



© Л.В. Спирина^{1,2}, А.В. Августинович², А.А. Баркышева¹, В.А. Богданова¹,
С.Г. Афанасьев¹, Д.А. Сваровский^{1,2}, Н.В. Юнусова²

Содержание белков 20S протеасом, Hsp27 и LC3B в экзосомах плазмы крови больных раком желудка, связь с метаболическими нарушениями

¹Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Сибирский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации, г. Томск, Российская Федерация

²Научно-исследовательский институт онкологии – филиал Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Томский национальный исследовательский медицинский центр Российской академии наук», г. Томск, Российская Федерация

© Lyudmila V. Spirina^{1,2}, Alexandra V. Augustinovich², Arzhana A. Barkysheva¹,
Veronika A. Bogdanova¹, Sergey G. Afanasyev¹, Dmitry A. Swarovsky^{1,2}, Natalya V. Yunusova²

20S Proteasomes, Hsp27 and LC3B Content in Plasma Exosomes of Gastric Cancer Patients, Association with Metabolic Disorders

¹Siberian State Medical University, Tomsk, the Russian Federation

²Cancer Research Institute, Tomsk National Research Medical Center of the Russian Academy of Sciences, Tomsk, the Russian Federation

Введение. Рак желудка (РЖ) является одним из распространенных онкологических заболеваний как в России, так и в мире. Ранняя диагностика данной патологии представляет важную проблему. За последние несколько лет были проведены исследования по использованию неинвазивной жидкостной биопсии при опухолях различных локализаций, которая проста в использовании и позволяет изучить внеклеточные везикулы плазмы крови. В настоящее время данное направление является перспективным в современной молекулярной онкологии.

Цель. Изучение содержания белков 20S протеасом, Hsp27 и LC3B в экзосомах плазмы крови при раке желудка, по сравнению с экзосомами, выделенными у больных с атрофическим гастритом с учетом метаболических нарушений и ожирения.

Материалы и методы. В исследование вошли 18 больных раком желудка, проходивших лечение в клиниках НИИ онкологии Томского НИМЦ. Группу сравнения составили 6 больных с атрофическим гастритом. Больные были разделены на группы в зависимости от стадии опухолевого процесса. Т1-2 стадия опухоли была отмечена у 12 пациентов, а Т3-4 — у 6 пациентов. Экзосомы плазмы крови выделяли с помощью метода ультрацентрифугирования. Типирование проводили с помощью маркера CD9. Содержание белков 20S протеасом, Hsp27 и LC3B в экзосомах плазмы проводили методом Вестерн блоттинг.

Результаты. В результате проведенного исследования был отмечен рост экзосом плазмы крови с содержанием 20S протеасом и LC3B в 3,8 и 1,4 раза, соответственно, у больных с раком желудка, по сравнению с пациентами без опухолевой патологии (атрофическим гастритом). При этом содержание Hsp27 в экзосомах, выделенных из плазмы крови больных, было снижено в 2,3 раза. При исследовании не была выявлена взаимосвязь стадии опухолевого процесса и содержания 20S протеасом в экзосомах крови. Однако рост содержания LC3B в экзосомах был сопряжен с ростом стадии опухолевого процесса.

Introduction. Stomach cancer is one of the most common oncological diseases in Russia and worldwide. Early diagnosis of this pathology is an important issue. In recent years, studies have been conducted on the use of a non-invasive liquid biopsy for tumors of various localizations, which is easy to use and allows studying extracellular plasma vesicles. This is currently a promising area of modern molecular oncology.

Aim. To analyse the content of proteins 20S proteasomes, Hsp27 and LC3B in plasma exosomes in gastric cancer compared with exosomes isolated from patients with atrophic gastritis, taking into account metabolic disorders and obesity.

Materials and Methods. The study included 18 patients with gastric cancer treated in the clinics of the Cancer Research Institute, Tomsk NRMС. The control group consisted of 6 patients with atrophic gastritis. The patients were divided into groups according to the stage of the tumor. Tumor stage T1-2 was observed in 12 patients and T3-4 in 6 patients. Blood plasma exosomes were isolated by ultracentrifugation. The typing was done using a CD9 marker. The content of 20S proteasome, Hsp27 and LC3B proteins in plasma exosomes were determined by Western blotting.

Results. The study found that plasma exosomes containing 20S proteasomes and LC3B were 3.8 and 1.4 times higher in patients with gastric cancer compared to patients without tumor pathology (atrophic gastritis). At the same time, there was a 2.3-fold reduction in the level of Hsp27 in exosomes isolated from the patients' blood plasma. The study did not reveal the relationship between the stage of the tumor process and the content of 20S proteasomes in blood exosomes. However, an increase in the LC3B content in exosomes was associated with an increase in the stage of the tumor process.

Выводы. Выявлен рост 20S протеасом и LC3B в экзосомах плазмы, выделенных у больных с раком желудка. При этом уровень белка Hsp27 в экзосомах был снижен у больных со злокачественными опухолями. Отмечена связь содержания белка LC3B и стадией опухолевого процесса, что требует дальнейшего изучения. В проведенном исследовании сформированы и обоснованы подходы для применения маркеров жидкостной биопсии при формировании групп риска и диагностики рака желудка. При этом особое значение придается метаболическими нарушениями как основным триггерам опухолевой прогрессии.

