

DOI: 10.17650/2313-805X-2022-9-3-38-48



# Матриксные металлопротеиназы и белки теплового шока на внеклеточных везикулах у больных колоректальным раком: связь с метаболическим статусом

Н.В. Юнусова<sup>1,2</sup>, Д.А. Сваровский<sup>2</sup>, Е.Э. Дандарова<sup>2</sup>, Д.Н. Костромицкий<sup>1</sup>, А.А. Димча<sup>1</sup>, О.В. Черемисина<sup>1</sup>, С.Г. Афанасьев<sup>1</sup>, А.И. Коновалов<sup>1</sup>, Ж.А. Старцева<sup>1</sup>, И.В. Кондакова<sup>1</sup>, М.Р. Патышева<sup>1</sup>, А.Е. Григорьева<sup>3</sup>, Л.В. Спирина<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Научно-исследовательский институт онкологии ФГБНУ «Томский национальный исследовательский медицинский центр Российской академии наук»; Россия 634009, Томск, Кооперативный пер., 5;

<sup>2</sup>ФГБОУ ВО «Сибирский государственный медицинский университет» Минздрава России; Россия, 634050 Томск, Московский тракт, 2;

<sup>3</sup>Институт химической биологии и фундаментальной медицины Сибирского отделения Российской академии наук; Россия, 630090 Новосибирск, проспект Академика Лаврентьева, 8

**Контакты:** Дмитрий Андреевич Сваровский [svarovsky.d.a@gmail.com](mailto:svarovsky.d.a@gmail.com)

**Введение.** У большинства больных колоректальным раком (КРР) опухоль возникает на фоне метаболически здорового ожирения, или метаболического синдрома (более чем в 60 % случаев), ключевым патогенетическим моментом которого является развивающаяся гиперинсулинемия. Метаболические изменения также характерны для больных с полипами толстой кишки (ПТК), которые в настоящее время рассматриваются как наиболее значимые предраковые заболевания. Показано, что фракции малых внеклеточных везикул (ВВ) адипоцитарного происхождения специфически обогащены белками внеклеточного матрикса, включая матриксные металлопротеиназы (ММПs), шаперонами, а также некоторыми метаболическими ферментами, участвующими в синтезе липидов и углеводов. Это послужило причиной выбора экзосомальных маркеров в нашем исследовании. Сравнение экспрессии протеинов на CD9- и FABP4-позитивных ВВ будет полезно для объяснения некоторых клинических моментов, например эффективности терморadioтерапии или радиотерапии у больных КРР с ожирением, а также для более обоснованного поиска везикулярных прогностических маркеров у онкологических пациентов с ожирением. Цель исследования была сформулирована с учетом отсутствия в литературе данных об уровне экспрессии ММПs и белков теплового шока (HSPs) в составе тотального пула ВВ и в FABP4-позитивных ВВ у пациентов с ПТК и КРР.

**Цель исследования** – изучение уровня ММПs и HSPs на CD9- и FABP4-позитивных ВВ у пациентов с ПТК и КРР во взаимосвязи с метаболическим статусом.

**Материалы и методы.** В исследование были включены 12 больных КРР (T2–4N0–2M0; средний возраст  $59,6 \pm 1,6$  года), проходивших лечение в отделении абдоминальной онкологии Научно-исследовательского института онкологии Томского национального исследовательского медицинского центра Российской академии наук с 2019 по 2021 г. В группу сравнения вошли 10 пациентов с ПТК. Уровень белков на поверхности CD9- и FABP4-позитивных ВВ был изучен с помощью проточной цитометрии.

**Результаты.** ММР9-позитивные ВВ чаще выявлялись у больных КРР по сравнению с пациентами с ПТК, однако ММР9+ММР2+ТИМР-позитивные ВВ достоверно чаще обнаруживались у последних. Из изученных белков теплового шока на поверхности ВВ наиболее часто экспрессировался HSP60, причем HSP60-позитивные ВВ выявлялись на поверхности CD9-позитивных экзосом при ПТК гораздо чаще, чем при КРР. У больных КРР по сравнению с пациентами с ПТК среди FABP4-позитивных ВВ наблюдалось существенное увеличение доли трипл-позитивных ВВ и ВВ с фенотипом ММР9+ММР2-ТИМР1+, что в целом может свидетельствовать о гиперэкспрессии ММР9 и ТИМР1 адипоцитами или макрофагами жировой ткани у больных КРР. Корреляционный анализ выявил множественные связи отдельных фенотипов CD9-позитивных ВВ у больных КРР с индексом массы тела и уровнем холестерина липопротеинов высокой плотности в сыворотке крови, в то время как фенотипы FABP4-позитивных ВВ были ассоциированы в основном с уровнем триглицеридов.

**Заключение.** Фенотипы CD9-позитивных и FABP4-позитивных циркулирующих ВВ перспективны в качестве предикторов для уточнения онкологического риска у больных с полипами толстой кишки, а также в плане объяснения эффективности лечения больных КРР с ожирением или метаболическим синдромом.

**Ключевые слова:** матриксные металлопротеиназы, белки теплового шока, жировая ткань, внеклеточные везикулы, FABP4, колоректальный рак

**Для цитирования:** Юнусова Н.В., Сваровский Д.А., Дандарова Е.Э. и др. Матриксные металлопротеиназы и белки теплового шока на внеклеточных везикулах у больных колоректальным раком: связь с метаболическим статусом. Успехи молекулярной онкологии 2022;9(3):38–48. DOI: 10.17650/2313-805X-2022-9-3-38-48

## Matrix metalloproteinases and heat shock proteins on extracellular vesicles in colorectal cancer patients: association with metabolic status

N.V. Yunusova<sup>1,2</sup>, D.A. Svarovsky<sup>2</sup>, E.E. Dandarova<sup>2</sup>, D.N. Kostromitsky<sup>1</sup>, A.A. Dimcha<sup>1</sup>, O.V. Cheremisina<sup>1</sup>, S.G. Afanasiev<sup>1</sup>, A.I. Konovalov<sup>1</sup>, Z.A. Startseva<sup>1</sup>, I.V. Kondakova<sup>1</sup>, M.R. Patysheva<sup>1</sup>, A.E. Grigor'eva<sup>3</sup>, L.V. Spirina<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Research Institute of Tomsk National Research Medical Center of the Russian Academy of Sciences; 5 Kooperativny Line, Tomsk 634009, Russia;

<sup>2</sup>Siberian State Medical University, Ministry of Health of Russia; 2 Moskovskiy Tract, Tomsk 634050, Russia;

<sup>3</sup>Institute of Chemical Biology and Fundamental Medicine of the Siberian branch of Russian Academy of Sciences; 8 Prospekt Akademika Lavrent'eva, Novosibirsk 630090, Russia

**Contacts:** Dmitry Andreevich Svarovski svarovsky.d.a@gmail.com

**Introduction.** In most patients with colorectal cancer (CRC), the tumor develops against the background of metabolically healthy obesity or metabolic syndrome (more than 60 % of patients), the key pathogenetic moment of which is developing hyperinsulinemia. Metabolic changes are also characteristic of patients with colon polyps (CP), which are currently considered as the most significant precancerous diseases. It has been shown that fractions of small extracellular vesicles (EVs) of adipocyte origin are specifically enriched in extracellular matrix proteins, including matrix metalloproteinases (MMPs), chaperones, and some metabolic enzymes involved in the synthesis of lipids and carbohydrates. This was the reason for choosing exosomal markers in our study. Comparison of protein expression on CD9- and FABP-4 positive vesicles will be useful to explain some clinical issues, such as the effectiveness of thermoradiotherapy or radiotherapy in obese CRC patients; for a more substantiated search for vesicular prognostic markers in obese cancer patients. However, taking into account the lack of data in the literature on the level of MMPs and HSPs expression in the composition of the total pool of EVs and in the composition of FABP4-positive EVs in patients with PTC and CRC patients, the aim of the work was formulated.

