF-1R [Tyr]), рецептор лептина и фактор роста фибробластов. Уровень лептинового рецептора и phospho-IR в циркулирующих ВВ был снижен у лиц с диабетом. Кроме того, индексы инсулинорезистентности HOMA-B и HOMA-IR были связаны с концентрацией ВВ и белками инсулинового каскада в ВВ, а именно: высокий уровень HOMA-IR был связан с более низким уровнем фосфо-S6RP и высоким уровнем FGF21. Полученные результаты свидетельствуют, что состав ВВ отражает различные компоненты диабета как на уровне сигнальных молекул, так и на системном уровне (инсулинорезистентность) [18]. В модели инсулинорезистентности *in vitro* на первичных нейрональных клетках, праймированных инсулином в течение 48 ч, а затем подвергшихся воздействию высоких доз инсулина, показано, что инсулинорезистентность значительно стимулирует секрецию ВВ, причём в аналогичном эксперименте с использованием ингибиторов аутофагии показано, что этот процесс

сопряжен с аутофагией [18]. Уровни активированных белков, участвующих в передаче сигналов от АКТ, уменьшаются в инсулинорезистентных тканях и клетках, что приводит к снижению уровня этих белков в везикулах, секретируемые этими клетками [18, 41].

В исследовании Kobayashi Y. et al. (2018) общая концентрация циркулирующих ВВ у 167 пациентов, имеющих метаболические факторы риска (нарушения липидного профиля, ожирение или избыточная масса тела, гипертония, различные расстройства углеводного обмена) была проанализирована во взаимосвязи с наличием и выраженностью этих метаболических факторов. Без разделения больных по полу при проведении однофакторного анализа статистически значимые взаимосвязи количества ВВ были выявлены с индексом массы тела, объемом скелетных мышц, систолическим и диастолическим давлением. Но наиболее сильная отрицательная взаимосвязь была выявлена с уровнем ХС ЛПВП и сильная положительная связь с уровнем триглицеридов в крови, в тоже время корреляций с уровнями ХС ЛПНП и уровнем общего холестерина не выявлено [33]. К сожалению, на настоящее время нет аналогичных данных, полученных на популяции онкологических больных, однако выявление таких ассоциаций позволит более полно изучить значимость ВВ в патогенезе такой сочетанной патологии.

### **1.3 Возможность использования адипоцитарных внеклеточных везикул для прогнозирования онкологического риска у больных с предраковыми заболеваниями толстой кишки**

Оценка риска развития рака может быть использована для определения наиболее подходящих скрининговых тестов и соответствующих вариантов диагностики и лечения для каждого пациента. Это может включать рекомендации по образу жизни, профилактические меры, такие как вакцинация, или хирургическое удаление предраковых поражений.

Выявление людей с высоким риском развития рака позволяет сосредоточить ресурсы здравоохранения на тех, у кого наиболее высока вероятность развития рака [19].

Оценка риска злокачественной трансформации полипов толстой кишки достаточно сложна из-за их вариабельности, включая гистологическую структуру, размер, форму и морфологию. Ожирение или метаболический синдром являются основными факторами развития КРР более чем у 60% пациентов. Аналогичные метаболические изменения наблюдаются также у пациентов с полипами и АТК. Аденоматозные полипы или ворсинчатые аденомы толстой кишки рассматриваются как предраковые изменения [82, 103].

Известно, что ВВ представляют собой гетерогенную популяцию мембранных частиц размером менее 1 мкм, секретируемых различными типами клеток и несущих маркеры родительской клетки. Большинство везикул, циркулирующих в крови человека, имеют тромбоцитарное, лейкоцитарное, эритроцитарное и эндотелиальное происхождение. ВВ, полученные из адипоцитов, составляют относительно небольшую долю от общего количества в плазме крови, и их уровень повышен у пациентов с ожирением [96]. В кровотоке также могут присутствовать опухолеспецифические ВВ, несущие опухолеспецифические маркеры (ассоциированную с экзосомами ДНК, микроРНК и белки). Эти везикулы способны проникать через гематоэнцефалический и гистогематический барьеры и обнаруживаться в различных биологических жидкостях человека [90, 104]. Однако концентрация опухолеспецифических везикул в кровотоке крайне низка, а диагностическая значимость маркеров в составе опухолеспецифических ВВ не определена [24]. Классические маркеры адипоцитов, такие как рецептор, активируемый пролифераторами пероксисом- $\gamma$  (PPAR- $\gamma$ ), белок, связывающий жирные кислоты 4 (FABP4), преадипоцитарный фактор 1 (PREF1) и перилипин-1, не обладают строгой тканевой специфичностью. Их экспрессия также выявляется в клетках

моноцитарно-макрофагального ряда, что затрудняет однозначную идентификацию внеклеточных везикул адипоцитарного происхождения [16, 30, 47, 53]. Фракции малых ВВ адипоцитарного происхождения характеризуются обогащением белками внеклеточного матрикса, включая MMPs и их ингибитор TIMP1, а также HSPs и ферменты, участвующие в метаболизме липидов и углеводов [28]. Это определило выбор везикулярных маркеров, рассматриваемых как перспективные для оценки риска развития рака у пациентов с предраковыми заболеваниями и ожирением.

Замбалова Е. с соавт. (2021) выявили предикторы риска рака у пациентов с полипами толстой кишки, включая тетраспанины (CD9, CD63, CD81, CD82, CD151 и Tspan8) и протеазы (протеазы ADAM, ММП, EMMPRIN) в экзосомах [48].

Willms E. с соавт. (2016) также показали, что EMMPRIN-положительные ВВ, полученные из эпителиальных клеток, можно использовать для формирования группы повышенного риска рака. Авторы выявили, что количество EpCAM+EMMPRIN-положительных циркулирующих везикул было выше у пациентов с КРР, чем у пациентов с полипами и воспалительными заболеваниями кишечника [27]. В исследовании Uratani R. с соавт. выявлено, что уровни четырёх микроРНК (микроРНК-21, микроРНК-29а, микроРНК-92а и микроРНК-135b) в тканях увеличивались в соответствии с прогрессированием опухоли (нормальная ткань - аденома - карцинома). Более того, уровни экспрессии трёх микроРНК (микроРНК-21, микроРНК-29а и микроРНК-92а) были значительно выше у пациентов с аденомой, чем у здоровых добровольцев; уровень микроРНК коррелировал с размером аденомы и общим количеством аденом. Также была оценена экспрессия микроРНК в экзосомах, выделенных из тех же образцов сыворотки крови. По сравнению с везикулярными микроРНК, сывороточные уровни микроРНК-21, микроРНК-29а и микроРНК-92а оказались лучшими диагностическими биомаркерами у пациентов с аденоматозными полипами высокого риска. Однако авторы оценили значимость свободных

циркулирующих и везикулярных микроРНК для дифференциации пациентов с аденомой от здоровых лиц, но не для оценки риска злокачественной трансформации АТК [43].

Таким образом, имеются попытки использовать состав циркулирующих ВВ для диагностики КРР и оценки онкологического риска у больных с предраком, однако ни один из маркеров на настоящее время не внедрен в клинику, а для больных с аденомами с отягощающими метаболическими факторами такие маркеры в настоящее время не идентифицированы.

#### **1.4 Особенности противоопухолевого эффекта сочетанного применения локальной гипертермии и радиотерапии у больных злокачественными новообразованиями с метаболическими нарушениями**

##### **1.4.1 Особенности системы репарации ДНК в опухоли при ожирении**

В настоящее время повышенный интерес вызывают исследования по применению дистанционной лучевой терапии или химиолучевой терапии в сочетании с локальной гипертермией, результаты которых свидетельствуют о повышении непосредственной эффективности лучевой терапии за счет выраженной регрессии опухоли, а также увеличении длительности безрецидивного периода для ряда локализаций, например, для плоскоклеточных карцином головы и шеи, рака шейки матки, РПК, местнораспространенного рака простаты из группы высокого риска. Так, по данным различных авторов, противоопухолевая эффективность ионизирующего излучения усиливается от 1,5-2 до 10-15 раз [1, 77].

Разнообразные метаболические нарушения (ожирение, избыточная масса тела, гликемия натощак, нарушение толерантности к глюкозе, сочетанные нарушения углеводного обмена, дислипидемии, сахарный диабет

второго типа (СД2), метаболический синдром) могут модулировать эффективность противоопухолевой терапии. Тепловой шок в опухолевых клетках вызывает ингибирование синтеза и транскрипции ДНК, процессинга мРНК, блокирует трансляцию и продвижение по клеточному циклу [36]. Ионизирующее излучение вызывает различные повреждения ДНК, в том числе окисление оснований, потеря оснований, одноцепочечные и двуцепочечные разрывы. Дефекты систем репарации, которые восстанавливают двуцепочечные разрывы, которые считаются наиболее смертельными повреждениями, такие как негомologичное соединение концов и гомологичная рекомбинация, особенно губительны для клеток. Показано, что гипертермия нарушает функцию белков BRCA1 и BRCA2 в клетке, что ухудшает способность репарации двухнитевых разрывов ДНК с помощью системы гомологичной рекомбинации [57]. При дополнительной потере активности белка PARP1 (при использовании PARP1 ингибиторов), который управляет эксцизионной репарацией оснований и репарацией однонитевых разрывов, увеличивается формирование повреждений, которые потенциально должны репарироваться белками BRCA1- и BRCA2. Вследствие чего клетки погибают от эндогенного метаболически индуцированного повреждения ДНК. Таким образом, локальная гипертермия может, в значительной степени имитировать дефицит гомологичной рекомбинации, что может быть важной опцией в лечении определенной категории больных, в том числе и больных с метаболическими нарушениями.

Ожирение, полагают, может приводить к нестабильности генома. Окислительный стресс, воспаление, провоцируемые ожирением, могут приводить к повреждению ДНК и нарушению репаративных механизмов. Также отмечено, что связь между нарушениями репарации и ожирением реализуется через механизмы хронического воспаления. Активное поглощение адипоцитами различных энергетических субстратов приводит к активации НАДФН-оксидазы 4, индуцируя повышенную выработку активных форм, вдобавок ко всему свою роль играют провоспалительные

адипокины, активно секретируемые адипоцитами. Цитокины усиливают инфильтрацию жировой ткани иммунными клетками и провоцируют развитие хронического воспаления на фоне ожирения [46]. Активированные макрофаги секретируют различные цитокины, TNF $\alpha$  (фактор некроза опухоли альфа), IL-6, которые могут приводить к повреждению ДНК в клетках, удаленных от источника воспалительной активности [46].

Повреждение ДНК вызывает активацию репаративных систем, однако выявлен также феномен ингибирования некоторых белков системы репарации в ответ на окислительный стресс. Есть данные об изменении степени метилирования ДНК у субъектов с избыточным весом [92]. Для опухолей, ассоциированных с ожирением и МС, и, в частности для рака эндометрия и КРР, характерен дефицит системы репарации ошибочно спаренных нуклеотидов (mismatch repair deficiency – MMR-D) [52]. Вероятность ошибки при репликации ДНК составляет  $10^{-7}$ - $10^{-8}$ , а данная система репарации снижает эту вероятность на порядок. Полагают, что процесс репарации заключается в распознавании дефекта, определении исходной и дочерней нити ДНК, удалении ошибочно включённого нуклеотида и его замена правильным нуклеотидом. Удаляется обычно не только неправильно спаренный нуклеотид, но и часть ДНК вокруг него, а дочерняя нить восстанавливается, используя основную нить как матрицу. Клиническим проявлением MMR-D являются опухоли с высокой микросателлитной нестабильностью (MSI-High). Карциномы эндометрия с MSI-High ассоциированы с различными механизмами MMR-D. По сравнению с пациентками с герминогенными ( $n = 25$ ) и соматическими ( $n = 39$ ) мутациями в системе MMR-D, пациентки РЭ с гиперметилированием промотора гена *MLH1* (MutL белок-гомолог 1) ( $n = 120$ ) были старше, более тучны и имели более высокую стадию рака при постановке диагноза ( $p = 0,025$ ). Кроме того, двухлетняя безрецидивная выживаемость была хуже для больных с гиперметилированием промотора *MLH1* по сравнению с группами с герминогенными и соматическими мутациями (70 % против

100 %, соответственно) [78, 79]. При иммуногистохимическом исследовании ткани опухоли у больных КРР, в целом, у 22 из 32 пациентов (69 %) были обнаружены 2 соматические (опухолевые) мутации в генах *MMR*, кодирующих белки, которые не детектировались в образцах опухоли. Из 10 оставшихся опухолей 3 имели одну соматическую мутацию в гене *MMR* с возможной потерей гетерозиготности, которая могла привести к дефициту *MMR*. Все опухоли, в которых обнаружены соматические мутации *MMR*, имели гипермутированный фенотип. Авторами сделан вывод, что среди аденокарцином толстой кишки опухоли с MSI-High преимущественно возникают не вследствие герминогенных, а вследствие соматических мутаций [35].

Одним из ключевых событий гипертермического воздействия является синтез белков теплового шока (HSP), которые связываются с компонентами системы репарации ДНК. На примере культур колоректальных карцином выявлено, что ко-локализация между HSPs, MLH1 и MSH2 увеличивались в *MMR*-позитивных клетках. Иммунопреципитация подтвердила взаимодействие между HSPs и белками *MMR* в контрольных и подвергшихся гипертермии клетках. Авторы полагают, что связывание белков системы репарации с HSPs приводит к снижению их функции [60].

#### **1.4.2 Значение стволовых клеток жировой ткани в модификации терморадииотерапии**

Адиipoциты жировой ткани являются важным элементом формирования опухолевого микроокружения. Основную роль в опухолевой прогрессии адипоциты осуществляют при помощи собственных стволовых клеток. Жировая ткань богата как мезенхимальными стволовыми клетками (ММСК), так и стволовыми клетками, собственно, адипоцитарного происхождения. ВВ от этих стволовых клеток способны мигрировать в злокачественные новообразования и стимулировать развитие опухоли. Среди

механизмов такого действия обсуждаются различные аспекты, например, ММСК запускают выработку хемокинов CXCL1, CXCL2, CXCL5, CXCL7, SDF1; некоторых цитокинов, таких как IL6, IL8, трансформирующий фактор роста, инсулиноподобный фактор роста 1, сосудисто-эндотелиальный фактор роста и другие [76]. Популяция ММСК и стволовых клеток адипоцитарного происхождения могут формировать раково-ассоциированную популяцию ММСК в ткани опухоли. Эти клетки, как полагают, могут дифференцироваться в ассоциированные с опухолью адипоциты и фибробласты, следовательно, ММСК играют ключевую роль в создании опухолевого микроокружения [61]. В тоже время показано, что подвергнутые гипертермии ММСК способны ингибировать пролиферацию опухолевых клеток при помощи механизмов ареста клеточного цикла или индукции некроза/ апоптоза. В этом же исследовании показано, что подвергнутые гипертермии ММСК вызывают деградацию цитоскелета, изменения ядра в клетках опухоли и ее микроокружения [3]. Таким образом, можно заключить, что стволовые клетки, в том числе адипоцитарного происхождения, могут являться потенциальными усилителями ответа опухоли на терапию на фоне гипертермии.

#### **1.4.3 Секретируемые жировой тканью гормоны как модификаторы эффективности термордиотерапии**

Отдельные патогенетические аспекты вовлеченности ожирения в канцерогенез исследованы широко. Особое внимание уделяется гормональному дисбалансу: гиперинсулинемия и инсулинорезистентность, гипергликемия, гиперэстрогения (у части больных), гиперлептинемия, снижение уровня гормона жировой ткани адипонектина - все эти факторы вовлечены в пролиферацию, апоптоз, ангиогенез, клеточную подвижность, повреждение ДНК активными формами кислорода. На примере культур КРР, рака молочной железы, рака простаты и эндометрия было изучено влияние

гормонов жировой ткани на экспрессию транскрипционных и ростовых факторов в опухолях. Спектр выявленных транскрипционных факторов включал AMPK, SREBP-1, PPAR $\alpha$ , STAT3, NF- $\kappa$ B, HIF $\alpha$ -1, ER $\alpha$ , из ростовых факторов наиболее значимы фактор роста эндотелия сосудов и его рецептор (VEGF, VEGFR1), инсулиноподобные факторы роста, связывающие их белки и рецептор I типа (IGF-I, IGF-II, IGFBPs, IGF-IR) [57]. Гипертермическое воздействие частично реализуется через эти же транскрипционные факторы и сигнальные пути. Показано, что гипертермия эффективно ингибирует NF- $\kappa$ B и HIF $\alpha$ -1 сигнальные пути [56], активирует AMPK и инактивирует mTOR и его нижестоящий эффектор S6K [46], снижает экспрессию VEGF, VEGFR2, IGF-IR в опухолях [74, 92].

#### **1.4.4 Состав циркулирующих внеклеточных везикул: связь с ответом опухоли на локальную гипертермию и терморадикотерапию**

Опухолевые клетки, подвергшиеся воздействию высоких температур и радиации, как показано, высвобождают большое количество ВВ. Терморадикотерапия индуцирует плеiotропные изменения в профиле связанных с опухолью микроРНК. Список микроРНК, индуцированных гипертермией и радиационным воздействием, представлен в таблице 1.

Таблица 1 – Индуцированные гипертермией и радиотерапией изменения в профиле микроРНК опухолей

| микроРНК                                      | Клеточные культуры                                                     | Эффекты                                                                                                                                                                                                                                                                                                        | Ссылки       |
|-----------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------|
| микроРНК-23а                                  | Карциномы молочной железы, колоректальные карциномы, лимфомы           | Высокие уровни микроРНК-23а, обусловленные гиперэкспрессией HSP70 приводят к снижению мРНК NOXa, который имеет микроРНК-23а связывающий сайт. NOXa связан напрямую с апоптозом. Соответственно, гиперэкспрессия этой микроРНК ответственна за высокую устойчивость клеток к повреждающему действию температуры | [100]        |
| микроРНК-34а                                  | Колоректальная карцинома HCT116/                                       | Гипертермия индуцирует гиперэкспрессию этой микроРНК, что индуцирует апоптоз и ингибирует пролиферацию с последующей активацией гена p53                                                                                                                                                                       | [55]         |
| <b>Индуцированные радиотерапией изменения</b> |                                                                        |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                |              |
| микроРНК-106b                                 | Колоректальная карцинома HT29                                          | Связана с радиорезистентностью, идентифицированы таргетные гены PTEN и p21.                                                                                                                                                                                                                                    | [15]         |
| микроРНК-100                                  | 7 линий колоректальных карцином                                        | Гиперэкспрессия микроРНК-100 сенситизирует CCL-244 клетки после облучения, таким образом микроРНК-100 ассоциирована с радиочувствительностью. В других культурах карцином кишечника после облучения экспрессия микроРНК-100 может снижаться, что приводит к радиорезистентности.                               | [80]         |
| микроРНК-124                                  | Колоректальные карциномы (SW480, SW620, LOVO), клинические образцы KPP | Связана с радиорезистентностью.                                                                                                                                                                                                                                                                                | [91]         |
| микроРНК-506                                  | Колоректальные карциномы SW480, HCT116, HT29, SW837                    | микроРНК-506 подавляет экспрессию мезенхимальных генов виментина, Snail 2, CD151, повышает чувствительность клеток колоректальных карцином к оксалиплатину через супрессию гена белка множественной лекарственной устойчивости 1 (P-гликопротеина).                                                            | [26, 68, 76] |

МикроРНК адипоцитарного происхождения по данным литературы также оказывают существенное влияние на течение опухолевого процесса, причем различные микроРНК оказывают как промотирующее, так и ингибирующее влияние на опухоль (таблица 2).

