

КОНЦЕНТРАЦИЯ И СОСТАВ ЦИРКУЛИРУЮЩИХ АДИПОЦИТАРНЫХ ВЕЗИКУЛ У БОЛЬНЫХ С ПОЛИПАМИ ТОЛСТОЙ КИШКИ И КОЛОРЕКТАЛЬНЫМ РАКОМ

© 2024 г. Н. В. Юнусова¹, Д. А. Сваровский^{1, *}, Е. С. Колегова², О. В. Черемисина², Д. Н. Костромицкий², И. В. Кондакова², Е. А. Сиденко², А. Ю. Добродеев², А. Е. Григорьева³

¹ Сибирский Государственный Медицинский Университет, кафедра биохимии и молекулярной биологии с курсом клинической лабораторной диагностики, Томск, Россия

² НИИ онкологии Томского НИМЦ, Томск, Россия

³ Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, г. Новосибирск, Россия

* e-mail: svarovsky.d.a@gmail.com

Поступила в редакцию 29.03.2024 г.

После доработки 31.05.2024 г.

Принята к публикации 03.06.2024 г.

Внеклеточные везикулы (ВВ) представляют собой гетерогенную популяцию мембранных частиц размером менее 1 мкм, секретируемую различными типами клеток. Большинство циркулирующих в крови человека ВВ являются частицами тромбоцитарного, лейкоцитарного, эритроцитарного и эндотелиального происхождения. Состав циркулирующих адипоцитарных ВВ при различных патологических состояниях практически не изучен. Малые ВВ из плазмы крови больных колоректальным раком (КРР) и полипами толстой кишки с наличием ожирения или метаболического синдрома выделены методом ультрафильтрации с двойным ультрацентрифугированием. Для изучения состава адипоцитарных ВВ использовали иммунопреципитацию в сочетании с Вестерн блоттингом и проточную цитометрию. Фракции везикул (FABP4- и CD11b-иммунопреципитированные ВВ, а также ВВ содержащиеся в супернатанте после удаления CD11b-позитивных ВВ) содержали комплекс адипоцитарных маркеров (FABP4, PPAR-γ и перилипин 1). Преципитированные на CD11b-покрытых частицах ВВ моноцитарно-макрофагального происхождения у больных КРР без ожирения характеризовались сочетанной гиперэкспрессией FABP4 и перилипина 1, в то время как для больных КРР с метаболическим синдромом или ожирением такая гиперэкспрессия была нехарактерна. Фракция истинно адипоцитарных везикул (супернатант после удаления CD11b-позитивных ВВ) характеризовалась наличием у всех больных комплекса адипоцитарных маркеров с преимущественной экспрессией в ней FABP4 как у больных с метаболическим синдромом/метаболически здоровым ожирением, так и больных без метаболических нарушений. Для больных без ожирения для корректной характеристики циркулирующих ВВ из препаратов ВВ необходимо удалять методом иммунопреципитации или аналогичными методиками фракцию CD11b-позитивных моноцитарно-макрофагальных ВВ, а в супернатанте после удаления/сорбции преципитированных ВВ — изучать состав адипоцитарных везикул, используя набор маркеров (FABP4, PPAR-γ, перилипин 1 и др.). Причем у больных с метаболическими нарушениями с учетом незначительной экспрессии FABP4 в составе CD11b-иммунопреципитированных ВВ, по-видимому, предварительная деплеция препаратов везикул не столь необходима.

Ключевые слова: циркулирующие внеклеточные везикулы, адипоцитарные маркеры, ожирение, колоректальный рак, полипы толстой кишки

DOI: 10.31857/S0044452924040078, **EDN:** YQBQSR

ВВЕДЕНИЕ

У большинства больных колоректальным раком (КРР) опухоль развивается на фоне так называемого «метаболически здорового ожирения» или метаболического синдрома (более чем у 70% больных), ключевым патогенетическим моментом которого является гиперинсулинемия. Сходные метаболи-

ческие изменения также характерны для больных с полипами толстой кишки, а в случае развития аденоматозных полипов или ворсинчатых аденом толстой кишки такие гистологические находки однозначно трактуются как предраковые изменения [1, 2]. Внеклеточные везикулы (ВВ) представляют собой гетерогенную популяцию мембранных частиц размером менее 1 мкм, секретируемую раз-

личными типами клеток. Большинство циркулирующих в крови человека ВВ являются частицами тромбоцитарного, лейкоцитарного, эритроцитарного и эндотелиального происхождения. Доказательства наличия в циркуляции ВВ адипоцитарного происхождения в крайне незначительном количестве у практически здоровых людей представлены в работах Catherine и соавт. [3] и Callie и соавт. [4]. Состав циркулирующих адипоцитарных ВВ при различных патологических состояниях практически не изучен, а большинство работ по этой тематике выполнены на моделях *in vitro* [3]. Везикулы различного состава могут секретироваться как адипоцитами, так и стромальными клетками жировой ткани. Предлагаемые кандидаты-маркеры везикул адипоцитарного происхождения (γ -рецепторы, активируемые пролифераторами пероксисом (PPAR γ), белок, связывающий жирные кислоты 4 (FABP4), преадипоцитарный секреторный фактор (PREF1) и перилипин 1 не являются строго специфичными для клеток жировой ткани, синтезируются также некоторыми иммунными клетками, в том числе макрофагами жировой ткани [3–7]. Таким образом, с использованием вышеперечисленных маркеров удается обычно выделить смешанную фракцию адипоцитарных и моноцитарно-макрофагальных ВВ.