**Aim.** Study of the level of MMPs and heat shock proteins (HSPs) on CD9- and FABP4-positive EVs in patients with CP and CRC in relation to metabolic status.

**Materials and methods.** The study included 12 patients with CRC (T2–4N0–2M0; mean age 59.6 ± 1.6 years) who were treated at the Department of Abdominal Oncology of the Cancer Research Institute of the Tomsk National Research Medical Center from 2019 to 2021. The comparison group included 10 patients with CP. The level of proteins on the surface of CD9- and FABP4-positive EVs was studied using flow cytometry.

**Results.** MMP9-positive EVs were detected more often in CRC patients than in CP patients, however, MMP9+MMP2+TIMP-positive EVs were significantly more frequently detected in CP patients. Among the studied heat shock proteins, HSP60 was most often expressed on the surface of EVs, and HSP60-positive EVs were detected on the surface of CD9-positive exosomes in patients with PTC much more often than in CRC. In patients with CRC, compared with patients with CP, among FABP4-positive EVs, the proportion of triple-positive EVs and EVs with the MMP9+MMP2-TIMP1+ phenotype significantly increases, which in general may indicate overexpression of MMP9 and TIMP1 by adipocytes or macrophages of adipose tissue in patients with CRC. Correlation analysis revealed multiple correlations of individual phenotypes of CD9-positive EVs in patients with CRC with body mass index and serum high density lipoprotein cholesterol levels, while the phenotypes of FABP4-positive EVs were associated mainly with triglyceride levels.

**Conclusions.** The phenotypes of CD9-positive and FABP4-positive circulating EVs are promising as predictors for clarifying cancer risk in patients with colon polyps, as well as in terms of explaining the effectiveness of the treatment of CRC patients with obesity or metabolic syndrome.

**Keywords:** matrix metalloproteinases, heat shock proteins, adipose tissue, extracellular vesicles, FABP4, colorectal cancer

**For citation:** Yunusova N.V., Svarovsky D.A., Dandarova E.E. et al. Matrix metalloproteinases and heat shock proteins on extracellular vesicles in colorectal cancer patients: association with metabolic status. *Uspekhi molekulyarnoy onkologii* = *Advances in Molecular Oncology* 2022;9(3):38–48. (In Russ.). DOI: 10.17650/2313-805X-2022-9-3-38-48

### ВВЕДЕНИЕ

Согласно данным литературы, а также на основании проведенных нами ранее исследований [1, 2] у большинства пациентов с колоректальным раком (КРР) опухоль возникает на фоне метаболически здорового ожирения, или метаболического синдрома

(более чем в 60 % случаев), ключевым патогенетическим моментом которого является развивающаяся гиперинсулинемия. Метаболические изменения также характерны для больных с полипами толстой кишки (ПТК), которые в настоящее время рассматриваются как наиболее значимые предраковые заболевания.

Адиipoциты продуцируют матриксные металлопротеиназы (MMPs) MMP-2, MMP-9 и их ингибитор TIMP1. Полученные из жировой ткани MMPs играют значительную роль в адипогенезе, ангиогенезе и ремоделировании внеклеточного матрикса, что может ускорить метастатический каскад [3, 4].

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: они составляют почти 50 % от общего числа клеток жировой ткани [5]. Предлагаемые кандидаты-маркеры везикул адипоцитарного происхождения (рецепторы, активируемые пероксисомными пролифераторами (PPAR- $\gamma$ ), белок, связывающий жирные кислоты 4 (FABP4), фактор 1 преадипоцитов (PREF-1)) не являются строго специфичными для клеток жировой ткани, могут секретироваться некоторыми иммунными клетками, в основном макрофагами, а также найдены в составе внеклеточных везикул (ВВ) эндотелиального происхождения [6–8]. Кроме того, в исследовании V. DeClercq и соавт. (2015) было показано, что адипонектин в экзосомах составляет лишь небольшую часть общего количества адипонектина, секретируемого клетками 3T3-L1, и поэтому не может быть надежным маркером ВВ плазмы [9]. FABP4 является маркером адипоцитов. Кроме того, ранее было показано, что этот белок гиперэкспрессирован в клеточных линиях дифференцированных адипоцитов мыши 3T3-L1, а также обнаружен в составе секретируемых в культуральную жидкость ВВ, что делает его наиболее привлекательным для изучения [10]. Мы не рассматриваем FABP4-позитивные ВВ как исключительно ВВ адипоцитарного происхождения. Однако детектируемые методом проточной цитометрии FABP4-позитивные циркулирующие ВВ могут быть представлены ВВ адипоцитарного и макрофагального происхождения, которые и формируют жировую ткань.

Показано, что фракции малых ВВ адипоцитарного происхождения специфически обогащены белками внеклеточного матрикса, включая MMPs, шаперонами, а также некоторыми метаболическими ферментами, участвующими в синтезе липидов и углеводов [11]. Это обусловило выбор экзосомальных маркеров в нашем исследовании. Мы также полагаем, что сравнение экспрессии протеинов на CD9- и FABP4-позитивных ВВ, возможно, будет полезно для объяснения некоторых клинических моментов, например эффективности терморрадиотерапии или радиотерапии у больных КРР с ожирением, а также для более обоснованного поиска везикулярных прогностических маркеров у онкологических больных с ожирением. Цель работы была сформулирована с учетом отсутствия в литературе данных об уровне экспрессии MMPs и белков теплового шока (HSPs) в составе тотального пула ВВ и циркулирующих

ВВ, имеющих происхождение из жировой ткани, у пациентов с полипами толстой кишки (ПТК) и КРР.

**Цель работы** – изучение уровня MMPs и белков теплового шока (HSPs) на CD9- и FABP4-позитивных ВВ плазмы крови у пациентов с ПТК и КРР во взаимосвязи с метаболическим статусом.

### МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В исследование были включены 12 больных КРР (T2–4N0–2M0; средний возраст  $59,6 \pm 1,6$  года), проходивших лечение в отделении абдоминальной онкологии Научно-исследовательского института онкологии Томского национального исследовательского медицинского центра Российской академии наук с 2019 по 2021 г. В группу сравнения вошли 10 пациентов, обследованных в условиях поликлинического отделения Института, у которых в ходе видеокolonоскопии была исключена злокачественная опухоль толстой кишки. У этих больных выявлены аденоматозные ПТК. Критериями включения пациентов в исследование являлись согласие на участие в нем и колоректальный рак T2–4N0–2M0. Критериями исключения при формировании группы КРР были первично-множественные формы КРР и КРР Ia стадии (T1N0M0).

В подгруппы метаболических нарушений были включены пациенты с ПТК и КРР, имеющие метаболический синдром, или так называемое метаболически здоровое ожирение, в соответствии с критериями Международной диабетической федерации (International Diabetes Federation, IDF; 2005), под которым подразумевается наличие абдоминального ожирения (по критериям IDF), индекс массы тела (ИМТ)  $\geq 30$  в сочетании с одним из дополнительных критериев метаболического синдрома или изолированное ожирение [1, 2].

