

© С.Н. Тамкович,^{1,2,3} Н.В. Юнусова⁴, Д.А. Сваровский⁴, Т.А. Штам⁵,
И.В. Кондакова⁴, А.Л. Чернышова^{1,3}

Уровень экзосомальных протеасом как перспективный маркер для дифференцирования больных с мастопатией и раком молочной железы методом «жидкостной биопсии»

¹Федеральное государственное бюджетное учреждение «Институт онкологии и нейрохирургии Национального медицинского исследовательского центра имени академика Е.Н. Мешалкина» Министерства здравоохранения Российской Федерации, г. Новосибирск, Российская Федерация

²Институт химической биологии и фундаментальной медицины Сибирского отделения Российской академии наук, г. Новосибирск, Российская Федерация

³Институт медицины и медицинских технологий Новосибирского государственного университета, г. Новосибирск, Российская Федерация

⁴Научно-исследовательский институт онкологии — филиал Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Томский национальный исследовательский медицинский центр Российской академии наук», г. Томск, Российская Федерация

⁵Федеральное государственное бюджетное учреждение «Петербургский институт ядерной физики имени Б.П. Константинова Национального исследовательского центра «Курчатовский институт», г. Гатчина Ленинградской обл., Российская Федерация

© Svetlana N. Tamkovich^{1,2,3}, Natalia V. Yunusova⁴, Dmitry A. Svarovsky⁴,
Tatiana A. Shtam⁵, Irina V. Kondakova⁴, Alyona L. Chernyshova^{1,3}

Exosomal Proteasome Levels as a Potential Biomarker for Differentiating Mastopathy from Breast Cancer via Liquid Biopsy

¹Institute of Oncology and Neurosurgery, E.N. Meshalkin National Medical Research Center, Ministry of Healthcare of the Russian Federation, Novosibirsk, the Russian Federation

²Institute of Chemical Biology and Fundamental Medicine, Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences, Novosibirsk, the Russian Federation

³Institute of Medicine and Medical Technologies, Novosibirsk State University, Novosibirsk, the Russian Federation

⁴Cancer Research Institute, Tomsk National Research Medical Center, Tomsk, the Russian Federation

⁵National Research Center “Kurchatov Institute”, Gatchina, the Russian Federation

Введение. Рак молочной железы (РМЖ) является наиболее распространенной онкологической патологией среди женщин. Недостатки маммографии и УЗИ, а также отсутствие чувствительных биомаркеров, позволяющих надежно дифференцировать доброкачественные и злокачественные заболевания молочной железы, приводят к неоправданным биопсиям и тревоге пациенток.

Цель. Оценка уровня 20S-протеасом в экзосомах крови пациенток с мастопатией и РМЖ.

Материалы и методы. В исследование включены образцы крови клинически здоровых женщин (n = 20), больных диффузной дисгормональной дисплазией молочной железы (n = 20) и РМЖ (T₁N₀M₀, n = 20). Экзосомы из плазмы и цельной крови выделены ультрацентрифугированием и охарактеризованы проточной цитометрией и трековым анализом. После характеристики общего спектра белков экзосом уровень 20S-протеасомы определяли с помощью вестерн-блоттинга.

Результаты. Показано, что 20S-протеасомы в составе экзосом не проявляют химотрипсин- и каспазаподобной активностей, однако их уровень статистически значимо повышен в экзосомах плазмы и цельной крови больных РМЖ, причем в экзосомах крови этот показатель выше, чем в экзосомах плазмы. Полученные данные позволяют

Introduction. Breast cancer (BC) remains the most prevalent malignancy among women worldwide. Limitations in mammography and ultrasound sensitivity, combined with the absence of reliable biomarkers for distinguishing benign from malignant breast lesions, frequently result in unnecessary biopsies and patient distress.

Aim. To quantify 20S proteasome levels within blood-derived exosomes from patients with mastopathy and BC.

Materials and Methods. The study included blood samples from clinically healthy women (n = 20), patients with diffuse dyshormonal breast dysplasia (n = 20), and BC patients (T₁N₀M₀, n = 20). Exosomes were isolated from plasma and whole blood via ultracentrifugation and characterized using flow cytometry and nanoparticle tracking analysis. Following comprehensive exosomal protein profiling, 20S proteasome levels were quantified through Western blot analysis.

Results. 20S proteasomes within exosomes demonstrated neither chymotrypsin-like nor caspase-like enzymatic activity. However, their expression levels were significantly elevated in both plasma and whole blood exosomes from BC patients, with whole blood exosomes showing higher concentrations than plasma-derived exosomes. These findings suggest BC

предположить, что развитие РМЖ связано с переносом субъединиц 20S-протеасомы в составе экзосом крови от клеток-доноров к клеткам-реципиентам.

Выводы. Полученные данные подтверждают возможность использования уровня 20S-протеасом для дифференцирования больных с доброкачественными и злокачественными заболеваниями молочной железы.

Ключевые слова: экзосомы; 20S-протеасома; плазма; рак молочной железы; мастопатия; жидкостная биопсия

Для цитирования: Тамкович С.Н., Юнусова Н.В., Сваровский Д.А., Штам Т.А., Кондакова И.В., Чернышова А.Л. Уровень экзосомальных протеасом как перспективный маркер для дифференцирования больных с мастопатией и раком молочной железы методом «жидкостной биопсии». Вопросы онкологии. 2025; 71(6): 00-00.-DOI: 10.37469/0507-3758-2025-71-6-OF-2500

✉ Контакты: Тамкович Светлана Николаевна, tamkovich_sn@meshalkin.ru

Введение

По данным Всемирной организации здравоохранения, в 2022 г. в мире было зарегистрировано 2 308 897 новых случаев РМЖ и 666 000 смертей, связанных с этим заболеванием [1], причем за последнее десятилетие отмечается рост заболеваемости на 13,75 % (с 45,75 на 100 000 населения в 2010 г. до 47,39 в 2020 г.) [2]. Поскольку вовремя диагностированное злокачественное новообразование (ЗНО) лучше поддается лечению и имеет большую вероятность ремиссии, одной из актуальных задач молекулярной онкологии является идентификация высокоточных биомаркеров, позволяющих выявить РМЖ на начальных стадиях. Принимая во внимание, что 39 % больных РМЖ в России являются женщинами трудоспособного возраста и из них более 50 % впервые выявленных в течение первого года получают инвалидность [3, 4], ранняя диагностика РМЖ снизит социально-экономическое бремя в РФ путем уменьшения затрат на оказание медицинской помощи, выплату пенсий по инвалидности и пособий по временной утрате трудоспособности.

Диагностика ЗНО с использованием «жидкостной биопсии» имеет такие преимущества перед тканевой биопсией, как минимальная инвазивность, возможность серийного взятия крови, более полное отражение гетерогенности опухоли [5], а также способность выявлять новообразования в анатомически недоступных областях [6]. Биомаркеры, которые можно обнаружить с помощью «жидкостной биопсии», включают циркулирующие опухолевые клетки [7], экзосомы [8, 9] и нуклеиновые кислоты в составе белковых комплексов [10].