Целью исследования было изучение концентрации и состава циркулирующих адипоцитарных везикулах у больных с метаболическими нарушениями и без метаболических нарушений.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Для решения поставленных задач была сформирована группа больных КРР $n = 20$ (13 женщин и 7 мужчин, $T_{2-4}N_{0-2}M_0$, средний возраст 59.6 ± 1.60 лет), имеющих метаболический синдром или метаболически здоровое ожирение по критериям IDF (2007). Измерялись и рассчитывались антропометрические параметры: обхват талии, обхват бедер, индекс массы тела. Уровень глюкозы, общего холестерина, холестерина ЛПВП, холестерина ЛПНП и триглицеридов в плазме крови исследовали на биохимическом анализаторе Torus 1220, Dixon (Россия) после 16-часового голодания. Индекс инсулинорезистентности рассчитывался по формуле: $\text{НОМА-IR} = \text{уровень глюкозы натощак (ммоль/л)} \times \text{уровень инсулина натощак (мкЕд/мл)} / 22.5$. В качестве групп сравнения были сформированы группы больных с аденоматозными полипами или ворсинчатыми аденомами толстой кишки с метаболическим синдромом или метаболически здоровым ожирением (ПТК) ($n = 15$, 8 мужчин и 7 женщин, средний возраст 54.2 ± 2.20 года) и группа больных КРР с нормальной массой тела ($n = 10$, 5 мужчин и 5 женщин, $T_{2-4}N_{0-2}M_0$, средний возраст 60.6 ± 1.91 лет), не имеющих метаболических нарушений. Всем паци-

ентам проводилась магнитнорезонансная томография на МРТ-сканере MAGNETOM ESSENZA 1,5 T (Siemens, Эрланген, Германия) с поверхностно-фазированной катушкой Body Matrix и эндоскопическое исследование с забором материала для гистологического исследования.

Изоляция ВВ. Малые ВВ из плазмы крови больных выделены методом ультрафильтрации с двойным ультрацентрифугированием (ультрацентрифуга OptimaXP, Beckman Coulter). Фракционирование клеток крови (около 18 мл венозной крови, стабилизированной ЭДТА) выполнялось на высокоскоростной центрифуге с угловым ротором при 4°C в течение 20 мин при ускорении 1000g (TGL-24MC, Drawell, Китай). Полученную при первом центрифугировании плазму повторно центрифугировали при 4°C , 20 мин, 13000g. Супернатант разводили PBS и фильтровали через фильтры с диаметром пор 220 нм (Minisart high flow 16553-K, Sartorius, Германия). Фильтрат подвергался ультрацентрифугированию дважды на ультрацентрифуге с бакет-ротором (Optima XPN 80, Beckman Coulter, США), 4°C , 90 мин, 100 000g. Полученные аликвоты малых ВВ хранили при -80°C .

Электронная микроскопия, NTA анализ и проточная цитометрия. Для подтверждения морфологии выделенных частиц проводилась трансмиссионная электронная микроскопия. Изолированные частицы адсорбировались в течение 1 мин на медных сетках, покрытых карбонизированной пленкой. Затем сетки подвергались воздействию в течение 5–10 сек 0.5% уранилацетата. Препараты были изучены на микроскопе Jem1400 (Jeol, Япония). Распределение и концентрация выделенных везикул изучены с помощью метода анализа траекторий наночастиц (nanoparticle tracking analysis, NTA) с использованием прибора NanoSight LM10 (Malvern Instruments, Великобритания). Для оптимизации измерений образцы везикул разводились PBS в пропорциях 1:100, 1:1000 и 1:10000. Анализировались средний гидродинамический диаметр (размер везикул, их распределение) и концентрация везикул. Для подтверждения везикулярной природы выделенных частиц исследовали уровень тетраспанинов CD81, CD63 и гликопротеина CD24 методом проточной цитометрии с использованием методологии сорбции везикул на латексных частицах. Цитометрия выполнена на приборе Cytotflex (Beckman Coulter, США), полученные данные анализировались с помощью программы CytExpert 2.0 Software. Медиана интенсивности флуоресценции (MFI) ВВ была проанализирована по сравнению с изотипическими и отрицательными контролями.