**Измерение антропометрических параметров и метаболических маркеров плазмы крови.** Измеряли окружность талии (посередине между нижним ребром и гребнем подвздошной кости) и бедер (в точке максимальной окружности ягодиц). Индекс массы тела рассчитывали по формуле:

$$\text{ИМТ} = \frac{\text{масса тела (кг)}}{\text{рост (м)}^2}.$$

Исследование уровней общего холестерина (ХС), ХС липопротеинов высокой плотности (ХС ЛПВП), ХС липопротеинов низкой плотности (ХС ЛПНП) и триглицеридов проводили на многоканальном биохимическом анализаторе Konelab-20 (Финляндия) после 16-часового голодания с использованием реактивов фирм Human (Германия) и ThermoScientific (Финляндия).

**Выделение внеклеточных везикул из плазмы крови.** Внеклеточные везикулы были выделены из плазмы крови методом ультрафильтрации с двойным ультрацентрифугированием. Венозную кровь (около 27 мл) от пациентов с ПТК и КРР собирали в пробирки с K3-ЭДТА (BD Vacutainer Plus Tubes, Becton Dickinson,

Великобритания). Ультрацентрифугирование выполняли на ультрацентрифуге Optima XPN 80 (Beckman Coulter, США). Выделенные ВВ ресуспендировали в 600 мкл фосфатно-солевого буфера. Аликвоты ВВ замораживали в жидком азоте и хранили при  $-80^{\circ}\text{C}$  [12, 13].

#### Типирование внеклеточных везикул плазмы крови.

Для подтверждения экзосомальной природы выделенных везикул проводили электронную микроскопию, а также определяли уровень тетраспанинов CD9, CD63 и CD81. Трансмиссионная электронная микроскопия выполнена на базе Института химической биологии и фундаментальной медицины Сибирского отделения Российской академии наук. Для проточной цитометрии 10 мкл ( $3 \times 10^5$ ) альдегид-сульфатных латексных частиц диаметром 4 мкм (4 %, A37304, Invitrogen, США) отмывали дважды по 100 мкл 0,1 М MES-буфером pH 5,5 (3000g, 15 мин) и ресуспендировали в 25 мкл MES-буфера. Затем к 12,5 мкл частиц вносили по 3 мкг моноклональных антител против CD9 (ab134375, Abcam, Великобритания) при комнатной температуре в течение 14 ч при осторожном перемешивании. Аликвоты ВВ (около 30 мкг белка) инкубировали с комплексами антитело – латексные частицы в 100 мкл фосфатно-солевого буфера (PBS) при  $4^{\circ}\text{C}$  в течение 14 ч при осторожном перемешивании. Реакцию блокировали 0,2 М глицином в течение 30 мин при  $4^{\circ}\text{C}$ . Комплексы ВВ-антитело – латексные частицы инкубировали с FITC-конъюгированными антителами против тетраспанинов (CD63, CD81 и CD24) при  $4^{\circ}\text{C}$  в течение 30 мин. Цитометрия комплексов выполнена на цитометре Cytotflex (Beckman Coulter, США). Данные анализировали с помощью программы CytExpert 2.0 Software. Медиана интенсивности флуоресценции (MFI) комплексов была проанализирована в сравнении с изотипическим контролем и отрицательными контролями.

**Количественная оценка белка.** Для оценки концентрации белка во ВВ использовали набор количественного определения NanoOrange Protein (Molecular Probes, CIF) в соответствии с рекомендациями производителя.

**Анализ сочетания экспрессии HSP60, HSP27 и HSP90 на поверхности CD9-позитивных внеклеточных везикул.** Аликвоты ВВ (около 30 мкг белка) инкубировали с  $3 \times 10^5$  анти-CD9-латексными частицами в 150 мкл PBS при  $4^{\circ}\text{C}$  в течение ночи при осторожном перемешивании и блокировали в 0,2 М глицине в течение 30 мин. Затем, после отмывки комплексов PBS, для блокирования неспецифического связывания использовали human BD Fc Block (564219, BD, США), далее их 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-APCF (2 мкл на тест, FAA863Hu51, Cloud-Clone Corp., Китай)) в течение 20 мин при комнатной температуре. Отдельные комплексы были гейтированы и исследованы на цитометре Cytotflex (Beckman Coulter, США). Данные анализировали с помощью программного обеспечения CytExpert 2.0.

**Анализ сочетания экспрессии MMP9, MMP2 и TIMP-1 на поверхности CD9-позитивных ВВ.** Анализ выполняли аналогично методике, представленной выше. Использовали антитела анти-TIMP1-APC (2 мкл на тест, FAA522Hu51, Cloud-Clone Corp., Китай), анти-MMP2-PE (2 мкл на тест, FAA100Hu41, Cloud-Clone Corp., Китай) и анти-MMP9-FITC (2 мкл на тест, FAA553Hu81, Cloud-Clone Corp., Китай).

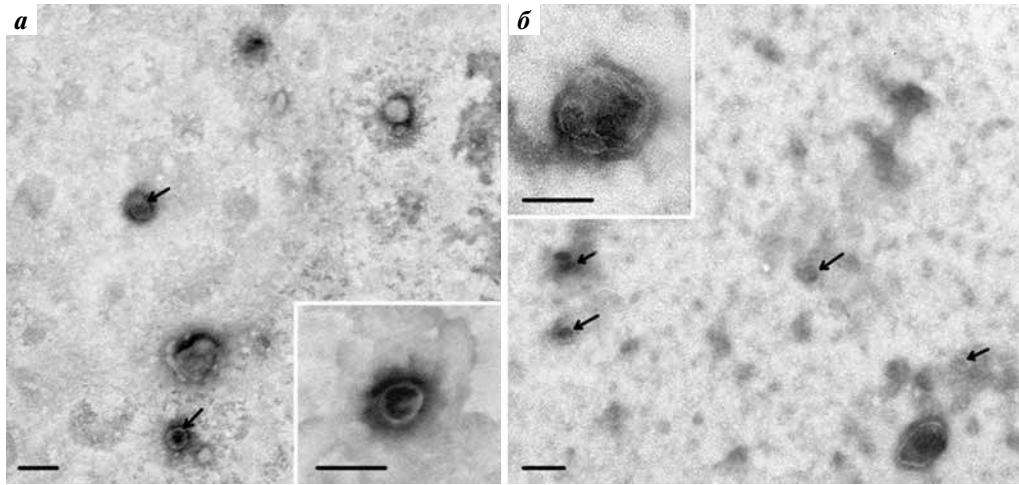
**Анализ сочетания экспрессии HSP60, HSP27, HSP90, MMP9, MMP2 и TIMP-1 на поверхности FABP4-позитивных экзосом.** Анализ выполняли аналогично представленной выше методике. Использовали моноклональные антитела против FABP4 (ab134375, Abcam, Великобритания).

**Статистическая обработка результатов.** Данные были обработаны с помощью пакета программ Statistica 10.0. Для оценки различий между группами использовали критерий Манна–Уитни. Для выявления корреляционных связей рассчитывали коэффициент ранговой корреляции Спирмена ( $r$ ).

