

Экзосомальные протеазы при колоректальном раке

Е.А. Замбалова¹, М.Р. Патышева¹, А.А. Димча¹, С.Н. Тамкович^{2,3}, А.Е. Григорьева²,
Е.С. Колегова¹, И.В. Кондакова¹, С.Г. Афанасьев¹, Н.В. Юнусова^{1,4}

¹НИИ онкологии ФГБНУ «Томский национальный исследовательский медицинский центр РАН»;
Россия, 634009 Томск, пер. Кооперативный, 5;

²ФГБУН «Институт химической биологии и фундаментальной медицины Сибирского отделения РАН»;
Россия, 630090 Новосибирск, пр-т акад. Лаврентьева, 8;

³ФГАОУ ВО «Новосибирский национальный исследовательский государственный университет»;
Россия, 630090 Новосибирск, ул. Пирогова, 2;

⁴ФГБОУ ВО «Сибирский государственный медицинский университет» Минздрава России;
Россия, 634050 Томск, Московский тракт, 2

Контакты: Елена Анатольевна Замбалова etugutova@mail.ru

Цель исследования — оценить уровень протеаз ADAM10 и ADAM17 (a disintegrin and metalloproteinase), а также 20S-протеасом в экзосомах плазмы крови больных колоректальным раком.

Материалы и методы. В исследование были включены 60 больных колоректальным раком (T2–4N0–2M0–1) и 10 пациентов контрольной группы. Материалом для исследования послужила 3-замещенная калиевая соль этилендиаминтетрауксусной кислоты (ЭДТА) плазма крови. Экзосомы плазмы крови выделены методом ультрафильтрации с ультрацентрифугированием. Уровень тетраспанин-ассоциированных (ADAM10 и ADAM17) и тетраспанин-неассоциированных (20S-протеасомы) протеаз оценивали с помощью проточной цитометрии и вестерн-блоттинга.

Результаты. Дважды негативная субпопуляция (ADAM10–/ADAM17–) преобладала как в экзосомах плазмы крови больных колоректальным раком, так и в экзосомах пациентов контрольной группы. Обнаружены статистически значимые различия в уровне ADAM10+/ADAM17– экзосом у пациентов контрольной группы по сравнению с больными колоректальным раком. Не выявлено значимых различий между субпопуляциями ADAM10/ADAM17 и уровнем 20S-протеасом экзосом в зависимости от пола, возраста и степени дифференцировки опухоли. У пациентов с метастатическим колоректальным раком с гематогенными метастазами выявлено снижение субпопуляции ADAM10+/ADAM17– экзосом по сравнению с пациентами с местно-распространенным колоректальным раком (T2–4N1–2M0) и 20S-протеасом по сравнению с пациентами с T2–4N0M0. В экзосомах больных колоректальным раком с наличием метаболического синдрома выявлено снижение ADAM10–/ADAM17+ экзосом и уровня 20S-протеасом по сравнению с больными без метаболических нарушений.

Ключевые слова: экзосома, 20S-протеасома, члены семейства ADAM-протеаз, ADAM10, ADAM17, колоректальный рак, метаболический синдром

Для цитирования: Замбалова Е.А., Патышева М.Р., Димча А.А. и др. Экзосомальные протеазы при колоректальном раке. Успехи молекулярной онкологии 2018;5(4):117–26.

DOI: 10.17650/2313-805X-2018-5-4-117-126

Exosomal proteases in colorectal cancer

Е.А. Zambalova¹, М.Р. Patysheva¹, А.А. Dimcha¹, С.Н. Tamkovich^{2,3}, А.Е. Grigor'eva²,
Е.С. Kolegova¹, И.В. Kondakova¹, С.Г. Afanas'ev¹, Н.В. Yunusova^{1,4}

¹Cancer Research Institute, Tomsk National Research Medical Center of Russian Academy of Sciences;
5 Kooperativnyy Pereulok, Tomsk 634009, Russia;

²Institute of Chemical Biology and Fundamental Medicine, Siberian Branch of Russian Academy of Sciences;
8 Akad. Lavrent'eva Prospekt, Novosibirsk 630090, Russia;

³Novosibirsk National State Research University; 2 Pirogova St., Novosibirsk 630090, Russia;

⁴Siberian State Medical University; 2 Moskovskiy Tract, Tomsk 634050, Russia

The objective is to evaluate the level of ADAM10 and ADAM17 (a disintegrin and metalloproteinase) proteases, as well as 20S-proteasomes in blood plasma exosomes of patients with colorectal cancer.

Materials and methods. The study included 60 patients with colorectal cancer (T2–4N0–2M0–1) and 10 control patients. The material for the study was EDTA blood plasma. Exosomes of blood plasma were isolated by ultrafiltration with ultracentrifugation. The level of tetraspanin-associated (ADAM10 and ADAM17) and tetraspanin-non-associated (20S-proteasome) proteases was evaluated by flow cytometry and Western blotting.

Results. A twice negative subpopulation (ADAM10–/ADAM17–) predominated in blood plasma exosomes of colorectal cancer patients and control patients. The level of ADAM10+/ADAM17– exosomes was significantly higher in the exosomes of the plasma of control patients. There were no significant differences between the ADAM10/ADAM17 subpopulations and the 20S-proteasome level, depending on sex, age

and tumor grade. A decrease in the ADAM10+/ADAM17- subpopulation was found in patients with metastatic colorectal cancer with haematogenous metastases compared with patients with T2-4N1-2M0 and 20S-proteasome compared to T2-4N0M0. A decrease in ADAM10-/ADAM17+ exosomes and 20S-proteasomes level was found in exosomes of patients with colorectal cancer with a metabolic syndrome in comparison with patients without metabolic disorders.

Key words: exosome, 20S-proteasomes, the members of ADAMs family, ADAM10, ADAM17, colorectal cancer, metabolic syndrome

For citation: Zambalova E.A., Patysheva M.R., Dimcha A.A. et al. Exosomal proteases in colorectal cancer. *Uspekhi molekulyarnoy onkologii = Advances in Molecular Oncology* 2018;5(4):117–26.

Введение

Колоректальный рак (КРР) – один из наиболее распространенных видов опухолей желудочно-кишечного тракта и занимает 2–3-е место в структуре онкологической заболеваемости в большинстве стран мира как у мужчин, так и у женщин. Особенностью является то, что почти в 20 % случаев КРР изначально манифестирует как метастатический. Примерно у трети пациентов с локализованными формами КРР возникают рецидивы опухоли или гематогенные метастазы (чаще в печень) в течение 3 лет [1]. Поэтому важен поиск молекулярных предикторов гематогенного метастазирования у пациентов с локализованным и местнораспространенным КРР в целях персонализации адъювантной терапии.