Оценка белка в препаратах ВВ. В работе использовался флюориметрический метод оценки белка с флюорескаминном (<https://assets.thermofisher.com/TFS-Assets/CAD/manuals/Fluorescamine-protocol.pdf>). Для определения белка 10 мкл препаратов ве-

зикул смешивали с 3 мкл лизирующего буфера (0.25 М Tris-HCl, 8% SDS, 0.2 М DTT, pH 6,8) на льду (10 мин), кипятили при 95 градусах в течение 10 мин. После центрифугирования при 12000 g в течение 10 мин весь надосадок смешивали с 3 мкл раствора флюорескамина (3 мг/мл, CAS 38183, BLD Pharm, Shanghai, China) в DMSO. Измерение проводили на ридере Agilent BioTek Cytation 1 Cell Imaging Multimode Reader (Biotek, США), длина волны возбуждения — 365 нм, длина волны эмиссии — 470 нм. Предварительно строили калибровку с использованием водных стандартов трипсина (трипсин кристаллический порошок лиофил., 10 мг фл, Россия).

Иммунопреципитация везикул и Вестерн блоттинг. Для исследования состава циркулирующих адипоцитарных везикул выполнена иммунопреципитация на предварительно отмытых в PBS альдегидных латексных частицах, покрытых антителами к FABP4 и CD11b. Пять микролитров 3×10^5 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, комнатная температура) и ресуспендировали в 25 мкл MES-буфера. Затем к частицам добавляли по 3 мкг моноклональных антител против CD11b (E-AB-F10081A, Elabscience, USA) и FABP-4 (FAB693Hu01, Cloud-Clone Corp., Китай) и инкубировали при комнатной температуре в течение 14 ч при перемешивании. Аликвоты выделенных из крови ВВ (около 35 мкг белка) инкубировали с комплексами антитело-латексных частицы (3 мкл отмытых комплексов) при комнатной температуре в течение 2 ч, шейкер 400 rpm. Далее образцы центрифугировали при 600g, 4°C, 15 мин. Фракции в осадках представляли собой иммунопреципитированные ВВ моноцитарно-макрофагатного происхождения и общую фракцию FABP4-позитивных ВВ плазмы крови. Эти фракции и супернатант ВВ после удаления CD11b-позитивных ВВ были лизированы (0.05 М Tris-HCl, pH 7.4; 0.15 М NaCl, 1% Triton X-100, 1% SDS) в присутствии смеси ингибиторов протеолиза (леупептин, пепстатин, апротинин) в течение полутора часов, при +4°C, далее образцы подвергали обработке ультразвуком на установке Sonopuls mini20 (Банделин, Германия) с ультразвуковым датчиком MS1 в течение 90 сек. во льду. После центрифугирования (13 000 g, 15 мин), экстракты протеинов были нормализованы по белку. Электрофорез проводился в 12.5% SDS-ПААГ, для нанесения использовался стандартный нередуцирующий буфер. Разделенные электрофорезом белки переносили на PVDF мембрану (Immobilon, Millipore, США). Мембрану блокировали 1X раствором iBind (Invitrogen, США). Окрашивание первичными и вторичными антителами выполнено с использованием устройства iBind Western Device (Thermo Scientific, США) в течение 3-3.5 ч [8]. В работе использовали следующие моно- и поликлональные антитела: антитело к CD63 (CSB-MA004950A0, Cusabio, Китай)

разведение 1:3000), антитело к FABP4 (MA5-29255, Invitrogen, США) разведение 1:2000, антитело к PPAR gamma (AF6284, Affinity Biosc., Китай) разведение 1:2000, антитело к перилипину 1 (DF7602, Affinity Biosc., Китай) разведение 1:2000, HRP-конъюгированные антикроличьи и антимышинные антитела (Cloud-Clone Corp., Китай), разведение 1:3000. Далее мембрану инкубировали с системой детектирования Affinity ECL субстрат для Вестерн блоттинга (KF8001, Affinity Biosc., Китай). Визуализацию осуществляли на системе ChemiDoc Touch (Bio-Rad, США). Плотность полос оценивали с помощью компьютерной программы ImageLab. Полученные результаты стандартизировали по уровню CD63 в ВВ и уровню соответствующих протеинов в ВВ больных с полипами толстой кишки с метаболическими нарушениями. В качестве стандарта молекулярной массы использовали MagicMark XP Western Protein Standard (LC5603, Life Technologies, США).

Статистическая обработка. Для всех видов анализа статистически значимыми считались различия при уровне значимости $p < 0,05$. Проверка нормальности распределения исследуемых выборок проводилась с использованием критерия Шапиро—Уилка. В таблице и на рисунках данные представлены как медианы с интерквартильным размахом. Для оценки значимости различий в выборках использовал критерий Краскал—Уоллиса.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Выделенные ВВ при трансмиссионной электронной микроскопии визуализировались как округлые мембранные структуры размером не более 220 нм. Также в препаратах присутствовали немембранные структуры обычно размером не более 100 нм — “не-везикулы”. Выделенные везикулы экспрессировали CD9, CD81, CD63, CD24. Средняя концентрация циркулирующих ВВ у больных ПТК и КРР значимо не отличалась и составила $25.1 \pm 2.33 \times 10^9$ и $24.0 \pm 4.92 \times 10^9$ частиц/мл крови, соответственно. Средний размер везикул у больных ПТК с полипами составил 95.3 ± 11.1 нм, у больных КРР — 96.2 ± 9.70 нм (рис. 1).