## РЕЗУЛЬТАТЫ

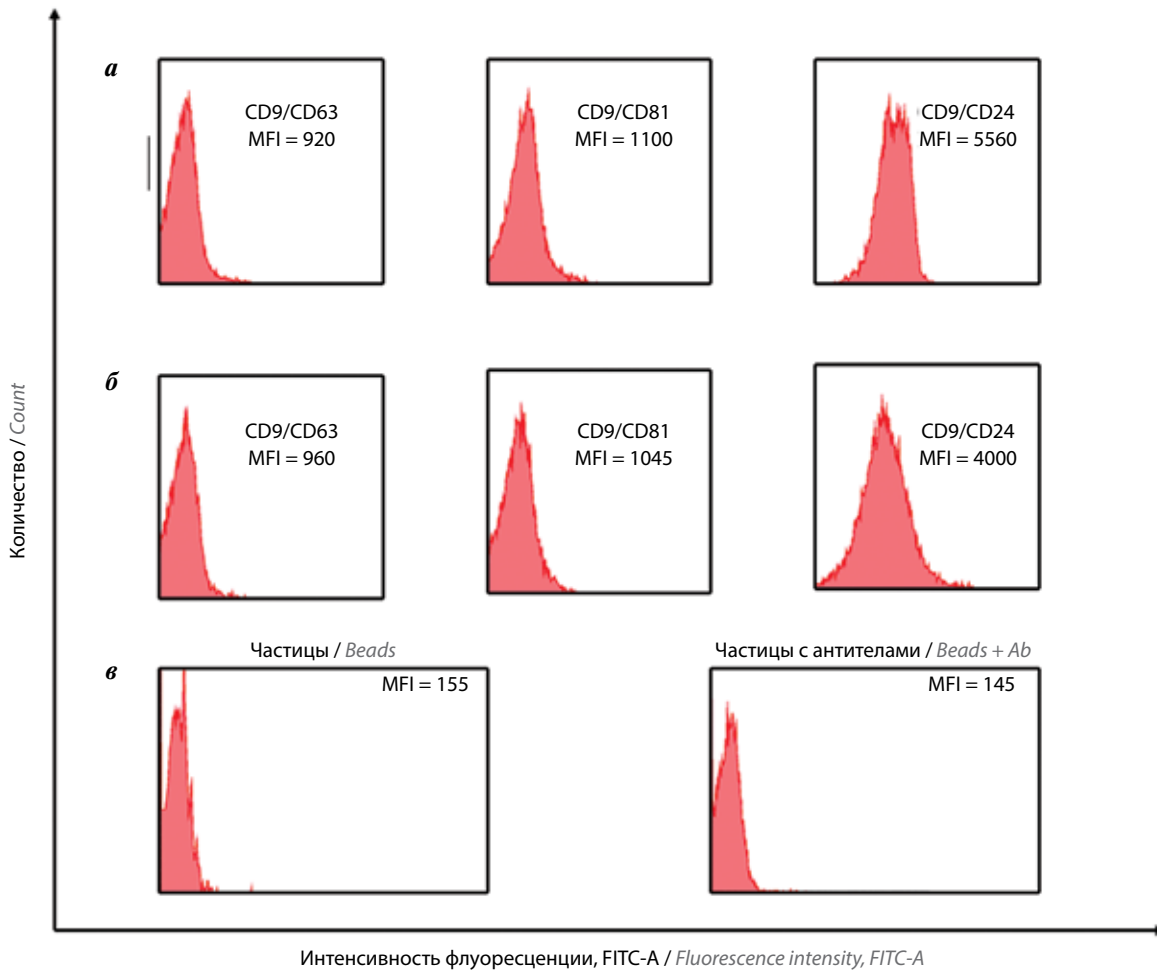
Экзосомальная природа выделенных везикул была подтверждена трансмиссионной электронной микроскопией. В препаратах, выделенных из плазмы крови пациентов с ПТК и КРР, малые ВВ (экзосомы) визуализировались как четко структурированные частицы чашеобразной формы низкой электронной плотности с сохранной мембраной. Кроме того, в препаратах присутствовали частицы, не соответствующие ВВ по морфологии («не-везикулы»), их размер не превышал 100 нм (рис. 1). Выделенные ВВ больных ПТК и КРР, как было показано и для других локализаций рака, экспрессировали типичные экзосомальные маркеры (CD9, CD81, CD63) (рис. 2) [12, 13]. Общая стратегия гейтирования, а также состав MMPs и HSPs на поверхности CD9-позитивных экзосом у пациентов с ПТК и КРР представлены на рис. 3 и в табл. 1. В таблице приведены только статистически значимые связи (с уровнем значимости  $p < 0,05$ ).

Представленные результаты согласуются с полученными нами ранее данными о преимущественной экспрессии MMP9 на поверхности CD9-позитивных ВВ по сравнению с MMP2 и TIMP1, причем MMP9-позитивные экзосомы чаще обнаруживались у больных КРР [14]. Трипл-позитивные по данным маркерам ВВ достоверно выявлялись у больных ПТК. Из изученных HSPs на поверхности ВВ наиболее часто экспрессировался HSP60, при этом HSP60-позитивные ВВ наблюдались при ПТК гораздо чаще, чем при КРР. Однако циркулирующие ВВ, экспрессирующие как HSP60, так и HSP27, встречались в 4 раза чаще при КРР (см. рис. 3 а–д). Состав матриксных MMPs и HSPs на поверхности FABP4-позитивных экзосом у больных ПТК и КРР с метаболическими нарушениями представлен в табл. 2.



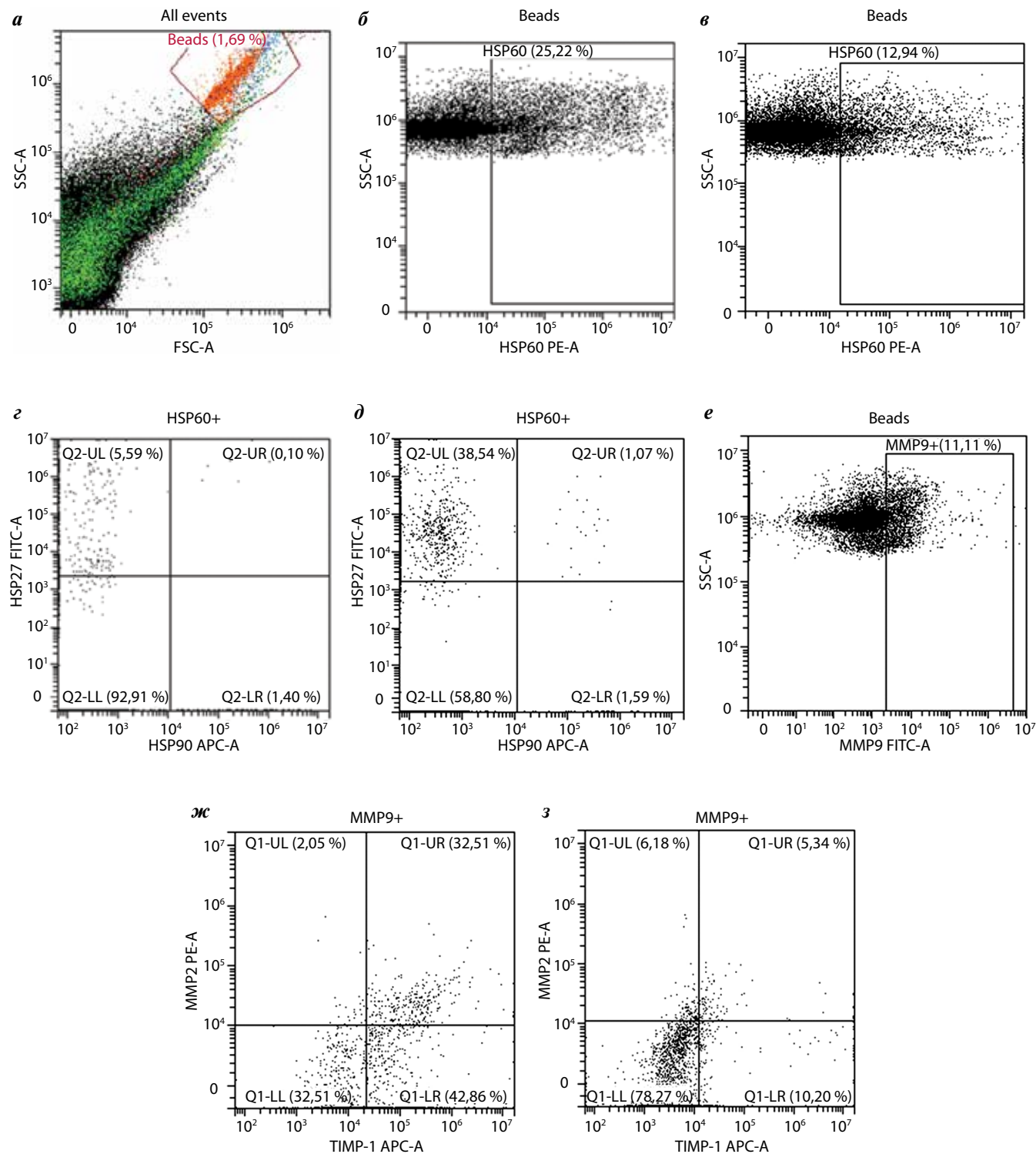
**Рис. 1.** Внеклеточные везикулы, выделенные из плазмы: а – пациентов с полипами толстой кишки; б – пациентов с колоректальным раком. Стрелками обозначены везикулы, по морфологии соответствующие экзосомам. Длина масштабной линии соответствует 200 нм, на врезках – 100 нм. Электронная микроскопия, негативное контрастирование фосфорновольфрамовой кислотой