Экзосомы — небольшие (30–150 нм) мембранные внеклеточные везикулы (ВВ), имеющие на своей поверхности тетраспанины CD9, CD63, CD81, которые высвобождаются во внеклеточную среду после слияния мультивезикулярных телец с плазматической мембраной [11]. Секре-

progression involves intercellular transfer of 20S proteasome subunits via blood exosomes from donor to recipient cells.

Conclusion. Quantification of 20S proteasome levels in circulating exosomes shows potential for differentiating between benign and malignant breast diseases.

Keywords: exosomes; 20S-proteasome; plasma; breast cancer; mastopathy; liquid biopsy

For Citation: Svetlana N. Tamkovich, Natalia V. Yunusova, Dmitry A. Svarovsky, Tatiana A. Shtam, Irina V. Kondakova, Alyona L. Chernyshova. Exosomal proteasome levels as a potential biomarker for differentiating mastopathy from breast cancer via liquid biopsy. *Voprosy Onkologii = Problems in Oncology*. 2025; 71(6): 00-00.-DOI: 10.37469/0507-3758-2025-71-6-OF-2500

тируемые раковыми клетками экзосомы переносятся кровью и лимфой и могут быть обнаружены в организме далеко от места локализации родительских клеток [12]. Показано, что экзосомы в крови стабильны в течение длительного времени и участвуют в ключевых физиологических процессах посредством горизонтального переноса РНК и белков, влияя как на развитие первичной опухоли, так и на отдаленное метастазирование [13]. В функциональной активности экзосомальных белков значимую роль играют протеазы и, в частности, 20S-протеасомы [14].

Протеасомы, обладающие трипсинподобной, химотрипсинподобной и каспазаподобной активностями, играют важную роль во внутриклеточной деградации белков, что обуславливает их важную роль в возникновении и развитии злокачественных новообразований [15]. Показано, что протеасомы участвуют в регуляции пролиферации, апоптоза, миграции клеток, транскрипции генов и иммунного ответа, разрушая или активируя белки — компоненты сигнальных путей, факторы транскрипции и другие функционально значимые молекулы [16]. Показано, что экзосомы переносят между клетками 20S-протеасомы, однако не ясно, имеет ли уровень этих протеолитических комплексов диагностическую ценность.

В данной статье мы провели сравнительное исследование уровня 20S-протеасом в экзосомах, полученных из плазмы и цельной крови здоровых женщин, пациенток с мастопатией и РМЖ для оценки возможности использования данного молекулярного груза везикул для жидкостной биопсии.

Материалы и методы

Образцы крови женщин получены в НМИЦ им. ак. Е.Н. Мешалкина. Работу проводили с соблюдением принципов добровольности и конфиденциальности в соответствии с Федеральным законом «Об основах охраны здоровья граждан в Российской Федерации» от 21.11.2011 N 323-ФЗ.

От каждого участника получено письменное информированное согласие, исследование одобрено локальным этическим комитетом. Образцы крови (по 9 мл), собранные путем венепункции в вакутейнеры, содержащие K_3 ЭДТА, хранили при 4 °С и обрабатывали в ближайший час.

Экзосомы из плазмы и из цельной крови 20 клинически здоровых женщин (средний возраст — 44 ± 4 года), 20 больных с диффузной дисгормональной дисплазией молочной железы (средний возраст — 42 ± 3 года) и 20 первичных больных люминальным РМЖ (табл. 1, средний возраст — 56 ± 2 года) выделяли методом комбинации ультрафильтрации и ультрацентрифугирования [17]. Образцы экзосом ресуспендировали в 200 мкл фосфатно-солевого буфера (10 мМ фосфатный буфер, 0,15 М NaCl, pH 7,5) (ФБ), замораживали в жидком азоте и хранили при -80 °С.

Размер и концентрацию внеклеточных везикул (ВВ) определяли методом анализа траектории наночастиц с использованием NanoSight 382 NS300 (Malvern, Великобритания), как описано ранее [18]. Для анализа полученных данных использовали программное обеспечение NTA analytical software version 2.3 (NanoSight Ltd., Великобритания).

Типирование экзосом на характерные поверхностные белки экзосом CD9, CD24, CD63, CD81 проводили методом проточной цитофлуориметрии с иммобилизованными антителами на латексных частицах [17]. Цитофлуориметрия была выполнена на проточном цитофлуориметре

FACS Canto II (США). В выделенной популяции экзосом анализировали медиану интенсивности флуоресценции в сравнении с изотипическим контролем (BD bioscience) и отрицательными контролями (латексные частицы, покрытые антителами + антитела против экзосом).

Химотрипсин- и каспазаподобную активность протеасом определяли в экзосомах путем гидролиза специфических флуорогенных пептидов Suc-LLVY-AMC (Sigma) [19] и Z-Leu-Leu-Glu-AMC (Sigma) [19, 20] соответственно. Предварительно был выполнен лизис везикул. Около 30 мкл экзосом лизировали добавлением 7 мкл буфера, содержащего 0,125 М Трис-HCl, pH 7,8, 0,75 М NaCl, 0,5 % SDS, 5 % Тритон X-100) и 3 мкл коктейля ингибиторов протеаз (1,3 мМ апротинина (Sigma, США), 0,33 мМ пепстатина А (ICN, США), 1 мкг/мл лейпептина (ICN, США)) с последующей инкубацией в течение 1,5 ч на льду; далее центрифугировали при 14 000 g, супернатант использовали для оценки ферментативной активности.

Реакционная смесь содержала 20 мМ Трис-HCl (pH 7,5), 1 мМ ДТТ, 5 мМ $MgCl_2$, 1 мМ АТФ и 30 мкМ специфического пептида. Реакцию проводили при 37 °С в течение 20 мин и останавливали добавлением 1 %-ного раствора SDS. Интенсивность флуоресценции оценивали при длине волны возбуждения 380 нм и длине волны испускания 440 нм (флуориметр VersaFluor™, Bio-Rad). В качестве контроля для каждого образца ставилась проба, где в реакционную смесь

Таблица 1. Характеристика больных РМЖ

		No (%)
Инфильтративная протоковая карцинома		20 (100 %)
Стадия (TNM)	T1	20 (100 %)
	N0	20 (100 %)
	M0	20 (100 %)
Люминальный В подтип	HER-2 положительный	5 (25 %)
	HER-2 отрицательный	15 (75 %)
Степень злокачественности	II	20 (100 %)
Общее количество пациентов		20 (100 %)

Table 1. Characteristics of Breast Cancer (BC) Patients

		No. (%)
Infiltrative ductal carcinoma		20 (100 %)
Stage (TNM)	T1	20 (100 %)
	N0	20 (100 %)
	M0	20 (100 %)
Luminal B subtype	HER-2 positive	5 (25 %)
	HER-2 negative	15 (75 %)
Grade of malignancy	II	20 (100 %)
Total number of patients		20 (100 %)

вместе с лизированными ВВ добавляли специфический ингибитор протеасом MG132 (Sigma). Расчет удельной химиотрипсин- и каспазаподобной активности выполнялся с учетом разницы между флуоресценцией пробы с субстратом и пробы с субстратом и ингибитором.