Ключевые слова: 20S протеасомы; Hsp27; LC3B; экзосомы; рак желудка

Для цитирования: Спирина Л.В., Августиневич А.В., Баркышева А.А., Богданова В.А., Афанасьев С.Г., Сваровский Д.А., Юнусова Н.В. Содержание белков 20S протеасом, Hsp27 и LC3B в экзосомах плазмы крови больных раком желудка, связь с метаболическими нарушениями. *Вопросы онкологии*. 2024; 70(5): 894-902.-DOI: 10.37469/0507-3758-2024-70-5-894-902

✉ Контакты: Баркышева Аржана Аржановна, barkysheva.arzhana@yandex.ru

Введение

Рак желудка (РЖ) является одним из распространенных онкологических заболеваний как в России, так и в мире. Ранняя диагностика, а соответственно назначение адекватного лечения представляют важную проблему в современной молекулярной онкологии. За последние несколько лет были проведены исследования по использованию неинвазивной жидкостной биопсии и повторного взятия образцов для мониторинга выявления как первичной опухоли, так и рецидива заболевания в режиме реального времени и оценки эффективности лечения и прогноза течения онкологического процесса [1]. Исследование внеклеточных везикул плазмы крови представляет собой перспективное направление. В настоящее время имеются данные о возможности обнаружения значимых белков, внеклеточных нуклеиновых кислот в содержимом экзосом [2], которые могут отражать интенсивность процессов онкогенеза, формирование инвазивного и метастатического потенциала в опухоли, а также служат маркером развития резистентности злокачественного процесса к противоопухолевому лечению.

Известно, что состав опухолевых экзосом крови соответствует биологическим свойствам трансформированной клетки. К универсальным системам, отражающим активность процессов опухолевой прогрессии, относят внутриклеточные каскады регуляции содержания и созревания белков, а также энергетического обмена. Увеличение активности протеасом является значимым признаком, ассоциированным с онкогенезом при РЖ [3]. Выявлена связь активности протеасомальной системы с эффективностью лечения и развитием резистентности [4, 5]. В развитии РЖ принимают участие белки теплового шока.

Conclusion. The growth of 20S proteasomes and LC3B in plasma exosomes isolated from patients with gastric cancer was revealed. At the same time, the level of Hsp27 protein in exosomes was reduced in patients with malignant tumors. The relationship between LC3B protein levels and the stage of the tumor process was noted, which requires further investigation. The study developed and justified criteria for the use of liquid biopsy markers in risk stratification and diagnosis of gastric cancer. Metabolic disorders were identified as the main drivers of tumor progression, and their significance was emphasized.

Keywords: 20S proteasomes; Hsp27; LC3B; exosomes; stomach cancer

For Citation: Lyudmila V. Spirina, Alexandra V. Augustinovich, Arzhana A. Barkysheva, Veronika A. Bogdanova, Sergey G. Afanasyev, Dmitry A. Swarovsky, Natalya V. Yunusova. 20S proteasomes, Hsp27 and LC3B content in plasma exosomes of gastric cancer patients, association with metabolic disorders. *Voprosy Onkologii = Problems in Oncology*. 2024; 70(5): 894-902. (In Rus).-DOI: 10.37469/0507-3758-2024-70-5-894-902

В частности, выявлена роль HSP27 в процессах инициации и опухолевой прогрессии [6, 7]. Также было показано, что данный маркер может отражать особенности ответа опухоли на лечение, формирования резистентности, а снижение его концентрации обычно связывают с плохим ответом опухоли на терапию [8]. Кроме того, выявлена связь содержания белков аутофагии LC3A с прогнозом заболевания у больных РЖ [9]. В проведенных ранее исследованиях было показано, что данный показатель не только связан с распространением опухоли, HER2, PD-L1 статусом опухоли, но и отражает эффективность проводимого лечения [10, 11, 12].

В настоящее время широко развивается представление о циркулирующих маркерах при злокачественных новообразованиях [13]. Полагают, что поиск ранних маркеров диагностики, прогрессирования заболевания с применением подходов жидкостной биопсии является наиболее перспективным. За последние три десятилетия показатели ожирения постепенно росли, причем Всемирная организация здравоохранения (ВОЗ) сообщила о трехкратном увеличении с 1975 г. [14]. Основываясь на последних результатах мета-анализа, избыточный вес и ожирение повышают риск развития рака желудка [15]. В связи с этим цель исследования заключалась в изучении содержания белков 20S протеасом, Hsp27 и LC3B в экзосомах плазмы крови при РЖ, по сравнению с экзосомами, выделенными у больных с атрофическим гастритом с учетом метаболических нарушений и ожирения.

Материалы и методы

В исследование вошли 18 больных РЖ, проходивших лечение в клиниках НИИ онкологии Томского НИМЦ. Группу сравнения составили

6 больных с атрофическим гастритом. Больные были разделены на группы в зависимости от стадии опухолевого процесса. Стадия T1-2N0M0 была отмечена у 12 пациентов, а T3-4N0M0 — у 6 пациентов. Больные были распределены на две группы: с повышенным питанием (ИМТ от 25 до 30) — 9 чел., и с ожирением I степени (ИМТ 30-35) — 9 чел. Все пациенты проходили комбинированное лечение с учетом распространенности процесса.

Проведение данной работы одобрено этическим комитетом НИИ онкологии Томского НИМЦ. Все процедуры с вовлечением больных были проведены в соответствии с Протоколом Хельсинкской декларации по правам человека (1964 г.), протокол № 22 от 28.11.2022. Все больные подписывали информированное согласие на участие в исследовании. Материалом исследования была плазма крови пациентов.

Выделение экзосом. Экзосомы плазмы крови выделяли с помощью ультрафильтрации с ультрацентрифугированием. Венозную кровь (18 мл) 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 1 200 g (бакет-ротатор, Labofuge 400R, Thermo Fisher Scientific, США) и температуре 4 °C. Для удаления клеточного дебриса образцы плазмы центрифугировали при 17 000 g (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, 16 553-K, Sartorius). Для осаждения экзосом фильтрат центрифугировали при 100 000 g (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.