Таблица 2 – Связь везикулярных микроРНК адипоцитарного происхождения с опухолевым ростом, инвазивностью и химиорезистентностью опухолей

| микроРНК                           | Источники микроРНК                                                             | Реципиенты                                                              | Эффекты                                                        | Ссылки |
|------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------|--------|
| микроРНК-27a-3p                    | Экзосомы адипоцитарного происхождения больных аденокарциномой легких           | Культура лимфоцитов селезенки мышей C67/BL6                             | Ингибирование пролиферации ICOS+ T-клеток и секреции IFN-гамма | [37]   |
| микроРНК-122                       | Экзосомы, полученные из модифицированной культуры АСК                          | Культура клеток гепатоцеллюлярной карциномы                             | Увеличение чувствительности опухолевых клеток к химиотерапии   | [39]   |
| микроРНК-503-3p                    | Экзосомы из АСК больных раком молочной железы                                  | Клеточные линии MCF7, BT-474, HCT-15 и COLO 205                         | Подавление опухолевого роста                                   | [40]   |
| микроРНК-3184-5p, микроРНК-181c-3p | Культура адипоцитов 3T3-L1                                                     | Клеточная линия рака молочной железы MDA-MB-231                         | Снижение пролиферативной активности клеток рака                | [41]   |
| микроРНК-23a/b                     | Везикулы адипоцитарного происхождения пациентов с гепатоцеллюлярной карциномой | Культуры клеток гепатоцеллюлярной карциномы от пациентов                | Усиление роста и миграции клеток гепатоцеллюлярной карциномы   | [42]   |
| микроРНК-199a                      | Везикулы адипоцитарного происхождения от пациентов, перенесших липосакцию      | Клеточные линии гепатоцеллюлярной карциномы Huh7, SMMC-7721 и PLC/PRF/5 | Повышение чувствительности опухоли к доксорубину               | [43]   |

| микроРНК                                           | Источники микроРНК                                                  | Реципиенты                                                     | Эффекты                                                | Ссылки |
|----------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------|--------|
| микроРНК-144, микроРНК-126                         | Везикулы адипоцитарного происхождения больных раком молочной железы | MCF-7, MDA-MB-231 и HEK 293 T                                  | Усиление прогрессирования опухоли                      | [44]   |
| микроРНК-302b                                      | Везикулы адипоцитарного происхождения больных раком молочной железы | Клеточные линии рака молочной железы MDA-MB-231, MCF-7, и T47D | Усиление секреции провоспалительных цитокинов опухолью | [49]   |
| Примечание – АСК – адипоцитарные стволовые клетки. |                                                                     |                                                                |                                                        |        |

Можно предположить, что при наличии гипергликемии или СД2 влияние циркулирующих ВВ на эффективность терморадитерапии безусловно не ограничивается, но может быть связано с их влиянием на моноциты крови. В работе Freeman D. W. et al. показано, что ВВ от пациентов с СД2, который часто ассоциируется с ожирением, предпочтительно интернализировались моноцитами (классическими и переходными) и В-клетками по сравнению с эугликемическими пациентами. Анализ экспрессии генов моноцитов с интернализированными диабетическими ВВ показал, что этот процесс усиливает регуляцию антиапоптотических генов в моноцитах. Показано, что снижение апоптоза может привести к усилению дифференцировки моноцитов в дендритные клетки. Выявлено увеличение IL-2, IL-4, и IL-12p70 в диабетических ВВ и уровня IL-2 в средах от моноцитов, обработанные этими везикулами, что свидетельствует о возможности везикул модифицировать воспалительный ответ [18]. Интернализация ВВ, продуцирующихся в условиях гипергликемии, ожирения и инсулинорезистентности, подавляет пути реакции на окислительный стресс в моноцитах, что может сопровождаться дефектами фагоцитоза [44]. Необходимо также учитывать, что проангиогенные белки семейства MMPs, которые экспрессируются на адипоцитарных ВВ, могут с

одной стороны отражать ангиогенез в опухоли, с другой стороны участвовать в ремоделировании микроокружения опухоли [14].

#### **1.4.5 Воспалительное опухолевое окружение на фоне метаболических изменений: связь с эффектами терморадииотерапии**

Хроническое воспаление малых градаций в жировой ткани является важным фактором, вызывающим развитие инсулинорезистентности. Так, Deng Z. B. et al. (2009) обнаружили, что экзосомы, секретируемые жировой тканью мышей с ожирением, индуцируют активацию макрофагов через путь TLR4/TRIF, а ретинол-связывающий белок 4 в этих экзосомах играет роль в индукции макрофагов, активируя их, а также способствуют поляризации макрофагов в M1, которые секретируют провоспалительные цитокины и экзосомы [12]. Комбинация радиотерапии с гипертермией индуцирует HSP70-зависимое созревание дендритных клеток и способствует выработке провоспалительных цитокинов макрофагами и дендритными клетками [93]. Таким образом, анализ литературы показал, что молекулярные механизмы эффективности локальной гипертермии в сочетании с радиотерапией у больных злокачественными новообразованиями с метаболическими нарушениями могут быть ассоциированы с особенностями системы репарации ДНК в опухоли при ожирении; с уровнем ассоциированных с терморадииорезистентностью микроРНК в опухоли, с составом циркулирующих ВВ адипоцитарного происхождения, с популяционным составом опухолевых стволовых клеток и адипоцитарных стволовых клеток в микроокружении опухоли, с уровнем адипокинов плазмы крови.

### **1.5 Роль ионизирующего излучения и гипертермии как модулирующего фактора секреции ВВ**

Влияние ионизирующего излучения на регуляцию секреции ВВ остаётся недостаточно охарактеризованным. Имеющиеся данные указывают на то, что рентгеновское облучение усиливает высвобождение малых ВВ (экзосом) опухолевыми клетками различных линий (MCF-7, FaDu, BHY). При этом у облучённых клеток регистрируются изменения характеристик экзосом, включая повышение содержания белка, а также сдвиги их размерных параметров и  $\zeta$ -потенциала по сравнению с контролем [69]. В составе везикулярного груза облучённых клеток (клеточная линия HPV-негативного плоскоклеточного рака головы и шеи FaDu) выявлено повышение уровня белков, связанных с процессами транскрипции, трансляции, клеточного деления, фолдинга (шапероны), а также компонентов протеасомного комплекса. Наличие в экзосомах факторов, участвующих в регуляции синтеза белка, его укладки и убиквитин-зависимой деградации, может свидетельствовать о формировании адаптивного ответа клеток на стрессовые воздействия. Предполагается, что секреция ВВ служит одним из механизмов удаления избыточных или повреждённых белков. Кроме того, показано, что радиационно-индуцированные изменения ВВ связаны с их способностью усиливать миграционную активность реципиентных клеток [67]. Протеомный анализ ВВ, полученных от облучённых и необлучённых донорских клеток линии BHY, выявил различия в белковом составе: у 39 белков отмечено повышение уровня, тогда как у 36 – снижение. Среди белков, демонстрирующих повышенное содержание в экзосомах после радиационного воздействия, выделяются HSP90AA1, HSP90AB1, HSP90B1 и FGFR1. Противоопухолевая активность экзосом, происходящих как из опухолевых, так и из неопухолевых клеток после воздействия гипертермии или её сочетания с химиотерапией, показана в ряде исследований; однако большинство этих данных получено в экспериментальных условиях [29, 59,

66, 67]. Механизмы данной активности остаются недостаточно изученными. Имеются данные, что она может быть связана со способностью ВВ в этих условиях аккумулировать и доставлять к опухолевым клеткам цитостатические препараты, хемокины, HSPs и микроРНК, участвующие в индукции апоптоза, перераспределении субпопуляций лимфоцитов и регуляции дифференцировки макрофагов в опухолевом микроокружении.

Белковая корона и мембрана ВВ, помимо тетраспанинов и интегринов, включают также комплекс протеаз (ADAM-протеазы, MMPs). Показано, что инкубация опухолевых клеток-реципиентов с ВВ, полученными от облучённых клеток-доноров, сопровождается повышением уровня MMP2 и MMP9, что рассматривается как один из ключевых механизмов опосредованного повреждающего эффекта радиотерапии [94, 98]. Роль MMPs, их индукторов и тканевых ингибиторов (TIMPs) в процессах инвазии, метастазирования и эпителиально-мезенхимального перехода хорошо описана. Вместе с тем участие MMPs и их регуляторов в составе ВВ в динамике противоопухолевой терапии с ТРХТ, а также их потенциальная прогностическая значимость для данного вида лечения остаются недостаточно изученными.

В числе механизмов терморезистентности рассматривается участие высококонсервативных белков теплового шока (HSP90, HSP70, HSP60, HSP27, кристаллины и др.), представленных в экстраклеточной, мембранной и везикулярной формах. Известно, что ВВ содержат HSPs как на своей поверхности, так и во внутреннем содержимом. Однако функциональное значение везикулярных форм HSPs остаётся недостаточно определённым, в том числе в физиологических условиях [2]. HSPs, локализованные на поверхности ВВ, могут распознаваться различными типами клеток, включая CD91+ опухолевые клетки и фибробласты, а также CD91+SREC1+TLR+ антигенпрезентирующие клетки и CD94+ цитолитические иммунные клетки. При этом обсуждается как их иммуностимулирующее, так и иммуносупрессивное действие в составе

внеклеточного пула HSPs [95, 101]. В работе А. В. Малек и соавт. показано, что тепловой стресс индуцирует секрецию клетками колоректальной карциномы специфической популяции ВВ, характеризующейся повышенным уровнем HSP70 на мембране и изменённым профилем микроРНК; указанные изменения коррелируют с выживаемостью клеток [2]. Таким образом, циркулирующие ВВ, содержащие HSPs, могут рассматриваться как перспективные предикторы эффективности терморадииотерапии.

### **1.6 Современные подходы к лечению больных с РПК ниже- и среднеампулярного отдела: поиск эффективных предикторов эффективности терморадииотерапии**

Главной задачей лечения больных РПК в современной клинической практике является не просто полное выздоровление пациентов, но и сохранение функций управления дефекации. Хотя хирургическое вмешательство до сих пор рассматривается как основной метод лечения при РПК, в последнее десятилетие активно разрабатываются новые комбинированные методы лечения, позволяющие проводить сфинктеросохраняющие операции или даже избежать хирургического вмешательства [38]. Основными рекомендованными неoadъювантными схемами терапии являются лучевая терапия (СОД 50-54 Гр) в сочетании с химиотерапией аналогами пиримидина, а также консолидирующая химиотерапия по схеме FOLFOX илиXELOX. Подобная стратегия тотальной неoadъювантной терапии позволяет проводить у пациентов с  $T_{2-3b}N_{0-1}M_0$  раком ниже- и среднеампулярного отделов прямой кишки стратегию «наблюдения и ожидания» с целью выполнения органосохраняющего лечения в случае полного клинического ответа на терапию. Различными исследованиями подтверждена целесообразность применения химиолучевого лечения с дополнительным использованием локальной гипертермии при

РПК, увеличивающее пятилетнюю безрецидивную выживаемость пациентов и локальный контроль опухоли [5, 40].

Такая стратегия имеет ряд дополнительных рисков для пациентов, связанных не только с опасностью рецидива, но и развитием осложнений, вызванных лекарственной токсичностью и воздействием на организм повышенной суммарной дозы облучения, и в частности показано достоверное увеличение частоты анальной инконтиненции и сексуальных дисфункций, которые существенно снижали качество жизни больных РПК [23, 65]. В связи с чем, поиск доступных молекулярных маркеров – предикторов ТРХТ – крайне важный аспект для персонализации лечения больных РПК. Необходимо отметить, что везикулярные предикторы эффективности терапии в онкологии будут иметь неоспоримые преимущества перед другими маркерами, а именно, они являются практически неинвазивными маркерами, так как могут быть получены при рутинном заборе крови; везикулярные маркеры отражают гетерогенность опухоли (на транскрипционном и трансляционном уровнях); возможен мониторинг везикулярных маркеров, что может быть полезно в контексте оценки динамики ответа опухоли на лечение.

## ГЛАВА 2 МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

### 2.1 Материал исследования

#### 2.1.1 Описание клинических групп

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 данных групп диагностирован либо метаболический синдром (МС) в соответствии с критериями IDF (2005), либо так называемое «метаболически здоровое ожирение» (МЗО), под которым подразумевали наличие абдоминального ожирения (по критериям IDF (2005) и индекса массы тела  $\geq 30$  в сочетании с одним из дополнительных критериев метаболического синдрома, или изолированное ожирение.

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 РПК ( $T_{2-4a}N_{0-2}M_0$ ) – 40 человек, которым был проведен курс лучевой терапии в стандартном режиме фракционирования дозы до СОД 54 Гр на фоне радиосенсибилизации капецитабином и локальной гипертермии. Все больные до начала лечения имели ожирение, определяемое как индекс массы тела  $\geq 30$ . 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 на аппарате MAGNETOM ESSENZA 1,5 T (Siemens, Эрланген, Германия) с использованием поверхностной фазированной катушки Body Matrix, а также эндоскопическое исследование с забором материала для гистологического анализа. Эндоскопия проводилась на видеоэндоскопическом комплексе EVIS EXERA III (Olympus-Evident, Япония). Использование этого оборудования позволяет выполнить стандартное эндоскопическое исследование в белом свете, а затем провести осмотр в режиме «узкого спектра» (NBI-техника). Режим NBI предоставляет уникальные возможности для визуализации капиллярного рисунка и поверхностной структуры слизистой. Видеоколоноскопия в белом свете позволяла визуализировать патологический процесс в различных отделах толстой кишки, определить его локализацию, размеры и распространённость в кишечнике. Дополнительная техника узкого спектра обеспечивала проведение дифференциальной диагностики между неопухолевыми и неопластическими поражениями. Для оценки использовалась микрососудистая классификация Sano для колоректальных поражений. Классификация капиллярного рисунка позволяла эндоскопически сделать заключение о характере выявленных

структур толстой кишки, что подтверждалось последующим гистологическим исследованием. Каждый пациент, включённый в группу АТК, имел как минимум один фрагмент, классифицированный как тубулярная или тубулярно-ворсинчатая аденома.

Критериями исключения при формировании онкологических групп явились первично-множественные формы КРР, отказ от лечения, отсутствие информированного согласия.

Больным РПК на первом этапе проводилась дистанционная гамма-терапия на аппарате Theratron Equinox 1,25 в стандартном режиме фракционирования, разовая очаговая доза (РОД) 2,0 Гр, 5 фракций в неделю до СОД 54 Гр. Одновременно с началом лучевой терапии была проведена радиомодификация капецитабином в дозе 825 мг/м<sup>2</sup> x 2 раза в сутки с интервалом 12 часов в дни проведения лучевой терапии, а все химиолучевое лечение проходило на фоне локальной гипертермии, которую проводили на аппарате Celsius TCS по схеме: 3 раза в неделю до сеанса облучения при температуре 42-44°C в течение 60 мин, всего 10 сеансов. Интервал между сеансом локальной гипертермии и дистанционной лучевой терапии составил не более 30 минут. Оценка эффективности лечения по критериям RECIST 1.1 и ESGAR с определением степени лечебного патоморфоза в соответствии с рекомендациями ВОЗ проводилась через 6-8 недель после окончания курса ТРХТ. В интервале между завершением курса ТРХТ и контрольным обследованием проводились курсы (обычно 3 курса) 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.

Для оценки объективного ответа на ТРХТ проводилось комплексное обследование. При эндоскопическом исследовании прямой кишки оценивалась динамика показателей расстояния дистального полюса опухоли от Z- линии (см) и протяженности опухолевого процесса (см), изменение объема экзофитного компонента опухоли, оценивалась степень выраженности лучевой ректопатии. С помощью МРТ оценивалась динамика показателей линейных размеров опухоли, объем экзофитного компонента, степень инвазии опухоли в стенку кишки (компонент pT), вовлеченность в опухолевый процесс смежных с прямой кишкой органов и тканей, размеры и количество измененных лимфатических узлов. По результатам анализа МР-томограмм у пациентов с полным ответом не было измеримых опухолей, а в ложе опухоли наблюдался фиброз без зон средней интенсивностью сигнала на T2-взвешенных изображениях (mrTRG 1) без повышения сигнала на DWI и патологического ограничения диффузии на картах ИКД. У пациентов с остаточной опухолью определялась остаточная опухолевая ткань, участки фиброза и участки с высоким сигналом на DWI, соответствующие зоне низкого сигнала на картах ИКД.

Для оценки степени лечебного патоморфоза также использовались данные гистологического исследования язвенного содержимого у больных раком прямой кишки после проведения ТРХТ. Степень морфологического ответа опухоли по рекомендации ВОЗ определялась в соответствии с классификацией А. М. Mandard через 6-8 недель после окончания курса ТРХТ. Данная шкала (tumor regression grade, TRG) использовалась для оценки выраженности ответа опухоли на проведённую терапию на основании соотношения остаточной опухолевой ткани и степени её замещения фиброзным компонентом в исследуемом материале. Интерпретация лечебного патоморфоза осуществлялась по следующим критериям:

- TRG 1 соответствует полной регрессии опухоли с её замещением фиброзной тканью;
- TRG 2 соответствует наличию единичных жизнеспособных опухолевых клеток либо небольших их скоплений;
- TRG 3 соответствует преобладанию фиброзной ткани над остаточной опухолевой паренхимой;
- TRG 4 соответствует преобладанию опухолевой ткани над фиброзными изменениями;
- TRG 5 соответствует отсутствию морфологических признаков ответа на проводимую терапию.

У пациентов с полной регрессией опухоли определялась I степень лечебного патоморфоза (TRG 1), тогда как у больных с наличием остаточной опухолевой ткани определялась II–III степень регрессии по Mandard (TRG 2–3).

### **2.1.2 Критерии метаболического синдрома и метаболически здорового ожирения**

Метаболически здоровое ожирение определялось как ожирение с индексом массы тела  $\geq 30$  кг/м<sup>2</sup> в сочетании с ещё одним компонентом метаболического синдрома либо изолированное ожирение (критерии IDF (2005)). В анализ включались следующие компоненты метаболического синдрома: абдоминальное ожирение (окружность талии более 94 см у мужчин и более 80 см у женщин), гипертриглицеридемия (уровень триглицеридов  $\geq 1,7$  ммоль/л), сниженный уровень холестерина липопротеинов высокой плотности (менее 1,0 ммоль/л у мужчин и менее 1,3 ммоль/л у женщин), артериальная гипертензия (артериальное давление  $\geq 130/85$  мм рт. ст.), гипергликемия натощак (глюкоза плазмы  $\geq 6,1$  ммоль/л при значении индекса инсулинорезистентности HOMA-IR  $< 2,7$ ).

Исследование одобрено этическим комитетом НИИ онкологии Томского НИМЦ (протокол N21 от 9 ноября 2023г.). Информированное согласие получено от всех больных, участвовавших в исследовании. Дизайн исследования представлен на рисунке 1.



Рисунок 1 – Дизайн исследования

## 2.2 Методы исследования

### 2.2.1 Выделение внеклеточных везикул

Малые ВВ из плазмы крови больных выделены методом ультрафильтрации с двойным ультрацентрифугированием (ультрацентрифуга OptimaXP, Beckman Coulter). Фракционирование клеток крови (около 18 мл венозной крови, стабилизированной ЭДТА) выполнялось на высокоскоростной центрифуге с угловым ротором при 4 °С в течение 20 минут при ускорении 1000g (TGL-24MC, Drawell, Китай). 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 (Minisart high flow 16553-K, Sartorius, Германия), далее фильтрат подвергался ультрацентрифугированию дважды на ультрацентрифуге с бакет-ротатором (Optima XPN 80, Beckman Coulter, США), 4°C, 90 минут, 100 000g. Полученные аликвоты малых ВВ хранили при -80°C.

### 2.2.2 Типирование внеклеточных везикул

Для подтверждения морфологии выделенных частиц проводилась трансмиссионная электронная микроскопия. Изолированные частицы адсорбировались в течение 1 минуты на медных сетках, покрытых карбонизированной пленкой. Затем сетки подвергались воздействию в течение 5-10 секунд 0,5 % уранилацетата. Препараты были изучены на микроскопе Jem1400 (Jeol, Япония). Распределение и концентрация выделенных везикул изучены с помощью метода анализа траекторий наночастиц (nanoparticle tracking analysis, NTA) с использованием NanoSight LM10 (Malvern Instruments, Великобритания). Для оптимизации измерений образцы везикул разводились PBS в пропорциях 1:100, 1:1000 и 1:10000. Анализировались средний гидродинамический диаметр (размер везикул, их распределение) и концентрация везикул. Для подтверждения везикулярной природы выделенных частиц исследовали уровень тетраспанинов CD81, CD63 и гликопротеина CD24 методом проточной цитометрии с использованием методологии сорбции везикул на латексных частицах. Цитометрия выполнена на приборе Cytotflex (Beckman Coulter, США), полученные данные анализировались с помощью программы CytExpert 2.0 Software (Beckman Coulter, США). Медиана интенсивности флуоресценции (MFI) ВВ была проанализирована по сравнению с изотипическими и отрицательными контролями.