В настоящее время большое значение в процессах инвазии и метастазирования опухолей придают секретлируемым внеклеточным везикулам, которые представляют собой экзосомы (средний размер 30–100 нм) и микровезикулы (средний размер 100–1000 нм). Они обнаружены во многих биологических жидкостях, таких как плазма, сыворотка крови, моча, слюна, грудное молоко, спинномозговая жидкость, а также при патологических выпотах (например, асцит) [2]. Тетраспанины CD9, CD63, CD81 являются экзосомальными биомаркерами [3, 4]. Около 32 % белкового состава экзосом составляют ферменты [5].

Важную роль в функциональной активности внеклеточных везикул играют протеазы, ферменты класса гидролаз. Показано, что экзосомы несут различные протеазы и их активаторы. Выделяют тетраспанин-ассоциированные, тетраспанин-неассоциированные протеазы, а также протеазы с неизвестной локализацией в экзосоме [4].

Тетраспанин-ассоциированные протеазы ADAM10 и ADAM17 (a disintegrin and metalloproteinase) представляют собой трансмембранные «молекулярные ножницы», которые осуществляют шеддинг – примембранный протеолиз белков, что приводит к расщеплению внеклеточного домена трансмембранных белков [6]. Субстратами шеддаз являются рецепторы факторов роста (EGFR1, HER2, TGFβ-III α), рецепторы адгезии (CD44 и L1CAM), рецептор апоптоза Fas-L. В результате шеддинга происходит модификация клеточных рецепторов с изменением сигналинга от рецепторов факторов роста и адгезии, а также появление растворимых форм рецепторов в биологических жидкостях:

sCD44, sEGFR1, sHER2, sTGFβ-III α , sFas-L [7]. Первоначальный протеолиз CD23, L1CAM и CD44, опосредованный ADAM10, может происходить в мультивезикулярных тельцах внутри клеток. Этот процесс также происходит в экзосомах, высвобождаемых из опухолевых клеток, как показано при исследовании RPMI 8866 В-клеточной линии хронического миелоидного лейкоза, OVMz и SKOV3ip – клеточных линий карциномы яичников [8].

К тетраспанин-неассоциированным экзосомальным протеазам относятся такие белки, как 20S-протеасомы и металлопротеиназа PAPP-A [9, 10]. 20S-протеасома представляет собой цилиндрический мультикаталитический комплекс, состоящий из 2 внутренних β-колец, фланкированных 2 внешними α-кольцами. Протеомные исследования выявили 7α- и 7β-цепей 20S-протеасом в экзосомах, высвобождающихся из мезенхимальных стволовых клеток [11]. В клетках и экзосомах 20S-протеасомы неспособны распознавать и связывать полиубиквитинированные белки, однако эти протеасомы деградируют некоторые поврежденные и чужеродные белки по аденозинтрифосфат- и убиквитин-независимым механизмам [12].

Цель исследования. С учетом важной роли экзосомальных протеаз в регулировании передачи сигналов от рецепторов факторов роста и рецепторов адгезии, подвижности клеток и фолдинга белков целью исследования явилась оценка уровня содержания протеаз ADAM10 и ADAM17, а также 20S-протеасом в циркулирующих экзосомах больных КРР. Кроме того, задачей исследования было определение возможной ассоциации протеаз с клиническими и гистологическими параметрами, а также с наличием метаболического синдрома для поиска перспективных экзосомальных маркеров, связанных с инвазией, метастазированием и метаболическими нарушениями при КРР.

Материалы и методы

Образцы крови пациентов контрольной группы (КП) (средний возраст 44,3 ± 3,1 года) и больных КРР с различными стадиями заболевания (средний возраст 58,6 ± 1,6 года) получены в НИИ онкологии ТНИМЦ.

Пациенты контрольной группы ($n = 10$) были обследованы в условиях поликлинического отделения НИИ онкологии ТНИМЦ. При обследовании, в том числе при видеоколоноскопии, у них исключена

злокачественная опухоль толстой и прямой кишки, а также другая онкологическая патология.

Критериями исключения при формировании группы КРР явились первично-множественные формы КРР, рак стадии Ia (T1N0M0), а также рак прямой кишки с поражением средне- и нижнеампулярного отдела.

Все пациенты с КРР ($n = 60$) были разделены на 2 подгруппы: с метаболическим синдромом ($n = 33$) и без метаболического синдрома ($n = 27$). Критерием включения в группу с метаболическим синдромом с учетом рекомендаций Международной федерации диабета (2005) было наличие абдоминального типа ожирения (окружность талии >94 см для мужчин и >80 см для женщин) в сочетании, по крайней мере, с 2 из 4 дополнительных критериев: повышение уровня триглицеридов в сыворотке крови $>1,7$ ммоль/л или лечение дислипидемии; снижение уровня липопротеинов высокой плотности $<1,03$ ммоль/л для мужчин и $<1,29$ ммоль/л для женщин; высокое артериальное давление (систолическое >135 мм рт.ст. или диастолическое >85 мм рт.ст., или терапия артериальной гипертензии); повышение уровня глюкозы в крови натощак $>5,6$ ммоль/л или выявленный сахарный диабет 2-го типа. Клинические и гистологические параметры для пациентов представлены в табл. 1. Исследование было одобрено локальным комитетом по медицинской этике НИИ онкологии ТНИМЦ. Все пациенты предоставили письменное информированное согласие на участие в исследовании.

Выделение экзосом. Экзосомы плазмы крови выделяли с помощью ультрафильтрации с ультрацентрифугированием. Венозную кровь (18 мл) от КРР и больных КРР собирали в пробирки с 3-замещенной калиевой солью этилендиаминтетрауксусной кислоты (ЭДТА) (BD Vacutainer Plus Tubes, Великобритания). Форменные элементы крови осаждали центрифугированием в течение 20 мин при 1200g (бакет-ротатор, Labofuge 400R, Thermo Fisher Scientific, США) и температуре 4 °C. Для удаления клеточного дедбриса образцы плазмы центрифугировали при 17000g (угловой ротор, центрифуга 5415R, Eppendorf) и температуре 4 °C в течение 20 мин. Для удаления везикул более 100 нм супернатант разбавляли в 5 раз PBS (10 mM фосфатным буфером; 0,15 M NaCl, pH 7,5) и пропускали через фильтр размером пор 100 нм (Minisart high flow, 16553-K, Sartorius). Для осаждения экзосом фильтрат центрифугировали при 100000g (бакет-ротатор, Optima XPN 80, Beckman Coulter, США) и температуре 4 °C в течение 90 мин, осадок ресуспендировали в 10 мл фосфатно-солевого буфера (PBS) и дважды центрифугировали при тех же условиях. Выделенные экзосомы ресуспендировали в 350 мкл PBS. Аликвоты экзосом замораживали в жидком азоте и хранили при температуре -80 °C.