Типирование внеклеточных везикул. Согласно рекомендациями Международного общества изучения внеклеточных везикул (ISEV) 2024 года [<https://doi.org/10.1002/jev2.12404>], типирование внеклеточных везикул проводится с помощью следующих методов: трансмиссионная электронная микроскопия (ТЭМ), анализ траекторий наночастиц (NTA) и типирование на мажорные тетраспанины с использованием проточной цитометрии.

Электронная микроскопия экзосом. Для негативного контрастирования образцы экзосом

сорбировали на медные сетки с формваровой подложкой, стабилизированной углеродом, в течение 1 мин. и 10 сек. 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.

Анализ траектории наночастиц. Распределение и концентрация изолированных везикул были исследованы с помощью метода анализа траекторий наночастиц (NTA) на приборе NanoSight® LM10 (Malvern Instruments, Великобритания). Для оптимизации измерений образцы экзосом разбавляли в PBS в соотношениях 1:100, 1:1000 и 1:10000. Полученные данные обрабатывались с использованием программного обеспечения NST 2.3. Во время анализа измерялись средний гидродинамический диаметр (размер везикул и их распределение) и концентрация везикул. Полученные данные позволяют сравнить наблюдаемые характеристики частиц с ожидаемыми параметрами для внеклеточных везикул. В частности, если частицы имеют размеры и распределение, соответствующие известным данным о внеклеточных везикулах, и их концентрация находится в ожидаемых пределах, это служит подтверждением их идентичности как везикул. Таким образом, NTA не только позволяет выявить присутствие внеклеточных везикул в образце, но и обеспечивает достоверную характеристику их физических параметров, что является важным этапом верификации.

Проточная цитометрия. Альдегид-сульфатные латексные частицы диаметром 4 мкм (Thermo Fisher Scientific, США) инкубировали с антителами против CD9 (ab134 375, Abcam) или CD24 (bsm-50 424M, 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 M глицином в течение 30 мин. при температуре 4 °C. 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 °C 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.

Лизис протеасом. Для лизиса экзосом, их аликвоты (30 мкл, 7 мкг экзосомального белка) в течение 90 мин. инкубировали на льду с 7 мкл лизис-буфера (125 мМ Трис-НСl; pH 7–8; 750 мМ NaCl; 0,5 % SDS; 5 % Triton X-100) с добавлением 3 мкл протеазного коктейля (1,3 мМ аprotинина (Sigma, США), 0,33 мМ пепстатина А (ICN, США), 1 мкг/мл лейпептина (ICN, США)). Далее в течение 7 мин. инкубировали при температуре 95 °C и центрифугировали при 13 000 g в течение 5 мин.

Вестерн-блоттинг. Супернатанты образцов наносили на 13 % ПАА-гель для SDS-PAGE электрофореза по Lemmlí. Для верификации полученных данных в гель наносили маркер молекулярного веса (10-250KD) («Affinity», КНР). 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 alpha 5 («Affinity», Китай); Hsp 27; LC3B; («Service Bio», Китай); 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 больных с атрофическим гастритом.

Определение концентрации глюкозы и триацилглицеридов. Концентрацию глюкозы и триацилглицеридов сыворотки крови определяли унифицированными методами исследования с помощью наборов Вектор Бест (Россия).

Определение содержания инсулина. Содержание инсулина оценивали при помощи ИФА наборов Вектор Бест (Россия).

Статистическую обработку результатов проводили с применением пакета программ Statistica 12.0. Нормальность проверяли с помощью критерия Колмогорова – Смирнова. Результаты определения экспрессии генов представлены как медиана (Me) (Q1; Q3). Значимость различий независимых параметров в 2 группах оценивали с использованием критерия Манна – Уитни. Критерий Краскела – Уоллиса применяли при оценке значимости различий более чем в 2 группах. Различия считали значимыми при $p < 0,05$.

Результаты

Идентификацию выделенных внеклеточных везикул осуществляли с помощью методов трансмиссионной электронной микроскопии (ТЭМ), анализа траектории частиц (NTA) и типирования на мажорные тетраспанины. ТЭМ выявила четко визуализирующиеся чашеобразные частицы с низкой электронной плотностью, которые были идентифицированы как экзосомы. Выделенные экзосомы больных РЖ экспрессировали типичные экзосомальные маркеры, CD9, CD24, CD63, CD81, что подтвердило типирование экзосом с антителами к мажорным тетраспанинам. Данные типирования представлены на рис. 1.

В результате проведенного исследования было отмечено увеличение содержания 20S протеасом и LC3B экзосом плазмы крови пациентов с раком желудка в 3,8 и 1,4 раза, соответственно, по сравнению с больными атрофическим гастритом. При этом содержание Hsp27 в экзосомах, выделенных из плазмы крови больных раком желудка было снижено в 2,3 раза (табл. 1). При этом изменений концентрации глюкозы, триглицеридов и содержания инсулина у этих пациентов не отмечено.

При исследовании связи с размером опухоли отмечено снижение уровня Hsp27 в экзосомах, выделенных у пациентов со стадией Т3-4, по сравнению с больными со стадией заболевания Т1-2 (табл. 1). Кроме того, отмечен рост концентрации глюкозы и триацилглицеридов крови с распространённостью заболевания. Данные показатели были повышены в 1,2 и 1,4 раза соответственно, в группе больных со стадией заболевания Т3-4, по сравнению с больными со стадией Т1-2 (рис. 3В).