**Fig. 1.** Plasma extracellular vesicles isolated from: a – of patients with colon polyps; б – patients with colorectal cancer. Arrows indicate the vesicles that have the morphology of exosomes. The length of the scale line equals 200 nm; in the insets, 100 nm. Electron microscopy; negative staining with phosphotungstic acid



**Рис. 2.** Экспрессия CD63, CD81 и CD24 на CD9-позитивных внеклеточных везикулах плазмы крови пациентов с полипами толстой кишки (а) и колоректальным раком (б). Изотипический и отрицательный контроль (латексные частицы с FITC-мечеными антителами против CD9 и CD81) (в). Приведены средние значения медианы интенсивности флуоресценции (MFI)

**Fig. 2.** Expression of CD63, CD81, and CD24 on CD9-positive plasma extracellular vesicles of patients with colon polyps (a) and colorectal cancer (б). Isotype and negative control (latex beads with FITC-labeled anti-CD9 and anti-CD81 antibodies) (в). Mean fluorescence intensity (MFI) is shown



**Рис. 3.** Проточная цитометрия внеклеточных везикул (ВВ) плазмы крови: а – прямое (FSC-A) и боковое светорассеяние (SSC-A) комплексов ВВ с альдегид-сульфатными латексными частицами; б – HSP60-позитивные ВВ в составе CD9-позитивных ВВ у пациентов с полипами толстой кишки (ПТК); в – HSP60-позитивные ВВ в составе CD9-позитивных ВВ у пациентов с колоректальным раком (КРР). Тройное мечение антителами против HSP60, HSP27, HSP90 ВВ плазмы крови больных ПТК (г) и КРР (д); е – MMP9-позитивные ВВ в составе FABP4-позитивных ВВ у больных КРР. Тройное мечение антителами против MMP9, MMP2, TIMP1 ВВ плазмы крови больных КРР (ж) и ПТК (з)

**Fig. 3.** Flow cytometry of plasma extracellular vesicles (EVs): а – forward (FSC-A) and side scatter (SSC-A) of EV complexes with aldehyde/sulfate latex beads; б – HSP60-positive EVs among CD9-positive EVs from patients with colon polyps (CPs); в – HSP60-positive EVs among CD9-positive EVs from patients with colorectal cancer (CRC). Triple labeling with anti-HSP60, -HSP27, and -HSP90 antibodies of serum EVs from CP patients (г) and CRC patients (д); е – MMP9-positive EVs among FABP4-positive EVs from CRC patients. Triple labeling with anti-MMP9, -MMP2, and -TIMP1 antibodies of serum EVs from CRC patients (ж) and CP patients (з)

**Таблица 1.** Состав матричных металлопротеиназ и белков теплового шока на поверхности CD9-позитивных внеклеточных везикул (ВВ) плазмы крови у пациентов с полипами толстой кишки (ПТК) и колоректальным раком (КРР), %

**Table 1.** Composition of matrix metalloproteinases and heat shock proteins on the surface of CD9-positive plasma extracellular vesicles (EVs) in patients with colon polyps (CPs) and colorectal cancer (CRC), %

Фенотип ВВ Phenotype of EVs	ПТК (n = 10) CPs (n = 10)	КРР (n = 12) CRC (n = 12)	p
HSP60+	19,4 ± 1,86	11,10 ± 1,21	<0,05
HSP60+HSP27+HSP90–	6,30 ± 3,26	26,5 ± 3,01	<0,05
HSP60+HSP27–HSP90–	91,7 ± 3,52	73,0 ± 2,91	<0,05
HSP60+HSP27–HSP90+	1,35 ± 0,55	1,49 ± 0,25	–
MMP9+	6,45 ± 1,82	11,00 ± 1,02	<0,05
MMP9+MMP2+TIMP1+	8,70 ± 1,02	5,80 ± 0,93	<0,05
MMP9+MMP2+TIMP1–	11,00 ± 0,92	9,70 ± 1,37	–
MMP9+MMP2–TIMP1–	71,75 ± 10,20	75,25 ± 4,50	–
MMP9+MMP2–TIMP1+	11,45 ± 3,71	10,40 ± 2,85	–

**Таблица 2.** Состав матричных металлопротеиназ и белков теплового шока на поверхности FABP4-позитивных внеклеточных везикул (ВВ) плазмы крови у пациентов с полипами толстой кишки (ПТК) и колоректальным раком (КРР) с метаболическими нарушениями, %

**Table 2.** Composition of matrix metalloproteinases and heat shock proteins on the surface of FABP4-positive plasma extracellular vesicles (EVs) in patients with colon polyps (CPs) and colorectal cancer (CRC) with metabolic disorders, %

Фенотип ВВ Phenotype of EVs	ПТК (n = 6) CPs (n = 6)	КРР (n = 8) CRC (n = 8)	p
HSP60+	18,90 ± 3,10	19,56 ± 2,21	–
HSP60+HSP27+HSP90–	24,10 ± 3,90	23,73 ± 3,22	–
HSP60+HSP27–HSP90–	74,75 ± 5,55	75,03 ± 5,35	–
HSP60+HSP27–HSP90+	0,95 ± 0,35	1,05 ± 0,24	–
MMP9+	8,33 ± 1,15	11,2 ± 2,00	–
MMP9+MMP2+TIMP1+	3,33 ± 1,71	10,85 ± 2,40	<0,05
MMP9+MMP2+TIMP1–	10,63 ± 2,53	10,38 ± 1,77	–
MMP9+MMP2–TIMP1–	82,33 ± 5,83	61,34 ± 6,38	<0,05
MMP9+MMP2–TIMP1+	3,73 ± 0,65	17,36 ± 3,10	<0,05

При анализе экспрессии MMPs, TIMP1 и HSPs на поверхности ВВ адипоцитарного происхождения статистически значимых различий в отношении HSPs между группами выявлено не было. Доля FABP4-позитивных ВВ, экспрессирующих MMP9, MMP2 и их ингибитор TIMP1, была значительно выше у больных КРР ( $p < 0,05$ ). Аналогично ВВ адипоцитарного происхождения, экспрессирующие MMP9 и TIMP1, но не экспрессирующие MMP2, чаще выявлялись у больных КРР. Полученные

результаты свидетельствуют, что экспрессия HSP90 как на CD9-позитивных, так и на FABP4-позитивных ВВ плазмы крови больных КРР и ПТК встречается редко (см. рис. 3а, 3е–з).