### 2.2.3 Оценка белка внеклеточных везикул

Для оценки концентрации белка ВВ использовался флюориметрический метод оценки белка с флюорескаминам. Около 10 мкл препарата ВВ смешивали с 3 мкл лизирующего буфера (0.25 М Tris-HCl, 8 % SDS, 0.2M DTT, pH 6,8) на льду (10 минут), кипятили при 95 градусах в течение 10 минут. После центрифугирования при 12000 g в течение 10 минут весь надосадок смешивали с 3 мкл раствора флюорескамина (3 мг/мл, CAS 38183, BLD Pharm, Shanghai, China) в DMSO. Измерение проводили на ридере Agilent BioTek Cytation 1 Cell Imaging Multimode Reader (Biotek, США), длина волны возбуждения - 365 нм, длина волны эмиссии - 470 нм. Предварительно строили калибровку с использованием водных стандартов трипсина.

### 2.2.4 Анализ HSPs и MMPs на поверхности CD9 и FABP4 везикул методом проточной цитофлуориметрии

Аликвоты ВВ (около 30 мкг белка) инкубировали с  $3 \times 10^5$  анти-CD9 или анти-FABP4 латексными частицами в 150 мкл PBS при 4°C в течение 14 часов, шейкер 400 об/мин и затем блокировали в 0,2 М глицине в течение 30 мин. После отмывки комплексов PBS для блокирования неспецифического связывания использовали human BD Fc Block (564219, BD, USA), далее комплексы окрашивали комплексом антител (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-APC (2 мкл на тест, FAA863Hu51, Cloud-Clone Corp.) в течение 20 мин при комнатной температуре. Анализ субпопуляций MMP9/MMP2/TIMP1 на поверхности ВВ выполнен аналогично, а именно использовались антитела anti-TIMP1-APC (2 мкл на тест, FAA522Hu51, Cloud-Clone Corp., Китай), anti-MMP2-PE (2 мкл на тест, FAA100Hu41, Cloud-Clone Corp., Китай) и anti-MMP9-FITC (2 мкл на

тест, FАА553Hu81, Cloud-Clone Corp., Китай). Цитометрия выполнена на приборе Cytoflex (Beckman Coulter, США), полученные данные анализировались с помощью программы CytExpert 2.0 Software.

## 2.2.5 Иммунопреципитация и Вестерн-блоттинг

Для исследования состава циркулирующих адипоцитарных везикул выполнена иммунопреципитация на предварительно отмытых в PBS альдегидных латексных частицах, покрытых антителами к FABP4 и CD11b. CD11b был выбран как наиболее универсальный маркер ВВ от клеток моноцитарно-макрофагального ряда, а FABP4 – как перспективный поверхностный маркер везикул адипоцитарного происхождения. Пять микролитров  $3 \times 10^5$  альдегид-сульфатных латексных частиц отмывали дважды по 100 мкл 0,1М MES-буфером pH 5,5 (3000g, 15 мин, комнатная температура) и ресуспендировали в 25 мкл MES-буфера. Затем к частицам добавляли по 3 мкг моноклональных антител против CD11b (E-AB-F10081A, Elabscience, USA) и FABP4 (FAB693Hu01, Cloud-Clone Corp., Китай) и инкубировали при комнатной температуре в течение 14 часов при перемешивании. Аликвоты выделенных из крови ВВ (около 35 мкг белка) инкубировали с комплексами антитело-латексные частицы при комнатной температуре в течение 2 часов, шейкер 400 rpm. Далее образцы центрифугировали при 600g, 4°C, 15 минут. Фракции в осадках представляли собой иммунопреципитированные ВВ моноцитарно-макрофагального происхождения и общую фракцию FABP4-позитивных ВВ плазмы крови. Фракции и супернатант ВВ после удаления CD11b-позитивных ВВ были лизированы (0.05 М Tris-HCl, pH 7.4; 0.15 М NaCl, 1 % Triton X-100, 1 % SDS) в присутствии смеси ингибиторов протеолиза в течение полутора часов на льду, далее образцы подвергали обработке ультразвуком на установке Sonopuls mini20 (Банделин, Германия) с ультразвуковым датчиком MS1 в течение 90 секунд также на льду.

После центрифугирования (13 000 g) в течение 15 минут экстракты протеинов были нормализованы по белку и использовались для электрофореза по Лемли. Разделенные электрофорезом белки переносили на PVDF мембрану (Immobilon, Millipore, США). Мембрану блокировали 1X раствором iBind (Invitrogen, США). Окрашивание первичными и вторичными антителами выполнено с использованием iBind Western Device (Thermo Scientific, США) в течение 3-3,5 часов. В работе использовали следующие моно- и поликлональные антитела: антитело к CD63 (CSB-MA004950A0, Cusabio, Китай) разведение 1:3000), антитело к FABP4 (MA5-29255, Invitrogen, США) разведение 1:2000, антитело к PPAR gamma (AF6284, Affinity Biosc., Китай) разведение 1:2000, антитело к перилипину-1 (DF7602, Affinity Biosc., Китай) разведение 1:2000, HRP-конъюгированные антикроличьи и антимышиные антитела (Cloud-Clone Corp., Китай), разведение 1:3000. Далее мембрану инкубировали с системой детектирования Affinity ECL субстрат для Вестерн блоттинга (KF8001, Affinity Biosc., Китай). Визуализацию осуществляли на системе ChemiDoc Touch (Bio-Rad, США). Плотность полос оценивали с помощью компьютерной программы ImageLab. Полученные результаты стандартизировали по уровню CD63 в ВВ и уровню соответствующих протеинов в ВВ больных с АТК с метаболическими нарушениями. В качестве стандарта молекулярной массы использовали MagicMark XP Western Protein Standard (LC5603, Life Technologies, США).

## **2.2.6 Выделение и количественный анализ микроРНК**

### **внеклеточных везикул**

Выделение суммарной РНК из внеклеточных везикул (ВВ) плазмы крови выполняли колоночным методом с использованием коммерческого набора RNA Solo (Евроген, Россия). Объем препаратов ВВ составлял 100 мкл на образец, полученных из 27 мл крови (исходя из минимального объема

крови для анализа одной микроРНК – 3 мл, необходимого для получения достаточного количества РНК). 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). Использование собственного лизис-буфера было направлено на повышение эффективности разрушения мембран внеклеточных везикул. При этом последующая очистка РНК проводилась на силикагель-колонках, что обеспечивало удаление детергентов и получение РНК, пригодной для дальнейшего анализа. К предварительно размороженным аликвотам ВВ объемом 100 мкл добавляли 50 мкл лизис-буфера, предварительно прогретого до 56 °С, перемешивали и инкубировали в течение 10 мин. Дальнейшую обработку образцов выполняли в соответствии с протоколом набора RNA Solo; удаление компонентов лизис-буфера и детергентов осуществлялось на этапах сорбции, промывки и элюции РНК на силикагель-матрице. Качественное и количественное определение суммарной РНК проводили с использованием флуориметра Quantus (Promega, США). Выделенную РНК хранили при температуре –80 °С до проведения анализа.

Получаемый препарат содержал фракцию малых РНК, включая микроРНК, пригодную для последующего анализа методом ОТ-ПЦР. Такой подход в целом соответствует рекомендациям MISEV, допускающим предварительный лизис внеклеточных везикул с последующим выделением нуклеиновых кислот для молекулярного анализа. В условиях ограниченного количества исходного материала применение универсального набора позволяет минимизировать потери РНК и обеспечить воспроизводимость результатов. Все этапы выделения РНК выполняли с использованием RNase-free расходных материалов и реагентов.

ПЦР в реальном времени с обратной транскрипцией выполняли на амплификаторе DTPPrime 4M1 (ДНК-Технология, Россия). Термостатирование проб проводили на твердотельном термостате ТТ-1

«Гном» (ДНК-Технология, Россия). Для амплификации использовали коммерческий набор OneTube RT-PCR (Евроген, Россия), обеспечивающий проведение обратной транскрипции и амплификации в одной пробирке. Детекцию продуктов амплификации осуществляли с использованием флуоресцентно-меченых олигонуклеотидов. Реакцию ставили в объеме 25 мкл, содержащем 5× OneTube PCRmix, олигонуклеотиды (конечная концентрация 0,2-0,4 мкМ), ревертазу и матрицу РНК. В качестве матрицы использовали суммарную РНК, выделенную из ВВ, в количестве, соответствующем рабочему диапазону набора (1-100 нг на реакцию). В каждой постановке использовали отрицательный контроль без матрицы и контроль без обратной транскрипции. Амплификацию проводили в следующем режиме: обратная транскрипция при 55 °С в течение 15 мин, активация полимеразы при 95 °С в течение 1 мин, затем 50 циклов, включающих денатурацию при 95 °С в течение 5 с, отжиг при температуре 50-68 °С в течение 20 с и элонгацию при 72 °С в течение 20 с регистрацией флуоресценции.

Результаты считали достоверными при значениях порогового цикла ( $C_q$ )  $\leq 38$  и различии между техническими повторами не более 1 цикла; значения  $C_q > 38$  интерпретировали как находящиеся за пределами чувствительности метода. Пороговое значение  $C_q \leq 38$  выбрано в соответствии с рекомендациями производителя набора, а также с учётом чувствительности метода. Значения выше данного порога рассматриваются как находящиеся на границе детекции и не используются для интерпретации результатов.

Олигонуклеотиды для амплификации и детекции микроРНК-124, микроРНК-506 и микроРНК-16 были синтезированы по индивидуальному заказу компанией Biolabmix (Россия) (таблица 3).

Таблица 3 - Параметры олигонуклеотидных праймеров

| Наименование олигонуклеотида | 5'-метка | Последовательность     | 3'-метка |
|------------------------------|----------|------------------------|----------|
| hsa-mir-124 forward          | HEX      | GCGCTAAGGCACGCGGTC     | BHQ1     |
| hsa-mir-506 forward          | HEX      | TAAGGCACCCTTCTGAGTAGA  | BHQ1     |
| hsa-mir-16 forward           | HEX      | AGCAGCACGTAAATATTGG    | BHQ1     |
| hsa-mir-124 reverse          | HEX      | GTGCAGGGTCCGAGGT       | BHQ1     |
| hsa-mir-506 reverse          | HEX      | GCGAGCACAGAATTAATACGAC | BHQ1     |
| hsa-mir-16 reverse           | HEX      | GTGCAGGGTCCGAGGT       | BHQ1     |

Полученные значения уровня РНК-мишени были нормализованы на микроРНК-16. Поскольку уровень микроРНК-16 во ВВ здоровых доноров и больных злокачественными новообразованиями достоверно не различается, данная микроРНК была выбрана в качестве нормирующей для исследуемых микроРНК [37, 75].

### 2.2.7 Биоинформационный анализ

Для отбора микроРНК, потенциально вовлечённых в развитие радиочувствительности, чувствительности к гипертермии и ассоциированных с раком прямой кишки, был проведён многоэтапный биоинформационный анализ. На первом этапе были сформированы ключевые слова для поиска, отражающие указанные критерии: radiosensitivity, hyperthermia sensitivity, rectal cancer, colorectal cancer, thermoradiochemotherapy response, radioresistance и др. Первичный поиск микроРНК проводился по сформированным ключевым словам в специализированных 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) с последующей фильтрацией по признаку ассоциации с

радиочувствительностью опухолевых клеток, ответом на гипертермическое воздействие и наличием данных об их обнаружении во внеклеточных везикулах. Для приоритизации кандидатных микроРНК применена собственная балльная система оценки, учитывавшая следующие параметры: наличие данных об их локализации во внеклеточных везикулах, связь с радиочувствительностью опухолевых клеток, чувствительностью к гипертермическому воздействию и ассоциацией с раком прямой кишки. По результатам данного этапа наибольшие суммарные баллы получили микроРНК-124 и микроРНК-506. Функциональная аннотация и анализ мишенных генов для этих микроРНК выполнены с использованием веб-ресурса DIANA-miRPath v4.0 (University of Thessaly, Греция) с привлечением встроенных баз данных: TargetScan v8.0 (Whitehead Institute for Biomedical Research, США), miRTarBase 2022 (National Cheng Kung University, Тайвань), TarBase v8.0 (University of Thessaly, Греция), microCLIP и microT-CDS. Построение сетей взаимодействий «микроРНК – гены» и белковых сетей проводилось в программной среде Cytoscape v3.8.0 (Institute for Systems Biology, США) с использованием расширений: CyTargetLinker v4.1.0 (Department of Bioinformatics – BiGCaT, Maastricht University, Нидерланды), RWRMTN v1.0 (Fudan University, Китай), stringApp v2.0.3 (STRING Consortium, Швейцария), yFiles Layout Algorithms v1.1.4 (yWorks GmbH, Германия). Биологическая интерпретация функций таргетных генов проведена с применением библиотеки PANTHER Classification System v8.0 (Protein ANalysis THrough Evolutionary Relationships; National Science Foundation, США), а также анализа данных о тканеспецифической экспрессии белков по STRING Database (STRING Consortium, Швейцария).

### 2.2.8 Статистическая обработка данных

Результаты исследования были обработаны с помощью специализированного программного обеспечения: STATISTICA 12.0 (TIBCO,

Palo Alto, CA, США), JASP 0.19.3 (Eric-Jan Wagenmakers, Department of Psychological Methods, University of Amsterdam, Нидерланды), и SPSS 28.0.1 (IBM, New York, NY, США). Данные в таблицах представлены как медианы с интерквартильным размахом (Me, Q1-Q3). Проверка соответствия закону нормального распределения проводилась с помощью критерия Шапиро-Уилка. Были использованы следующие статистические критерии и подходы: критерий Фридмана для связанных выборок, критерии Манна-Уитни и Краскера-Уоллеса для независимых выборок. Для выявления субпопуляций везикул, изменения которых в динамике ТРХТ ассоциировались с непосредственным ответом опухоли на ТРХТ, использовали дискриминантный анализ. На рисунках показан уровень значимости ( $p$ ) критерия лямбда Уилка для дискриминантной модели.

Для построения прогностических моделей использовали пошаговую логистическую регрессию. Чувствительность и специфичность моделей оценивалась с помощью ROC-анализа.

## ГЛАВА 3 РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

### 3.1 Характеристика FABP4-позитивных и «истинно-адипоцитарных» ВВ в плазме крови больных с аденомами толстой кишки, а также у больных РОК. Выявление наиболее приемлемого маркера для характеристики адипоцитарных ВВ в циркуляции

Для выполнения данного блока исследований была сформирована группа больных РОК  $n = 40$  (26 женщин и 14 мужчин,  $T_{2-4}N_{0-2}M_0$ , средний возраст  $59,6 \pm 1,6$  лет), имеющих метаболический синдром или метаболически здоровое ожирение по критериям IDF (2005). В качестве групп сравнения были сформированы группы пациентов с АТК с метаболическим синдромом или метаболически здоровым ожирением ( $n = 20$ ) и группа больных РОК с нормальной массой тела ( $n = 10$ ), не имеющих метаболических нарушений по критериям IDF (2005).

Выделенные ВВ при трансмиссионной электронной микроскопии визуализировались как округлые мембранные структуры размером не более 220 нм. Также в препаратах присутствовали немембранные структуры обычно размером не более 100 нм – “не-везикулы”. Выделенные везикулы 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).

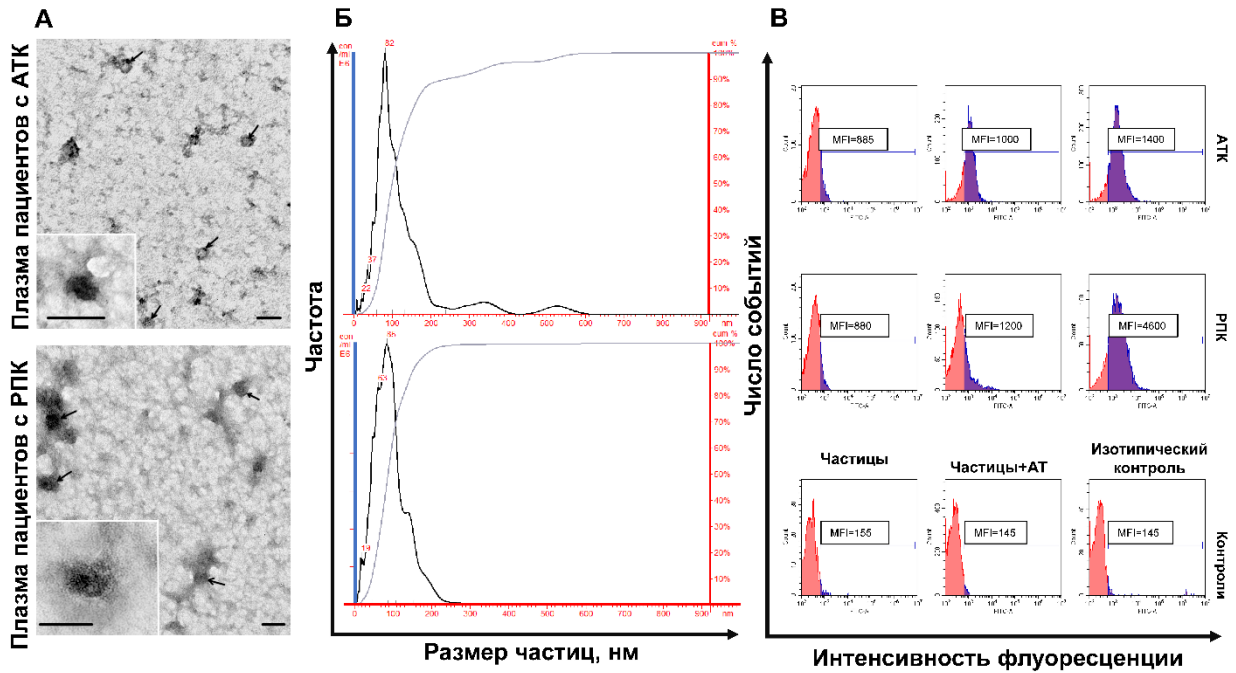


Рисунок 2 – Идентификация изолированных ВВ. (а) Трансмиссионная электронная микроскопия

Примечание - На вставках показаны малые ВВ. Масштабные линии соответствуют 100 нм. Электронная микроскопия, отрицательное окрашивание уранилацетатом; (б) Данные анализа NTA для ВВ, изолированных из плазмы крови больных ATK и РОК (в) экспрессия CD63, CD81 и CD24 на CD9-положительных ВВ больных с ATK и РОК. Показаны репрезентативные средние значения интенсивности флуоресценции (MFI), а также изотипический (гистограмма справа) и отрицательные контроли (гистограмма в центре и справа).

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-FABP4 латексных частицах (рисунок 3).