Образцы ВВ пяти больных из всех групп были использованы для анализа концентрации, среднего размера везикул и общего белка во фракциях ВВ до иммунопреципитации, в супернатантах после иммунопреципитации на анти-CD11b латексных частицах и после последовательной иммунопреципитации на анти- CD11b и анти-FABP4 латексных частицах (рис. 2). Максимальная концентрация везикул отмечена у больных КРР с метаболическим синдромом. Концентрация везикул у больных с ПТК с метаболическим синдромом практически в 2 раза ниже, а у больных с КРР без метаболических нарушений — в 8 раз ниже по сравнению с больными с КРР с синдромом, $p < 0.05$, $n = 5$ (рис. 2а). Во всех группах

концентрация везикул несколько снижалась при удалении везикул моноцитарно-макрофагального ряда методом иммунопреципитации и далее снижалась крайне незначительно после удаления из супернатанта еще и FABP4-позитивных ВВ. Аналогичная динамика выявлена и для белка ВВ (рис. 2с). После удаления везикул моноцитарно-макрофагального происхождения фракции по размеру становятся более гомогенными по размеру частиц (рис. 2d), а средний размер везикул несколько уменьшался у больных с ПТК с метаболическими нарушениями и у больных КРР без метаболических нарушений. До иммунопреципитации средний размер везикул у больных ПТК с метаболическими нарушениями и у больных КРР без метаболических нарушений составил 95.3 ± 11.0 нм и 106.7 ± 6.04 нм, соответственно, а после иммунопреципитации — 77.7 ± 4.00 нм и 91.7 ± 5.02 нм, соответственно, $p < 0.05$, $n = 5$. В тоже время, у больных КРР с метаболическими нарушениями средний размер везикул до и после иммунопреципитации практически не изменил-

ся, 91.0 ± 2.51 нм и 92.7 ± 3.05 нм, соответственно, $p > 0.05$, $n = 5$ (рис. 2d).

Уровень FABP4, перилипина 1 и PPAR- γ во фракциях циркулирующих ВВ у больных с метаболическими нарушениями и без них представлен на рисунке 3. Видно, что все фракции циркулирующих везикул содержат комплекс адипоцитарных маркеров (FABP4, PPAR γ и перилипин 1). Необходимо отметить, что преципитированные на CD11b-покрытых частицах ВВ моноцитарно-макрофагального происхождения у больных КРР без ожирения характеризовались сочетанной гиперэкспрессией FABP4 и перилипина 1, в то время как для больных КРР с метаболическим синдромом или ожирением такая гиперэкспрессия была нехарактерна (рис.3b). Истинно адипоцитарные везикулы, как мы полагаем, находятся преимущественно в препаратах после удаления из них везикул моноцитарно-макрофагального происхождения. Эта фракция характеризовалась наличием у всех больных комплекса адипоцитарных маркеров с преимущественной экспрессией в ней FABP4 как у больных с мета-