Корреляционные связи (коэффициенты ранговой корреляции Спирмена) между фенотипами CD9-позитивных ВВ и возрастом, ИМТ, окружностью талии, уровнем триглицеридов, ХС, ХС ЛПВП у больных КРР представлены в табл. 3, а между фенотипами

FABP4-позитивных ВВ и возрастом, ИМТ, обхватом талии, уровнем триглицеридов, ХС, ХС ЛПВП у больных КРР – в табл. 4. Проведенный корреляционный анализ не выявил статистически значимых взаимосвязей в группе ПТК как для CD9-, так и для FABP4-позитивных экзосом.

Проведенный корреляционный анализ выявил множественные связи фенотипов CD9-позитивных ВВ у больных КРР с ИМТ и уровнем ХС ЛПВП сыворотки крови, в то время как фенотипы FABP4-позитивных ВВ были ассоциированы в основном с уровнем триглицеридов (рис. 4).

**Таблица 3.** Корреляционные связи между фенотипами CD9-позитивных внеклеточных везикул (ВВ) и возрастом, индексом массы тела, окружностью талии, уровнем триглицеридов, общим холестерином (ХС), ХС липопротеинов высокой плотности (ХС ЛПВП) у больных колоректальным раком

**Table 3.** Correlation between the phenotypes of CD9-positive extracellular vesicles (EVs) and colorectal cancer patients' age, body mass index, waist circumference, levels of triglycerides, total cholesterol (CL), and high-density lipoprotein CL (HDL CL)

Фенотип ВВ Phenotype of EVs	Возраст Age	Индекс массы тела Body mass index	Окружность талии Waist circumference	Уровень триглицеридов Level of triglycerides	Уровень ХС CL level	Уровень ХС ЛПВП HDL CL level
60+	–	–	–	–	–	–
60+27+90–	–	–	–	–	–	0,61
60+27–90–	–	–	–	–	–	–0,61
60+27–90+	–	–0,61	–	–	–	–0,68
9+	–	0,53	0,60	–	–	–
9+2+TIMP+	–	–	–	–	–	–
9+2+TIMP–	0,57	–	–	–	–	–
9+2–TIMP–	–	–	–	–	–	–
9+2–TIMP+	–	0,56	–	–	–	0,62

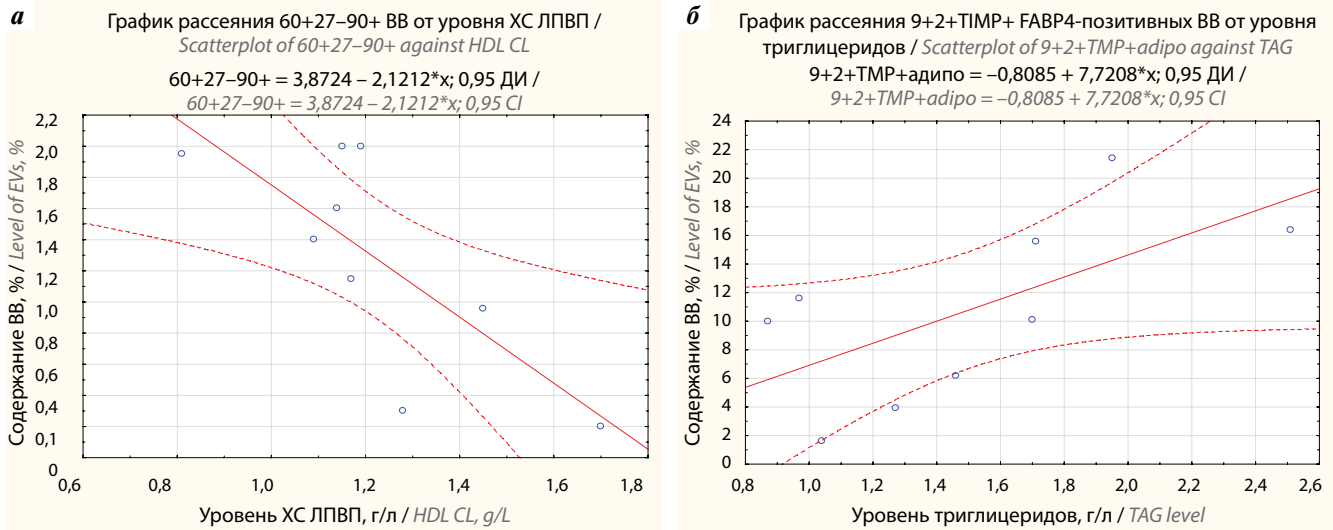
**Примечание.** Представлены только значимые коэффициенты корреляции с уровнем значимости  $p < 0,05$ .  
Note. Only significant correlation coefficients with  $p < 0.05$  are shown.

**Таблица 4.** Корреляционные связи между фенотипами FABP4-позитивных внеклеточных везикул (ВВ) и возрастом, индексом массы тела, окружностью талии, уровнем триглицеридов, общим холестерином (ХС), ХС липопротеинов высокой плотности (ХС ЛПВП) у больных колоректальным раком

**Table 4.** Correlation between the phenotypes of FABP4-positive extracellular vesicles (EVs) and colorectal cancer patients' age, body mass index, waist circumference, levels of triglycerides, total cholesterol (CL), and high-density lipoprotein cholesterol (HDL CL)

Фенотип ВВ Phenotype of EVs	Возраст Age	Индекс массы тела Body mass index	Окружность талии Waist circumference	Уровень триглицеридов Level of triglycerides	Уровень ХС CL level	Уровень ХС ЛПВП HDL CL level
60+	–	–	–	–	–	–0,59
60+27+90–	–	–	–	–	–	–
60+27–90–	–	–	0,53	0,54	–	–
60+27–90+	–	–0,68	–0,79	–	–	–
9+	–	–	–	–	–0,74	–
9+2+TIMP+	–	–	–	0,67	–	–
9+2+TIMP–	–	–	–	–	–	–
9+2–TIMP–	–	–	–	–	–	–
9+2–TIMP+	–	–	–	0,52	–	–





**Рис. 4.** Графики рассеяния. Зависимость содержания CD9-позитивных внеклеточных везикул (ВВ) с фенотипом HSP60+HSP27–HSP90+ от уровня холестерина липопротеинов высокой плотности (ХС ЛПВП) в сыворотке крови (а), FABP4-позитивных ВВ с фенотипом MMP9+MMP2+TIMP1+ от уровня триглицеридов в сыворотке крови (б) у больных колоректальным раком. Сплошная линия – линия тренда, пунктирная линия – 95% доверительный интервал (ДИ)