Электронная микроскопия экзосом. Для негативно контрастирования образцы экзосом сорбировали на медные сетки с формваровой подложкой,

Таблица 1. Клинические и гистологические параметры больных КРР

Table 1. Clinical and histological characteristics of patients with CRC

Параметр Parameter	n	%
Пол: Sex:		
мужской male	29	48,3
женский female	31	51,7
Возраст, лет: Age, years:		
≤ 59	18	30,0
> 59	42	70,0
Стадия: Stage:		
T2–4N0M0 (локализованный КРР) T2–4N0M0 (localized CRC)	27	45,0
T2–4N1–2M0 (местно-распространенный КРР) T2–4N1–2M0 (locally advanced CRC)	25	41,6
TanyNanyM1 (метастатический КРР) TanyNanyM1 (metastatic CRC)	8	13,4
Степень дифференцировки: Differentiation grade:		
G _{1–2}	53	88,3
G ₃	7	11,7
Наличие метаболического синдрома: Presence of metabolic syndrome:		
есть yes	33	55,0
нет no	27	45,0

Примечание. КРР – колоректальный рак.

Note. CRC – colorectal cancer.

стабилизированной углеродом, в течение 1 мин и 10 с и контрастировали 2 % раствором фосфорно-вольфрамовой кислоты. Сетки были изучены с использованием просвечивающего электронного микроскопа Jem 1400 (Jeol, Япония), изображения получены с помощью цифровой камеры Veleta (Olympus Corporation, Япония).

Количественная оценка белка в экзосомах. Для оценки концентрации белка в экзосомах применяли набор количественного определения NanoOrange Protein (Molecular Probes, США) в соответствии с рекомендациями производителя.

Проточная цитометрия. Альдегид-сульфатные латексные частицы диаметром 4 мкм (Thermo Fisher Scientific, США) инкубировали с антителами против CD9 (ab134375, Abcam) или CD24 (bsm-50424M, Bioss) при комнатной температуре в течение 14 ч при осторожном перемешивании. Аликвоты экзосом (около 30 мкг экзосомального белка) инкубировали с комплексами антитело-латексные частицы в 100 мкл PBS при температуре 4 °C в течение 14 ч при осторожном

перемешивании. Реакцию блокировали 0,2 М глицином в течение 30 мин при температуре 4 °С. Комплексы «экзосомы—антитело—латексные частицы» дважды отмывали промывочным буфером (PBS с добавлением 2 % бычьей сыворотки, деплетированной от экзосом), инкубировали с блокирующим иммуноглобулином G (IgG) (BD BioSciences, США) при комнатной температуре в течение 10 мин, отмывали, затем проводили инкубацию с FITC-конъюгированными антителами против тетраспанинов (CD63, CD81, CD9, CD24) (BD BioSciences, США) при температуре 4 °С в течение 50 мин. Комплексы отмывали дважды промывочным буфером и исследовали образцы на цитометре FACS Canto II (BD BioSciences, США), данные анализировали с использованием программного обеспечения FACS Diva 6.1. Медиана интенсивности флуоресценции экзосом была проанализирована по сравнению с изотипическим контролем (BD BioSciences, США) и отрицательным контролем.

Анализ субпопуляций ADAM10/ADAM17 экзосом. Аликвоты экзосом (около 30 мкг экзосомального белка) инкубировали с 3×10^5 анти-CD9 латексными частицами в 150 мкл PBS при температуре 4 °С в течение ночи при осторожном перемешивании и блокировали в 0,2 М глицине в течение 30 мин, затем окрашивали анти-ADAM10 (CD156c) – PE (5 мкл на тест; BioLegend, США) и анти-ADAM17/TACE (разведение 1:10; LifeSpan BioSciences, США) в течение 20 мин при комнатной температуре. Затем комплексы окрашивали вторичным антителом IgG, Alexa Fluor 488 (разведение 1:3000; Thermo Fisher Scientific, США). Проточная цитометрия выполнена на цитометре Cytotflex (Beckman Coulter, США). Данные анализировали с помощью программного обеспечения CytExpert 2.0.

Вестерн-блоттинг. Аликвоты экзосом (30 мкл, 7 мкг экзосомального белка) были инкубированы в течение 90 мин на льду с 7 мкл лизис-буфера (125 мМ Трис-НСl; рН 7–8; 750 мМ NaCl; 0,5 % SDS; 5 % Triton X-100) с добавлением 3 мкл протеазного коктейля (1,3 мМ апротинина (Sigma, США), 0,33 мМ пепстатина А (ICN, США), 1 мкг/мл лейпептина (ICN, США)). Образцы лизированных экзосом инкубировали с sample-буфером при температуре 95 °С в течение 7 мин и центрифугировали при 13000g в течение 5 мин. Супернатанты образцов наносили на 13 % ПАА-гель для SDS-PAGE электрофореза по Lemmli. После электрофореза белки переносили на PVDF-мембрану (Immobilon, Millipore, США). Мембрану блокировали раствором 1X iBind (Invitrogen, США). Связывание с первичным антителом к 20S-протеасомам (анти-Proteasome 20S-альфа+бета ab22673; Abcam, Великобритания); 1:2000), промывку, связывание со вторичным антителом (IgA-HRP антитело, Santa Cruz Biotechnology, 1:5000) проводили с использованием автоматизированного устройства iBind Western Device (Thermo Fisher Scientific, США). Далее мембрану инкубировали с раствором детекции Amersham ECL

(Amersham, США). Визуализация была выполнена в системе ChemiDoc Touch (Bio-Rad, США). Плотность полос оценивали с использованием компьютерной программы ImageLab. Результаты были стандартизированы с учетом уровня CD63 в экзосомах и выражены в условных единицах от уровня 20S-протеасом в экзосомах у КП.

Статистический анализ. Статистическую обработку данных проводили в программе Statistica 10.0. Данные проанализированы на соответствие выборки нормальному распределению с использованием критерия Шапиро–Уилка. Все данные выражены как медианы с межквартильным размахом или как средние со стандартными ошибками. Достоверность различий оценивали с помощью U-критерия Манна–Уитни и критерия Крускала–Уоллиса. Различия считали достоверными при значениях $p \leq 0,05$.

Результаты

Характеристика экзосом плазмы. Принадлежность выделенных везикул к классу экзосом была подтверждена методом трансмиссионной электронной микроскопии. В препаратах экзосом, выделенных из плазмы крови КП и больных КРР, обнаружены четко структурированные частицы чашеобразной формы низкой электронной плотности с сохранной мембраной (рис. 1). Выявлено, что их морфология не отличается от экзосом больных с другими злокачественными новообразованиями [13]. В препаратах также присутствовали частицы, не соответствующие экзосомам по морфологии [14].

Выделенные экзосомы также охарактеризованы методом проточной цитометрии на наличие экзосомальных маркеров (CD9, CD24, CD63 и CD81). Сочетание конъюгированных и неконъюгированных антител позволяет идентифицировать различные субпопуляции экзосом. По снижению медианы интенсивности флуоресценции субпопуляции экзосом распределялись следующим образом: CD24/CD9 > CD9/CD81 > CD24/CD63 > CD9/CD63 (экзосомы плазмы крови КП); CD9/CD81 > CD9/CD63 > CD24/CD9 > CD24/CD63 (экзосомы плазмы крови больных КРР). Таким образом, субпопуляционный состав экзосом из плазмы крови КП и больных КРР различен (табл. 2).