При исследовании содержания 20S протеасом, Hsp27 и LC3B в экзосомах плазмы крови были выявлены изменения уровня 20S протеасом и LC3B (табл. 2). Отмечен рост уровня 20S протеасом в 4,32 раза у больных с 1 степенью ожирения (ИМТ > 30), по сравнению с пациентами с повышенным питанием (ИМТ от 25 до 30). При этом количество белка LC3B в экзосомах снижалось в 2,0 раза с увеличением ИМТ в исследуемых группах пациентов.

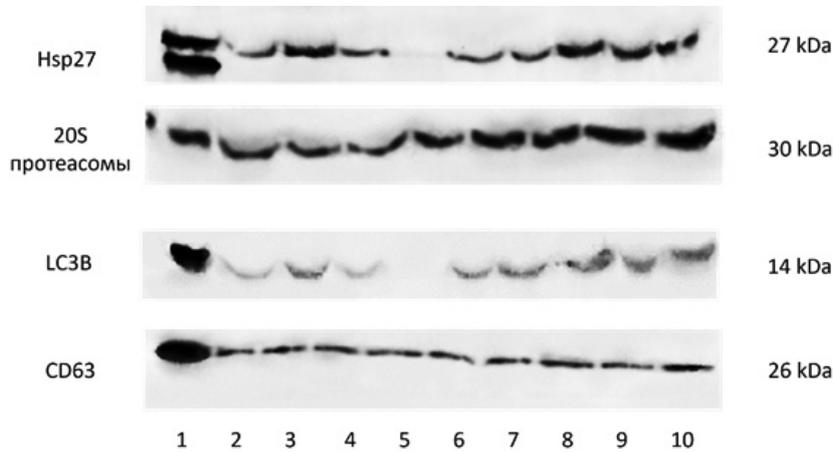


Рис. 1. Содержание белков CD63, Hsp27, 20S протеасом, LC3B в экзосомах крови. 2, 3 — атрофический гастрит; 5, 6, 7, 8, 9, 10 — рак желудка
 Fig. 1. The content of CD63, Hsp27, 20S proteasome, LC3B proteins in blood exosomes. 2, 3 — atrophic gastritis; 5, 6, 7, 8, 9, 10 — stomach cancer

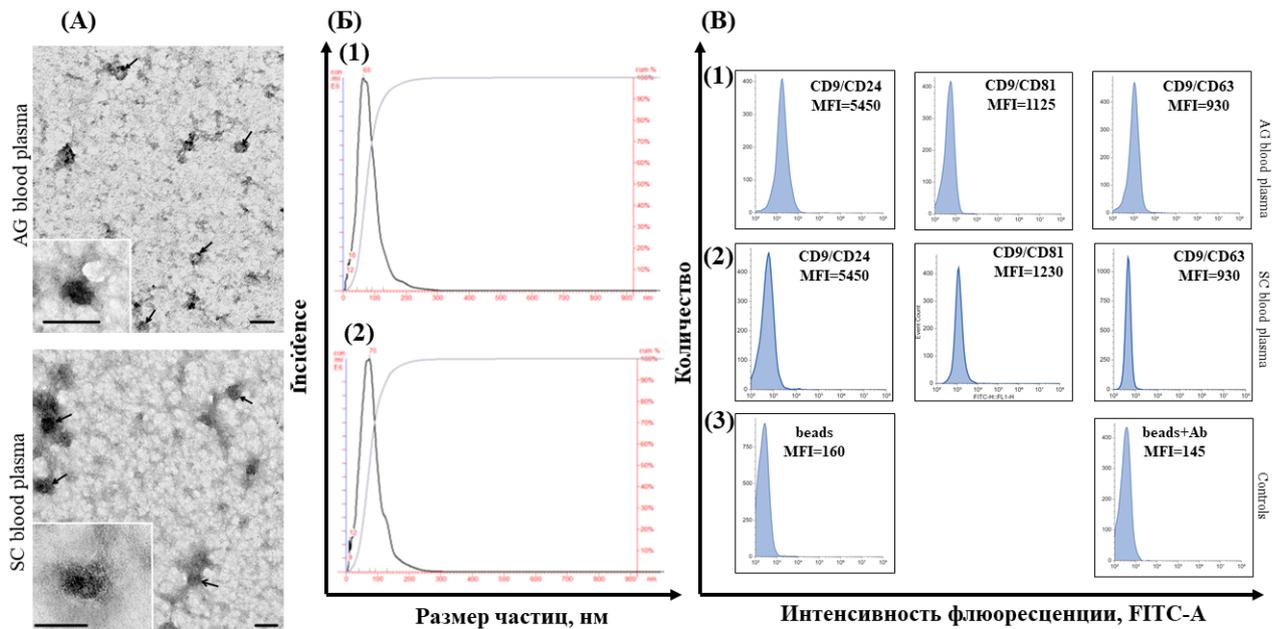


Рис. 2. Типирование внеклеточных везикул. Типирование внеклеточных везикул. (А) Трансмиссионная электронная микроскопия показала наличие везикул размером не более 100 нм, на вставке показаны малые внеклеточные везикулы, масштабные линии соответствуют 100 нм; (Б) Распределение размеров внеклеточных везикул у пациентов с атрофическим гастритом (1) и раком желудка (2), по данным анализа траекторий частиц (НТА); (В) Экспрессия CD24, CD63 и CD81 на CD9-позитивных внеклеточных везикулах плазмы крови пациентов с атрофическим гастритом (1), пациентов раком желудка (2). Изотипический и отрицательный контроли (латексные частицы с конъюгированными с FITC антителами к CD9 и CD81 (3). Приведены средние значения медианы интенсивности флюоресценции (MFI). SG — рак желудка (gastric cancer); AG — атрофический гастрит (atrophic gastritis); Controls — контроли
 Fig. 2. Typing of extracellular vesicles. Typing of extracellular vesicles. (A) Transmission electron microscopy showed the presence of vesicles no larger than 100 nm, the insert shows small extracellular vesicles, scale lines correspond to 100 nm; (B) The size distribution of extracellular vesicles in patients with atrophic gastritis (1) and gastric cancer (2) according to particle trajectory analysis (NTA); (B) Expression of CD24, CD63 and CD81 on CD9-positive extracellular plasma vesicles of patients with atrophic gastritis (1), patients with gastric cancer (2). Isotypic and negative controls (latex particles with FITC conjugated antibodies to CD9 and CD81 (3). The average values of the median fluorescence intensity (MFI) are given. SG — gastric cancer; AG — atrophic gastritis