Определение уровня 20S-протеасомы в составе экзосом проводили после разделения белка электрофорезом в полиакриламидном геле и последующего вестерн-блоттинга с использованием специфических поликлональных кроличьих антител к α - и β -субъединицам 20S-протеасомы человека (ab22673, Abcam, Великобритания). В частности, 30 мкл экзосом лизировали, как указано выше, смешивали с буфером для нанесения образцов и нагревали 7 мин при 95 °С. Для разделения белков использовали 12 %-ный додецилсульфат-содержащий полиакриламидный гель. В качестве стандартной смеси белков для определения масс использовали набор маркеров PageRuler Prestained Protein Ladder (10–180 кДа, Thermo Scientific, США). После разделения белки переносили с геля на PVDF-мембрану (0,45 мкм, Immobilon, Millipore, США). Визуализацию белковых пятен в гелях осуществляли методом окрашивания нитратом серебра с сульфатом натрия [21].

Для оценки уровня 20S-протеасомы в составе экзосом PVDF-мембрану блокировали 5 %-ным обезжиренным молоком, а затем последовательно инкубировали в течение 1 ч с антителами против 20S-протеасомы (Anti-Proteasome 20S α + β subunit antibody (ab22673, Abcam, Велико-

британия), разведение 1 : 2000), и в течение 1 ч со вторичными козьими антителами против кроличьих антител, конъюгированными с пероксидазой хрена (Santa Cruz Biotechnology, Великобритания), разведение 1 : 5000). После трехкратной промывки связавшиеся антитела детектировали с помощью системы детекции вестерн-блоттинга Amersham ECL-Plus (Amersham, США) и системы визуализации ChemiDoc Touch (Bio-Rad, США) по протоколу производителя. Денситометрию изображений проводили с помощью программы ImageJ. Относительное содержание 20S-протеасомы нормализовали по уровню экзосомального CD9. Исследование выполнено на оборудовании ЦКП «Медицинская геномика» (Томский НИМЦ, Томск).

Статистический анализ проводили с использованием программы Statistica 6.0. Все данные представляли в виде медиан с межквартильными размахами или средних значений со стандартными ошибками. Для оценки различий использовался U-критерий Манна — Уитни. Значения $p < 0,05$ считались статистически значимыми. Чувствительность и специфичность были рассчитаны на основе характеристических кривых (ROC-кривых).

Результаты

Для оценки уровня 20S-протеасомы в составе экзосом плазмы и экзосом крови клинически здоровых женщин ($n = 20$), больных с диффуз-

Таблица 2. Данные анализа траектории наночастиц при характеристизации экзосом*

Источник экзосом среднее		Размер ВВ, нм		Концентрация ВВ, $\times 10^7$ ВВ/мл	
		SD	медиана	интервал	
Здоровые женщины	плазма	120	63	16,1	8–21
	кровь	115	70	26,4	10–24
Больные с мастопатией молочной железы	плазма	96	43	24,4	20–136
	кровь	139	91	42,3	31–123
Больные люминальным РМЖ	плазма	103	45	31,9	21–183
	кровь	108	55	57,1	43–122

*Приведены средние значения для трех образцов, каждый из которых оценен в трех повторях.

Table 2. Nanoparticle Trajectory Analysis Data from Exosome Characterization*

Source of exosomes Mean		Size EVs, nm		Concentration of EVs, $\times 10^7$ EVs/ml	
		SD	Median	Interval	
Healthy females	plasma	120	63	16.1	8–21
	blood	115	70	26.4	10–24
Benign breast tumor patients	plasma	96	43	24.4	20–136
	blood	139	91	42.3	31–123
Luminal breast cancer patients	plasma	103	45	31.9	21–183
	blood	108	55	57.1	43–122

*Values represent the mean of three independent samples, each analyzed in triplicate.

ной дисгормональной дисплазией молочной железы ($n = 20$) и первичных больных люминальным РМЖ ($n = 20$), ВВ выделяли комбинацией ультрафильтрации и ультрацентрифугирования. Аликвоты полученных образцов использовали для характеристики в соответствии с требованиями Общества по исследованию ВВ (по размеру — анализ траектории частиц, по поверхностным маркерам — проточная цитометрия), а также для определения каталитической активности (флуоресцентный анализ) и уровня 20S-протеасомы (электрофорез и вестерн-блоттинг).

Для подтверждения экзосомальной природы выделенных ВВ использовали анализ траектории наночастиц и проточную цитометрию. При помощи анализа траекторий наночастиц установлено, что размер ВВ в образцах не превышает 150 нм (рис. 1, табл. 2). Кроме того, было установлено, что концентрация ВВ статистически значимо возрастает в плазме и крови больных РМЖ по сравнению с контрольными группами ($p < 0,05$ для всех случаев, рис. 1, табл. 2).

Выделенные ВВ также были исследованы на наличие экзосомальных маркеров (CD9, CD24, CD63 и CD81) с помощью проточной цитометрии. Для этого ВВ, адсорбированные на шариках, покрытых антителами к CD9, были окрашены флуоресцентно мечеными антителами к

рецепторам семейства тетраспанинов CD63 и CD81, а также рецептору CD24. Не выявлено статистически значимых отличий в представленности маркерных белков CD9, CD24, CD63 и CD81 на поверхности ВВ (рис. 2). Таким образом, размер ВВ в диапазоне до 150 нм и наличие характерных белков-маркеров на их поверхности позволяет отнести полученные ВВ к экзосомам.

Для сравнения спектра молекулярного веса белков в составе циркулирующих в крови экзосом на первом этапе белки были проанализированы при помощи белкового электрофореза (рис. 3). Показано, что в составе экзосом присутствуют белки с молекулярной массой от 10 до 170 кДа, с преобладающими мажорными компонентами 25–100 кДа. Тем не менее, концентрация и спектр экзосомальных белков онкологических больных отличаются от таковых для здоровых доноров. В частности, только в экзосомах плазмы здоровых женщин и больных с мастопатией были выявлены белки с молекулярной массой 10 кДа, а в экзосомах плазмы и экзосомах цельной крови больных с мастопатией и РМЖ — белки 13 кДа (рис. 3).

Показано, что химотрипсин- и каспазаподобная активности протеасом во всех образцах экзосом плазмы и экзосом цельной крови были ниже уровня детекции (данные не представлены).