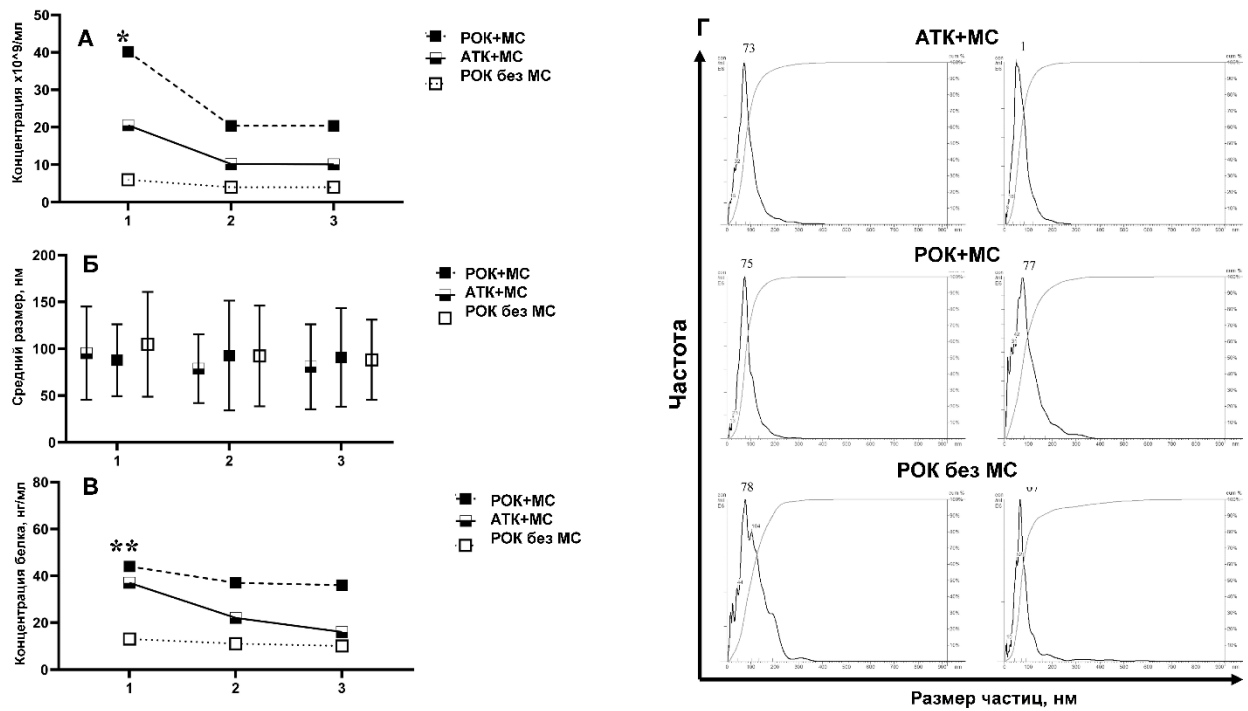


Рисунок 3 – Концентрация, размер ВВ и уровень общего белка во фракциях и супернатанте при иммунопреципитации

Примечание – (а) – концентрация ВВ в препаратах: 1 – до иммунопреципитации, 2 – в супернатанте после иммунопреципитации CD11b-позитивных ВВ, 3 – в супернатанте после последовательной иммунопреципитации CD11b-позитивных и FABP4-позитивных ВВ у больных с ATK с метаболическими нарушениями (штрихованные боксы), больных РОК с метаболическими нарушениями (темные боксы) и больных РОК без метаболических нарушений (светлые боксы); (б) – средний размер везикул у больных в супернатантах до и после иммунопреципитации; (в) – концентрация белка в образцах ВВ больных в супернатантах до и после иммунопреципитации; (г) – данные анализа NTA в образцах циркулирующих ВВ больных до иммунопреципитации (слева) и после иммунопреципитации CD11b-позитивных ВВ (справа).

Максимальная концентрация везикул отмечена у больных РОК с метаболическим синдромом. Концентрация везикул у больных с ATK 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 метаболическими нарушениями,  $p < 0,05$  (рисунок 3а). Во всех группах концентрация везикул снижалась при удалении везикул моноцитарно-макрофагального ряда (иммунопреципитации) и далее снижалась крайне незначительно после удаления из супернатанта еще и FABP4-позитивных ВВ (иммунопреципитация). Аналогичная динамика выявлена по белку ВВ.

После удаления везикул моноцитарно-макрофагального происхождения фракции по размеру (size) становятся более гомогенными (рисунок 3г), а средний размер везикул несколько уменьшался у больных с АТК с метаболическими нарушениями и у больных РОК без метаболических нарушений ( $95,3 \pm 11,0$  нм и  $106,7 \pm 6,04$  нм, соответственно, до иммунопреципитации;  $77,7 \pm 4,00$  нм и  $91,7 \pm 5,02$  нм, соответственно, после иммунопреципитации,  $p < 0,05$ . В тоже время, у больных РОК с метаболическими нарушениями средний размер везикул до и после иммунопреципитации практически не изменился,  $91,0 \pm 2,51$  нм и  $92,7 \pm 3,05$  нм, соответственно,  $p > 0,05$  (рисунок 3г).

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

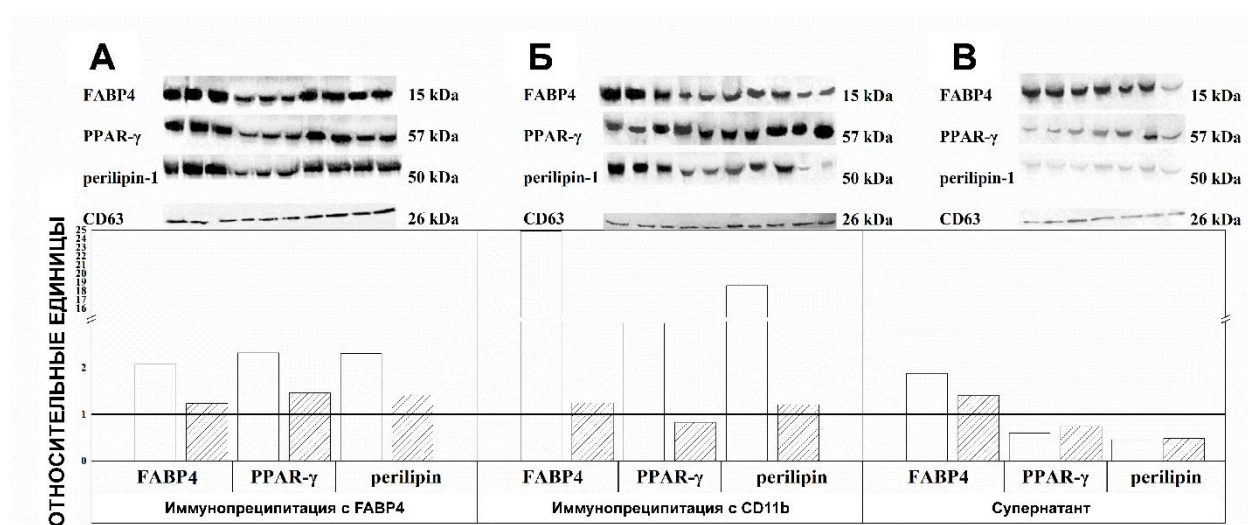


Рисунок 4 – Фракционный состав циркулирующих ВВ

Примечание – уровни FABP4, перилипина-1 и PPAR- $\gamma$  во фракциях циркулирующих ВВ после иммунопреципитации ВВ на латексных частицах, покрытых антителами к FABP4 (а), к CD11b (б) и в супернатанте после удаления ВВ моноцитарно-макрофагального происхождения (в) у больных РОК с метаболическими нарушениями (светлые столбцы) и РОК без метаболических нарушений (темные столбцы) по сравнению с больными АТК с метаболическими нарушениями (условная линия, равная 1). RU – условные единицы. Дорожки 1, 2, 3 – больные РОК без метаболических нарушений, 4-7 – больные РОК с метаболическими нарушениями, 8-10 – аденомы толстой кишки с метаболическими нарушениями (3а, 3б). Дорожки 1, 2 – больные РОК без метаболических нарушений, 3-5 – больные РОК с метаболическими нарушениями, 6-7 – аденомы толстой кишки с метаболическими нарушениями (3в). Иммунопреципитация с вестерн-блоттингом.

Видно, что все фракции циркулирующих везикул содержат комплекс адипоцитарных маркеров (FABP4, PPAR- $\gamma$  и перилипин-1). Преципитированные на CD11b-покрытых частицах ВВ моноцитарно-макрофагального происхождения у больных РОК без ожирения характеризовались сочетанной гиперэкспрессией FABP4 и перилипина-1. Для больных РОК с метаболическим синдромом или ожирением о такая гиперэкспрессия была нехарактерна (рисунок 4б). Истинно адипоцитарные везикулы, как мы полагаем, находятся преимущественно в препаратах после удаления из них везикул моноцитарно-макрофагального происхождения. Эта фракция характеризовалась наличием у всех больных комплекса адипоцитарных маркеров с преимущественной экспрессией в ней FABP4 как у больных с метаболическим синдромом/метаболически здоровым ожирением, так и больных без метаболических нарушений (рисунок 4в).

### 3.2 Уровень 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

Стратегия гейтирования популяций изолированных ВВ с сочетанной экспрессией HSPs и MMPs представлена на рисунке 5.

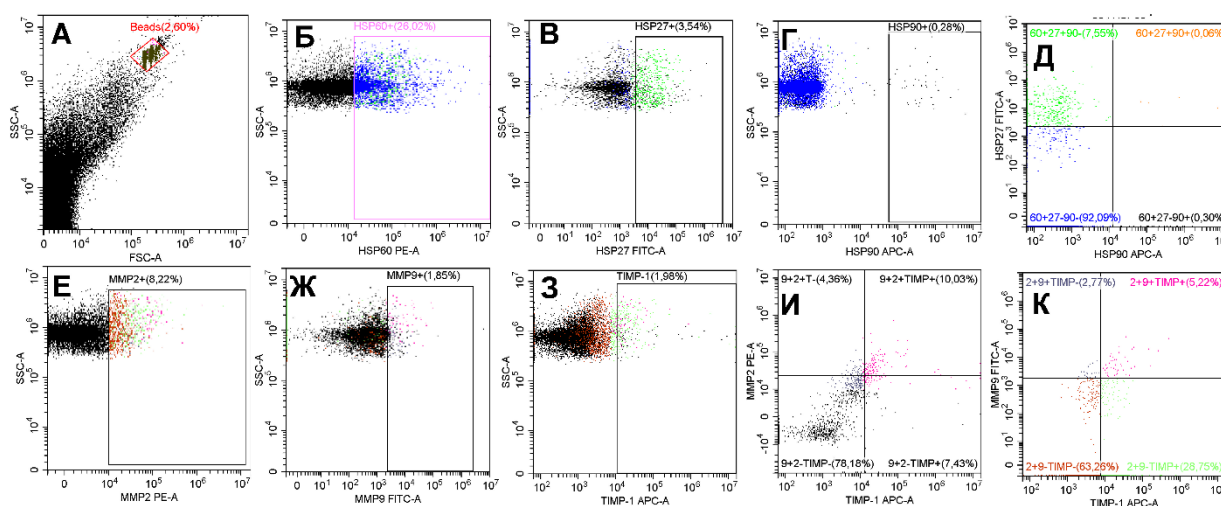


Рисунок 5 – Стратегия гейтирования ВВ

Примечание – первоначально выделяли гейт синглетных латексных частиц с сорбированными ВВ (5А), затем из этого гейта выделяли гейты ВВ, экспрессирующих HSPs, а также MMP2 и MMP9.

Анализ содержания MMP- и HSP-субпопуляций CD9-положительных везикул представлен в таблице 4, для FABP4-положительных везикул – в таблице 5. Данные корреляционного анализа везикулярных, клинических и метаболических параметров у больных РОК представлены на рисунке 6.

Таблица 4 – Сочетание MMPs и HSPs на поверхности CD9-позитивных ВВ плазмы крови у больных АТК и РОК

| Субпопуляция ВВ  | АТК, % (Ме (Q1; Q3)) | РОК, % (Ме (Q1; Q3)) | Р (критерий Манна-Уитни) |
|------------------|----------------------|----------------------|--------------------------|
| CD9+HSP60+       | 59,4 (44,2; 87,8)    | 17,2<br>(9,29; 54,9) | 0,02985                  |
| CD9+HSP60+27+90- | 8,79<br>(6; 24,4)    | 22<br>(5,28; 33,8)   | 0,2975                   |
| CD9+HSP60+27-90- | 90,7<br>(75; 93,4)   | 77,7<br>(66; 94,6)   | 0,491                    |
| CD9+MMP2+        | 12,1 (9,23; 20,3)    | 4,21<br>(2,63; 9,58) | 0,01884                  |
| CD9+2+9+TIMP+    | 1,04 (0,417; 1,9)    | 1,2<br>(0,428; 11)   | 0,584                    |
| CD9+2+9+TIMP-    | 6,87 (5,87; 8,09)    | 3,53<br>(1,33; 15,2) | 0,2813                   |
| CD9+2+9-TIMP+    | 21,9 (15,2; 24,8)    | 13,1<br>(8,8; 16,3)  | 0,02985                  |
| CD9+MMP9+        | 4,57 (3,86; 4,91)    | 4,66<br>(3,99; 8,96) | 0,4268                   |
| CD9+9+2-TIMP+    | 7,11 (5,93; 9,35)    | 10,4<br>(5,08; 24,9) | 0,2974                   |

Таблица 5 – Сочетание MMPs и HSPs на поверхности FABP4-позитивных ВВ плазмы крови у больных АТК и РОК

| Субпопуляция ВВ    | АТК, % (Ме (Q1; Q3)) | РОК, % (Ме (Q1; Q3))  | Р (критерий Манна-Уитни) |
|--------------------|----------------------|-----------------------|--------------------------|
| FABP4+HSP60+       | 56,2<br>(35,2; 77,1) | 26<br>(17,4; 38)      | 0,005392                 |
| FABP4+HSP60+27+90- | 7,95<br>(3,55; 22,7) | 15,3<br>(8,44; 31,1)  | 0,1214                   |
| FABP4+HSP60+27-90- | 90,6<br>(76,9; 96,1) | 84,7<br>(68,8; 91,1)  | 0,1641                   |
| FABP4+MMP2+        | 10,1<br>(7,5; 15,4)  | 6,73<br>(3,99; 11,3)  | 0,0642                   |
| FABP4+2+9+TIMP+    | 1,01<br>(0,39; 3,91) | 4,49<br>(0,385; 18,3) | 0,248                    |
| FABP4+2+9+TIMP-    | 8,35<br>(4,69; 10,4) | 2,77<br>(1,27; 14)    | 0,1602                   |
| FABP4+2+9-TIMP+    | 16,5<br>(12,2; 29,6) | 20,1<br>(15,2; 23,4)  | 0,8748                   |
| FABP4+MMP9+        | 5,54<br>(4,17; 6,03) | 6,14<br>(3,11; 7,87)  | 0,6938                   |
| FABP4+9+2-TIMP+    | 6,82<br>(6,29; 10,9) | 8<br>(5,69; 11,9)     | 0,9581                   |

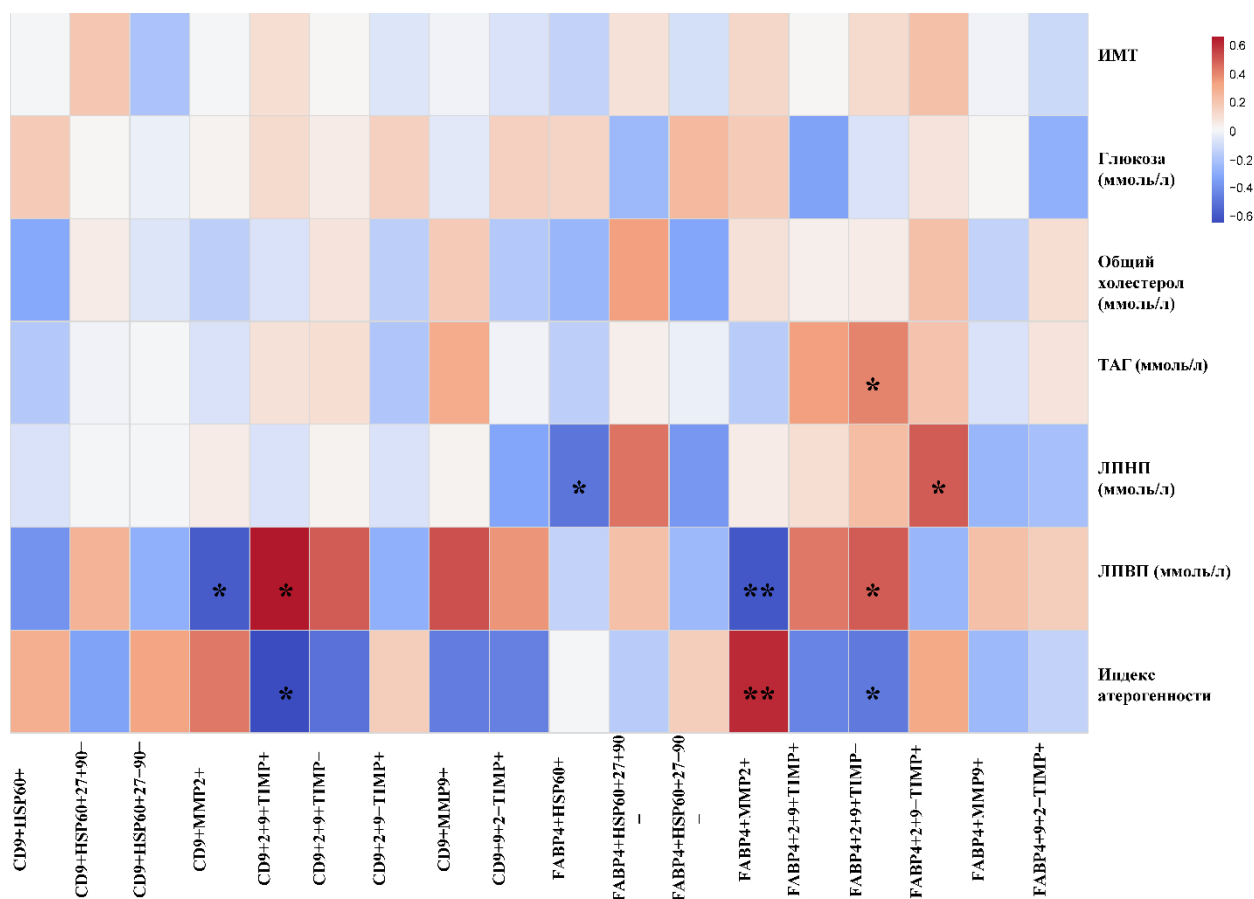


Рисунок 6 – Аннотированная тепловая карта корреляционных связей между метаболическими показателями (ИМТ, глюкоза, общий холестерол, ТАГ, ЛПНП, ЛПВП, индекс атерогенности) и экспрессией комбинаций белков на поверхности внеклеточных везикул (ВВ) плазмы крови у больных РОК

Примечание – По оси X - субпопуляции ВВ, характеризующиеся экспрессией CD9 или FABP4 в сочетании с белками HSP60, MMP2, MMP9 и TIMP1. По оси Y - клинико-биохимические показатели липидного и углеводного обмена. Цветовая шкала отражает коэффициент корреляции Спирмена (от -0,6 до +0,6): синие тона соответствуют отрицательным, а красные - положительным связям. Одной звёздочкой (\*) отмечены статистически значимые корреляции при  $p < 0,05$ ; двумя звёздочками (\*\*) - корреляции с высокой значимостью при  $p < 0,01$ .

Анализ корреляций между поверхностным фенотипом внеклеточных везикул (ВВ) и метаболическими показателями у больных колоректальным раком выявил ряд значимых ассоциаций, отражающих вклад различных

субпопуляций ВВ в липидно-метаболическую перестройку организма, особенно на фоне избыточной массы тела. Отмечено, что субпопуляции CD9+MMP2+MMP9+TIMP+ отрицательно коррелировали с уровнем липопротеинов высокой плотности (ЛПВП) и индексом атерогенности, что может указывать на участие этих ВВ в ремоделировании внеклеточного матрикса и компенсаторном торможении MMP-активности при системном воспалении. TIMP1, представленный на таких везикулах, способен модулировать баланс протеолитических процессов и косвенно влиять на липидный обмен, что описано для сочетания метаболического синдрома и опухолевого роста [22]. Аналогичная отрицательная корреляция между уровнем CD9+MMP2+ ВВ и концентрацией ЛПВП подтверждает связь MMP-положительных субпопуляций с деградацией липид-ассоциированных белков и снижением эффективности обратного транспорта холестерина [84]. Увеличение доли FABP4+HSP60+ ВВ сопровождалось снижением уровня липопротеинов низкой плотности (ЛПНП), что отражает митохондриальный стресс адипоцитов и высвобождение стресс-индуцированных ВВ, участвующих в межклеточной сигнализации при нарушенном липидном обмене [20].