Таблица 1. Содержание 20S протеасом, Hsp27 и LC3B в экзосомах плазмы крови при раке желудка, по сравнению с экзосомами, выделенными у больных с атрофическим гастритом, Me (Q1-Q3)
Table 1. The content of 20S proteasomes, Hsp27 and LC3B in plasma exosomes in gastric cancer compared to exosomes isolated from patients with atrophic gastritis, Me (Q1-Q3)

Показатели	Атрофический гастрит	Общая группа рак желудка	T1-2	T3-4
Содержание 20S alpha 5, Усл. Ед.	1,05 (1,03; 1,07)	4,06 (2,12; 22,57)*	4,32 (1,35; 10,70)	3,80 (2,23; 22,57)
Содержание Hsp27, Усл. Ед.	2, 64 (1,09; 4,19)	1,16 (0,74; 2,66)*	2,66 (1,16; 2,66)	1,03 (0,65; 1,87) #
Содержание LC3B, Усл. Ед.	1,34 (1,09; 1,59)	1,91 (1,16; 6,13)*	1,91 (1,68; 1,91)	2,59 (1,16; 6,13)

* Значимость различий (p < 0,05), по сравнению с больными с атрофическим гастритом; # значимость различий (p < 0,05), по сравнению с больными раком желудка T1-2.

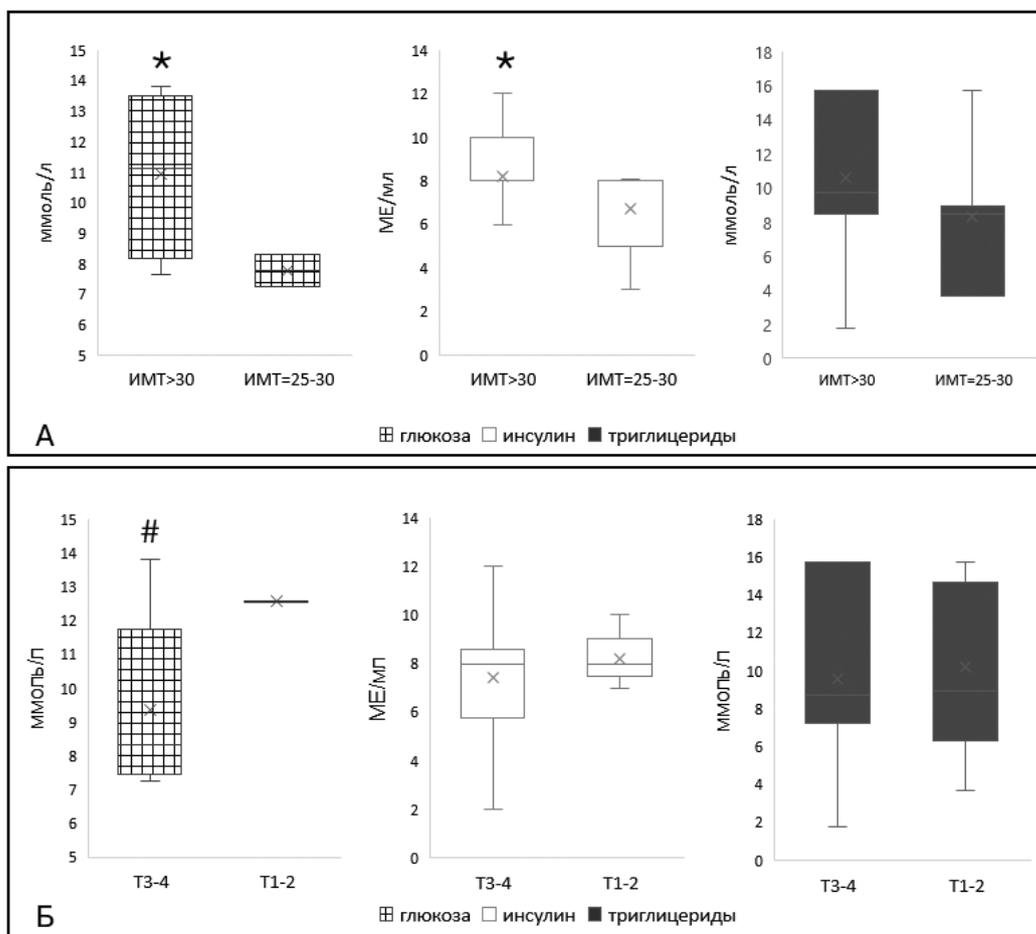


Рис. 3. Концентрации глюкозы, триглицеридов и содержания инсулина в плазме крови: А — у больных раком желудка в зависимости от ИМТ; Б — у больных раком желудка в зависимости от стадии опухолевого процесса. * — значимость различий (p < 0,05), по сравнению с больными раком желудка и ИМТ от 25 до 30; # — значимость различий (p < 0,05), по сравнению с больными раком желудка T1-2.
 Fig. 3. Blood plasma glucose, triglyceride and insulin concentrations: A — in gastric cancer patients according to BMI; Б — in gastric cancer patients according to the stage of the tumor process. * — Significance of differences (p < 0.05) compared with gastric cancer patients and BMI from 25 to 30; # — Significance of differences (p < 0.05) compared with gastric cancer patients T1-2