Статистически значимых различий в уровне экзосомального белка между препаратами от КП и больных КРР не обнаружено.

Анализ субпопуляций ADAM10/ADAM17 экзосом плазмы крови. Фенотипирование экзосом методом проточной цитометрии подразумевает анализ экзосом с использованием латексных частиц, покрытых антителом. Согласно результатам, полученным на предыдущем этапе нашей работы, мы использовали латексные частицы с антителами против CD9 для обнаружения субпопуляций ADAM10/ADAM17 экзосом в плазме КП и больных КРР (рис. 2a).

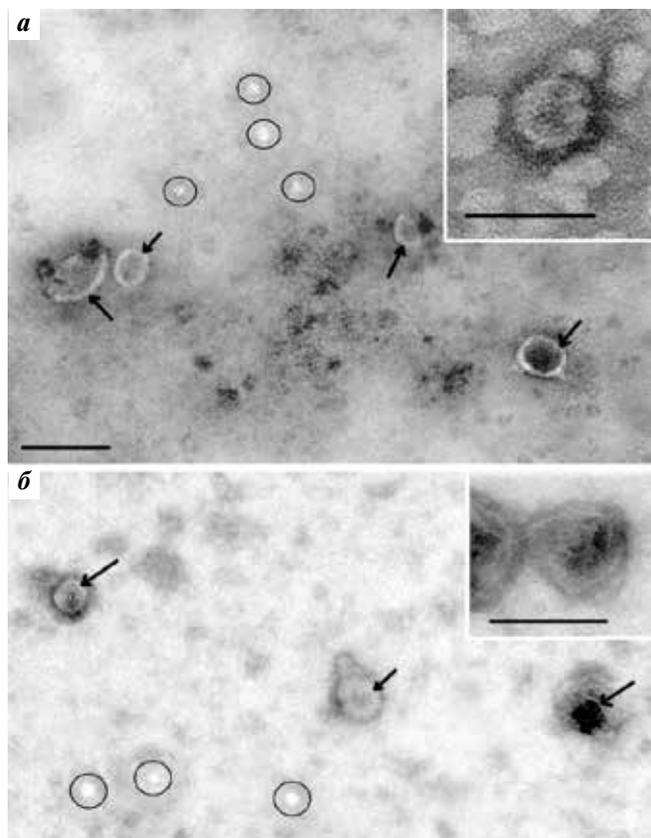


Рис. 1. Общий вид препаратов экзосом, полученных из плазмы крови пациента контрольной группы (а), больного колоректальным раком (б) (электронная микроскопия, негативное контрастирование фосфорно-вольфрамовой кислотой). На вставках изображены экзосомы. Стрелки указывают на экзосомы, эллипсы — «невезикулы». Размер шкалы соответствует 100 нм

Fig. 1. General appearance of exosome samples isolated from plasma of a control patient (a), patient with colorectal cancer (b) (electron microscopy, negative contrast with phosphorous-wolfram acid). Panels show exosomes. Arrows point at exosomes, ellipses — at non-vesicles. Scale 100 nm

Распределение субпопуляций ADAM10/ADAM17 у КП и больных КРР оказалось сходным (рис. 2б–г). Субпопуляция ADAM10–/ADAM17– преобладала в обеих группах (у больных КРР — $88,0 \pm 4,4$ %, у КП — $77,0 \pm 3,85$ %; $p > 0,05$) по сравнению с другими субпопуляциями экзосом. Выявлены статистически значимые различия в уровне ADAM10+/ADAM17– экзосом у КП по сравнению с больными КРР: $12,0 \pm 0,6$ и $7,0 \pm 0,35$ % соответственно ($p < 0,05$) (рис. 2г). Статистически значимое снижение уровня ADAM10+/ADAM17– экзосом обнаружено у пациентов с метастатическим КРР по сравнению с пациентами с распространенностью процесса T2–4N1–2M0, т.е. при отсутствии отдаленных метастазов (рис. 3). Не выявлено значимых различий между субпопуляциями ADAM10/ADAM17 экзосом в зависимости от пола, возраста и степени дифференцировки.

Уровень 20S-протеасом экзосом плазмы крови. Анализ вестерн-блоттинг показал, что уровень 20S-протеасом в экзосомах плазмы больных КРР в 1,8 раза выше, чем в экзосомах КП (рис. 4а). Максимальный уровень

Таблица 2. Экспрессия CD9, CD24, CD63 и CD81 на поверхности экзосом плазмы крови пациентов контрольной группы и больных колоректальным раком, $m \pm M$

Table 2. CD9, CD24, CD63 and CD81 expression on the surface of plasma exosomes of control patients and patients with colorectal cancer, $m \pm M$

Экспрессия Expression	Пациенты контрольной группы Control patients	Больные колорек- тальным раком Patients with colorectal cancer
CD9-положительные экзосомы CD9-positive exosomes		
CD63	513 ± 76	720 ± 84
CD81	645 ± 97	$1020 \pm 105^*$
CD24-положительные экзосомы CD24-positive exosomes		
CD9	1048 ± 120	$680 \pm 85^*$
CD63	523 ± 75	500 ± 71

*Значимые различия по сравнению с экзосомами контрольных пациентов.

*Significant differences compared to exosomes of control patients.

20S-протеасом в экзосомах плазмы крови выявлен у больных КРР с локализованным процессом (T2–4N0M0). Значительные различия обнаружены в уровне 20S-протеасом между этими пациентами (T2–4N0M0) и больными с КРР при наличии гематогенных метастазов: $2,31 \pm 0,11$ и $1,45 \pm 0,07$ усл. ед. соответственно ($p < 0,05$) (рис. 4б). Значимых различий в уровне 20S-протеасом в зависимости от пола, возраста и степени дифференцировки не выявлено.

Связь ADAM10, ADAM17 и 20S-протеасом экзосом с метаболическим синдромом у больных КРР. В данном исследовании заболеваемость метаболическим синдромом больных КРР составляла 55 %. Метаболический синдром чаще встречался у женщин (64 %), чем у мужчин (36 %). Нами обнаружено, что уровень ADAM10–/ADAM17 экзосом был значительно снижен у больных КРР с метаболическим синдромом по сравнению с пациентами без него: $3,97 \pm 0,71$ и $13,04 \pm 1,34$ % соответственно ($p < 0,05$) (рис. 5а). Выявлено снижение уровня 20S-протеасом в экзосомах плазмы крови больных КРР с метаболическим синдромом по сравнению с больными КРР без метаболических нарушений: $1,98 \pm 0,25$ и $2,92 \pm 0,42$ усл. ед. соответственно ($p < 0,05$) (рис. 5б).