Наиболее значимые корреляции ( $p < 0,01$ ) были выявлены для субпопуляции FABP4+MMP2+: положительная связь с индексом атерогенности и отрицательная - с уровнем ЛПВП. Вероятно, эти ВВ отражают системную активацию MMP-зависимых процессов, что соответствует концепции воспалительного фенотипа при опухолевых и метаболических заболеваниях [97]. Разнонаправленные связи продемонстрировала субпопуляция FABP4+2+9+TIMP-: отрицательная корреляция с индексом атерогенности и положительные - с ЛПВП и ТАГ. В противоположность этому субпопуляция FABP4+2+9-TIMP+ положительно коррелировала с ЛПНП, что указывает на её вовлечённость в перестройку липидного профиля. TIMP1, обладающий цитокиноподобной активностью,

может усиливать экспрессию липогенетических генов и способствовать сосудистому ремоделированию [25].

В совокупности полученные данные свидетельствуют, что FABP4-ассоциированные ВВ преимущественно связаны с параметрами липидного обмена, формируя атерогенный и воспалительный фенотип при РОК, тогда как CD9-положительные субпопуляции отражают системный стресс и компенсаторное торможение перестройки внеклеточного матрикса. Таким образом, состав внеклеточных везикул, особенно FABP4+MMP2+ и TIMP-модифицированных субпопуляций, тесно коррелирует с дисбалансом липопротеинов и может рассматриваться как потенциальный индикатор метаболических осложнений и прогрессии опухолевого процесса.

У больных с АТК с ожирением или МС фенотип ВВ не ассоциировался с возрастом и метаболическими параметрами.

### **3.3 Ассоциированные с адипоцитарными ВВ маркеры повышенного онкологического риска у больных с аденомами толстой кишки с ожирением**

Краткая характеристика пациентов с АТК и РОК, включенными в этот раздел исследования представлена в таблице 6.

Таблица 6 – 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 |

| Параметры                               | РОК         | АТК       | Р     |
|-----------------------------------------|-------------|-----------|-------|
| Наличие метаболического синдрома, n (%) | 12 (30 %)   | 14 (70 %) | <0,05 |
| Наличие СД2, n (%)                      | 15 (37,5 %) | 1 (5 %)   | <0,05 |

У пациентов с РОК вероятность развития метаболического синдрома и СД2 типа была значительно выше, чем у пациентов с АТК, хотя индекс массы тела в обеих группах не различался. Диаграммы размаха экспрессии HSPs и MMPs на поверхности циркулирующих CD9- и FABP4-позитивных ВВ у больных РОК и АТК с метаболическими нарушениями представлены на рисунке 7.

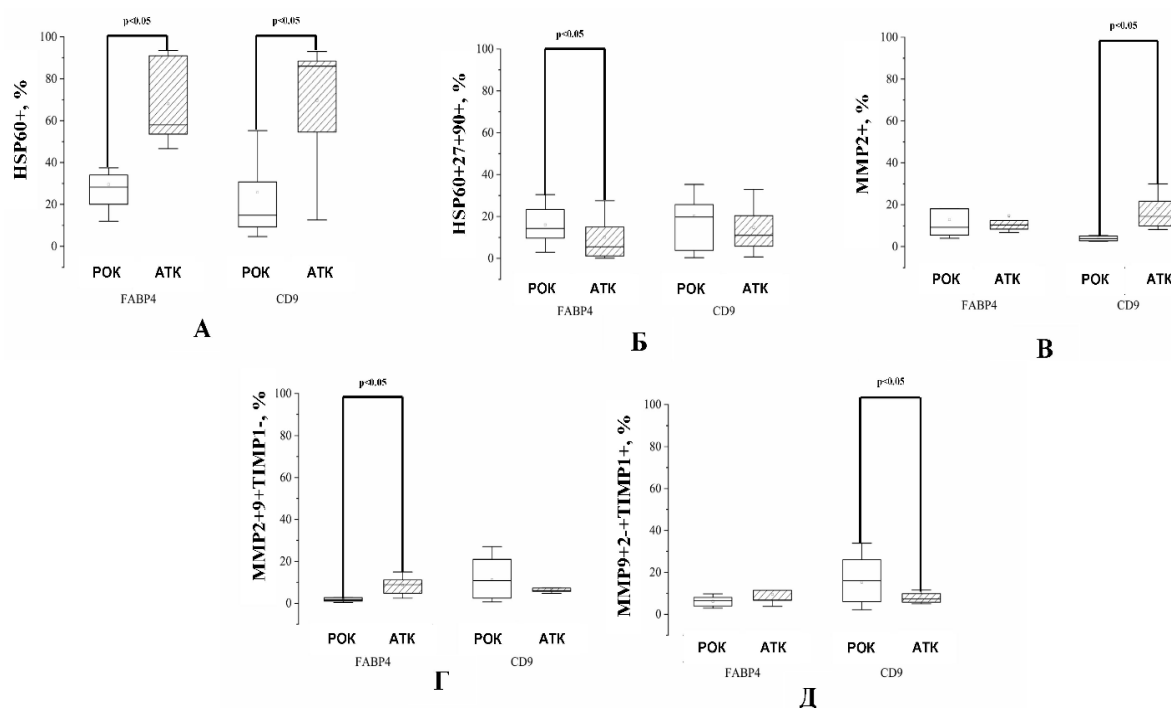


Рисунок 7 – Диаграммы размаха экспрессии HSPs и MMPs на поверхности CD9- и FABP4-позитивных ВВ у пациентов с РОК и АТК

Примечание – на каждом из рисунков: слева – FABP4-позитивные ВВ, справа – CD9-позитивные ВВ; РОК – рак ободочной кишки, АТК – аденомы

толстой кишки. По оси ординат – популяции ВВ в процентах, р – уровень значимости по критерию Краскера-Уоллеса для независимых выборок.

Выявлены статистически значимые различия в экспрессии HSP60 на поверхности как CD9-позитивных, так и FABP4- позитивных ВВ между больных с РОК и АТК, имеющих метаболический синдром или метаболически здоровое ожирение. Кроме того, выявлены еще две популяции CD9-позитивных (MMP2+MMP9-TIMP1+ и MMP2+ везикулы) и 2 популяции FABP4-позитивных (HSP60+HSP27+HSP90- и MMP2+MMP9+TIMP1-) ВВ, уровень которых статистически значимо различался у больных с АТК и РОК. Проведенный ROC-анализ выявил шесть субпопуляций ВВ, прогнозирующих онкологический риск у пациентов с АТК, из них три CD9-позитивных субпопуляции (CD9+HSP60+, CD9+MMP2+, CD9+MMP2+MMP9-TIMP1+) и три FABP4-позитивных субпопуляции (FABP4+HSP60+, FABP4+HSP60+HSP27+HSP90- и FABP4+MMP2+MMP9+TIMP1-). Клинические параметры, включенные в анализ (пол, возраст, индекс массы тела, уровень гликемии натощак), не явились значимыми предикторами онкологического риска. Результаты ROC-анализа приведены в таблице 7.

Таблица 7 - Результаты ROC-анализа субпопуляций ВВ для прогноза онкологического риска у больных АТК

| Переменные         | Площадь под кривой (AUC) | Точка отсечения | Асимптотическая знач-ть | ДИ 95 %  |           | Ниж. гр. | Верх. Гр. |
|--------------------|--------------------------|-----------------|-------------------------|----------|-----------|----------|-----------|
|                    |                          |                 |                         | Ниж. гр. | Верх. Гр. |          |           |
| CD9+HSP60+         | 0,844                    | 37,4            | 0,011                   | 0,653    | 1         | 78       | 90        |
| CD9+MMP2+          | 0,988                    | 8,32            | 0,003                   | 0,953    | 1         | 89       | 90        |
| FABP4+HSP60+       | 0,922                    | 48,2            | 0,002                   | 0,772    | 1         | 89       | 90        |
| FABP4+HSP60+27+90- | 0,727                    | 8,64            | 0,102                   | 0,477    | 0.961     | 89       | 70        |

| Переменные                                                                                                                                                                 | Площадь под кривой (AUC) | Точка отсечения | Асимптотическая знач-ть | ДИ 95 %  |           | Ниж. гр. | Верх. Гр. |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------|-----------------|-------------------------|----------|-----------|----------|-----------|
|                                                                                                                                                                            |                          |                 |                         | Ниж. гр. | Верх. Гр. |          |           |
| FABP4+MMP2+9+TIMP1-                                                                                                                                                        | 0,988                    | 4,73            | 0,003                   | 0,953    | 1         | 98       | 90        |
| CD9+MMP2+9-TIMP1+                                                                                                                                                          | 0,866                    | 17,6            | 0,007                   | 0,671    | 1         | 89       | 90        |
| Примечания:<br>1 AUC – показатель, который позволяет суммировать производительность модели одним числом, измеряя площадь под кривой ROC;<br>2 ДИ – доверительный интервал. |                          |                 |                         |          |           |          |           |

Проведенный ROC-анализ подчеркивает важность разработки эффективных моделей прогноза онкологического риска у пациентов с АТК, а также подтверждает целесообразность использования ВВ в качестве прогностических маркеров онкологического риска.

На основании полученных результатов разработанная модель логистической регрессии имеет вид:

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

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).

### **3.4 Состав CD9-позитивных и FABP4-позитивных циркулирующих ВВ на этапах комбинированного лечения с термохимиорадитерапией**

#### **3.4.1 Изменение фенотипа циркулирующих ВВ в процессе проведения ТРХТ**

Кровь для выделения ВВ и оценки их состава брали в динамике проведения ТРХТ. Были выбраны следующие точки

- 1-я точка – до начала лечения;
- 2-я точка – середина курса ТРХТ;
- 3-я точка – через 6-7 недель после окончания курса ТРХТ (приблизительно 3 месяца после первой точки);
- 4-я точка – через 6 месяцев после первой точки.

Интервал для забора 3-й контрольной точки целесообразен ввиду того, что в этот срок полностью реализуется эффект от проведенного курса ТРХТ, когда достигаются максимальные показатели непосредственной эффективности лечения. Кроме того, в соответствии с требованиями клинических рекомендаций АОР, необходимо соблюдение следующей периодичности проведения контрольного обследования пациентов после завершения лечения по поводу РПК с целью своевременной диагностики прогрессирования заболевания – в первые 1-2 года обследование рекомендуется проводить каждые 3-6 месяцев. 4 точка нашего исследования укладывалась в эти сроки, при этом было подтверждено нахождение пациента в состоянии полной клинико-морфологической регрессии.

Из 40 пролеченных по данному способу больных РПК у 22 зарегистрирована полная клинико-морфологическая регрессия, у 18 наблюдалась остаточная опухоль.

Изменения субпопуляций CD9-позитивных ВВ, представленные в таблице 8, в динамике проведения ТРХТ имели волнообразный характер и были статистически не значимы.

Таблица 8 – Динамика экспрессии маркеров HSPs, MMPs и TIMP1 на CD9-позитивных ВВ на этапах комбинированного лечения с ТРХТ

| Популяции<br>CD9+ ВВ | Экспрессия маркеров в контрольных точках, % |                         |                         |                         | p     |
|----------------------|---------------------------------------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|-------|
|                      | 1                                           | 2                       | 3                       | 4                       |       |
| HSP60+               | 14,90<br>(9,25; 55,28)                      | 16,86<br>(13,75; 25,51) | 19,05<br>(11,91; 45,71) | 16,75<br>(10,73; 31,14) | 0,457 |
| HSP60+27+90-         | 19,80<br>(4,44; 35,3)                       | 16,97<br>(5,46; 30,21)  | 12,74<br>(1,52; 37,70)  | 19,75<br>(9,70; 42,25)  | 0,241 |
| HSP60+27-90-         | 79,64<br>(64,56; 95,56)                     | 79,17<br>(69,80; 94,29) | 86,83<br>(61,79; 98,18) | 79,81<br>(57,15; 89,71) | 0,241 |
| MMP2+                | 4,68<br>(2,97; 9,98)                        | 6,84<br>(2,84; 18,57)   | 5,73<br>(3,30; 9,44)    | 4,86<br>(2,09; 9,95)    | 0,272 |
| MMP2+9+TIMP1+        | 1,07<br>(0,40; 10,79)                       | 0,54<br>(0,15; 1,92)    | 2,21<br>(0,36; 12,57)   | 1,04<br>(0,68; 11,46)   | 0,682 |
| MMP2+9+TIMP1-        | 2,79<br>(1,18; 15,46)                       | 1,48<br>(1,20; 2,16)    | 1,98<br>(1,17; 6,29)    | 4,59<br>(1,89; 9,70)    | 0,753 |
| MMP2+9-TIMP1+        | 15,32<br>(9,15; 16,62)                      | 12,11<br>(8,54; 19,02)  | 13,30<br>(8,61; 20,70)  | 17,25<br>(10,70; 21,05) | 0,212 |
| MMP9+                | 4,52<br>(3,76; 6,84)                        | 3,22<br>(3,01; 5,30)    | 4,27<br>(2,86; 4,90)    | 3,71<br>(3,29; 5,02)    | 0,960 |
| MMP9+2-TIMP1+        | 8,48<br>(4,89; 26,05)                       | 7,14<br>(5,87; 16,96)   | 7,14<br>(5,83; 11,37)   | 9,37<br>(6,62; 12,45)   | 0,682 |

Популяции FABP4+MMP2+, FABP4+MMP2+9+TIMP1+, FABP4+MMP2+9+TIMP1-, FABP4+MMP2+9+TIMP1-, FABP4+MMP9+ и FABP4+MMP2-9+TIMP1+ адипоцитарных везикул также незначительно изменялись в динамике проведения ТРХТ, однако уровень FABP4+HSP60+, FABP4+HSP60+27+90-, FABP4+HSP60+27-90- и FABP4+MMP2+9-TIMP1+

ВВ - в динамике изменялся статистически значимо ( $p = 0,006$ ,  $p = 0,005$ ,  $p = 0,005$ ,  $p = 0,022$ ) (таблица 9).

Таблица 9 – Динамика экспрессии маркеров HSPs, MMPs и TIMP1 на FABP4-позитивных внеклеточных везикулах на этапах комбинированного лечения с ТРХТ

| Популяции<br>FABP4+ ВВ | Экспрессия маркеров в контрольных точках, % |                         |                         |                         | p            |
|------------------------|---------------------------------------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|--------------|
|                        | 1                                           | 2                       | 3                       | 4                       |              |
| HSP60+                 | 28,08<br>(18,23; 38,62)                     | 34,84<br>(21,22; 51,72) | 39,34<br>(35,48; 63,08) | 30,36<br>(20,35; 41,04) | <b>0,006</b> |
| HSP60+27+90-           | 13,60<br>(10,03; 18,09)                     | 14,82<br>(8,96; 31,19)  | 6,51<br>(1,50; 10,53)   | 6,06<br>(4,43; 13,04)   | <b>0,005</b> |
| HSP60+27-90-           | 86,40<br>(81,72; 89,89)                     | 84,99<br>(68,81; 90,81) | 93,31<br>(89,36; 98,34) | 93,85<br>(86,36; 95,51) | <b>0,005</b> |
| MMP2+                  | 8,32<br>(6,55; 11,68)                       | 7,77<br>(5,81; 10,41)   | 7,75<br>(5,46; 13,24)   | 8,02<br>(6,40; 9,53)    | 0,988        |
| MMP2+9+TIMP1+          | 0,79<br>(0,23; 4,49)                        | 0,89<br>(0,10; 4,88)    | 1,63<br>(0,29; 4,64)    | 0,87<br>(0,07; 3,68)    | 0,160        |
| MMP2+9+TIMP1-          | 1,79<br>(0,85; 2,77)                        | 2,62<br>(0,46; 5,92)    | 1,89<br>(0,99; 4,57)    | 1,09<br>(0,52; 1,96)    | 0,231        |
| MMP2+9-TIMP1+          | 21,41<br>(17,51; 28,75)                     | 17,18<br>(9,47; 23,43)  | 24,38<br>(11,84; 32,78) | 16,54<br>(7,73; 16,32)  | <b>0,022</b> |
| MMP9+                  | 4,94<br>(1,44; 6,59)                        | 3,77<br>(1,47; 5,59)    | 4,19<br>(1,45; 6,83)    | 3,96<br>(1,69; 4,65)    | 0,178        |
| MMP2-9+TIMP1+          | 6,03<br>(4,25; 8,00)                        | 5,36<br>(3,24; 8,18)    | 1,43<br>(5,13; 8,72)    | 5,46<br>(3,86; 8,52)    | 0,341        |

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

Далее был проведен анализ состава везикул во взаимосвязи с эффективностью ТРХТ. Результаты анализа представлены на рисунке 8.

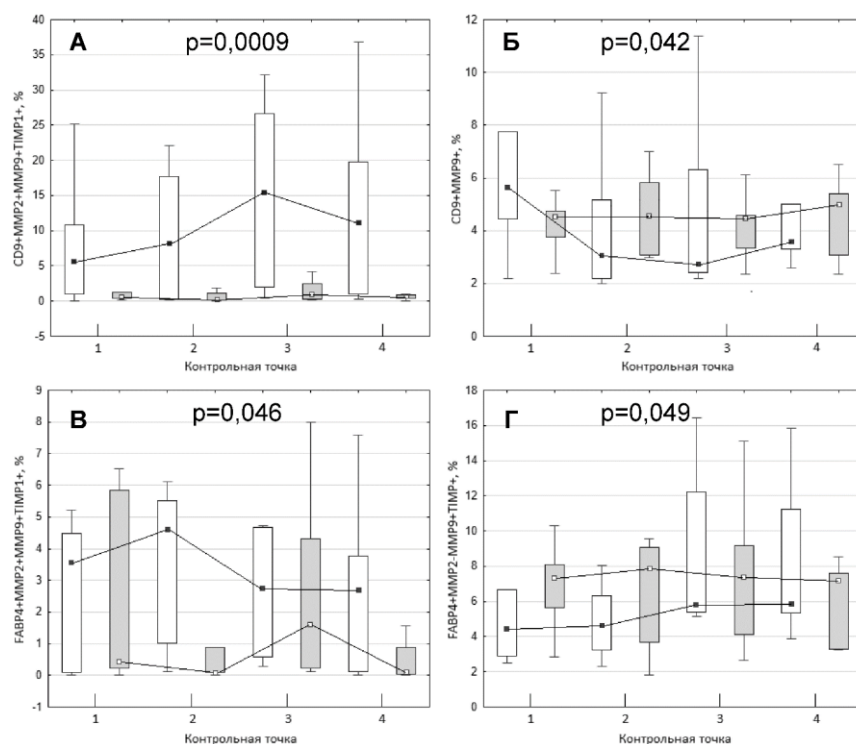


Рисунок 8 – Экспрессия MMPs и TIMP1 на CD9-позитивных (А-Б) и FABP4-позитивных (В-Г) везикулах больных РПК в зависимости от эффективности терморадитерапии

Примечание – 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.

### 3.4.3 Биоинформатический поиск ассоциированных с термо- и радиочувствительностью микроРНК

Биоинформатический поиск микроРНК представлял некоторую сложность, так как необходимо было выявить экспрессированные во внеклеточных везикулах микроРНК, ассоциированные с гипертермией, радиотерапией, в контексте рака прямой кишки. Стратегия биоинформатического поиска представлена на рисунке 9.

В качестве исходной точки были выявлены ключевые слова, по которым осуществлялся поиск данных микроРНК. Для поиска

использовалась база данных HMDD 4.0 (Human microRNA Disease Database, China) в комбинации с mirTarBase. Проводился отбор микроРНК, ассоциированных с эффективностью ТРХТ, ключевыми словами для поиска являлись термины, описывающие ТРХТ, КРР, а также ассоциацию с внеклеточными везикулами: colorectal cancer, hyperthermia, chemotherapy, radiotherapy, colon cancer, rectal cancer, extracellular vesicles и др. Всего было отобрано 13 кандидатных микроРНК. В итоге были отобраны две наиболее удовлетворительные параметрам микроРНК: микроРНК-124 и микроРНК-506. В качестве референтной микроРНК была выбрана микроРНК-16, как микроРНК со стабильной экспрессией как в здоровых, так и в опухолевых клетках.