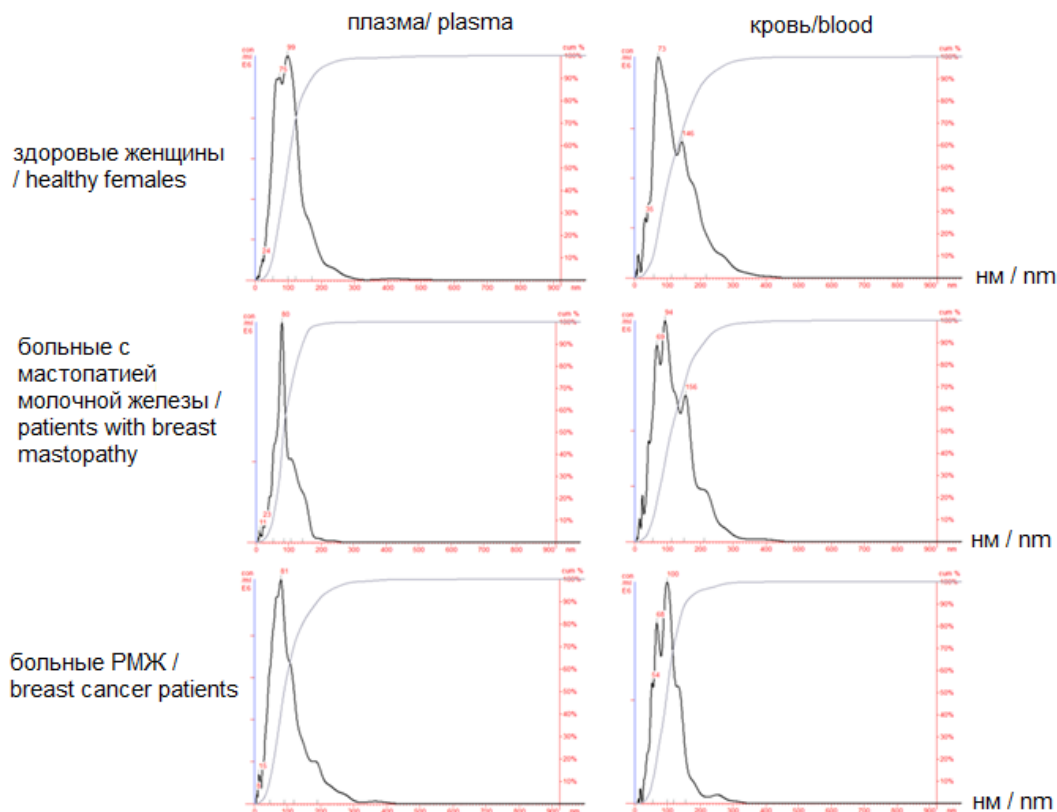


Рис. 1. Данные анализа траектории частиц. Приведены репрезентативные графики для ВВ плазмы и ВВ крови здоровых женщин, больных с мастопатией молочной железы и больных РМЖ

Fig. 1. Nanoparticle tracking analysis. Representative size distribution of plasma and whole blood extracellular vesicles profiles from healthy females, patients with breast mastopathy, and breast cancer patients

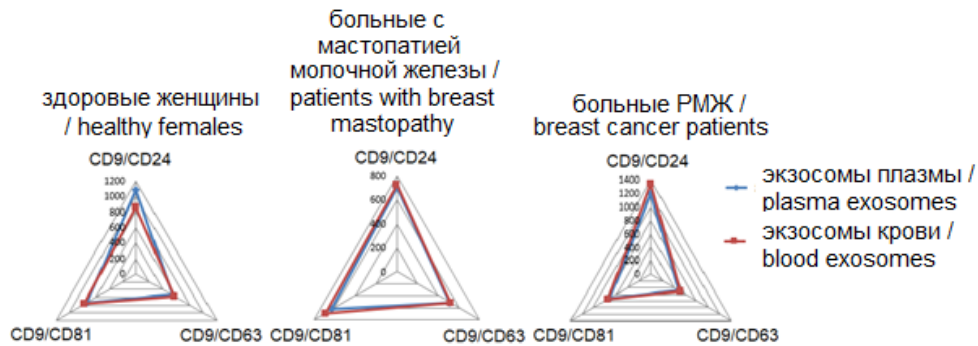


Рис. 2. Уровни CD 24, CD63 и CD81 на CD 9-положительных экзосомах плазмы и экзосомах цельной крови здоровых женщин, больных с мастопатией и больных РМЖ. Данные представлены в виде средней интенсивности флуоресценции трех повторов
Fig. 2. CD24, CD63, and CD81 levels on CD9-positive plasma-derived and whole blood-derived exosomes from healthy females, mastopathy patients, and breast cancer patients. Mean fluorescence intensity \pm SD, n = 3 replicates

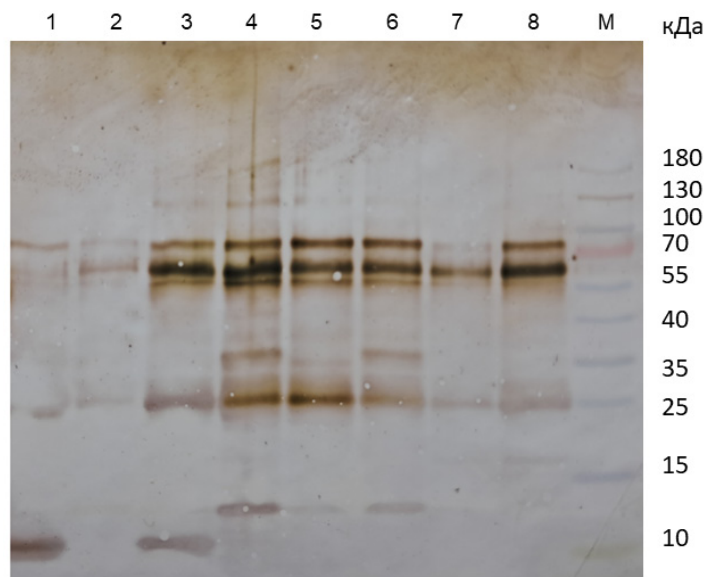


Рис. 3. Анализ белков экзосом, выделенных из плазмы и из цельной крови здоровых женщин, больных с мастопатией и больных РМЖ. Белки разделяли SDS-диск электрофорезом, переносили на нитроцеллюлозную мембрану и окрашивали коллоидным серебром.
М — маркер молекулярного веса белков PageRuler Prestained Protein Ladder (10–180 кДа, Thermo Scientific); 1 — белки экзосом плазмы здоровой женщины; 2 — белки экзосом цельной крови здоровой женщины; 3 — белки экзосом плазмы крови больной с мастопатией; 4 — белки экзосом цельной крови больной с мастопатией; 5, 7 — белки экзосом плазмы крови больной РМЖ; 6, 8 — белки экзосом цельной крови больной РМЖ