Обсуждение

В настоящее время существуют противоречивые данные о количестве циркулирующих экзосом у пациентов с КРР. Ряд авторов утверждают, что нет существенной разницы в средней концентрации экзосом между препаратами крови больных и здоровых лиц [15]. Другие авторы считают, что доля экзосом при КРР статистически выше, чем у здоровых лиц. Высокий

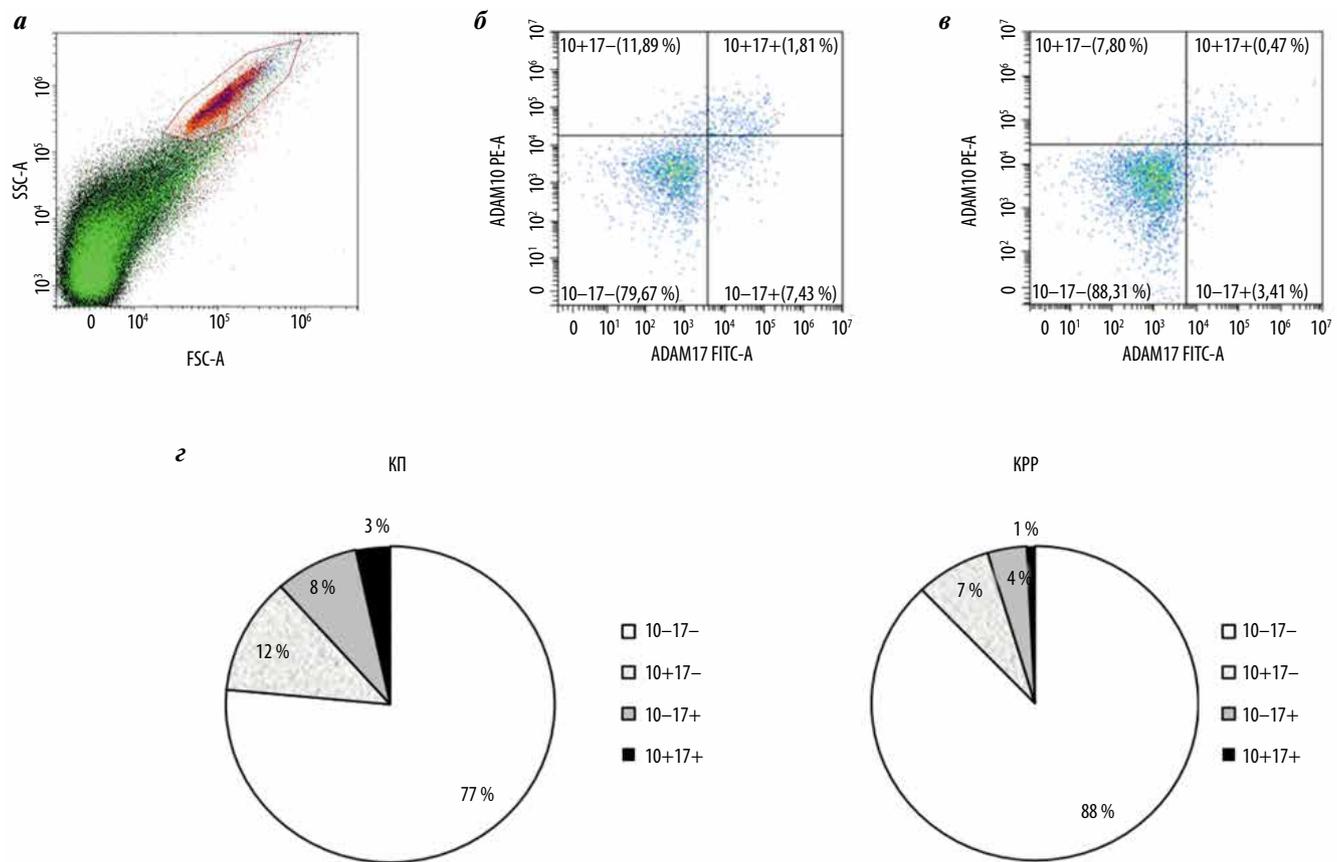


Рис. 2. Различия между субпопуляциями ADAM10/ADAM17 экзосом, выделенных из плазмы крови пациентов контрольной группы (КП) и больных колоректальным раком (KPP): а – прямое (FSC-A) и боковое (SSC-A) светорассеяние комплексов экзосом с альдегид-сульфатными латексными частицами; б, в – двойное мечение антителами против ADAM10 и ADAM17 экзосом плазмы крови КП (б) и больных KPP (в); г – процентное соотношение ADAM10/ADAM17 субпопуляций экзосом плазмы крови. Проточная цитометрия плазменных экзосом

Fig. 2. Differences between ADAM10/ADAM17 exosome subpopulations isolated from plasma of control patients (CP) and patients with colorectal cancer (CRC): а – direct (FSC-A) and lateral (SSC-A) light scattering of exosome complexes with aldehyde-sulfate latex particles; б, в – dual staining with antibodies against ADAM10 and ADAM17 exosomes from plasma of CPs (б) and patients with CRC (в); г – ratio between ADAM10/ADAM17 exosome plasma subpopulations in percent. Plasma exosome flow cytometry

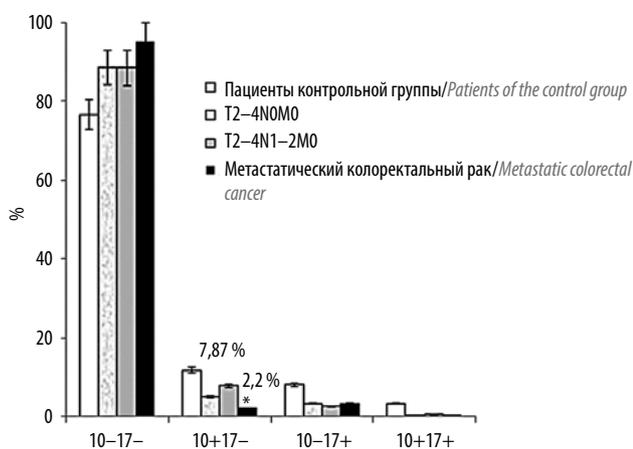


Рис. 3. Процентное соотношение субпопуляций ADAM10/ADAM17 экзосом плазмы крови больных колоректальным раком в зависимости от стадии заболевания. *Значимое различие по сравнению с больными с T2-4N1-2M0

Fig. 3. Ratio between ADAM10/ADAM17 plasma exosome subpopulations in percent in patients with colorectal cancer depending on disease stage. *Significant difference compared to patients with T2-4N1-2M0

уровень экзосом в плазме пациентов с KPP коррелировал с высоким уровнем раково-эмбрионального антигена и низкой степенью дифференцировки опухоли [16]. По-видимому, это связано с различными подходами к выделению экзосом и определением белка в изолированных везикулах.

Данные о субпопуляционном составе экзосом больных KPP немногочисленны. CD147 и CD9 дабл-положительные экзосомы встречались чаще в плазме крови больных KPP, чем у здоровых доноров [17]. Субпопуляция CD9/CD81 экзосом преобладала в плазме крови больных KPP и занимала около 31,8 % [15], что соответствует нашим данным.