Таблица 2. Содержание 20S протеасом, Hsp27, LC3B в экзосомах плазмы крови у больных раком желудка в зависимости от ИМТ, Me (Q1-Q3)
Table 2. The 20S proteasomes, Hsp27, LC3B content in plasma exosomes in gastric cancer patients, depending on BMI, Me (Q1-Q3)

Показатели	Больные раком желудка с ИМТ=25-30	Больные раком желудка с ИМТ > 30
Содержание 20S alpha 5, Усл. Ед.	3,80 (3,24; 22,57)	4,32 (2,12 ;11,05) *
Содержание Hsp27, Усл. Ед.	1,34 (1,00; 2,14)	1,16 (0,74; 2,66)
Содержание LC3B, Усл. Ед.	3,99 (1,66; 7,05)	1,91 (1,16; 2,97) *

* Значимость различий, по сравнению с больными раком желудка и ИМТ от 25 до 30.

Стоит отметить, что содержание инсулина, концентрация глюкозы и триглицеридов повышалось в 1,23; 1,19 и 1,4 раза соответственно в группах больных с ИМТ > 30, по сравнению с пациентами с повышенным питанием (ИМТ от 25 до 30) (рис. 3а).

Обсуждение

В результате проведенного исследования были выявлены особенности распределения белков 20S протеасом, Hsp27 и LC3B в экзосомах

плазмы крови при РЖ. Активация онкогенеза, сопровождаемая ростом активности протеасом и инициацией аутофагии, была зафиксирована в экзосомах крови. Данный факт согласуется с ранее полученными данными о повышении количества маркеров данных процессов в ткани опухоли [11, 12]. В ранее проведенных исследованиях были отмечены факты повышения содержания 20S протеасом у больных с раком яичников [2], что свидетельствует о возможности определения данных маркеров в экзосомах плазмы крови больных со злокачественными

новообразованиями. Также отмечено, что содержание белка LC3B может быть связано с распространением опухоли желудка [11, 12], а также с эффективностью проводимого лечения. Подобные результаты были зафиксированы для папиллярного рака щитовидной железы [16].

Снижение содержания белков теплового шока Hsp27, отмеченное в проведенном исследовании, вероятно, связано с процессами опухолевой прогрессии [4, 5]. В работе Н. Ге и соавт. была показано, что данный показатель не ассоциирован с клинико-морфологическими особенностями опухоли [6].

Известно, что метаболические нарушения увеличивают риск развития РЖ и являются неблагоприятным факторами прогноза [15, 17]. Активность протеолитических процессов возрастает как на фоне ожирения, так и при развитии злокачественных опухолей [18], что также было подтверждено в данном исследовании. Связь между снижением уровня белков, ассоциированных с аутофагией, и ожирением выявили в работе [19]. В проведенном исследовании также показано снижение содержания белка LC3B в экзосомах больных с ожирением I степени, что сочеталось с повышением ИМТ, ростом содержания инсулина, глюкозы и триглицеридов.

В ранее проведенных исследованиях было отмечено, что накопление жировой ткани в различных органах играет ключевую роль в нарушении функции клеток этих органов, что может привести к различным хроническим заболеваниям, включая рак. Избыточное накопление жира в организме, особенно в брюшной области, связано с резистентностью к инсулину. Поскольку инсулин и инсулиноподобный фактор роста-I (ИФР-I) играют значительную роль в пролиферации клеток, изменение резистентности к инсулину может вызывать нарушение апоптоза и способствовать канцерогенезу [20]. Кроме того, провоспалительные адипоцитокينات, такие как лептин и адипонектин, которые вырабатываются в ответ на ожирение, могут запускать провоспалительные процессы и стимулировать развитие рака. И наоборот, у лиц с ожирением в ответ на повышенную выработку провоспалительных цитокинов снижается уровень адипонектина, индуцирующего апоптоз [21].

Низкий уровень адипонектина коррелирует с резистентностью к инсулину и повышенным уровнем инсулина [22]. Уровни циркулирующего инсулина и ИФР-I часто повышаются у лиц с избыточной массой тела и ожирением как следствие сниженной чувствительности к инсулину, обусловленной частично изменениями уровня адипонектина. Существует связь между увеличением ИМТ и повышенной резистентностью к инсулину, а также уровнем инсулина натощак

[23, 24]. Было подсчитано, что каждое повышение значения ИМТ на 1 кг/м² увеличивает уровень инсулина натощак на 8,5 % [25].

Таким образом, были получены подтверждающие сведения о возможности применения подходов жидкостной биопсии для исследования особенностей РЖ, формирования групп риска, особенно у пациентов с метаболическими нарушениями. Выявленные факты, несомненно, требуют дальнейшего исследования, однако в данной работе получены результаты, совпадающие с подобными работами, проведенными на опухолевой ткани.

Заключение

Выявлен рост 20S протеасом и LC3B в экзосомах плазмы, выделенных у больных с РЖ. При этом уровень белка Hsp27 в экзосомах был снижен у больных со злокачественными опухолями, в сравнении с пациентами с предраком. Отмечена связь содержания белка LC3B, метаболических нарушений со стадией опухолевого процесса у больных РЖ на фоне ожирения, что, несомненно, требует дальнейшего изучения. Выявлена ассоциация между ИМТ, содержанием 20S протеасом и LC3B белка в экзосомах плазмы больных РЖ, что может указывать на вовлеченность метаболических изменений в процессы опухолевой прогрессии. Таким образом, в проведенном исследовании сформированы и обоснованы подходы для применения маркеров жидкостной биопсии при формировании групп риска и диагностики РЖ. При этом особое значение придается метаболическим нарушениям как основному триггеру опухолевой прогрессии.