Fig. 3. Analysis of exosomal proteins isolated from plasma and blood of healthy females, patients with breast mastopathy and breast cancer patients. The proteins were separated by SDS-PAGE, transferred to a nitrocellulose membrane, and stained with colloidal silver.
M — molecular weight protein marker PageRuler Prestained Protein Ladder (10–180 kDa, Thermo Scientific); 1 — exosomal proteins of healthy female plasma; 2 — exosomal proteins of healthy female whole blood; 3 — exosomal proteins of mastopathy patient plasma; 4 — exosomal proteins of mastopathy patient whole blood; 5, 7 — exosomal proteins of breast cancer patient plasma; 6, 8 — exosomal proteins of breast cancer patient whole blood

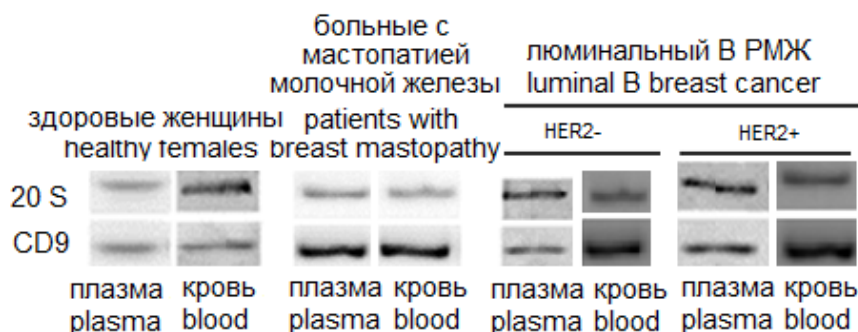


Рис. 4. Уровень 20S-протеасомы в экзосомах плазмы и экзосомах крови здоровых женщин, больных с мастопатией и больных РМЖ. Вестерн-блоттинг с использованием антител против α - и β -субъединиц протеасомы 20S и CD9 в качестве внутреннего контроля
Fig. 4. The level of 20S-proteasome in plasma exosomes and whole blood exosomes of healthy females, patients with breast mastopathy and breast cancer patients. Western blot detection using antibodies against the α and β subunits of the 20S proteasome and CD9 served as loading control

Таблица 3. Уровень 20S-протеасомы в составе экзосом в плазмы и экзосом цельной крови здоровых женщин и женщин с заболеваниями молочной железы*

Источник экзосом		Уровень 20S протеасомы ($\alpha + \beta$), усл.ед. среднее \pm ошибка среднего
Здоровые женщины	плазма	1,00
	кровь	1,15 \pm 0,13
Больные с мастопатией молочной железы	плазма	1,81 \pm 0,34*
	кровь	1,20 \pm 0,33
Больные люминальным РМЖ	плазма	2,13 \pm 0,17*
	кровь	2,28 \pm 0,46**

*Статистически значимые отличия в плазме по сравнению с нормой, $p < 0,05$, ** статистически значимые отличия в крови по сравнению с нормой, $p < 0,05$.

Table 3. Level of 20S Proteasome in Plasma and Whole Blood Exosomes from Healthy Females and Patients with Breast Diseases*

Source of exosomes		20S proteasome level ($\alpha + \beta$), units mean \pm SE
Healthy females	plasma	1.00
	blood	1.15 \pm 0.13
Benign breast tumor patients	plasma	1.81 \pm 0.34*
	blood	1.20 \pm 0.33
Luminal breast cancer patients	plasma	2.13 \pm 0.17*
	blood	2.28 \pm 0.46**

*Statistically significant difference in plasma compared to the norm (healthy females), $p < 0.05$

**Statistically significant difference in whole blood compared to the norm (healthy females), $p < 0.05$

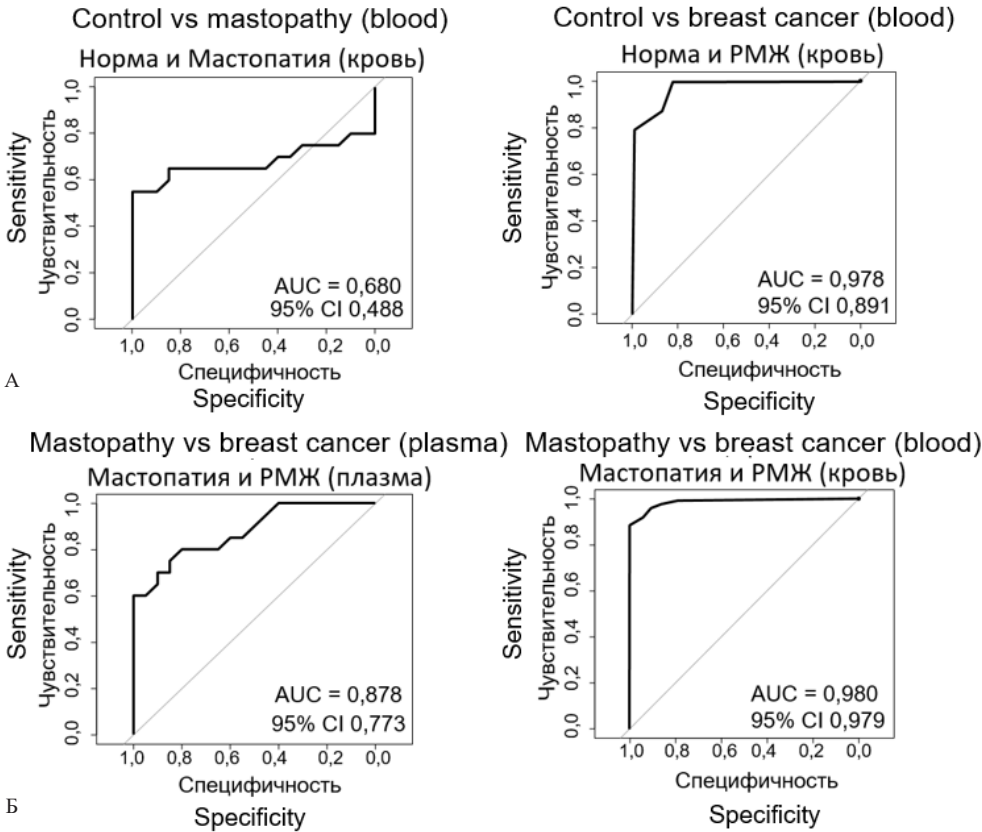


Рис. 5. ROC-анализ уровня 20S-протеасомы экзосом плазмы и экзосом крови больных РМЖ. А — клинически здоровые женщины в качестве контрольной группы; Б — больные мастопатией молочной железы в качестве контрольной группы. Примечание: AUC — область под кривой; рисунок выполнен авторами

Fig. 5. ROC curve analysis of the 20S-proteasome level of plasma exosomes and whole blood exosomes of breast cancer patients. А — healthy females as a control group; Б — patients with breast mastopathy as a control group. Note: AUC — area under the curve; the figure was created by the authors

Уровень 20S-протеасом был статистически значимо повышен как в экзосомах плазмы, так и экзосомах цельной крови больных РМЖ по сравнению со здоровыми женщинами (в 2,1 и 2 раза соответственно, $p < 0,05$) (рис. 4, табл. 3). У больных с мастопатией молочной железы по сравнению со здоровыми женщинами уровень 20S-протеасом статистически значимо повышен в экзосомах плазмы (в 1,8 раза, $p < 0,05$), но при этом не отличается в экзосомах цельной крови (рис. 4, табл. 3).