Известно, что ADAM10 проявляет протеолитическую активность в мультивезикулярных тельцах, поэтому зрелый ADAM10 уже включен в экзосомы [18]. Включение зрелого ADAM10 в экзосомы и его протеолитическую активность регулируют тетраспанины CD9, CD81, CD82 [19]. ADAM17 переносится в эндоплазматический ретикулум в неактивной, латентной форме, которая взаимодействует с неактивным белком iRHOM2. Это способствует транслокации pro-ADAM17

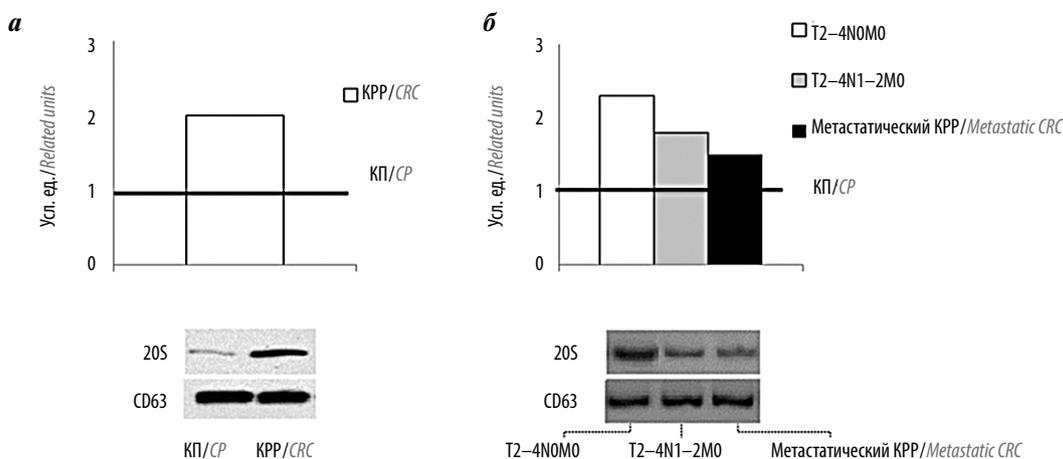


Рис. 4. Анализ вестерн-блоттинг: а – уровень 20S-протеасом экзосом плазмы крови больных колоректальным раком (КРР) по сравнению с пациентами контрольной группы (КП); б – уровень 20S-протеасом экзосом в зависимости от стадии заболевания. Результаты стандартизованы с учетом уровня CD63 в экзосомах и выражены в условных единицах от уровня 20S-протеасом в экзосомах у КП
Fig. 4. Western-blotting analysis: а – exosomal 20S proteasome level in plasma of patients with colorectal cancer (CRC) compared to control patients (CP); б – exosomal 20S proteasome level depending on disease stage. Results normalized taking into account CD63 level in exosomes and expressed in arbitrary units of exosomal 20S proteasome level in CP

в комплекс Гольджи, где он активируется фурин-конвертазой [20]. На клеточных культурах (линия эпителиальных клеток альвеолярной легочной карциномы A549, клеточной линии эпителиального рака молочной железы MDA-MB-231, линии эмбриональной почки человека HEK293 и линии клеток лейкемии человека THP-1) показано выделение ADAM17 в составе экзосом [21]. Комплексный протеомный анализ выявил определенную взаимосвязь между субъединицами 20S-протеасом и рибосомными белками в опухоли-ассоциированных макрофагах [22]. Изменения в химотрипсинаподобной активности протеасом в клетках КРР по сравнению с соответствующими нормальными тканями наблюдались в сочетании с повышенной экспрессией иммунных субъединиц и/или протеасомным активатором RA28β, связанным с активностью 20S-протеасомы [23]. Высокий уровень 20S-протеасом в экзосомах плазмы крови больных КРР, выявленный в нашей работе, по-видимому, обусловлен увеличени-

ем экспрессии как 26S-, так и 20S-пулов в опухолевой ткани, что необходимо для клеток-реципиентов для реализации множества протеасомных функций в опухолевых клетках и микроокружении опухоли [12]. У пациентов с метастатическим КРР с гематогенными метастазами выявлено снижение субпопуляции ADAM10+/ADAM17 – экзосом по сравнению с пациентами с местно-распространенным КРР (T2-4N1-2M0) и 20S-протеасом по сравнению с группой T2-4N0M0, что требует дальнейшего изучения.

КРР в настоящее время рассматривается как злокачественное новообразование, в значительной степени связанное с метаболическим синдромом [24]. Согласно нашим ранее опубликованным данным метаболический синдром обнаружен примерно в 60 % случаев КРР со стадиями II–III, что соответствует данным литературы [25, 26]. Показано, что наличие метаболического синдрома коррелирует с увеличением количества в крови прокоагулянтных

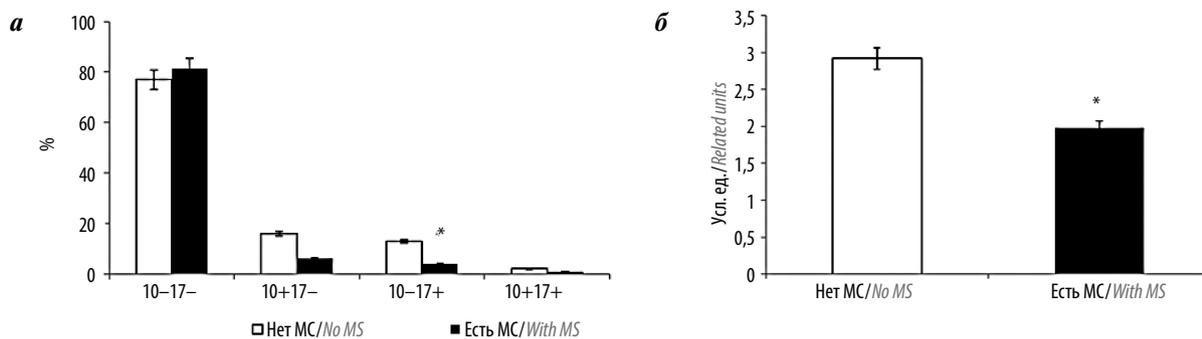


Рис. 5. Экспрессия ADAM10, ADAM17 и 20S-протеасом в зависимости от наличия метаболического синдрома: субпопуляции ADAM10/ADAM17 (в %) в экзосомах плазмы крови больных колоректальным раком (а) и уровень 20S-протеасом (в усл. ед.) экзосом больных колоректальным раком (б). МС – метаболический синдром. *Значимые различия по сравнению с больными колоректальным раком без МС
Fig. 5. ADAM10, ADAM17 and 20S proteasome expression depending on the presence of metabolic syndrome: ADAM10/ADAM17 subpopulations (in %) in plasma exosomes of patients with colorectal cancer (а) and exosomal 20S proteasome level (in AU) in patients with colorectal cancer (б). MS – metabolic syndrome. *Significant differences compared to patients with colorectal cancer without MS

внеклеточных везикул, экспрессирующих тканевой фактор (TF+), полученных из тромбоцитов (аннексин V/CD41+ и CD62P+), эндотелиальных клеток (CD31+/CD41– и CD62E+) и лейкоцитов (CD45+) по сравнению с здоровыми лицами [27]. Кроме того, как внеклеточные везикулы, так и экзосомы несут комплекс маркеров, связанных с ожирением и резистентностью к инсулину, а экзосомы, полученные из адипоцитов, способствуют метастазированию [28, 29]. В настоящее время свойства экзосом при КРР, связанные с ожирением или метаболическим синдромом, не описаны. Потеря ADAM17 и 20S-протеасом в экзосомах, по нашим данным, может быть связана с наличием метаболического синдрома у больных КРР. Изучение субпопуляций, связанных с тетраспаннин-ассоциированными и тетраспаннин-неассоциированными протеазами в экзосомах, полученных из адипоцитов, прояснило бы роль ожирения в перераспределении экзосомальных протеаз.