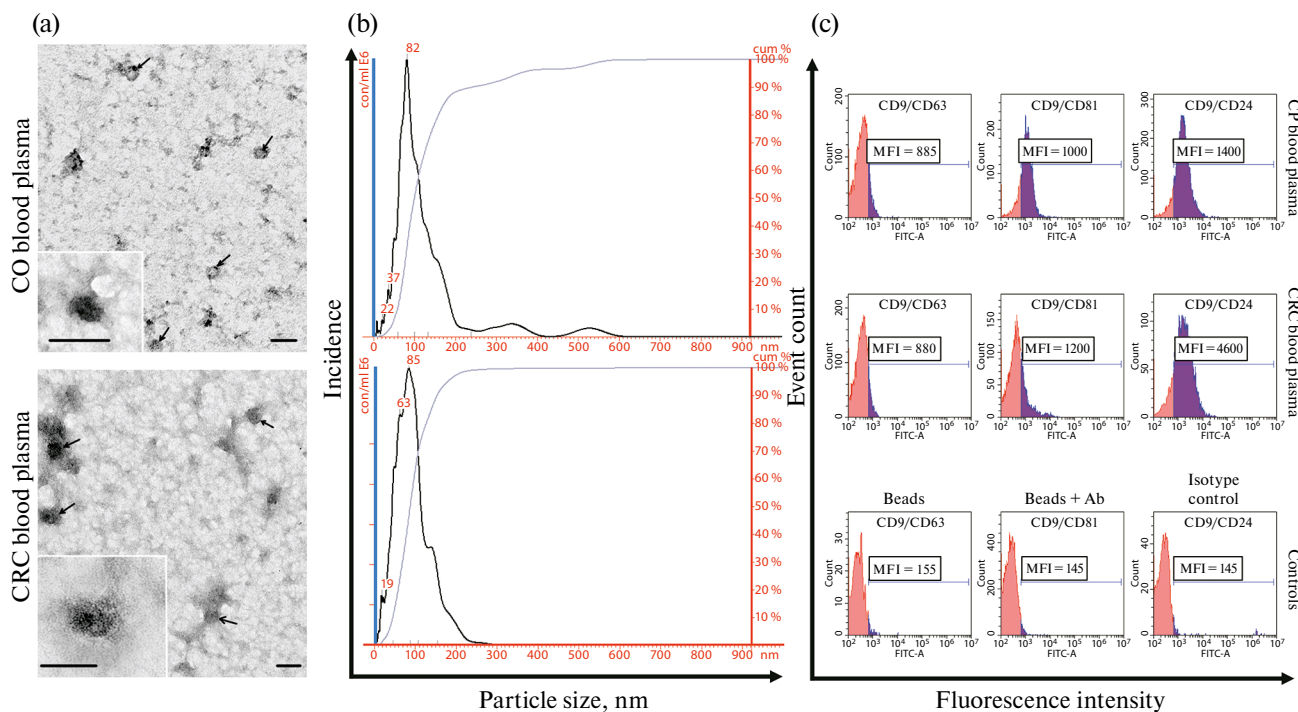


Рис. 1. Идентификация изолированных ВВ. (а) — ТЭМ показала наличие везикул с типичной морфологией и отсутствие везикул размером более 220 нм. На вставках показаны малые ВВ. Масштабные линии соответствуют 100 нм. Электронная микроскопия, отрицательное окрашивание уранилацетатом; (б) — данные анализа NTA для ВВ, изолированных из плазмы крови больных КРР и ПТК (CRC and CP). Ось абсцисс представляет собой размер частиц (нм), ось ординат — концентрацию частиц (частиц/мл), вспомогательная ось — кумулятивная частота (%). (с) — Экспрессия CD63, CD81 и CD24 на CD9-положительных sEV КРР и ПТК плазмы крови. Показаны репрезентативные средние значения интенсивности флуоресценции (MFI), каждое измерение выполнялось трижды. Для изотипического контроля (гистограмма справа) меченные комплексы частицы-антитело к CD9-sEV инкубировали с мышиным FITC IgG1 контрольным изотипом или FITC IgG2a контрольным изотипом. Показан один из репрезентативных изотипических контролей. В качестве отрицательного контроля к латексным частицам, меченым антителами CD9 (гистограмма слева), ничего не добавляли. Так же ставили отрицательный контроль, когда покрытые частицы инкубировали с антителами, конъюгированными с FITC без добавления везикул (гистограмма в центре).