Конфликт интересов

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Conflict of interest

The authors declare no conflict of interest.

Соблюдение правил биоэтики

Проведение данной работы одобрено этическим комитетом НИИ онкологии Томского НИМЦ. Все процедуры с вовлечением больных были проведены в соответствии с Протоколом Хельсинской декларации по правам человека (1964 г.), протокол № 22 от 28.11.2022. Все больные подписывали информированное согласие на участие в исследовании.

Compliance with the rules of bioethics

The work was approved by the Ethical Committee of the Cancer Research Institute of the Tomsk National Research Medical Center. All procedures involving patients were performed in accordance with the Protocol of the Declaration of Helsinki (1964). All patients signed an informed consent to participate in the study. (Protocol No. 22 of 28.11.2022).

Финансирование

Работа выполнена при финансовой поддержке ФГБОУ ВО СибГМУ Минздрава России.

Financing

This work was funded by the Siberian State Medical University of the Ministry of Health of Russia.

Участие авторов

Спирина Л.В. — написание текста статьи, анализ и интерпретация данных;

Афанасьев С.Г. — формулировка цели исследования;

Августиневич А.В. — научное редактирование, клиническое сопровождение исследования;

Баркышева А.А. — выделение экзосом, техническое редактирование, оформление библиографии;

Богданова В.А. — выделение экзосом, дизайн исследования;

Сваровский Д.А. — формирование групп пациентов;

Юнусова Н.В. — участие в исследовании.

Все авторы одобрили финальную версию статьи перед публикацией, выразили согласие нести ответственность за все аспекты работы, подразумевающее надлежащее изучение и решение вопросов, связанных с точностью или добросовестностью любой части работы.

Authors' contributions

Spirina L.V. — drafted the article, analyzed and interpreted the data;

Afanasyev S.G. — formulated the purpose of the study;

Augustinovich A.V. — performed scientific editing, clinical support of the study;

Barkysheva A.A. — performed isolation of exosomes, technical editing, organised the reference list;

Bogdanova V.A. — designed the study, isolated the exosomes;

Swarovsky D.A. — organised patient groups;

Yunusova N.V. — participated in the study.

All authors have approved the final version of the article prior to publication and have agreed to accept responsibility for all aspects of the work, including proper review and resolution of any issues related to the accuracy or integrity of any part of the work.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

1. Zhang Z., Wu H., Chong W., et al. Liquid biopsy in gastric cancer: predictive and prognostic biomarkers. *Cell Death Dis.* 2022; 13(10): 903.-DOI: <https://doi.org/10.1038/s41419-022-05350-2>.
2. Yunusova N., Kolegova E., Sereda E., et al. Plasma exosomes of patients with breast and ovarian tumors contain an inactive 20S proteasome. *Molecules.* 2021; 26(22): 6965.-DOI: <https://doi.org/10.3390/molecules26226965>.
3. Deng Y.Q., Gao M., Lu D., et al. Compound-composed Chinese medicine of Huachansu triggers apoptosis of gastric cancer cells through increase of reactive oxygen species levels and suppression of proteasome activities. *Phytomedicine.* 2023; 123: 155169.-DOI: <https://doi.org/10.1016/j.phymed.2023.155169>.
4. Sun L., Chen Y., Xia L., et al. TRIM69 suppressed the anoikis resistance and metastasis of gastric cancer through ubiquitin-proteasome-mediated degradation of PRKCD. *Oncogene.* 2023; 42(49): 3619-3632.-DOI: <https://doi.org/10.1038/s41388-023-02873-6>.
5. Monittola F., Bianchi M., Nasoni M.G., et al. Gastric cancer cell types display distinct proteasome/immunoproteasome patterns associated with migration and resistance to proteasome inhibitors. *J Cancer Res Clin Oncol.* 2023; 149(12): 10085-10097.-DOI: <https://doi.org/10.1007/s00432-023-04948-z>.
6. Ge H., He X., Guo L., Yang X. Clinicopathological significance of HSP27 in gastric cancer: a meta-analysis.