Заключение

Дважды негативная субпопуляция (ADAM10–/ADAM17–) преобладала как в экзосомах плазмы крови больных КРР, так и в экзосомах КР. Обнаружены статистически значимые различия в уровне ADAM10+/ADAM17– экзосом у КР по сравнению с больными КРР. Не выявлено значимых различий между субпопуляциями ADAM10/ADAM17 и уровнем 20S-протеасом экзосом в зависимости от пола, возраста и степени дифференцировки опухоли. У пациентов с метастатическим КРР с гематогенными метастазами отмечено снижение уровня субпопуляции ADAM10+/ADAM17– экзосом по сравнению с пациентами с местно-распространенным КРР (T2–4N1–2M0) и 20S-протеасом по сравнению с группой T2–4N0M0. В экзосомах больных КРР с наличием метаболического синдрома выявлено снижение ADAM10–/ADAM17+ экзосом и уровня 20S-протеасом по сравнению с больными без метаболических нарушений.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

- Loree J., Kopetz S. Recent developments in the treatment of metastatic colorectal cancer. *Ther Adv Med Oncol* 2017;9(8):551–64. DOI: 10.1177/1758834017714997. PMID: 28794806.
- Li W., Li C., Zhou T. et al. Role of exosomal proteins in cancer diagnosis. *Mol Cancer* 2017;16(1):145. DOI: 10.1186/s12943-017-0706-8. PMID: 28851367.
- Yunusova N.V., Tamkovich S.N., Stakheeva M.N. et al. The characterization of exosome from blood plasma of patients with colorectal cancer. *AIP Conference Proceedings* 2016;1760, № 020070.
- Юнусова Н.В., Тугутова Е.А., Тамкович С.Н. и др. Роль тетраспанинов и протеаз экзосом в опухолевой прогрессии. *Биомедицинская химия* 2018;64(2):123–33. DOI: 10.18097/PBMC20186402123. [Yunusova N.V., Tugutova E.A., Tamkovich S.N. et al. The role of exosomal tetraspanins and proteases in tumor progression. *Biomeditsinskaya khimiya = Biomedical Chemistry* 2018;64(2):123–33. DOI: 10.18097/PBMC20186402123. (In Russ.)].
- Mathivanan S., Ji H., Simpson R.J. Exosomes: extracellular organelles important in intercellular communication. *J Proteomics* 2010;73(10):1907–20. DOI: 10.1016/j.jprot.2010.06.006. PMID: 20601276.
- Matthews A.L., Noy P.J., Reyat J.S. et al. Regulation of A disintegrin and metalloproteinase (ADAM) family sheddases ADAM10 and ADAM17: The emerging role of tetraspanins and rhomboids. *Platelets* 2017;28(4):333–41. DOI: 10.1080/09537104.2016.1184751. PMID: 27256961.
- Lee S.B., Schramme A., Doberstein K. et al. ADAM10 is upregulated in melanoma metastasis compared with primary melanoma. *J Invest Dermatol* 2010;130(3):763–73. DOI: 10.1038/jid.2009.335. PMID: 19865098.
- Stoeck A., Keller S., Riedel S. et al. A role for exosomes in the constitutive and stimulus-induced ectodomain cleavage of L1 and CD44. *Biochem J* 2006;393(3):609–18. DOI: 10.1042/BJ20051013. PMID: 16229685.
- Юнусова Н.В., Спирина Л.В., Кондакова И.В. и др. Связь экспрессии металлопротеиназы PAPP-A с экспрессией ростовых и транскрипционных факторов при раке эндометрия. *Известия РАН. Серия биологическая* 2013;3:284. DOI:10.7868/S0002332913030119. [Yunusova N.V., Spirina L.V., Kondakova I.V. et al. Relationship between the expression levels of PAPP-A metalloprotease and growth and transcriptional factors in endometrial cancer. *Izvestiya RAN. Seriya biologicheskaya = Biology Bulletin* 2013;3:284. (In Russ.)].
- Kondakova I.V., Yunusova N.V., Spirina L.V. et al. Association between intracellular proteinase activities and the content of locomotor proteins in tissues of primary tumors and metastases of ovarian cancer. *Bioorg Chem* 2014;40(6):681–7. PMID: 25895370.
- Lai R.C., Tan S.S., Teh B.J. et al. Proteolytic potential of the MSC exosome proteome: implications for an exosome-mediated delivery of therapeutic proteasome. *J Proteomics* 2012;12:971907. DOI: 10.1155/2012/971907. PMID: 22852084.
- Sharova N., Zakharova L. Multiple forms of proteasomes and their role in tumor fate. *Recent Patents On Endocrine, Metabolic & Immune Drug Discovery* 2005;2(3):152–61.
- Тамкович С.Н., Юнусова Н.В., Стахеева М.Н. и др. Выделение и характеристика экзосом плазмы крови больных раком молочной железы и колоректальным раком. *Биомедицинская химия* 2017;63(2):165–9. DOI: 10.18097/PBMC20176302165. [Tamkovich S.N., Yunusova N.V., Stakheeva M.N. et al. Isolation and characterization of exosomes from blood plasma of breast cancer and colorectal cancer patients. *Biomeditsinskaya khimiya = Biomedical Chemistry* 2017;63(2):165–9. (In Russ.)].
- Григорьева А.Е., Дырхеева Н.С., Брызгунова О.Е. и др. Контаминация препаратов экзосом, выделенных из биологических жидкостей. *Биомедицинская химия* 2017;63(1):91–6. DOI: 10.18097/PBMC2017630191. [Grigorieva A.E., Dyrkheeva N.S., Bryzgunova O.E. et al. Contamination of exosome preparations isolated from biological fluids *Biomeditsinskaya khimiya = Biomedical Chemistry* 2017;63(1):91–6. (In Russ.)].
- Tian Y., Ma L., Gong M. et al. Protein profiling and sizing of extracellular vesicles from colorectal cancer patients via flow cytometry. *ACS Nano* 2018;12(1):671–80. DOI: 10.1021/acsnano.7b07782. PMID: 29300458.
- Silva J., Garcia V., Rodriguez M. et al. Analysis of exosome release and its prog-