Для ROC-анализа данных уровня 20S-протеасом в экзосомах плазмы и экзосомах крови больных РМЖ в качестве контрольных групп выступали группа клинически здоровых женщин и группа больных с мастопатией молочной железы. Показано, что оценка уровня 20S-протеасом в экзосомах плазмы позволяет дифференцировать больных с мастопатией молочной железы и больных РМЖ с чувствительностью 87,8 и специфичностью 98,2 %, а при использовании экзосом крови — 96,7 и 97,3 % соответственно (рис. 5). Кроме того, уровень данного маркера в составе экзосом крови позволяет различать здоровых женщин и больных с мастопатией молочной железы с чувствительностью 68,0 и специфичностью 87,2 %, а здоровых женщин и больных РМЖ — 89,1 и 98,8 % соответственно (рис. 5). Таким образом, наибольшей диагностической ценностью обладает уровень 20S-протеасом в экзосомах крови.

Обсуждение

Злокачественные новообразования молочной железы представляют собой наиболее распространенную онкологическую патологию среди женщин. За последнее десятилетие отмечается рост заболеваемости на 13,75 % (с 45,75 на 100 000 населения в 2010 г. до 47,39 в 2020 г.) [2], при этом 24 % первично выявленных больных с РМЖ имеют III–IV стадии заболевания [22]. Данное обстоятельство связано с его бессимптомным развитием, несвоевременным обращением пациенток к специалистам, тенденцией к более раннему старту злокачественного новообразования, а также недостатками инструментальных методов анализа и отсутствием чувствительных биомаркеров. Развитие методов молекулярной биологии и биохимии позволяет надеяться на внедрение в обозримом будущем выявления злокачественных новообразований с помощью жидкостной биопсии [11].

В данной работе проведено сравнительное исследование уровня 20S-протеасом в экзосомах, полученных из плазмы и цельной крови здоровых женщин, пациенток с мастопатией и РМЖ для оценки возможности использования

данного молекулярного груза ВВ для жидкостной биопсии. Установлено, что выделенные ультрафильтрацией и ультрацентрифугированием ВВ из плазмы и из крови имеют сопоставимый размер и представленность характерных белков в короне, что согласуется с литературными данными [11]. Выявленное статистически значимое увеличение концентрации ВВ в плазме и крови больных РМЖ по сравнению с контрольными группами также согласуется с рядом исследований [11].

Анализ спектра молекулярных масс белков экзосом с помощью диск-электрофореза и окраски белков коллоидным серебром на мембране показал универсальность мажорных белков экзосом (аналогичные данные были получены при протеомном исследовании экзосом плазмы крови больных колоректальным раком, плоскоклеточными карциномами головы и шеи и раком легкого [17]). Идентичность большинства мажорных экзосомальных белков как в норме, так и при заболеваниях молочной железы вероятно объясняется общими механизмами генерации данных ВВ, а также наличием в кровотоке экзосом не только из патологически измененных, но и из нормальных клеток [23].

Ранее было показано, что активность 20S-протеасом в опухолевой ткани выше, чем в нетрансформированной ткани [24]. В данной работе впервые было продемонстрировано отсутствие каталитической активности протеасом в составе циркулирующих в крови экзосом, что может свидетельствовать о переносе в составе экзосом ингибитора 20S-протеасомы, защищающего молекулярный груз ВВ от протеолиза. Поскольку ранее было показано, что ингибиторы протеасом обладают иммуносупрессивным действием [25, 26], можно также предположить, что именно этот компонент экзосом обуславливает иммуносупрессивное действие опухолевых экзосом.

Несмотря на небольшую выборку в данном пилотном исследовании (в сумме — 60 человек), полученные сведения о статистически значимо повышенном уровне 20S-протеасом как в экзосомах плазмы, так и экзосомах цельной крови больных РМЖ по сравнению со контрольной группой, согласуются с нашим предыдущим исследованием, в котором было показано, что 20S-протеасомы в составе экзосом не обладают каталитической активностью, а их уровень в плазме крови больных с колоректальным раком выше, чем у пациентов с колоректальным полипом [27].

Известно, что для регуляции реакций в клетке убиквитин-протеасомная система обеспечивает протеолиз большей части внутриклеточных белков, а также быстрое удаление поверхностных рецепторов клетки, в том числе эстрогеновых,

например в ответ на гормональную стимуляцию [19]. После переноса в клетки-реципиенты с помощью экзосом-неактивных протеасом в комплексе с ингибитором диссоциация такого комплекса может приводить к изменению клеточного метаболизма с усилением черт злокачественности.

Заключение

Таким образом, полученные данные демонстрируют возможность дискриминации здоровых женщин, больных с незлокачественными и злокачественными заболеваниями молочной железы по уровню 20S-протеасом в составе экзосом плазмы и экзосом цельной крови. Выявленное увеличение уровня 20S-протеасом в составе экзосом при РМЖ свидетельствует о недооцененной роли экзосом цельной крови в развитии злокачественных новообразований.

Конфликт интересов

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Conflict of interest

The authors declare no conflict of interest.

Финансирование

Исследование выполнено в рамках темы НИР НИИ онкологии Томского НИМЦ FGWM-2022-0019.

Funding

This study was supported by research grant FGWM-2022-0019 from the Cancer Research Institute at Tomsk National Research Medical Center.

Соблюдение прав пациентов и правил биоэтики

Все процедуры с вовлечением больных были проведены в соответствии с Хельсинкской декларацией по правам человека в редакции 2013 г. Проведение данной работы одобрено этическим комитетом НИМЦ им. ак. Е.Н. Мешалкина, протокол № 2 от 26.02.2025. Все больные подписывали информированное согласие на участие в исследовании.

Compliance with patient rights and principles of bioethics

All study procedures involving human participants were conducted in accordance with the ethical principles of the Declaration of Helsinki (2013). The study protocol was approved by the Ethics Committee of the E.N. Meshalkin National Medical Research Center (Protocol No. 2, February 26, 2025). Written informed consent was obtained from all individual participants.

Участие авторов

Авторы декларируют соответствие своего авторства международным критериям ICMJE.

Тамкович С.Н. — идея публикации, выделение экзосом, оценка спектра белков экзосом с помощью электрофореза, оценка каталитической активности 20S-протеасомы, написание текста статьи, анализ и интерпретация данных; Юнусова Н.В. — анализ поверхностных белков проточной цитометрией, оценка уровня 20S-протеасомы, написание текста статьи, анализ и интерпретация данных; Сваровский Д.А. — анализ чувствительности и специфичности анализа, построение ROC-кривых; Штам Т.А. — анализ размера и концентрации везикул;

Кондакова И.В. — обзор публикаций по теме статьи, техническое редактирование;

Чернышова А.Л. — разработка дизайна исследования, научное редактирование.