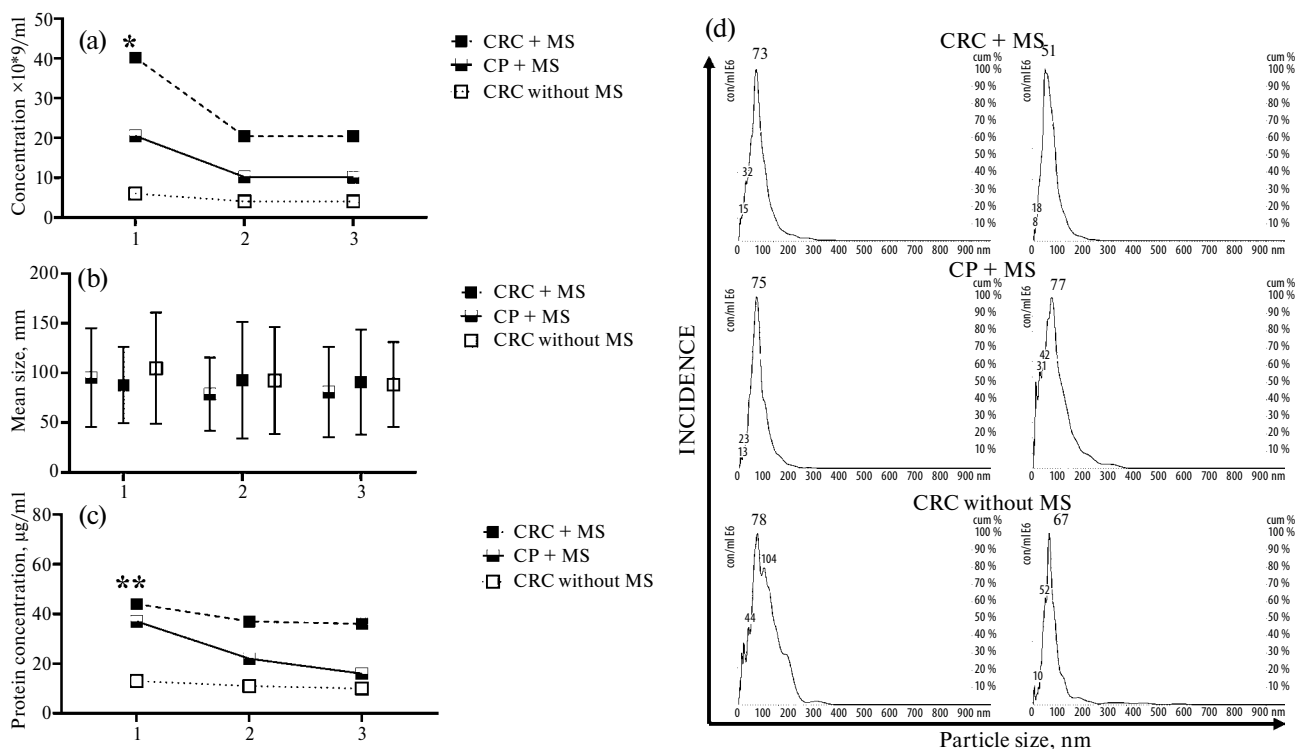


Рис. 2. Концентрация, размер ВВ и уровень общего белка во фракциях и супернатанте при иммунопреципитации. (a) — концентрация ВВ в препаратах: 1 — до иммунопреципитации, 2 — в супернатанте после иммунопреципитации CD11b-позитивных ВВ, 3 — в супернатанте после последовательной иммунопреципитации CD11b-позитивных и FABP4-позитивных ВВ у больных КРП с метаболическими нарушениями (CRC+MS) (темные боксы), у больных ПТК с метаболическими нарушениями (CP+MS) (штрихованные боксы), и больных КРП без метаболических нарушений (CRC without MS) (светлые боксы). * — различия достоверны по сравнению с концентрацией ВВ у больных CP+MS и CRC without MS, $p < 0.05$. (b) — средний размер везикул у больных в супернатантах до и после иммунопреципитации; (c) — концентрация белка в образцах ВВ больных в супернатантах до и после иммунопреципитации, ** — различия достоверны по сравнению с концентрацией белка в везикулах у больных CRC without MS, $p < 0.05$. (d) — данные анализа NTA в образцах циркулирующих ВВ больных до иммунопреципитации (слева) и после иммунопреципитации CD11b-позитивных ВВ (справа). Ось абсцисс представляет собой размер частиц (nm), ось ординат — концентрацию частиц (частиц/мл), вспомогательная ось — кумулятивная частота (%).

болическим синдромом/метаболически здоровым ожирением, так и больных без метаболических нарушений (рис. 3с).

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Проблема как качественной, так и количественной идентификации циркулирующих ВВ адипоцитарного происхождения обусловлена, с одной стороны, известным фактом, что несколько типов клеток жировой ткани, включая адипоциты, макрофаги, мезенхимальные стволовые клетки и эндотелиальные клетки жировой ткани секретируют везикулы, которые, в свою очередь, действуют паракринным или эндокринным образом, опосредуют межклеточные и межорганные взаимосвязи [9]. С другой стороны, ранее было показано, что неассоциированные с жировой тканью моноциты и макрофаги, например, макрофаги ткани легких, селезенки, макрофаги атеросклеротических бляшек, а также, например, высокоспециализированные

клетки крипт тонкого кишечника — клетки Панета также экспрессируют классические адипоцитарные маркеры, везикулы от которых могут находиться в циркуляции [10–12].

Аналогичная предлагаемой методика ранее использовалась для характеристики ВВ адипоцитарного происхождения, находящихся в циркуляции у человека, где были представлены убедительные данные, что сочетание CD9, FABP4, PPAR- γ , адипонектина и перилипина 1 в выделенных из плазмы крови ВВ с наибольшей вероятностью детектирует именно ВВ адипоцитарного происхождения [3]. FABP4 является переносчиком жирных кислот, который преимущественно экспрессирован на адипоцитах и макрофагах. Он связывает длинноцепочечные жирные кислоты и ретиноевую кислоту, а также транспортирует их в ядро. FABP4 является популярным и часто используемым маркером ВВ адипоцитарного происхождения, имеющим определенные преимущества перед другими кандидатными маркерами (адипонектин, PPAR- γ , перилипин 1)