- nostic value in human colorectal cancer. *Genes Chromosomes Cancer* 2012;51(4):409–18. PMID: 22420032.
17. Yoshioka Y., Kosaka N., Konishi Y. et al. Ultra-sensitive liquid biopsy of circulating extracellular vesicles using ExoScreen. *Nat Commun* 2011;5:3591. DOI: 10.1038/ncomms4591. PMID: 24710016.
 18. Mathews J.A., Gibb D.R., Chen B.H. et al. CD23 Shedase A disintegrin and metalloproteinase 10 (ADAM10) is also required for CD23 sorting into B cell-derived exosomes. *J Biol Chem* 2010;285(48):37531–41. DOI: 10.1074/jbc.M110.141556. PMID: 20876574.
 19. Arduise C., Abache T., Li L. et al. Tetraspanins regulate ADAM10-mediated cleavage of TNF-alpha and epidermal growth factor. *J Immunol* 2008;181(10):7002–13. PMID: 18981120.
 20. Lopez-Verrilli M.A., Picou F., Court F.A. Schwann cell-derived exosomes enhance axonal regeneration in the peripheral nervous system. *Glia* 2013;61(11):1795–806. DOI: 10.1002/glia.22558. PMID: 24038411.
 21. Groth E., Pruessmeyer J., Babendreyer A. et al. Stimulated release and functional activity of surface expressed metalloproteinase ADAM17 in exosomes. *Biochim Biophys Acta* 2016;1863(11):2795–808. DOI: 10.1016/j.bbamer.2016.09.002. PMID: 27599715.
 22. Zhu Y., Chen X., Pan Q.J. et al. A comprehensive proteomics analysis reveals a secretory path- and status-dependent signature of exosomes released from tumor-associated macrophages. *Proteome Res* 2015;14(10):4319–31. DOI: 10.1021/acs.jproteome.5b00770.
 23. Кондакова И.В., Спирина Л.В., Коваль В.Д. и др. Химотрипсинподобная активность и субъединичный состав протеасом в злокачественных опухолях человека. *Молекулярная биология* 2014;48(3):384–9. DOI: 10.7868/S0026898414030112. [Kondakova I.V., Spirina L.V., Koval V.D. et al. Chymotrypsin-like activity and subunit composition of proteasomes in human cancers. *Molekulyarnaya biologiya = Molecular Biology* 2014;48(3):384–9. (In Russ.)].
 24. Yunusova N.V., Kondakova I.V., Kolomiets L.A. et al. Molecular targets for the therapy of cancer associated with metabolic syndrome (transcription and growth factors). *Asia Pac J Clin Oncol* 2017;14(3):134–40. DOI: 10.1111/ajco.12780. PMID: 29115033.
 25. Юнусова Н.В., Кондакова И.В., Коломиец Л.А. и др. Адипокины и их рецепторы у больных раком эндометрия и ободочной кишки: связь с инвазией и метастазированием. *Вопросы онкологии* 2015;61(4):619–23. [Yunusova N.V., Kondakova I.V., Kolomiets L.A. et al. Serum adipokines and their receptors in endometrial and colon cancer patients: relationship with tumor progression and metastasis. *Voprosy onkologii = Problems in Oncology* 2015;61(4):619–23. (In Russ.)].
 26. Yunusova N.V., Spirina L.V., Frolova A.E. et al. Association of IGF1R-6 expression with metabolic syndrome and adiponectin and IGF-1R receptor levels in colorectal cancer. *Asian Pac J Cancer Prev* 2016;17(8):3963–9. DOI: 10.22034/APJCP.2016.17.12.5315. PMID: 27644646.
 27. Martinez M.C., Andriantsitohaina R. Extracellular Vesicles in Metabolic Syndrome. *Circ Res* 2017;120(10):1674–86. DOI: 10.1161/CIRCRESA-NA.117.309419.
 28. Eitan E., Tosti V., Suire C.N. et al. In a randomized trial in prostate cancer patients, dietary protein restriction modifies markers of leptin and insulin signaling in plasma extracellular vesicles. *Aging Cell* 2017;16(6):1430–3. DOI 10.1111/ace1.12657. PMID: 28921841.
 29. Wang J., Wu Y., Guo J. et al. Adipocyte-derived exosomes promote lung cancer metastasis by increasing MMP9 activity via transferring MMP3 to lung cancer cells. *Oncotarget* 2017;8(47):81880–91. DOI: 10.18632/oncotarget.18737. PMID: 29137230.

Вклад авторов

Е.А. Замбалова: выделение экзосом, проточная цитометрия, статистический анализ, обзор публикаций, написание текста рукописи;
 М.Р. Патышева: проточная цитометрия, обзор публикаций;
 А.А. Димча: сбор клинических данных;
 С.Н. Тамкович: анализ полученных данных;
 А.Е. Григорьева: трансмиссионная электронная микроскопия;
 Е.С. Колегова: вестерн-блоттинг;
 И.В. Кондакова: обзор публикаций по теме статьи, анализ полученных данных;
 С.Г. Афанасьев: разработка дизайна исследования, анализ полученных данных;
 Н.В. Юнусова: обзор публикаций, анализ полученных данных.

Authors' contributions

E.A. Zambalova: exosome isolation, flow cytometry, statistical analysis, reviewing of publications, article writing;
 M.R. Patysheva: flow cytometry, reviewing of publications;
 A.A. Dimcha: collecting of clinical data;
 S.N. Tamkovich: analysis of obtained data;
 A.E. Grigor'eva: transmission electron microscopy;
 E.S. Kolegova: western-blotting;
 I.V. Kondakova: reviewing of publications, analysis of obtained data;
 S.G. Afanas'ev: developing the research design, analysis of obtained data;
 N.V. Yunusova: reviewing of publications, analysis of obtained data.

ORCID авторов/ORCID of authors

Е.А. Замбалова/E.A. Zambalova: <https://orcid.org/0000-0003-3698-8455>
 М.Р. Патышева/M.R. Patysheva: <https://orcid.org/0000-0003-2865-7576>
 А.А. Димча/A.A. Dimcha: <https://orcid.org/0000-0002-9551-1908>
 С.Н. Тамкович/S.N. Tamkovich: <https://orcid.org/0000-0001-7774-943X>
 Е.С. Колегова/E.S. Kolegova: <https://orcid.org/0000-0001-9122-3274>
 И.В. Кондакова/I.V. Kondakova: <https://orcid.org/0000-0003-0907-4615>
 С.Г. Афанасьев/S.G. Afanas'ev: <https://orcid.org/0000-0002-4701-0375>
 Н.В. Юнусова/N.V. Yunusova: <https://orcid.org/0000-0003-4595-4177>

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.
Conflict of interest. The authors declare no conflict of interest.

Финансирование. Исследование выполнено при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований и администрации Томской области в рамках научного проекта № 18-415-703 006.

Financing. The reported research was funded by Russian Foundation for Basic Research and the government of the Tomsk region of the Russian Federation, grant № 18-415-703 006.

Информированное согласие. Все пациенты подписали информированное согласие на участие в исследовании.

Informed consent. All patients gave written informed consent to participate in the study.