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

Authors' contributions

All authors meet the International Committee of Medical Journal Editors (ICMJE) criteria for authorship.

Tamkovich S.N.: Study conception, exosome isolation, electrophoretic protein analysis, 20S proteasome activity assessment, manuscript drafting, data analysis and interpretation.

Yunusova N.V.: Flow cytometry analysis, 20S proteasome quantification, manuscript drafting, data analysis and interpretation.

Svarovsky D.A.: Diagnostic accuracy analysis, ROC curve construction.

Shtam T.A.: Vesicle size and concentration analysis.

Kondakova I.V.: Literature review, technical editing.

Chernyshova A.L.: Study design, scientific editing.

All authors approved the final version of the article before publication, expressed their consent to be responsible for all aspects of the work, implying the proper study and resolution of issues related to the accuracy or integrity of any part of the work.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

1. Bray F., Laversanne M., Sung H., et al. Global cancer statistics 2022: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA Cancer J Clin.* 2024; 74(3): 229-263. -DOI: <https://doi.org/10.3322/caac.21834>.-URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/38572751>.
2. Под ред. Каприна А.Д., Старинского В.В., Шахзадовой А.О. Злокачественные новообразования в России в 2020 г. (заболеваемость и смертность). М.: МНИОИ им. П.А. Герцена — филиал ФГБУ «НМИЦ радиологии» Минздрава России, 2021; 252 (Ил.).-ISBN: 978-5-85502-268-1.-URL: https://oncology.ru/service/statistics/malignant_tumors/2021.pdf. [Ed. by Kaprin A.D., Starinsky V.V., Shakhzadova A.O. Malignant neoplasms in Russia in 2020 (incidence and mortality). Moscow: P.A. Herzen Moscow Research Institute of Oncology – the branch of the National Medical Research Radiological Centre of the Ministry of Health of the Russian Federation. 2021; 252 (ill.).-ISBN: 978-5-85502-268-1.-URL: https://oncology.ru/service/statistics/malignant_tumors/2021.pdf (in Rus)].
3. Игнатьева В.И., Грецова О.П., Стенина М.Б., et al. Социально-экономическое бремя рака молочной железы в РФ. *Медицинские технологии.* 2016; 4: 32-49.-EDN: XUXYQX.-URL: <https://elibrary.ru/item.asp?id=28283208>. [Ignatieva V.I., Gretsova O.P., Stenina M.B., et al. The socioeconomic burden of breast cancer in the Russian Federation. *Medical Technologies.* 2016; 4: 32-49.-EDN: XUXYQX.-URL: <https://elibrary.ru/item.asp?id=28283208> (in Rus)].
4. Winters S., Martin C., Murphy D., Shokar N.K. Breast cancer epidemiology, prevention, and screening. *Prog Mol Biol Transl Sci.* 2017; 151: 1-32.-DOI: <https://doi.org/10.1016/bs.pmbts.2017.07.002>. URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29096890>.
5. Alimirzaie S., Bagherzadeh M., Akbari M.R. Liquid biopsy in breast cancer: A comprehensive review. *Clin Genet.* 2019; 95:

- 643-660.-DOI: <https://doi.org/10.1111/cge.13514>.-URL: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/cge.13514>.
6. Cohen J.D., Li L., Wang Y., et al. Detection and localization of surgically resectable cancers with a multi-analyte blood test. *Science*. 2018; 359: 926–930.-DOI: <https://doi.org/10.1126/science.aar3247>. URL: <https://www.science.org/doi/10.1126/science.aar3247>.
 7. Ye Q., Ling S., Zheng S., Xu X. Liquid biopsy in hepatocellular carcinoma: circulating tumor cells and circulating tumor DNA. *Mol Cancer*. 2019; 18: 114.-DOI: <https://doi.org/10.1186/s12943-019-1043-x>.-URL: <https://molecular-cancer.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12943-019-1043-x>.
 8. Tay T.K.Y., Tan P.H. Liquid biopsy in breast cancer: A focused review. *Arch Pathol Lab Med*. 2020;1 45: 678-686.-DOI: <https://doi.org/10.5858/arpa.2019-0559-RA>.-URL: <https://meridian.allenpress.com/aplm/article/145/6/678/427493/Liquid-Biopsy-in-Breast-Cancer-A-Focused-Review>.
 9. Aakel N., Mohammed R., Fathima A., et al. Role of exosome in solid cancer progression and its potential therapeutics in cancer treatment. *Cancer Med*. 2025; 14: e70941.-DOI: <https://doi.org/10.1002/cam4.70941>.-URL: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/cam4.70941>.
 10. Tutanov O., Tamkovich S. The influence of proteins on fate and biological role of circulating DNA. *Int J Mol Sci*. 2022; 23: 13.-DOI: <https://doi.org/10.3390/ijms23137224>.-URL: <https://www.mdpi.com/1422-0067/23/13/7224>.
 11. Shefer A., Yalovaya A., Tamkovich S. Exosomes in breast cancer: involvement in tumor dissemination and prospects for liquid biopsy. *Int J Mol Sci*. 2022; 23: 8845.-DOI: <https://doi.org/10.3390/ijms23168845>.-URL: <https://www.mdpi.com/1422-0067/23/16/8845>.
 12. Whiteside T.L. The potential of tumor-derived exosomes for noninvasive cancer monitoring: an update. *Expert Rev Mol Diagn*. 2018; 18(12): 1029-1040.-DOI: <https://doi.org/10.1080/14737159.2018.1544494>.-URL: <https://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/14737159.2018.1544494>.
 13. Jia Y., Chen Y., Wang Q., et al. Exosome: emerging biomarker in breast cancer. *Oncotarget*. 2017; 8(25): 41717-41733.-DOI: <https://doi.org/10.18632/oncotarget.16684>.-URL: <https://www.oncotarget.com/article/16684/text>.
 14. Юнусова Н.В., Тугутова Е.А., Тамкович С.Н., Кондакова И.В. Роль тетраспанинов и протеаз экзосом в опухолевой прогрессии. *Биомедицинская химия*. 2018; 64(2): 123-133. -DOI: <https://doi.org/10.18097/PBMC20186402123>.-EDN: UPNJPO.-URL: <https://elibrary.ru/item.asp?id=34959591>. [Yunusova N.V., Tugutova E.A., Tamkovich S.N., Kondakova I.V. The role of tetraspanins and exosome proteases in tumor progression. *Biomedical Chemistry*. 2018; 64(2): 123-133. -DOI: <https://doi.org/10.18097/PBMC20186402123>.-EDN: UPNJPO.-URL: <https://elibrary.ru/item.asp?id=34959591> (in Rus)].
 15. Mofers A., Pellegrini P., Linder S., D'Arcy P. Proteasome-associated deubiquitinases and cancer. *Cancer Metastasis Rev*. 2017; 36(4): 635-53.-DOI: <https://doi.org/10.1007/s10555-017-9697-6>.-URL: <https://link.springer.com/article/10.1007/s10555-017-9697-6>.
 16. Кондакова И.В., Юнусова Н.В., Спирина Л.В., et al. Связь активности внутриклеточных протеиназ с содержанием локомоторных белков в тканях первичных опухолей и метастазах при раке яичников. *Биоорганическая химия*. 2014; 40: 735–742.-DOI: <https://doi.org/10.1134/s1068162014060089>.-URL: <https://link.springer.com/article/10.1134/s1068162014060089>. [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. *Russ J Bioorg Chem*. 2014; 40: 735–742.-DOI: <https://doi.org/10.1134/s1068162014060089>.-URL: <https://link.springer.com/article/10.1134/s1068162014060089> (in Rus)].
 17. Тамкович С.Н., Юнусова Н.В., Сомов А.К., et al. Сравнительный субпопуляционный анализ экзосом плазмы крови больных злокачественными новообразованиями. *Биомедицинская химия*. 2018; 64 (1): 110–114. -DOI: <https://doi.org/10.18097/PBMC20186401110>. EDN: VDEYSP. URL: <https://elibrary.ru/item.asp?id=32469710>. [Tamkovich S.N., Yunusova N.V., Somov A.K., et al. Comparative subpopulation analysis of exosomes in blood plasma of patients with malignant neoplasms. *Biomedical Chemistry*. 2018; 64 (1): 110–114. -DOI: <https://doi.org/10.18097/PBMC20186401110>. EDN: VDEYSP. URL: <https://elibrary.ru/item.asp?id=32469710> (in Rus)].
 18. Konoshenko M., Sagaradze G., Orlova E., et al. Total blood exosomes in breast cancer: Potential role in crucial steps of tumorigenesis. *Int J Mol Sci*. 2020; 21(19): 7341.-DOI: <https://doi.org/10.3390/ijms21197341>.-URL: <https://www.mdpi.com/1422-0067/21/19/7341>.
 19. Tecalco-Cruz A.C., Ramírez-Jarquín J.O. Mechanisms that increase stability of estrogen receptor alpha in breast cancer. *Clin Breast Cancer*. 2017; 17: 1–10.-DOI: <https://doi.org/10.1016/j.clbc.2016.07.015>.-URL: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S1526820916302087?via%20ihub>.
 20. Sannino S., Brodsky J.L. Targeting protein quality control pathways in breast cancer. *BMC Biol*. 2017; 15: 109.-DOI: <https://doi.org/10.1186/s12915-017-0449-4>.-URL: <https://bmcbiol.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12915-017-0449-4>.
 21. Галь Э., Медьеша Г., Верецкеи Л. Электрофорез в разделении биологических макромолекул. М.: Мир. 1982; 446.-URL: https://rusneb.ru/catalog/000200_000018_rc_1115053. [Gal E., Medgyesi G., Veretsekai L. Electrophoresis in the separation of biological macromolecules. Moscow: Mir. 1982; 446.-URL: https://rusneb.ru/catalog/000200_000018_rc_1115053 (In Rus)].
 22. Шахзадова А.О., Старинский В.В., Лисичникова И.В. Состояние онкологической помощи населению России в 2022 году. *Сибирский онкологический журнал*. 2023; 22: 5-13. EDN: PESHHL.-DOI: <https://doi.org/10.21294/1814-4861-2023-22-5-5-13>.-URL: <https://elibrary.ru/item.asp?id=54888843>. [Shakhzadova A.O., Starinsky V.V., Lisichnikova I.V. The State of cancer care in Russia in 2022. *Siberian Journal of Oncology*. 2023; 22: 5-13. EDN: PESHHL.-DOI: <https://doi.org/10.21294/1814-4861-2023-22-5-5-13>.-URL: <https://elibrary.ru/item.asp?id=54888843> (In Rus)].
 23. Tutanov O., Orlova E., Proskura K., et al. Proteomic analysis of blood exosomes from healthy females and breast cancer patients reveals an association between different exosomal bioactivity on non-tumorigenic epithelial cell and breast cancer cell migration *in vitro*. *Biomolecules*. 2020; 10(4): 495.-DOI: <https://doi.org/10.3390/biom10040495>.-URL: <https://www.mdpi.com/2218-273X/10/4/495>.
 24. Shashova E.E., Lyupina Y.V., Glushchenko S.A., et al. Proteasome functioning in breast cancer: Connection with clinical-pathological factors. *PLoS ONE*. 2014; 9

- (10): e109933. -DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0109933>.-URL: <https://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0109933>.
25. Berges C., Habersack H., Fuchs D., et al. Proteasome inhibition suppresses essential immune functions of human CD4⁺ T cells. *Immunology*. 2008; 124: 234–246. -DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1365-2567.2007.02761.x>.-URL: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1365-2567.2007.02761.x>.
26. Moran E., Carbone F., Augusti V., et al. Proteasome inhibitors as immunosuppressants: Biological rationale and clinical experience. *Semin Hematol*. 2012; 49: 270–276.-DOI: <https://doi.org/10.1053/j.seminhematol.2012.04.004>.-URL: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0037196312000273?via%20ihub>.
27. 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: 861–869.-DOI: <https://doi.org/10.31557/APJCP.2021.22.3.861>.-URL: https://journal.waocp.org/article_89525.html.
- Поступила в редакцию / Received / 24.09.2025
 Прошла рецензирование / Reviewed / 27.10.2025
 Принята к печати / Accepted for publication /

Сведения об авторах / Author Information / ORCID

Светлана Николаевна Тамкович / Svetlana N. Tamkovich / ORCID ID: <http://orcid.org/0000-0001-7774-943X>; eLibrary SPIN: 6462-3700; Researcher ID (WOS): G-9790-2013; Author ID (Scopus): 7801643574.

Наталья Валерьевна Юнусова / Natalia V. Yunusova / ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0003-4595-4177>; eLibrary SPIN: 3513-1888; Author ID (Scopus): 558006.

Дмитрий Андреевич Сваровский / Dmitry A. Svarovsky / ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0002-8985-009X>; eLibrary SPIN: 4131-8608; Author ID (Scopus): 57417248900.

Татьяна Александровна Штам / Tatiana A. Shtam / ORCID ID: <http://orcid.org/0000-0003-0651-4785>; eLibrary SPIN: 3738-8187; Author ID (Scopus): 95878.

Ирина Викторовна Кондакова / Irina V. Kondakova / ORCID ID: <http://orcid.org/0000-0002-0947-8778>; eLibrary SPIN: 9338-4149; Author ID (Scopus): 349081.

Алена Леонидовна Чернышова / Alyona L. Chernyshova / ORCID: <http://orcid.org/0000-0002-8194-2811>; eLibrary SPIN: 2522-7513; Author ID (Scopus): 557924. Researcher ID (WOS): C-8608-2012.