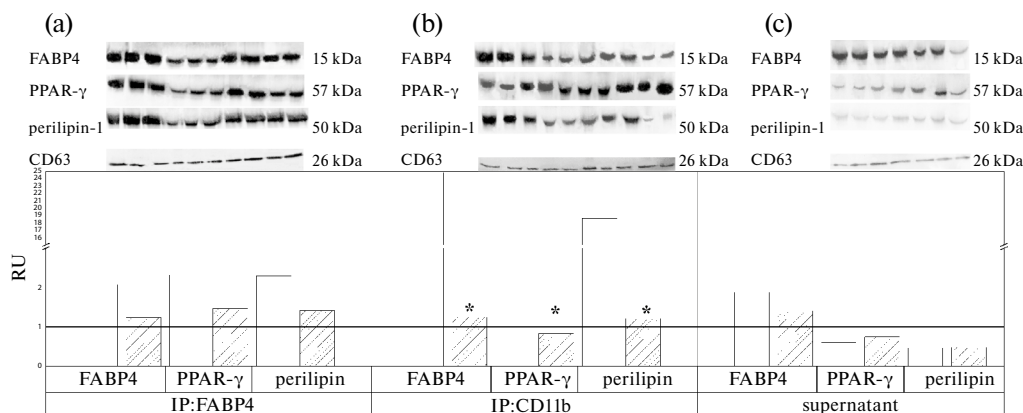


Рис. 3. Уровни FABP4, перилипина-1 и PPAR- γ во фракциях циркулирующих ВВ после иммунопреципитации ВВ на латексных частицах, покрытых антителами к FABP4 (а), к CD11b (б) и в супернатанте после удаления ВВ моноцитарно-макрофагального происхождения (с) у больных КРР без метаболических нарушений (светлые столбцы) и КРР с метаболическими нарушениями (штрихованные столбцы) по сравнению с больными с полипами толстой кишки с метаболическими нарушениями (СР). RU — условные единицы. Дорожки 1, 2, 3 — больные КРР без метаболических нарушений, 4-7 — больные КРР с метаболическими нарушениями, 8-10 — полипы толстой кишки с метаболическими нарушениями (3а, 3б). Дорожки 1, 2 — больные КРР без метаболических нарушений, 3-5 — больные КРР с метаболическими нарушениями, 6-7 — полипы толстой кишки с метаболическими нарушениями (3с). Вестерн блоттинг. * — различия достоверны по сравнению с группой больных КРР без метаболических нарушений, $p < 0.05$, $n = 20$.

такие как, высокая концентрация и поверхностная локализация маркера на ВВ, позволяющая использовать удобный и высокопроизводительный метод проточной цитометрии для детекции таких везикул [4, 13, 14]. Хотя нельзя исключать, что FABP4 как секретируемый белок, присутствующий в плазме крови в растворимом виде, сорбируется также в так называемой “короне” ВВ [4]. Анализ ВВ, выделенных из ex vivo культур эксплантатов жировой ткани человека, выявил как адипонектин-положительные, так и адипонектин-отрицательные подгруппы с помощью дифференциального ультрацентрифугирования в сочетании с иммуноблоттингом. Однако, поскольку адипонектин в везикулах детектировался иммуноблоттингом, остается неизвестным, находится ли адипонектин на поверхности или внутри адипоцитарных ВВ [15, 16]. Уровень циркулирующих ВВ, позитивных по перилипину 1 резко увеличился как у мышей с диет-индуцированным ожирением, так и у пациентов с ожирением. Кроме того, у людей с ожирением уровень перилипин-позитивных циркулирующих ВВ положительно коррелировал с уровнем инсулина в плазме и индексом инсулинорезистентности НОМА-IR. Это также нацеливает в перспективе на возможность использования перилипин-1-позитивных ВВ как биомаркера инсулинорезистентности, однако этот маркер может быть определен только иммуноблоттингом [6]. Используя FABP4 в качестве маркера для идентификации адипоцитарных ВВ в кровотоке, Hupal и соавт. обнаружили, что содержание микроРНК в циркулирующих адипоцитарных ВВ, нацеленных на различные гены в каноническом пути передачи сигналов, опосредованного рецептором инсулина,

значительно изменилось через 1 год после бариатрической хирургии. Эти изменения были связаны с уменьшением инсулинорезистентности, что позволяет предположить, что FABP4-положительные ВВ могут быть полезны для мониторинга метаболического статуса пациентов с ожирением после хирургического вмешательства [14].

Фракция супернатанта ВВ после удаления из нее CD11b-позитивных ВВ в нашем исследовании с большой долей вероятности представляет фракцию, содержащую ВВ преимущественно адипоцитарного происхождения. Судя по полученным данным в этой фракции во всех клинических группах уровень FABP4 был несколько выше по сравнению с другими адипоцитарными маркерами, однако все изученные адипоцитарные маркеры присутствовали в этой фракции ВВ (рис.3с). При анализе фракции CD11b-иммунопреципитированных ВВ выявлено, что также у всех пациентов эта фракция содержит комплекс маркеров FABP4, перилипин 1 и PPAR- γ , однако соотношение белков различно. У больных КРР с нормальной или сниженной массой тела уровень FABP4 в этой фракции в 24 раза выше по сравнению с больными с ПТК с метаболическим синдромом или ожирением и практически в 19 раз выше по сравнению с КРР с метаболическим синдромом или ожирением (рис. 3б). Из этого следует, что у больных без метаболических нарушений, по-видимому, для более корректной характеристики циркулирующих ВВ сначала из препаратов ВВ необходимо удалить методом иммунопреципитации или аналогичными методиками фракцию CD11b-позитивных моноцитарно-макрофагальных ВВ, а в супернатанте после

удаления/сорбции преципитированных ВВ можно изучать состав адипоцитарных везикул, например, используя предлагаемый набор маркеров. Причем у больных с метаболическими нарушениями с учетом незначительной экспрессии FABP4 в составе CD11b-иммунопреципитированных ВВ, по-видимому, предварительная деплеция препаратов везикул не столь необходима.

При выполнении проточной цитометрии с укрупнением везикул на латексных или магнитных частицах для изучения циркулирующих адипоцитарных везикул наиболее перспективно и логично использовать покрытые антителами к FABP4 частицы или при работе по методологии прямой детекции ВВ — после выполнения калибровки с калибровочными частицами — окрашивать ВВ комплексом антител, включающим FABP4 antibody, как в исследовании Gustafson с соавт. [4].