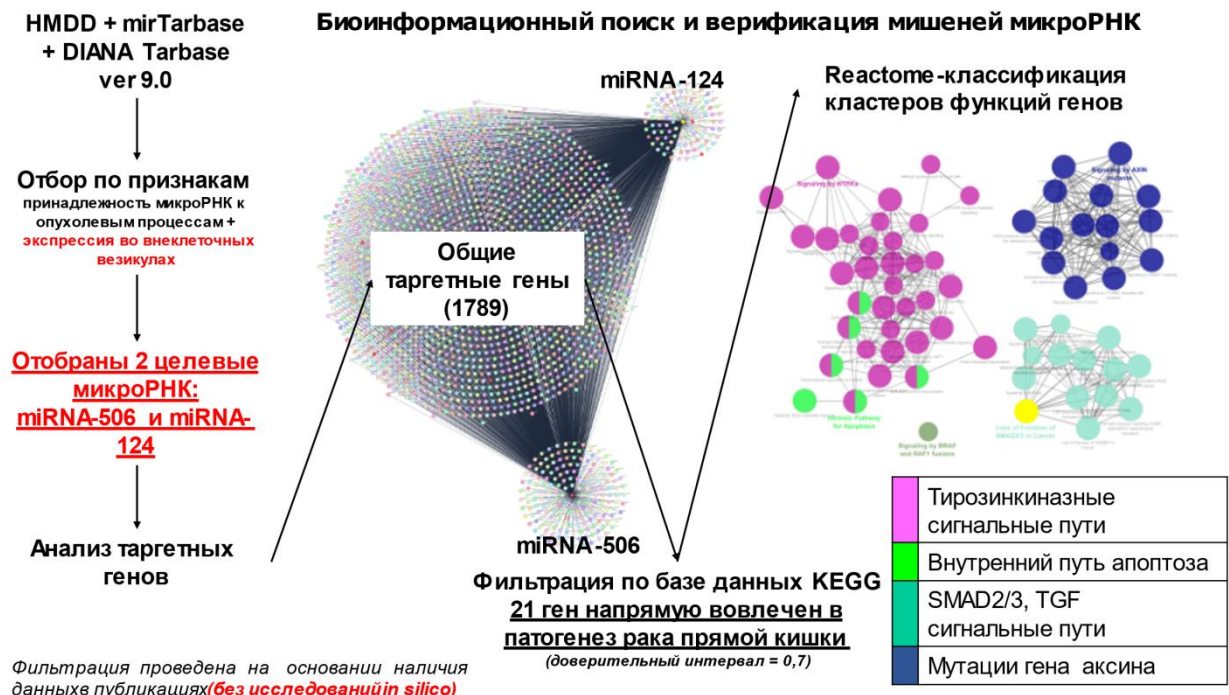


Рисунок 9 – Стратегия биоинформатического поиска и верификации мишеней микроРНК 124 и 506

### 3.4.4 Экспрессия микроРНК-124 и микроРНК-506 в составе ВВ плазмы крови у больных РПК с ожирением на этапах терморadioхимиотерапии

Из ВВ, полученных от пациентов в каждой контрольной точке, 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 контрольной точке (рисунок 10).

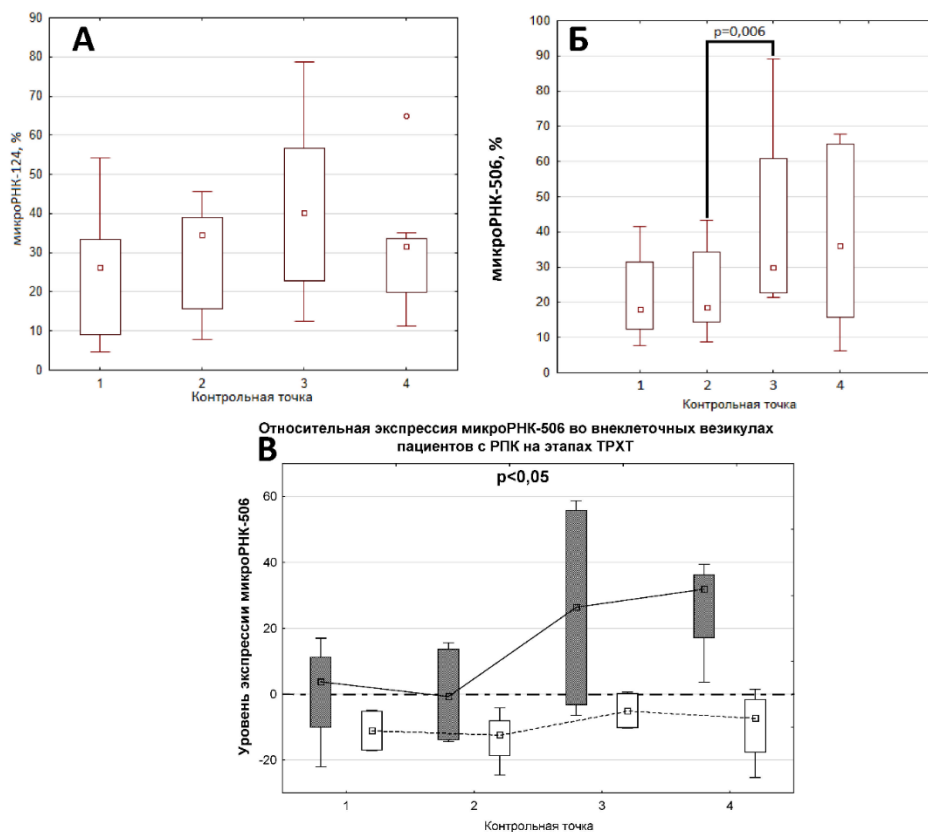


Рисунок 10 – Относительная экспрессия микроРНК-124 и микроРНК-506 в составе ВВ пациентов с РПК на этапах ТРХТ (А и Б)

Примечание – 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.

При этом по данным дискриминантного анализа установлено, что у пациентов с полной регрессией опухоли по окончании лечения уровень экспрессии везикулярной микроРНК-506 был выше, чем у пациентов с остаточной опухолью ( $p = 0,022$ ) (рисунок 10В).

### 3.4.5 Построение математической модели для прогнозирования эффективности терморадиохимиотерапии у больных раком прямой кишки с оценкой показателей чувствительности и специфичности

Краткая характеристика пациентов с РПК, включенными в этот раздел исследования представлена в таблице 10.

Таблица 10 – Характеристика больных РПК, включенных в исследование для прогнозирования оценки эффективности ТРХТ

| Параметр                                                                                                                                         |                   | Полная регрессия (n = 22) | 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/м² (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 %)                  |                      |
| Примечания:                                                                                                                                      |                   |                           |                             |                      |
| 1 параметр Mandard не оценивается, т.к. был использован при формировании групп сравнения;                                                        |                   |                           |                             |                      |
| 2 статистическую значимость различий оценивали с использованием U-критерия Манна–Уитни и точного критерия Фишера при уровне значимости p < 0,05. |                   |                           |                             |                      |

Для прогнозирования непосредственной эффективности ТРХТ был выполнен регрессионный анализ в двух вариантах: в первом варианте в качестве предикторов в модель были включены клинические параметры (пол, возраст, степень дифференцировки опухоли, показатели метаболического статуса), субпопуляции ВВ и уровни микроРНК до лечения, во втором варианте – клинические параметры и уровни микроРНК ВВ до лечения.

В первом варианте 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 8. Далее по формуле (1) рассчитывалась  $P$  – 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. Оценка чувствительности и специфичности данной модели составила 83,3 % и 70 %, соответственно. AUROC модели составил 0,77, доверительный интервал составил (0,65-0,88).

Во втором варианте уравнение имело вид  $F = - 25,174 * [\text{возраст}] + 3,498 * [\text{микроРНК-506}] + 155,478$ , где в качестве переменных в модели используются возраст пациентов и экспрессия везикулярной микроРНК-506 до начала лечения. Показатели чувствительности и специфичности второй регрессионной модели (81,0 % и 56,5 %, соответственно) были ниже

аналогичных показателей первой модели. Хотя вторая регрессионная модель имеет предельно простой вид, однако вследствие низкой ее специфичности, для прогнозирования эффективности ТРХТ у больных РПК первая модель более приемлема.

## ГЛАВА 4 ОБСУЖДЕНИЕ СОБСТВЕННЫХ РЕЗУЛЬТАТОВ ИССЛЕДОВАНИЯ

Качественная и количественная идентификация адипоцитарных ВВ сопряжена с рядом трудностей, ключевой из которых является разнообразие клеточного состава жировой ткани, в которой присутствуют как адипоциты, так и резидентные макрофаги и ММСК, секретирующие внеклеточные везикулы. С другой стороны, неассоциированные с жировой тканью моноциты и макрофаги, например, макрофаги ткани легких, селезенки, макрофаги атеросклеротических бляшек, а также, высокоспециализированные клетки крипт тонкого кишечника – клетки Панета также экспрессируют классические адипоцитарные маркеры, везикулы от которых могут находиться в циркуляции [7, 28, 102].

Аналогичная выполненной нами методология использовалась для характеристики ВВ адипоцитарного происхождения, находящихся в циркуляции у человека. В этой работе были представлены убедительные данные, что сочетание CD9, FABP4, PPAR- $\gamma$ , адипонектина и перилипина-1 в выделенных из плазмы крови ВВ с наибольшей вероятностью детектирует именно ВВ адипоцитарного происхождения [10]. FABP4 является переносчиком жирных кислот, который преимущественно экспрессирован на адипоцитах и клетках моноцитарно-макрофагального ряда. Он связывает длинноцепочечные жирные кислоты и ретиноевую кислоту, а также транспортирует их в ядро. В тоже время FABP4 является популярным и часто используемым маркером ВВ адипоцитарного происхождения, имеющим определенные преимущества перед другими кандидатными маркерами (адипонектин, PPAR- $\gamma$ , перилипин-1) такие как, высокая концентрация и поверхностная локализация маркера на ВВ, позволяющая использовать удобный и высокопроизводительный метод проточной цитометрии, чтобы визуализировать адипоцитарные везикулы [47, 54, 58]. Хотя нельзя исключать, что FABP4 как секретируемый белок присутствует в

плазме крови в растворимом виде и сорбируется в так называемой “короне” ВВ [54]. Анализ ВВ, выделенных из *ex vivo* культур эксплантатов жировой ткани человека, выявил как адипонектин-положительные, так и адипонектин-отрицательные подгруппы с помощью дифференциального ультрацентрифугирования в сочетании с иммуноблоттингом [28, 47]. Уровень циркулирующих ВВ, позитивных по перилипину 1 резко увеличился как у мышей с диет-индуцированным ожирением. У людей с ожирением уровень перилипин-позитивных циркулирующих ВВ положительно коррелировал с уровнем инсулина в плазме и индексом инсулинорезистентности. Это также нацеливает в перспективе на возможность использования перилипин-1-позитивных ВВ как биомаркера инсулинорезистентности, однако этот маркер может быть определен только иммуноблоттингом [28]. Используя FABP4 в качестве маркера для идентификации и сорбции адипоцитарных ВВ, Hubal M. et al. обнаружили, что содержание микроРНК в циркулирующих адипоцитарных ВВ, нацеленных на различные гены в каноническом пути передачи сигналов, опосредованного рецептором инсулина, значительно изменилось через 1 год после бариатрической хирургии. Эти изменения были связаны с оцениваемыми индексами инсулинорезистентности пациентов [30].

На основании полученных нами результатов можно заключить, что фракция супернатанта ВВ после удаления из нее CD11b- позитивных ВВ в нашем исследовании представляет фракцию “истинно адипоцитарных” ВВ. Судя по полученным нами данным в этой фракции во всех клинических группах уровень FABP4 был выше по сравнению с другими адипоцитарными маркерами. Все изученные адипоцитарные маркеры присутствовали в этой фракции ВВ. При анализе фракции CD11b-иммунопреципитированных ВВ выявлено, что у всех пациентов эта фракция содержит комплекс маркеров FABP4, перилипин-1 и PPAR- $\gamma$ , однако соотношение белков различно. Преципитированные на CD11b-покрытых частицах ВВ моноцитарно-макрофагального происхождения у больных РОК без ожирения

характеризовались сочетанной гиперэкспрессией FABP4 и перилипина-1, в то время как для больных РОК с метаболическим синдромом или ожирением такая гиперэкспрессия была нехарактерна. Из этого следует, что у больных без метаболических нарушений, по-видимому, для более корректной характеристики циркулирующих ВВ сначала из препаратов ВВ необходимо удалить методом иммунопреципитации или аналогичными методиками фракцию CD11b-позитивных моноцитарно-макрофагальных ВВ, а в супернатанте после удаления/сорбции преципитированных ВВ можно изучать состав адипоцитарных везикул, например, используя предлагаемый набор маркеров. Причем у больных с метаболическими нарушениями с учетом незначительной экспрессии FABP4 в составе CD11b-иммунопреципитированных ВВ, по-видимому, предварительная деплеция препаратов везикул не столь необходима.

При выполнении проточной цитометрии с укрупнением везикул на латексных или магнитных частицах для изучения циркулирующих адипоцитарных везикул наиболее перспективно и логично использовать покрытые антителами к FABP4 частицы. Такой подход использовался нами далее при анализе субпопуляционного состава везикул у больных с КРР и АТК с метаболическими нарушениями.

Выявленные взаимосвязи состава популяций CD9-позитивных и FABP4-позитивных циркулирующих ВВ у больных РОК с метаболическими нарушениями соответствуют данным литературы. Существенный вклад в пул адипоцитарных ВВ вносят везикулы, происходящие из собственно жировой ткани и резидентных мононуклеаров [39, 58]. Нерезидентные для жировой ткани мононуклеарные клетки, такие как, например, макрофаги ткани легкого, селезенки, атеросклеротические макрофаги, клетки Панета – также способны к экспрессии адипоцитарных внеклеточных везикул [17, 49, 93].

У пациентов с предраковыми поражениями толстой кишки риск развития КРР остается повышенным даже после хирургического удаления предраковых образований. Тубулярно-ворсинчатые аденомы

озлокачиваются в 25-40 % случаев, а риск озлокачивания гиперпластических полипов толстой кишки традиционно оценивается менее чем в 10 % [72, 99]. Тактика ведения пациентов с гиперпластическими полипами или ворсинчатыми аденомами толстой кишки с дисплазией/без дисплазии у пациентов без метаболических нарушений или с ожирением/метаболическим синдромом не различается. В настоящее время существует мнение, что только аденомы диаметром 5 мм требуют эндоскопической резекции, поскольку более мелкие образования редко озлокачиваются. Пациентам с аденомами менее 5 мм предлагается наблюдение. Однако более распространенной стратегией является удаление всех аденом, независимо от размера новообразования, поскольку гистологические исследования показывают, что полипы даже диаметром менее 5 мм часто имеют участки трубчатого строения и могут подвергаться злокачественной трансформации в 60-70 % случаев.

В настоящее время не существует эффективного консервативного лечения тубулярных аденом. Пациентам рекомендуется хирургическое лечение. К сожалению, тубулярные аденомы склонны к рецидивам. Поэтому после удаления аденом необходимо проводить комплекс мер, направленных на профилактику появления новых очагов. Поскольку такие факторы питания, как диета с высоким содержанием жиров и низким содержанием клетчатки, напрямую связаны с возникновением аденом толстой кишки, корректировка диеты после удаления аденомы может не только предотвратить появление новых тубулярных аденом, но и оказать положительное влияние на рост существующих аденом. Поскольку малоподвижный образ жизни и избыточная масса тела способствуют развитию аденом толстой кишки, физическая активность и нормализация веса также могут быть обоснованными рекомендациями для профилактики тубулярных аденом. Вторым важным и необходимым компонентом наблюдения за данной группой пациентов является эндоскопическое

исследование. Частота контрольных колоноскопий определяется индивидуально. Традиционно рекомендуют:

- каждые 6 месяцев в течение первого года, а затем ежегодно после удаления крупных аденом на ножке,
- каждые 3 месяца в течение первого года, каждые 6 месяцев во второй год, а затем ежегодно после удаления крупных аденом с широким основанием и тубулярных аденом с дисплазией [99].

В исследовании Kim J. et al. был проведен опрос среди корейских эндоскопистов о частоте и необходимости колоноскопического наблюдения после удаления опухолей толстой кишки. Участников спрашивали о предпочтительных интервалах наблюдения и возрасте пациентов, при котором наблюдение прекращалось. Также анализировалось соблюдение последних рекомендаций Межобщественной целевой группы США по КРР (USMSTF). Средний уровень соблюдения рекомендаций USMSTF составил 30,7 %. Наибольшая доля респондентов (40,8-55,1 %) прекратила наблюдение, когда пациентам исполнилось 80-84 года. Авторы отметили значительное расхождение между предпочтительными интервалами наблюдения после полипэктомии и последними международными рекомендациями, что привело к выводу о необходимости индивидуализированного подхода к наблюдению для повышения уровня соблюдения рекомендаций [6].

Учитывая данные исследований о сроках проведения контрольной колоноскопии, по-видимому, наиболее целесообразным является сочетание стандартных клинических рекомендаций и данных об индивидуальном риске рака. Данные об уровне MMPs и HSPs в составе короны циркулирующих ВВ могут быть использованы в качестве дополнительных параметров, уточняющих онкологический риск. Преимуществами рассчитанной математической модели являются: 1) параметры, входящие в модель, оцениваются в ВВ плазмы крови, что не требует проведения инвазивных процедур (колоноскопия, взятие биопсии); 2) модель учитывает наличие

метаболических нарушений, поскольку в модель включены субпопуляции CD9-позитивных везикул и FABP4-позитивных (адипоцитарного происхождения) ВВ в качестве предикторов риска развития рака; 3) расчет риска развития рака с использованием данной модели можно повторять, что позволяет оценивать онкологический риск в динамике.

При обсуждении блока собственных результатов по изменению состава циркулирующих ВВ при проведении больным с РПК ТРХТ необходимо отметить, что локальные виды терапии как радиация, и гипертермия, как по отдельности, так и в сочетании, будут приводить к гиперпродукции ВВ с измененным составом. Эти воздействия являются для клеток сильным стрессом, что может вести к изменению представленности HSPs на поверхности циркулирующих ВВ [2]. 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 [62]. 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 TIMP-1 вместе с  $\beta$ 1-интегрином, который формирует супрамолекулярный комплекс, расположенный на поверхности эпителиальных клеток молочной железы человека [62, 71]. Многочисленные данные литературы свидетельствуют о наличии изменений в пуле микроРНК в культурах карцином толстого кишечника при гипертермическом или радиационном воздействии [9, 13, 15, 19, 44, 55, 80, 100]. Логично, что такие изменения могут отражаться и на пуле микроРНК циркулирующих везикул.

Источником CD9+ и CD63+везикул, как полагают большинство исследователей, являются практически все клетки организма, так как эти белки являются универсальными маркерами ВВ, в то время как адипоцитарные везикулы представлены преимущественно FABP4+

везикулами. Можно предположить, что везикулы, 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 в свою очередь, может вести к измененной секреции FABP4-позитивных (адипоцитарных) везикул, которые также могут интернализироваться опухолью и приводить к ее регрессии [36]. Схематическое изображение положений данной гипотезы представлено на рисунке 11.