- Onco Targets Ther.* 2017; 10: 4543-4551.-DOI: <https://doi.org/10.2147/OTT.S146590>.
7. Liu T., Liu D., Kong X., Dong M. Clinicopathological significance of heat shock protein (HSP) 27 expression in gastric cancer: a updated meta-analysis. *Evid Based Complement Alternat Med.* 2020; 2020: 7018562.-DOI: <https://doi.org/10.1155/2020/7018562>.
8. Liu Z., Liu Y., Long Y., et al. Role of HSP27 in the multidrug sensitivity and resistance of colon cancer cells. *Oncol Lett.* 2020; 19(3): 2021-2027.-DOI: <https://doi.org/10.3892/ol.2020.11255>.
9. Giatromanolaki A., Koukourakis M.I., Georgiou I., et al. LC3A, LC3B and beclin-1 expression in gastric cancer. *Anticancer Res.* 2018; 38(12): 6827-6833.-DOI: <https://doi.org/10.21873/anticancer.13056>.
10. Kim J.S., Bae G.E., Kim K.H., et al. Prognostic significance of LC3B and p62/SQSTM1 expression in gastric adenocarcinoma. *Anticancer Res.* 2019; 39(12): 6711-6722.-DOI: <https://doi.org/10.21873/anticancer.13886>.
11. Spirina L.V., Avgustinovich A.V., Afanas'ev S.G., et al. Expression and content of protein LC3B in gastric cancer tissue, relationship with expression of mTOR, AMPK in gastric cancer tissue and HER2 and PD-L1 status of the tumor. *Bull Exp Biol Med.* 2021; 172(2): 202-205. DOI: <https://doi.org/10.1007/s10517-021-05376-0>.
12. Spirina L.V., Avgustinovich A.V., Bakina O.V., et al. LC3B, mTOR, AMPK are molecular targets for neoadjuvant chemotherapy in gastric cancers. *Curr Issues Mol Biol.* 2022; 44(7): 2772-2782.-DOI: <https://doi.org/10.3390/cimb44070190>.
13. Repetto O., Vettori R., Steffan A., et al. Circulating proteins as diagnostic markers in gastric cancer. *Int J Mol Sci.* 2023; 24(23): 16931.-DOI: <https://doi.org/10.3390/ijms242316931>.
14. World Health Organization. Obesity and Overweight.-URL: <http://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/obesity-and-overweight>.
15. Azizi N., Zangiabadian M., Seifi G., et al. Gastric cancer risk in association with underweight, overweight, and obesity: a systematic review and meta-analysis. *Cancers (Basel).* 2023; 15(10): 2778.-DOI: <https://doi.org/10.3390/cancers15102778>.
16. Ковалева И.В., Спирина Л.В., Чижевская С.Ю., et al. Экспрессия и содержание белка LC3B в ткани папиллярного рака щитовидной железы, связь с клинико-морфологическими параметрами опухоли. *Вопр онкол.* 2022; 68(4): 439-444.-DOI: <https://doi.org/10.37469/0507-3758-2022-68-4-439-444>. [Kovaleva I.V., Spirina L.V., Chizhevskaya S.Y., et al. LC3B protein content and expression in the papillary thyroid cancer tissue, relation with the clinical and morphological parameters of the tumor. *Voprosy Onkologii = Problems in Oncology.* 2022; 68(4): 439-444.-DOI: <https://doi.org/10.37469/0507-3758-2022-68-4-439-444>. (In Rus)].
17. Zhuang C.L., Wu H.F., Jiang H.J., et al. Muscle attenuation, not skeletal muscle index, is an independent prognostic factor for survival in gastric cancer patients with overweight and obesity. *Nutrition.* 2024; 122: 112391.-DOI: <https://doi.org/10.1016/j.nut.2024.112391>.
18. Guerra J., Matta L., Bartelt A. Cardiac proteostasis in obesity and cardiovascular disease. *Herz.* 2024; 49(2): 118-123.-DOI: <https://doi.org/10.1007/s00059-024-05233-6>.
19. Cohen M., Guo E., Pucchio A., et al. Maternal obesity reduces placental autophagy marker expression in uncomplicated pregnancies. *J Obstet Gynaecol Res.* 2020; 46(8): 1282-1291.-DOI: <https://doi.org/10.1111/jog.14315>.
20. Cannata D., Fierz Y., Vijayakumar A., LeRoith D. Type 2 diabetes and cancer: what is the connection? *Mt Sinai J*

- Med.* 2010; 77(2): 197-213.-DOI: <https://doi.org/10.1002/msj.20167>.
21. Friedenreich C.M., Ryder-Burbidge C., McNeil J. Physical activity, obesity and sedentary behavior in cancer etiology: epidemiologic evidence and biologic mechanisms. *Mol Oncol.* 2021; 15(3): 790-800.-DOI: <https://doi.org/10.1002/1878-0261.12772>.
 22. Kadowaki T., Yamauchi T., Kubota N., et al. Adiponectin and adiponectin receptors in insulin resistance, diabetes, and the metabolic syndrome. *J Clin Invest.* 2006; 116(7): 1784-92.-DOI: <https://doi.org/10.1172/JCI29126>.
 23. Song Q., Huang T., Song J., et al. Causal associations of body mass index and waist-to-hip ratio with cardiometabolic traits among Chinese children: A Mendelian randomization study. *Nutr Metab Cardiovasc Dis.* 2020; 30(9): 1554-1563.-DOI: <https://doi.org/10.1016/j.numecd.2020.05.008>.
 24. Zhang H., Li D., Liu X., et al. Fasting insulin and risk of overall and 14 site-specific cancers: evidence from genetic data. *Front Oncol.* 2022; 12: 863340.-DOI: <https://doi.org/10.3389/fonc.2022.863340>.
 25. Holmes M.V., Lange L.A., Palmer T., et al. Causal effects of body mass index on cardiometabolic traits and events: a Mendelian randomization analysis. *Am J Hum Genet.* 2014; 94(2): 198-208.-DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ajhg.2013.12.014>.

Поступила в редакцию / Received / 17.04.2024

Прошла рецензирование / Reviewed / 13.06.2024

Принята к печати / Accepted for publication / 13.06.2024

Сведения об авторах / Author's information / ORCID

Людмила Викторовна Спирина / Lyudmila V. Spirina / ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0002-5269-736X>, SPIN: 1336-836.

Александра Владимировна Августинович / Alexandra V. Augustinovich / ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0003-3796-7218>, SPIN: 2952-6119.

Аржана Аржановна Баркышева / Arzhana A. Barkysheva / ORCID ID: <https://orcid.org/0009-0005-2068-0036>.

Вероника Александровна Богданова / Veronika A. Bogdanova / ORCID ID: <https://orcid.org/0009-0003-8473-4182>.

Сергей Геннадьевич Афанасьев / Sergey G. Afanasyev / ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0002-4701-0375>, SPIN: 9206-3037.

Дмитрий Андреевич Сваровский / Dmitry A. Swarovsky / ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0002-8985-009X>.

Наталья Валерьевна Юнусова / Natalya V. Yunusova / ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0003-4595-4177>, SPIN: 3513-1888.