**Fig. 4.** Scatter plots. Correlation between the level of CD9-positive extracellular vesicles (EVs) with the HSP60+HSP27–HSP90+ phenotype and serum level of high-density lipoprotein cholesterol (HDL CL) (а); correlation between the level of FABP4-positive EVs with the MMP9+MMP2+TIMP1+ phenotype and serum level of triglycerides (TAG) (б). Solid line – trend line; dotted line – 95% confidence interval (CI)

## ОБСУЖДЕНИЕ

Мембрана экзосом наряду с тетраспанинами и интегринами содержит комплекс протеаз (ADAM-протеазы, MMPs). Секретируемые (MMP1, MMP13, MMP2, MMP9, MMP3, MMP10, MMP7) и мембрано-связанные (MMP14, MMP24, MMP25) MMPs выявлены в экзосомах. Наиболее изучены желатиназы MMP2 и MMP9. В составе ВВ выявлены ингибиторы MMPs: TIMP1, TIMP2, TIMP3 [15–19]. Полагают, что перенос ВВ MMP2, MMP3 и MMP9 увеличивает их содержание в отдаленных от первичной опухоли участках, в частности в лимфатических узлах и ткани легкого, однако роль конкретно везикулярных металлопротеиназ и их ингибиторов в формировании и прогрессировании злокачественных опухолей изучена недостаточно.

Белки теплового шока, находящиеся внутри клеток, являются молекулярными шаперонами, необходимыми для фолдинга белков и поддержания определенного баланса между синтезом и протеолизом белков, а также мощными антиапоптотическими агентами [20–22]. Для большинства солидных опухолей высокий уровень свободных HSPs в сыворотке крови ассоциирован с неблагоприятным прогнозом [21]. Внеклеточные везикулы несут HSPs, причем как на своей поверхности, так и внутри. Показано, что HSPs на поверхности клеток и ВВ могут распознаваться CD91+ опухолевыми клетками, CD91+ фибробластами, CD91+SREC1+TLR+ антигенпрезентирующими клетками и CD94+ цитолитическими иммунными клетками. Обсуждается иммуностимулирующая и иммуносупрессивная роль экстраклеточных HSPs [21, 22]. В работе С.С. Bavisotto и соавт. (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 слабо экспрессированы [23]. Хотя в данной работе для определения уровня HSPs в экзосомах был использован Вестерн-блоттинг, а в нашей работе – проточная цитометрия, мы получили принципиально сходные данные о распределении HSPs в малых ВВ пациентов с предопухолевыми заболеваниями и КРР, свидетельствующие о преобладании на поверхности как CD9-позитивных ВВ, так и FABP4-позитивных ВВ HSP60 и HSP27.

FABP4 является популярным и часто используемым маркером ВВ адипоцитарного происхождения, имеющим определенные преимущества перед другими кандидатными маркерами (адипонектином, PPAR-γ), такие как высокая концентрация маркера на поверхности ВВ, известный механизм секреции маркера в составе ВВ [10, 24]. О том, что FABP4 локализован на поверхности ВВ плазмы крови человека и может быть с успехом использован для визуализации ВВ адипоцитарного происхождения и ВВ макрофагов жировой ткани методом проточной цитометрии, свидетельствует исследование С.М. Gustafson и соавт. [25]. Полученные нами результаты показали, что уровни поверхностных MMPs и TIMP1 значительно различаются на CD9- и FABP4-позитивных ВВ: на FABP4-позитивных ВВ у больных КРР по сравнению с пациентами с ПТК существенно увеличивается доля трипл-позитивных ВВ и везикул с фенотипом MMP9+MMP2–TIMP1+. В целом это может свидетельствовать о гиперэкспрессии MMP9 и TIMP1 адипоцитами или макрофагами

жировой ткани у пациентов с КРР. Фенотипы CD9-позитивных и FABP4-позитивных циркулирующих ВВ перспективны в качестве предикторов для уточнения онкологического риска у больных с полипами толстой кишки, а также в плане объяснения эффективности лечения больных КРР с ожирением или метаболическим синдромом.

### ЗАКЛЮЧЕНИЕ

ММР9-позитивные ВВ чаще обнаруживались у больных КРР по сравнению с больными ПТК, однако ММР9+ММР2+ТИМР-позитивные ВВ достоверно чаще выявлялись у пациентов с ПТК. Из изученных HSPs на поверхности ВВ наиболее часто экспрессировался

HSP60, причем HSP60-позитивные ВВ при ПТК выявлялись на поверхности CD9-позитивных экзосом гораздо чаще, чем при КРР. У больных КРР по сравнению с больными ПТК на FABP4-позитивных ВВ существенно увеличивается доля трипл-позитивных ВВ и ВВ с фенотипом ММР9+ММР2–ТИМР1+, что в целом может свидетельствовать о гиперэкспрессии ММР9 и ТИМР1 адипоцитами или макрофагами жировой ткани у пациентов с КРР. Проведенный корреляционный анализ выявил множественные связи отдельных фенотипов CD9-позитивных ВВ у больных КРР с ИМТ и уровнем ХС ЛПВП сыворотки крови, в то время как фенотипы FABP4-позитивных ВВ были ассоциированы в основном с уровнем триглицеридов.

## ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

1. Yunusova N.V., Kondakova I.V., Kolomiets L.A. et al. The role of metabolic syndrome variant in the malignant tumors progression. *Diabetes Metab Syndr* 2018;12(5):807–12. DOI: 10.1016/j.dsx.2018.04.028
2. 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* 2018;14(3):134–40. DOI: 10.1111/ajco.12780
3. 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
4. Bouloumié A., Sengenès C., Portolan G. et al. Adipocyte produces matrix metalloproteinases 2 and 9: involvement in adipose differentiation. *Diabetes* 2001;50(9):2080–6. DOI: 10.2337/diabetes.50.9.2080
5. Weisberg S.P., McCann D., Desai M. et al. Obesity is associated with macrophage accumulation in adipose tissue. *J Clin Invest* 2003; 112(12):1796–808. DOI: 10.1172/JCI19246
6. Gao X., Salomon C., Freeman D.J. et al. Extracellular vesicles from adipose tissue – a potential role in obesity and type 2 diabetes? *Front Endocrinol (Lausanne)* 2017;8:202. DOI: 10.3389/fendo.2017.00202
7. Furuhashi M. Fatty Acid-binding protein 4 in cardiovascular and metabolic diseases. *J Atheroscler Thromb* 2019;26(3):216–32. DOI: 10.5551/jat.48710
8. Eguchi A., Lasic M., Armando A.M. et al. Circulating adipocyte-derived extracellular vesicles are novel markers of metabolic stress. *J Mol Med (Berl)* 2016;94(11):1241–53. DOI: 10.1007/s00109-016-1446-8
9. DeClercq V., d'Eon B., McLeod R.S. Fatty acids increase adiponectin secretion through both classical and exosome pathways. *Biochim Biophys Acta* 2015;1851(9):1123–33. DOI: 10.1016/j.bbali.2015.04.005
10. Kralisch S., Ebert T., Lossner U. et al. Adipocyte fatty acid-binding protein is released from adipocytes by a non-conventional mechanism. *Int J Obes (Lond)* 2014;38(9):1251–4. DOI: 10.1038/ijo.2013.232
11. Durcin M., Fleury A., Taillebois E. et al. Characterisation of adipocyte-derived extracellular vesicle subtypes identifies distinct protein and lipid signatures for large and small extracellular vesicles. *J Extracell Vesicles* 2017;6(1):1305677. DOI: 10.1080/20013078.2017.1305677
12. 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
13. Тамкович С.Н., Юнусова Н.В., Стахеева М.Н. et al. Isolation and characterization of blood plasma in patients with breast cancer and colorectal cancer. *Biomedicinskaya Khimiya = Biomedical Chemistry* 2017;63(2):165–9. (in Russ.). DOI: 10.18097/PBMC20176302165
14. Тамкович С.Н., Юнусова Н.В., Сомов А.К. и др. Сравнительный субпопуляционный анализ экзосом плазмы крови больных злокачественными новообразованиями. *Биомедицинская химия* 2018;64(1):110–4. DOI: 10.18097/PBMC20186401110
15. Тамкович С.Н., Юнусова Н.В., Сомов А.К. et al. Comparative sub-population analysis of exosomes from blood plasma of cancer patients. *Biomedicinskaya Khimiya = Biomedical Chemistry* 2018;64(1):110–4. (In Russ.). DOI: 10.18097/PBMC20186401110
16. Yunusova N.V., Zambalova E.A., Patysheva M.R. et al. Exosomal protease cargo as prognostic biomarker in colorectal cancer. *Asian Pac J Cancer Prev* 2021;22(3):861–9. DOI: 10.31557/APJCP.2021.22.3.861
17. Matthews A.L., Noy P.J., Reyat J.C. 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
18. Gutwein P., Stoeck A., Riedle S. Cleavage of L1 in exosomes and apoptotic membrane vesicles released from ovarian carcinoma cells. *Clin Cancer Res* 2005;11(7):2492–501. DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-04-1688
19. Buzás E.I., Tót E.A., Sódar B.V. Molecular interactions at the surface of extracellular vesicles. *Semin Immunopathol* 2018;40(5):453–64. DOI: 10.1007/s00281-018-0682-0
20. Shimoda M., Khokha R. Metalloproteinases in extracellular vesicles. *Biochim Biophys Acta Mol Cell Res* 2017;1864(11 Pt. A):1989–2000. DOI: 10.1016/j.bbamcr.2017.05.027
21. Ginestra A., Monea S., Seghezzi G. Urokinase plasminogen activator and gelatinases are associated with membrane vesicles shed by human HT1080 fibrosarcoma cells. *J Biol Chem* 1997;272(27):17216–22. DOI: 10.1074/jbc.272.27.17216
22. Kaur P., Hurwitz M.D., Krishnan S. et al. Combined hyperthermia and radiotherapy for the treatment of cancer. *Cancers (Basel)* 2011;3(4):3799–823. DOI: 10.3390/cancers3043799
23. Taha E.A., Ono K., Eguchi T. Roles of extracellular HSPs as biomarkers in immune surveillance and immune evasion. *Int J Mol Sci* 2019;20(18):4588. DOI: 10.3390/ijms20184588
24. Lv L.H., Wan Y.L., Lin Y. et al. 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. *J Biol Chem* 2012;287(19):15874–85. DOI: 10.1074/jbc.M112.340588

23. Bavisotto C.C., Cipolla C., Graceffa G. et al. Immunophenological pattern of molecular chaperones in normal and pathological thyroid tissues and circulating exosomes: potential use in clinics. *Int J Mol Sci* 2019;20(18):4496. DOI: 10.3390/ijms20184496
24. Hubal M.J., Nadler E.P., Ferrante S.C. et al. Circulating adipocyte-derived exosomal MicroRNAs associated with decreased insulin resistance after gastric bypass. *Obesity (Silver Spring)* 2017;25(1):102–10. DOI: 10.1002/oby.21709
25. Gustafson C.M., Shepherd A.J., Miller V.M., Jayachandran M. Age- and sex-specific differences in blood-borne microvesicles from apparently healthy humans. *Biol Sex Differ* 2015;6:10. DOI: 10.1186/s13293-015-0028-8

#### Вклад авторов

Н.В. Юнусова: идея, написание текста статьи, анализ и интерпретация результатов;  
Д.А. Сваровский, Е.Э. Дандарова, А.И. Коновалов, М.Р. Патышева, А.Е. Григорьева: выполнение экспериментов, статистическая обработка данных;

Д.Н. Костромичский, А.А. Димча, О.В. Черемисина, С.Г. Афанасьев, Ж.А. Старцева: анализ клинических данных;

Л.В. Спирина, И.В. Кондакова: научное консультирование и финансовая поддержка.

#### Authors' contribution

N.V. Yunusova: idea, article writing, analysis and interpretation of results;

D.A. Swarovsky, E.E. Dandarova, A.I. Kononov, M.R. Latysheva, A.E. Grigor'eva: performing experiments, statistical data processing;

D.N. Kostromitsky, A.A. Dimcha, O.V. Cheremisina, S.G. Afanasiev, Z.A. Startseva: analysis of clinical data;

L.V. Spirina and I.V. Kondakova: scientific consulting and financial support.

#### ORCID авторов / ORCID of authors

Н.В. Юнусова / N.V. Yunusova: <https://orcid.org/0000-0003-4595-4177>

О.В. Черемисина / O.V. Cheremisina: <https://orcid.org/0000-0001-7234-4708>

М.Р. Патышева / M.R. Patysheva: <https://orcid.org/0000-0003-2865-7576>

С.Г. Афанасьев / S.G. Afanasiev: <https://orcid.org/0000-0002-4701-0375>

Ж.А. Старцева / Z.A. Startseva: <https://orcid.org/0000-0002-4345-7719>

И.В. Кондакова / I.V. Kondakova: <https://orcid.org/0000-0002-0947-8778>

А.Е. Григорьева / A.E. Grigor'eva: <https://orcid.org/0000-0001-9853-223X>.

**Конфликт интересов.** Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

**Conflict of interest.** The authors declare that there is no conflict of interest.

**Финансирование.** Исследование проведено в рамках гранта ФГБОУ ВО «Сибирский государственный медицинский университет» Минздрава России «Молекулярные и биохимические механизмы развития инфекционных и неинфекционных соматических заболеваний на основе регуляции протеолиза и формирования метаболических нарушений».

При выполнении данного исследования использовалось оборудование Центра коллективного пользования «Медицинская геномика» (ФГБНУ «Томский национальный медицинский исследовательский центр Российской академии наук»).

**Funding.** The study was conducted within the framework of the grant of the Siberian State Medical University, Ministry of Health of Russia “Molecular and biochemical mechanisms of the development of infectious and non-infectious somatic diseases based on the regulation of proteolysis and the formation of metabolic disorders”.

When performing this study, the equipment of the Center for Collective Use “Medical Genomics” (Tomsk National Research Medical Center of the Russian Academy of Sciences) was used.

#### Соблюдение прав пациентов и правил биоэтики

Исследование одобрено комитетом по биомедицинской этике Научно-исследовательского института онкологии ФГБНУ «Томский национальный исследовательский медицинский центр Российской академии наук» (протокол № 4 от 05.02.2019 г.).

Все пациенты подписали информированное согласие на участие в исследовании.

#### Compliance with patient rights and principles of bioethics

The study protocol was approved by the biomedical ethics committee of Research Institute of Tomsk National Research Medical Center of the Russian Academy of Sciences.

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

Статья поступила: 09.03.2022. Принята к публикации: 19.06.2022.

Article submitted: 09.03.2022. Accepted for publication: 19.06.2022.