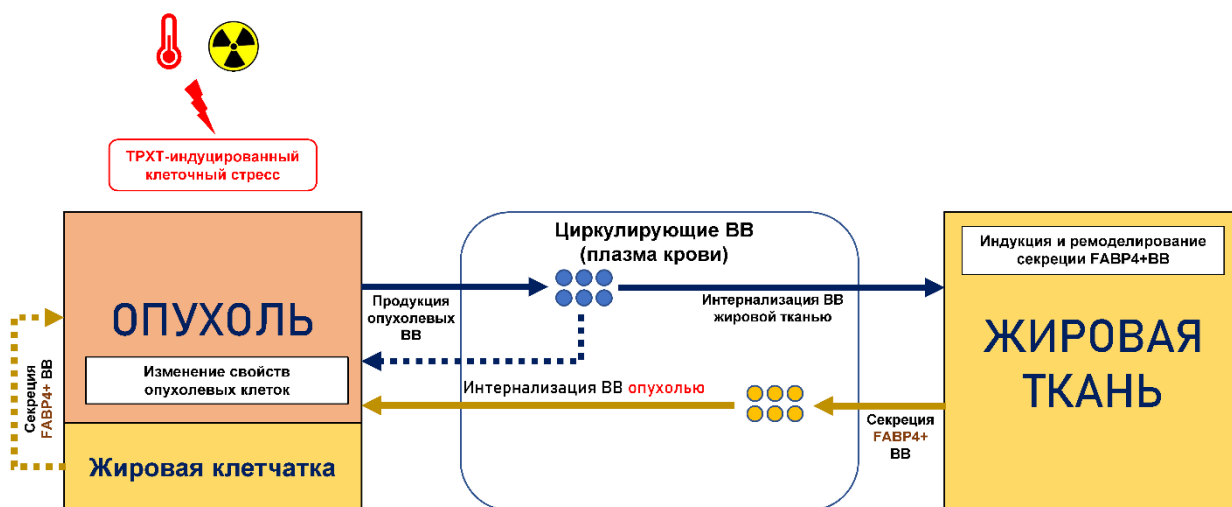


Рисунок 11 – Схема, иллюстрирующая взаимодействие опухоли и жировой ткани с участием ВВ в условиях сочетанного применения радиации и локальной гипертермии

Примечание – ВВ – внеклеточные везикулы, FABP4 – маркер адипоцитарных ВВ.

Доказательства в пользу такой гипотезы представлены на уровне *in vitro* и *in vivo* моделей и их сочетания, однако на клиническом материале эти механизмы не изучены, что явилось одной из задач исследования [29, 30, 64, 101]. Полученные нами результаты свидетельствуют о четкой взаимосвязи динамики отдельных субпопуляций как CD9-позитивных, так и FABP4-позитивных экзосом с непосредственной эффективностью ТРХТ у больных РПК с ожирением (рисунок 12).

При анализе параметров, вошедших в первую регрессионную модель для прогнозирования непосредственной эффективности ТРХТ у больных РПК, необходимо отметить, что из клинико-морфологических показателей значимым явился только индекс массы тела. Кроме того, уровень HSPs в составе ВВ хотя и существенно изменялся в динамике при проведении терапии, однако HSP+ВВ не являлись значимыми предикторами эффективности ТРХТ. Хотя динамика микроРНК-506 в составе ВВ ассоциировалась с непосредственной эффективностью ТРХТ, однако специфичность регрессионной модели для прогнозирования эффективности ТРХТ, включающая возраст пациента и уровень этой микроРНК в составе ВВ оказалась низкой.

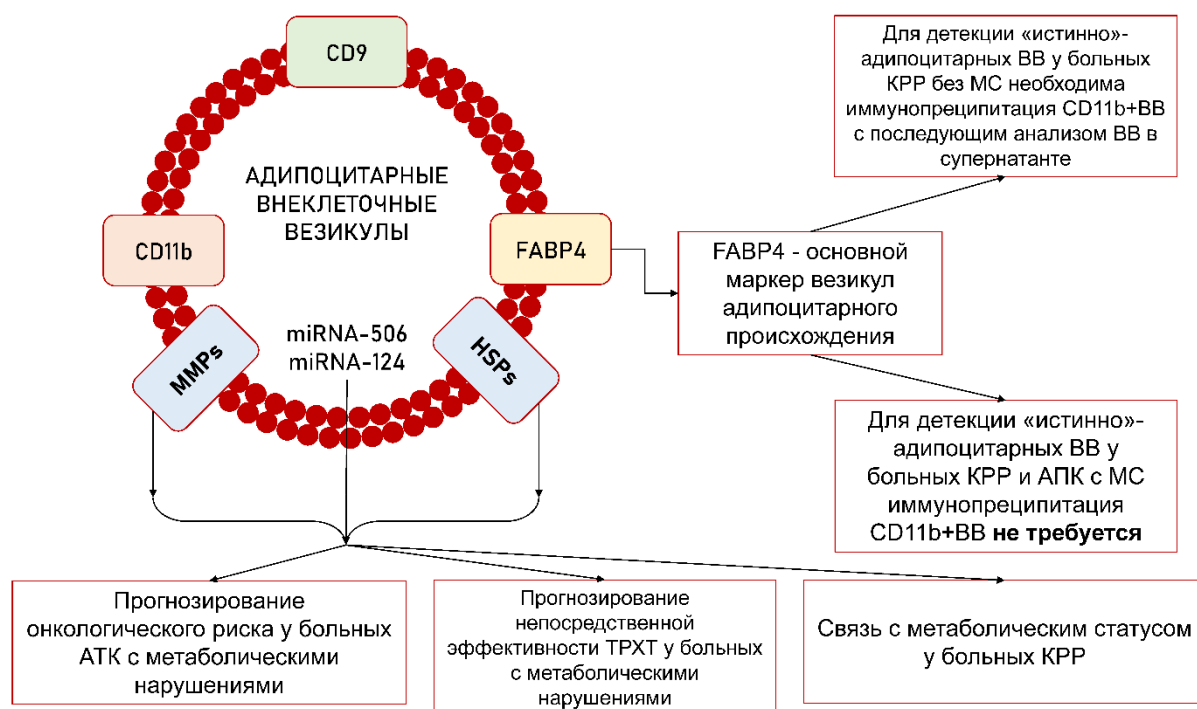


Рисунок 12 – Схематическое представление результатов исследования, отражающее диагностическую и прогностическую значимость адипоцитарных внеклеточных везикул, подход к их идентификации и связь с метаболическим статусом и риском КРР

Возможно расширение спектра исследуемых микроРНК в перспективе позволит создать модель с лучшими показателями чувствительности и специфичности.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Адипоцитарные 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 адипоцитарного 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 везикул, так и анализ относительной экспрессии везикулярной микроРНК-506. Прогностический потенциал FABP4-позитивных везикул 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 адипоцитарных везикул при построении прогностической модели эффективности ТРХТ. С практической точки зрения, результаты работы позволяют использовать адипоцитарные ВВ в качестве дополнительных прогностических маркеров, полученные модели не предназначены для самостоятельного изменения стандартных режимов терапии и не заменяют собой стандартные прогностические критерии.

## ВЫВОДЫ

1. Для везикул адипоцитарного 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 адипоцитарных маркеров (перилипина-1, FABP4, PPAR- $\gamma$ ) 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  $P$  – 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  $P > 0,5$  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:  $F = 0,126 * [ИМТ] - 1,170 * [CD9+MMP9+] - 0,387 * [CD9+MMP2+9+TIMP1+] + 3,041 * [CD9+MMP2+9+TIMP1-] - 0,3088 * [CD9+MMP2+MMP9-TIMP1+] - 1,04413 * [FABP4+HSP60+] - 0,8894 * [FABP4+HSP60+HSP27+HSP90-] - 4,38259 * [FABP4+MMP2+MMP2+TIMP1-] + 71,81$ .

$[FABP4+MMP2+9+TIMP+] + 5,689 * [FABP4+MMP2-9+TIMP1+] - 30,878$ . 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

|                                                                                                                                  |                                                                                                                                                                              |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| АСК                                                                                                                              | – адипоцитарные стволовые клетки                                                                                                                                             |
| АТК                                                                                                                              | – аденомы толстой кишки                                                                                                                                                      |
| ВВ                                                                                                                               | – внеклеточные везикулы                                                                                                                                                      |
| КРР                                                                                                                              | – колоректальный рак                                                                                                                                                         |
| ММСК                                                                                                                             | – мультипотентные мезенхимальные стволовые клетки                                                                                                                            |
| РОК                                                                                                                              | – рак ободочной кишки                                                                                                                                                        |
| РПК                                                                                                                              | – рак прямой кишки                                                                                                                                                           |
| СД2                                                                                                                              | – сахарный диабет второго типа                                                                                                                                               |
| ТРХТ                                                                                                                             | – терморадиохимиотерапия                                                                                                                                                     |
| ХС ЛПВП                                                                                                                          | – холестерин липопротеидов высокой плотности                                                                                                                                 |
| ХС ЛПНП                                                                                                                          | – холестерин липопротеидов низкой плотности                                                                                                                                  |
| AMPK, SREBP-1, PPAR $\alpha$ , STAT3, NF- $\kappa$ B, HIF $\alpha$ -1, ER $\alpha$ , VEGF, VEGFR1, IGF-I, IGF-II, IGFBPs, IGF-IR | – транскрипционные, ростовые факторы и их рецепторы, вовлеченные в патогенез ожирения                                                                                        |
| AUC                                                                                                                              | – Area Under the ROC Curve, показатель, который позволяет суммировать производительность модели одним числом, измеряя площадь под кривой ROC                                 |
| CD9, CD63, CD81                                                                                                                  | – мажорные белки везикул, тетраспанины                                                                                                                                       |
| FABP4                                                                                                                            | – fatty acid binding protein 4; белок, связывающий жирные кислоты 4                                                                                                          |
| IDF                                                                                                                              | – International Diabetes Federation                                                                                                                                          |
| HSPs                                                                                                                             | – белки теплового шока                                                                                                                                                       |
| MMR-D                                                                                                                            | – mismatch repair deficiency, система репарации ошибочно спаренных нуклеотидов                                                                                               |
| MLH1 и MSH2                                                                                                                      | – белки, компоненты системы MMR-D                                                                                                                                            |
| MMPs                                                                                                                             | – матриксные металлопротеиназы                                                                                                                                               |
| NTA                                                                                                                              | – nanoparticle tracking analysis, анализ траектории наночастиц                                                                                                               |
| PPAR- $\gamma$                                                                                                                   | – рецепторы, активируемые пероксисомными пролифераторами, группа рецепторов клеточного ядра, функционирующих в качестве фактора транскрипции, один из адипоцитарных маркеров |

|       |                                                                             |
|-------|-----------------------------------------------------------------------------|
| TRG   | – Tumor Regression Grade, шкала степени регрессии опухоли                   |
| XELOX | – схема химиотерапии, включающая кальция фолинат, фторурацил и оксалиплатин |

## СПИСОК ИСПОЛЬЗУЕМОЙ ЛИТЕРАТУРЫ

1. Локальная гипертермия в комбинированном лечении рака гортани и гортаноглотки / Е. Л. Чойнзонов, Ж. А. Старцева, М. Р. Мухамедов [и др.]. // Сибирский онкологический журнал. – 2014. – № 5. – С. 5-9.
2. Малек, А. В. Возможности применения нановезикулярных технологий в онкологии: диссертация на соискание ученой степени доктора медицинских наук: 14.01.12 / А. В. Малек. – Санкт-Петербург: ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России, 2021. – 230 с.
3. Матриксные металлопротеиназы и белки теплового шока на внеклеточных везикулах у больных колоректальным раком: связь с метаболическим статусом / Н. В. Юнусова, Д. А. Сваровский, Е. Э. Дандарова [и др.]. // Успехи молекулярной онкологии. – 2022. – Т. 9, № 3. – С. 38-48.
4. A Criterion of Colorectal Cancer Diagnosis Using Exosome Fluorescence-Lifetime Imaging / A. V. Borisov, O. A. Zakharova, A. A. Samarinova [et al.] // Diagnostics. – 2022. – Vol. 12, № 8. – P. 1792.
5. A novel strategy of radiofrequency hyperthermia (neothermia) in combination with preoperative chemoradiotherapy for the treatment of advanced rectal cancer: a pilot study / H. Shoji, M. Motegi, K. Osawa [et al.] // Cancer Medicine. – 2015. – Vol. 4, № 6. – P. 834-843.
6. A survey of current practices in post-polypectomy surveillance in Korea / J. Kim, T.-G. Gweon, M. S. Kwak [et al.] // Intestinal Research. – 2024. – Vol. 22, № 2. – P. 186-207.
7. Adipocyte fatty acid-binding protein is released from adipocytes by a non-conventional mechanism / S. Kralisch, T. Ebert, U. Lossner [et al.] // International Journal of Obesity. – 2014. – Vol. 38, № 9. – P. 1251-1254.
8. Adipocyte Produces Matrix Metalloproteinases 2 and 9 / A. Bouloumié, C. Sengenès, G. Portolan [et al.] // Diabetes. – 2001. – Vol. 50, № 9. – P. 2080-2086.

9. Adipocyte-Derived Exosomal MiR-27a Induces Insulin Resistance in Skeletal Muscle Through Repression of PPAR $\gamma$  / Y. Yu, H. Du, S. Wei [et al.] // *Theranostics*. – 2018. – Vol. 8, № 8. – P. 2171-2188.
10. Adipocyte-derived exosomes promote lung cancer metastasis by increasing MMP9 activity via transferring MMP3 to lung cancer cells / J. Wang, Y. Wu, J. Guo [et al.] // *Oncotarget*. – 2017. – Vol. 8, № 47. – P. 81880-81891.
11. Adipocyte-secreted exosomal microRNA-34a inhibits M2 macrophage polarization to promote obesity-induced adipose inflammation / Y. Pan, X. Hui, R. L. C. Hoo [et al.] // *Journal of Clinical Investigation*. – 2019. – Vol. 129, № 2. – P. 834-849.
12. Adipose Tissue Exosome-Like Vesicles Mediate Activation of Macrophage-Induced Insulin Resistance / Z. Deng, A. Poliakov, R. W. Hardy [et al.] // *Diabetes*. – 2009. – Vol. 58, № 11. – P. 2498-2505.
13. Adipose Tissue Macrophage-Derived Exosomal miRNAs Can Modulate In Vivo and In Vitro Insulin Sensitivity / W. Ying, M. Riopel, G. Bandyopadhyay [et al.] // *Cell*. – 2017. – Vol. 171, № 2. – P. 372-384.e12.
14. Adipose Tissue-Derived Extracellular Vesicles and the Tumor Microenvironment: Revisiting the Hallmarks of Cancer / J. A. Moraes, C. Encarnação, V. A. Franco [et al.] // *Cancers*. – 2021. – Vol. 13, № 13. – P. 3328.
15. Adipose-derived exosomes deliver miR-23a/b to regulate tumor growth in hepatocellular cancer by targeting the VHL/HIF axis / Y. Liu, J. Tan, S. Ou [et al.] // *Journal of Physiology and Biochemistry*. – 2019. – Vol. 75, № 3. – P. 391-401.
16. Age- and sex-specific differences in blood-borne microvesicles from apparently healthy humans / C. M. Gustafson, A. J. Shepherd, V. M. Miller, M. Jayachandran // *Biology of Sex Differences*. – 2015. – Vol. 6, № 1. – P. 10.
17. AICAR inhibits PPAR $\gamma$  during monocyte differentiation to attenuate inflammatory responses to atherogenic lipids / D. Namgaladze, M. Kemmerer, A. Von Knethen, B. Brüne // *Cardiovascular Research*. – 2013. – Vol. 98, № 3. – P. 479-487.

18. Altered Extracellular Vesicle Concentration, Cargo, and Function in Diabetes / D. W. Freeman, N. Noren Hooten, E. Eitan [et al.] // *Diabetes*. – 2018. – Vol. 67, № 11. – P. 2377-2388.
19. An Update on the Epidemiology, Molecular Characterization, Diagnosis, and Screening Strategies for Early-Onset Colorectal Cancer / A. N. Burnett-Hartman, J. K. Lee, J. Demb, S. Gupta // *Gastroenterology*. – 2021. – Vol. 160, № 4. – P. 1041-1049.
20. Analysis of Proapoptotic Protein Trafficking to and from Mitochondria / I. Vega-Naredo, G. Oliveira, T. Cunha-Oliveira [et al.]. – Text : electronic // *Mitochondrial Regulation : Methods in Molecular Biology* / eds. C. M. Palmeira, A. P. Rolo. – New York, NY: Springer US, 2021. – Vol. 2310. – P. 161-178. – URL: [https://link.springer.com/10.1007/978-1-0716-1433-4\\_10](https://link.springer.com/10.1007/978-1-0716-1433-4_10) (date accessed: 14.02.2026).
21. Anticancer Drugs Cause Release of Exosomes with Heat Shock Proteins from Human Hepatocellular Carcinoma Cells That Elicit Effective Natural Killer Cell Antitumor Responses in Vitro / L.-H. Lv, Y.-L. Wan, Y. Lin [et al.] // *Journal of Biological Chemistry*. – 2012. – Vol. 287, № 19. – P. 15874-15885.
22. Arpino, V. The role of TIMPs in regulation of extracellular matrix proteolysis / V. Arpino, M. Brock, S. E. Gill // *Matrix Biology*. – 2015. – Vol. 44-46. – P. 247-254.
23. Association between Anal Function and Therapeutic Effect after Preoperative Chemoradiotherapy followed by Intersphincteric Resection / Y. Nishizawa, N. Saito, S. Fujii [et al.] // *Digestive Surgery*. – 2012. – Vol. 29, № 5. – P. 439-445.
24. Blood Plasma Exosomes Contain Circulating DNA in Their Crown / O. Tutanov, T. Shtam, A. Grigor'eva [et al.] // *Diagnostics*. – 2022. – Vol. 12, № 4. – P. 854.
25. Brew, K. The tissue inhibitors of metalloproteinases (TIMPs): An ancient family with structural and functional diversity / K. Brew, H. Nagase // *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research*. – 2010. –

Vol. 1803. – The tissue inhibitors of metalloproteinases (TIMPs). – № 1. – P. 55-71.

26. Cancer-associated adipocytes: key players in breast cancer progression / Q. Wu, B. Li, Z. Li [et al.] // *Journal of Hematology & Oncology*. – 2019. – Vol. 12. – Cancer-associated adipocytes. – № 1. – P. 95.

27. Cells release subpopulations of exosomes with distinct molecular and biological properties / E. Willms, H. J. Johansson, I. Mäger [et al.] // *Scientific Reports*. – 2016. – Vol. 6, № 1. – P. 22519.

28. Characterisation of adipocyte-derived extracellular vesicle subtypes identifies distinct protein and lipid signatures for large and small extracellular vesicles / M. Durcin, A. Fleury, E. Taillebois [et al.] // *Journal of Extracellular Vesicles*. – 2017. – Vol. 6, № 1. – P. 1305677.

29. Chemokine-Containing Exosomes Are Released from Heat-Stressed Tumor Cells via Lipid Raft-Dependent Pathway and Act as Efficient Tumor Vaccine / T. Chen, J. Guo, M. Yang [et al.] // *The Journal of Immunology*. – 2011. – Vol. 186, № 4. – P. 2219-2228.

30. Circulating adipocyte-derived exosomal microRNAs associated with decreased insulin resistance after gastric bypass / M. J. Hubal, E. P. Nadler, S. C. Ferrante [et al.] // *Obesity (Silver Spring, Md.)*. – 2017. – T. 25, № 1. – C. 102-110.

31. Circulating adipocyte-derived extracellular vesicles are novel markers of metabolic stress / A. Eguchi, M. Lazic, A. M. Armando [et al.] // *Journal of Molecular Medicine*. – 2016. – Vol. 94, № 11. – P. 1241-1253.

32. Circulating Exosomal microRNAs as Biomarkers of Colon Cancer / H. Ogata-Kawata, M. Izumiya, D. Kurioka [et al.] // *PLoS ONE*. – 2014. – Vol. 9, № 4. – P. e92921.

33. Circulating extracellular vesicles are associated with lipid and insulin metabolism / Y. Kobayashi, A. Eguchi, M. Tempaku [et al.] // *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism*. – 2018. – Vol. 315, № 4. – P. E574-E582.

34. Cleavage of L1 in Exosomes and Apoptotic Membrane Vesicles Released from Ovarian Carcinoma Cells / P. Gutwein, A. Stoeck, S. Riedle [et al.] // *Clinical Cancer Research*. – 2005. – Vol. 11, № 7. – P. 2492-2501.
35. Colon and Endometrial Cancers With Mismatch Repair Deficiency Can Arise From Somatic, Rather Than Germline, Mutations / S. Haraldsdottir, H. Hampel, J. Tomsic [et al.] // *Gastroenterology*. – 2014. – Vol. 147, № 6. – P. 1308-1316.e1.
36. Combined Hyperthermia and Radiotherapy for the Treatment of Cancer / P. Kaur, M. D. Hurwitz, S. Krishnan, A. Asea // *Cancers*. – 2011. – Vol. 3, № 4. – P. 3799-3823.
37. Comparative Study of Extracellular Vesicles from the Urine of Healthy Individuals and Prostate Cancer Patients / O. E. Bryzgunova, M. M. Zaripov, T. E. Skvortsova [et al.] // *PLOS ONE*. – 2016. – Vol. 11, № 6. – P. e0157566.
38. Complete Neoadjuvant Treatment for Rectal Cancer: The Brown University Oncology Group CONTRE Study / K. Perez, H. Safran, W. Sikov [et al.] // *American Journal of Clinical Oncology*. – 2017. – Vol. 40, № 3. – P. 283-287.
39. Concentration and Composition of Circulating Adipocyte-Derived Extracellular Vesicles in Patients with Colonic Polyps and Colorectal Cancer / N. V. Yunusova, D. A. Svarovsky, E. S. Kolegova [et al.] // *Journal of Evolutionary Biochemistry and Physiology*. – 2024. – Vol. 60, № 4. – P. 1328-1335.
40. Concomitant hyperthermia and radiation therapy for treating locally advanced rectal cancer / D. F. De Haas-Kock, J. Buijsen, M. Pijls-Johannesma [et al.]. – Text : electronic // *Cochrane Database of Systematic Reviews*. – 2009. – Vol. 2010. – № 1. – URL: <http://doi.wiley.com/10.1002/14651858.CD006269.pub2> (date accessed: 25.03.2026).

41. Cortical Neurons Develop Insulin Resistance and Blunted Akt Signaling: A Potential Mechanism Contributing to Enhanced Ischemic Injury in Diabetes / B. Kim, K. A. Sullivan, C. Backus, E. L. Feldman // *Antioxidants & Redox Signaling*. – 2011. – Vol. 14, № 10. – P. 1829-1839.

42. DeClercq, V. Fatty acids increase adiponectin secretion through both classical and exosome pathways / V. DeClercq, B. d'Eon, R. S. McLeod // *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids*. – 2015. – Vol. 1851, № 9. – P. 1123-1133.

43. Diagnostic Potential of Cell-Free and Exosomal MicroRNAs in the Identification of Patients with High-Risk Colorectal Adenomas / R. Uratani, Y. Toiyama, T. Kitajima [et al.] // *PLOS ONE*. – 2016. – Vol. 11, № 10. – P. e0160722.

44. Endothelial Microparticle-Mediated Transfer of MicroRNA-126 Promotes Vascular Endothelial Cell Repair via SPRED1 and Is Abrogated in Glucose-Damaged Endothelial Microparticles / F. Jansen, X. Yang, M. Hoelscher [et al.] // *Circulation*. – 2013. – Vol. 128, № 18. – P. 2026-2038.

45. Endothelial Microparticles Correlate with Endothelial Dysfunction in Obese Women / K. Esposito, M. Ciotola, B. Schisano [et al.] // *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*. – 2006. – Vol. 91, № 9. – P. 3676-3679.

46. Evaluation of cell damage and modulation of cytokines TNF- $\alpha$ , IL-6 and IL-10 in macrophages exposed to PpIX-mediated photodynamic therapy / R. D. R. Tiveron, D. A. Costa, M. D. I. Leite [et al.] // *Brazilian Journal of Biology*. – 2020. – Vol. 80, № 3. – P. 497-505.

47. Evidence for Adipocyte-Derived Extracellular Vesicles in the Human Circulation / K. D. Connolly, R. M. Wadey, D. Mathew [et al.] // *Endocrinology*. – 2018. – Vol. 159, № 9. – P. 3259-3267.

48. Exosomal Protease Cargo as Prognostic Biomarker in Colorectal Cancer / N. V. Yunusova, E. Zambalova, M. Patysheva [et al.] // *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention*. – 2021. – Vol. 22. – № 3. – P. 861-869.

49. Expression of FABP4, adipsin and adiponectin in Paneth cells is modulated by gut *Lactobacillus* / X. Su, H. Yan, Y. Huang [et al.] // *Scientific Reports*. – 2015. – Vol. 5, № 1. – P. 18588.
50. Extracellular Vesicle-Mediated Cell–Cell Communication in the Nervous System: Focus on Neurological Diseases / C. Caruso Bavisotto, F. Scalia, A. Marino Gammazza [et al.] // *International Journal of Molecular Sciences*. – 2019. – Vol. 20, № 2. – P. 434.
51. Ferrari, L. Neoadjuvant chemoradiation therapy and pathological complete response in rectal cancer / L. Ferrari, A. Fichera // *Gastroenterology Report*. – 2015. – P. gov039.
52. Frequency of Mismatch Repair Deficiency/High Microsatellite Instability and Its Role as a Predictive Biomarker of Response to Immune Checkpoint Inhibitors in Gynecologic Cancers / J. J. Noh, M. K. Kim, M. C. Choi [et al.] // *Cancer Research and Treatment*. – 2022. – Vol. 54, № 4. – P. 1200-1208.
53. Furuhashi, M. Fatty Acid-Binding Protein 4 in Cardiovascular and Metabolic Diseases / M. Furuhashi // *Journal of Atherosclerosis and Thrombosis*. – 2019. – Vol. 26, № 3. – P. 216-232.
54. Gao, X. Extracellular Vesicles from Adipose Tissue – A Potential Role in Obesity and Type 2 Diabetes? / X. Gao, C. Salomon, D. J. Freeman // *Frontiers in Endocrinology*. – 2017. – Vol. 8. – P. 202.
55. Genome-wide analysis reveals miR-3184-5p and miR-181c-3p as a critical regulator for adipocytes-associated breast cancer / D. Rajarajan, S. Selvarajan, M. R. Charan Raja [et al.] // *Journal of Cellular Physiology*. – 2019. – Vol. 234, № 10. – P. 17959-17974.
56. Han, C. Y. Roles of Reactive Oxygen Species on Insulin Resistance in Adipose Tissue / C. Y. Han // *Diabetes & Metabolism Journal*. – 2016. – Vol. 40, № 4. – P. 272.
57. Heat-induced BRCA2 degradation in human tumours provides rationale for hyperthermia-PARP-inhibitor combination therapies / N. Van Den

Tempel, H. Odijk, N. Van Holthe [et al.] // International Journal of Hyperthermia. – 2018. – Vol. 34, № 4. – P. 407-414.

58. Huang, Z. Adipose Extracellular Vesicles in Intercellular and Inter-Organ Crosstalk in Metabolic Health and Diseases / Z. Huang, A. Xu // Frontiers in Immunology. – 2021. – Vol. 12. – C. 608680.

59. Human mesenchymal stem cell-derived iron oxide exosomes allow targeted ablation of tumor cells via magnetic hyperthermia / U. Altanerova, M. Babincova, P. Babinec [et al.] // International Journal of Nanomedicine. – 2017. – Vol. 12. – P. 7923-7936.

60. Hyperthermia effects on Hsp27 and Hsp72 associations with mismatch repair (MMR) proteins and cisplatin toxicity in MMR-deficient/proficient colon cancer cell lines / M. L. Sottile, A. D. Losinno, M. A. Fanelli [et al.] // International Journal of Hyperthermia. – 2015. – Vol. 31, № 5. – P. 464-475.

61. Hyperthermia promotes exosome secretion by regulating Rab7b while increasing drug sensitivity in adriamycin-resistant breast cancer / D. Xu, W.-J. Tang, Y.-Z. Zhu [et al.] // International Journal of Hyperthermia. – 2022. – Vol. 39, № 1. – P. 246-257.

62. Identification of CD63 as a tissue inhibitor of metalloproteinase-1 interacting cell surface protein / K. Jung, X. Liu, R. Chirco [et al.] // The EMBO Journal. – 2006. – Vol. 25, № 17. – P. 3934-3942.

63. Immediate results of radical surgery under conditions of combined modality treatment of rectal cancer / S. G. Afanasyev, Zh. A. Startseva, [et al.] // Siberian Journal of Oncology. – 2016. – Vol. 15. – № 1. – P. 5-10.

64. Immunomorphological Pattern of Molecular Chaperones in Normal and Pathological Thyroid Tissues and Circulating Exosomes: Potential Use in Clinics / C. Caruso Bavisotto, C. Cipolla, G. Graceffa [et al.] // International Journal of Molecular Sciences. – 2019. – Vol. 20, № 18. – P. 4496.

65. Impact of Short-Term Preoperative Radiotherapy on Health-Related Quality of Life and Sexual Functioning in Primary Rectal Cancer: Report of a

Multicenter Randomized Trial / C. A. M. Marijnen, C. J. H. Van De Velde, H. Putter [et al.] // *Journal of Clinical Oncology*. – 2005. – Vol. 23, № 9. – P. 1847-1858.

66. Increased anti-tumour activity by exosomes derived from doxorubicin-treated tumour cells via heat stress / Y. Yang, Y. Chen, F. Zhang [et al.] // *International Journal of Hyperthermia*. – 2015. – Vol. 31, № 5. – P. 498-506.

67. Induction of a tumour-specific CTL response by exosomes isolated from heat-treated malignant ascites of gastric cancer patients / H. Zhong, Y. Yang, S. Ma [et al.] // *International Journal of Hyperthermia*. – 2011. – Vol. 27, № 6. – P. 604-611.

68. Interactions between Adipocytes and Breast Cancer Cells Stimulate Cytokine Production and Drive Src/Sox2/miR-302b-Mediated Malignant Progression / M. Picon-Ruiz, C. Pan, K. Drews-Elger [et al.] // *Cancer Research*. – 2016. – Vol. 76, № 2. – P. 491-504.

69. Jabbari, N. Ionizing Radiation Increases the Activity of Exosomal Secretory Pathway in MCF-7 Human Breast Cancer Cells: A Possible Way to Communicate Resistance against Radiotherapy / N. Jabbari, M. Nawaz, J. Rezaie // *International Journal of Molecular Sciences*. – 2019. – Vol. 20, № 15. – P. 3649.

70. Jelonek, K. The Influence of Ionizing Radiation on Exosome Composition, Secretion and Intercellular Communication / K. Jelonek, P. Widlak, M. Pietrowska // *Protein & Peptide Letters*. – 2016. – Vol. 23, № 7. – P. 656-663.

71. Justo, B. L. Characteristics of TIMP1, CD63, and  $\beta$ 1-Integrin and the Functional Impact of Their Interaction in Cancer / B. L. Justo, M. G. Jasiulionis // *International Journal of Molecular Sciences*. – 2021. – Vol. 22, № 17. – P. 9319.

72. Leggett, B. Role of the Serrated Pathway in Colorectal Cancer Pathogenesis / B. Leggett, V. Whitehall // *Gastroenterology*. – 2010. – Vol. 138, № 6. – P. 2088-2100.

73. Lu, B. The metabolic syndrome and its components as prognostic factors in colorectal cancer: A meta-analysis and systematic review / B. Lu,

J. Qian, J. Li // *Journal of Gastroenterology and Hepatology*. – 2023. – Vol. 38, № 2. – P. 187-196.

74. McAdam, E. Oxidative Stress–Induced Protein Damage Inhibits DNA Repair and Determines Mutation Risk and Therapeutic Efficacy / E. McAdam, R. Brem, P. Karran // *Molecular Cancer Research*. – 2016. – Vol. 14, № 7. – P. 612-622.

75. McDermott, A. M. Identification and Validation of miRNAs as Endogenous Controls for RQ-PCR in Blood Specimens for Breast Cancer Studies / A. M. McDermott, M. J. Kerin, N. Miller // *PLoS ONE*. – 2013. – Vol. 8, № 12. – P. e83718.

76. Mesenchymal stem cells within tumour stroma promote breast cancer metastasis / A. E. Karnoub, A. B. Dash, A. P. Vo [et al.] // *Nature*. – 2007. – Vol. 449, № 7162. – P. 557-563.

77. Metabolic Syndrome and Risk of Cancer / K. Esposito, P. Chiodini, A. Colao [et al.] // *Diabetes Care*. – 2012. – Vol. 35, № 11. – P. 2402-2411.

78. Metcalf, A. M. Endometrial tumour BRAF mutations and MLH1 promoter methylation as predictors of germline mismatch repair gene mutation status: a literature review / A. M. Metcalf, A. B. Spurdle // *Familial Cancer*. – 2014. – Vol. 13, № 1. – P. 1-12.

79. Microsatellite Instability–High Endometrial Cancers with *MLH1* Promoter Hypermethylation Have Distinct Molecular and Clinical Profiles / B. L. Manning-Geist, Y. L. Liu, K. A. Devereaux [et al.] // *Clinical Cancer Research*. – 2022. – Vol. 28, № 19. – P. 4302-4311.

80. MiR-199a-modified exosomes from adipose tissue-derived mesenchymal stem cells improve hepatocellular carcinoma chemosensitivity through mTOR pathway / G. Lou, L. Chen, C. Xia [et al.] // *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research*. – 2020. – Vol. 39, № 1. – P. 4.

81. Molecular interactions at the surface of extracellular vesicles / E. I. Buzás, E. Á. Tóth, B. W. Sódar, K. É. Szabó-Taylor // *Seminars in Immunopathology*. – 2018. – Vol. 40, № 5. – P. 453-464.

82. Molecular targets for the therapy of cancer associated with metabolic syndrome (transcription and growth factors) / N. V. Yunusova, I. V. Kondakova, L. A. Kolomiets [et al.] // *Asia-Pacific Journal of Clinical Oncology*. – 2018. – Vol. 14, № 3. – P. 134-140.

83. Neoadjuvant Chemotherapy Without Routine Use of Radiation Therapy for Patients With Locally Advanced Rectal Cancer: A Pilot Trial / D. Schrag, M. R. Weiser, K. A. Goodman [et al.] // *Journal of Clinical Oncology*. – 2014. – Vol. 32, № 6. – P. 513-518.

84. Novel Role for Matrix Metalloproteinase 9 in Modulation of Cholesterol Metabolism / S. Hernandez-Anzaldo, V. Brglez, B. Hemmeryckx [et al.] // *Journal of the American Heart Association*. – 2016. – Vol. 5, № 10. – P. e004228.

85. Obesity and cancer—mechanisms underlying tumour progression and recurrence / J. Park, T. S. Morley, M. Kim [et al.] // *Nature Reviews Endocrinology*. – 2014. – Vol. 10 № 8. – P. 455-465.

86. Obesity is associated with macrophage accumulation in adipose tissue / S. P. Weisberg, D. McCann, M. Desai [et al.] // *Journal of Clinical Investigation*. – 2003. – Vol. 112, № 12. – P. 1796-1808.

87. Oxaliplatin added to fluorouracil-based preoperative chemoradiotherapy and postoperative chemotherapy of locally advanced rectal cancer (the German CAO/ARO/AIO-04 study): final results of the multicentre, open-label, randomised, phase 3 trial / C. Rödel, U. Graeven, R. Fietkau [et al.] // *The Lancet Oncology*. – 2015. – Vol. 16, № 8. – P. 979-989.

88. PAR-4/Ca<sup>2+</sup>-calpain pathway activation stimulates platelet-derived microparticles in hyperglycemic type 2 diabetes / A. Giannella, G. Ceolotto, C. M. Radu [et al.] // *Cardiovascular Diabetology*. – 2021. – Vol. 20, № 1. – P. 77.

89. Perilipin and adipophilin expression in lipid loaded macrophages / J. Persson, E. Degerman, J. Nilsson, M. W. Lindholm // *Biochemical and Biophysical Research Communications*. – 2007. – Vol. 363, № 4. – P. 1020-1026.

90. Plasma Exosomes of Patients with Breast and Ovarian Tumors Contain an Inactive 20S Proteasome / N. Yunusova, E. Kolegova, E. Sereda [et al.] // *Molecules*. – 2021. – Vol. 26, № 22. – P. 6965.

91. Production and Internalization of Extracellular Vesicles in Norm and under Conditions of Hyperglycemia and Insulin Resistance / N. Yunusova, E. Dandarova, D. Svarovsky [et al.]. // *Biochemistry (Moscow), Supplement Series B: Biomedical Chemistry* – 2021. – Vol. 16, P. 104-112.

92. Prolonged high-fat diet induces gradual and fat depot-specific DNA methylation changes in adult mice / R. A. J. Zwamborn, R. C. Slieker, P. C. A. Mulder [et al.] // *Scientific Reports*. – 2017. – Vol. 7, № 1. – P. 43261.

93. Radiation combined with hyperthermia induces HSP70-dependent maturation of dendritic cells and release of pro-inflammatory cytokines by dendritic cells and macrophages / P. Schildkopf, B. Frey, O. J. Ott [et al.] // *Radiotherapy and Oncology*. – 2011. – Vol. 101, № 1. – P. 109-115.

94. Regulation of A disintegrin and metalloproteinase (ADAM) family sheddases ADAM10 and ADAM17: The emerging role of tetraspanins and rhomboids / A. L. Matthews, P. J. Noy, J. S. Reyat, M. G. Tomlinson // *Platelets*. – 2017. – Vol. 28, № 4. – P. 333-341.

95. Role of HSP27 in the multidrug sensitivity and resistance of colon cancer cells / Z. Liu, Y. Liu, Y. Long [et al.] // *Oncol. Lett.* – 2020. – Vol. 19, № 3. – P. 2021-2027.

96. Romantsova, T. R. Immunometabolism and metainflammation in obesity / T. R. Romantsova, Y. P. Sych // *Obesity and metabolism*. – 2019. – Vol. 16, № 4. – P. 3-17.

97. Serum Levels of IL-1 RA Increase with Obesity and Type 2 Diabetes in Relation to Adipose Tissue Dysfunction and are Reduced After Bariatric Surgery in Parallel to Adiposity / G. Frühbeck, V. Catalán, B. Ramírez [et al.] // *Journal of Inflammation Research*. – 2022. – Vol. 15. – P. 1331-1345.

98. Shimoda, M. Extracellular vesicle-associated MMPs: A modulator of the tissue microenvironment / M. Shimoda. – Text: electronic // *Advances in*

Clinical Chemistry. – Elsevier, 2019. – Vol. 88. – P. 35-66. – URL: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0065242318300726> (date accessed: 20.05.2025).

99. Spotlight: US Multi-Society Task Force on Colorectal Cancer Recommendations for Follow-up After Colonoscopy and Polypectomy / S. Gupta, D. Lieberman, J. C. Anderson [et al.] // Gastroenterology. – 2020. – Vol. 158, № 4. – P. 1154.

100. Stemness-Attenuating miR-503-3p as a Paracrine Factor to Regulate Growth of Cancer Stem Cells / M. Seo, S. M. Kim, E. Y. Woo [et al.] // Stem Cells International. – 2018. – Vol. 2018. – P. 1-10.

101. Taha, E. A. Roles of Extracellular HSPs as Biomarkers in Immune Surveillance and Immune Evasion / E. A. Taha, K. Ono, T. Eguchi // International Journal of Molecular Sciences. – 2019. – Vol. 20, № 18. – C. 4588.

102. Tamkovich, S. N. Exosomes: Generation, structure, transport, biological activity, and diagnostic application / S. N. Tamkovich, O. S. Tutanov, P. P. Laktionov // Biochemistry (Moscow) Supplement Series A: Membrane and Cell Biology. – 2016. – Vol. 10, № 3. – P. 163-173.

103. The role of metabolic syndrome variant in the malignant tumors progression / N. V. Yunusova, I. V. Kondakova, L. A. Kolomiets [et al.] // Diabetes & Metabolic Syndrome: Clinical Research & Reviews. – 2018. – Vol. 12, № 5. – P. 807-812.

104. What information can be obtained from the tears of a patient with primary open angle glaucoma? / S. Tamkovich, A. Grigor'eva, A. Eremina [et al.] // Clinica Chimica Acta. – 2019. – Vol. 495. – P. 529-537.