ВКЛАДЫ АВТОРОВ

Идея работы и планирование эксперимента (Н.В.Ю., И.В.К.), сбор данных (О.В.Ч., К.Д.Н., А.Ю.Д.), обработка данных (Д.А.С., Е.С.К.), экспериментальные работы (Е.С.К., Н.В.Ю., Д.А.С., Е.А.С., А.Е.Г.) написание и редактирование манускрипта (Н.В.Ю., И.В.К.).

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Исследование проведено в соответствии с Хельсинкской декларацией и одобрено Этическим комитетом НИИ онкологии Томского НИМЦ (протокол №5 от 10 февраля 2019 г.). Информированное согласие было получено от всех пациентов, участвовавших в исследовании.

ИСТОЧНИКИ ФИНАНСИРОВАНИЯ

Исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда № 23-25-00085, <https://rscf.ru/project/23-25-00085/>

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы декларируют отсутствие явных и потенциальных конфликтов интересов, связанных с публикацией данной статьи.

БЛАГОДАРНОСТИ

Авторы приносят благодарность Татьяне Александровне Штам, старшему научному сотруднику группы клеточных и биомедицинских технологий НИЦ “Курчатовский институт”, ПИЯФ, Санкт-Петербург, канд биол. наук за выполнение блока работы анализ траектории частиц выделенных везикул.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Yunusova NV, Kondakova IV, Kolomiets LA, Afanas'ev SG, Kishkina AY, Spirina LV (2018) The role of metabolic syndrome variant in the malignant tumors progression. *Diabetes Metab Syndr*. 12(5):807–812. <https://doi.org/10.1016/j.dsx.2018.04.028>.
2. Borisov AV, Zakharova OA, Samarinova AA, Yunusova NV, Cheremisina OV, Kistenev YV. (2022) A Criterion of Colorectal Cancer Diagnosis Using Exosome Fluorescence-Lifetime Imaging. *Diagnostics* (Basel). 12(8):1792. <https://doi.org/10.3390/diagnostics12081792>
3. Connolly KD, Wadey RM, Mathew D, Johnson E, Rees DA, James PE (2018) Evidence for Adipocyte-Derived Extracellular Vesicles in the Human Circulation. *Endocrinology*. 159(9):3259–3267. <https://doi.org/10.1210/en.2018-00266>
4. Gustafson CM, Shepherd AJ, Miller VM, Jayachandran M (2015) Age- and sex-specific differences in blood-borne microvesicles from apparently healthy humans. *Biol Sex Differ*. 6:10. <https://doi.org/10.1186/s13293-015-0028-8>
5. Furuhashi M (2019) Fatty Acid-Binding Protein 4 in Cardiovascular and Metabolic Diseases. *J Atheroscler Thromb*. 26(3):216–232. <https://doi.org/10.5551/jat.48710>
6. Eguchi A, Lazic M, Armando AM, Phillips SA, Katebian R, Maraka S, Quehenberger O, Sears DD, Feldstein AE (2016) Circulating adipocyte-derived extracellular vesicles are novel markers of metabolic stress. *J Mol Med (Berl)*. 94(11):1241–1253. <https://doi.org/10.1007/s00109-016-1446-8>
7. DeClercq V, d'Eon B, McLeod RS (2015) Fatty acids increase adiponectin secretion through both classical and exosome pathways. *Biochim Biophys Acta* 1851(9):1123–1133. <https://doi.org/10.1016/j.bbali.2015.04.005>
8. Yunusova N, Kolegova E, Sereda E, Kolomiets L, Villert A, Patysheva M, Reveda I, Grigor'eva A, Tarabanovskaya N, Kondakova I, Tamkovich S (2021) Plasma Exosomes of Patients with Breast and Ovarian Tumors Contain an Inactive 20S Proteasome. *Molecules*. 26(22):6965. <https://doi.org/10.3390/molecules26226965>
9. Huang Z, Xu A (2021) Adipose Extracellular Vesicles in Intercellular and Inter-Organ Crosstalk in Metabolic Health and Diseases. *Front Immunol*. 12:608680. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2021.608680>
10. Persson J, Degerman E, Nilsson J, Lindholm MW (2007) Perilipin and adipophilin expression in lipid loaded macrophages. *Biochem Biophys Res Commun*. 363(4):1020–1026. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2007.09.074>
11. Namgaladze D, Kemmerer M, von Knethen A, Brüne B (2013) AICAR inhibits PPAR γ during monocyte differentiation to attenuate inflammatory responses to atherogenic lipids. *Cardiovasc Res*. 98(3):479–487. <https://doi.org/10.1093/cvr/cvt073>
12. Su X, Yan H, Huang Y, Yun H, Zeng B, Wang E, Liu Y, Zhang Y, Liu F, Che Y, Zhang Z, Yang R (2015) Expression of FABP4, adipsin and adiponectin in Paneth cells is modulated by gut Lactobacillus. *Sci Rep*. 5:18588. <https://doi.org/10.1038/srep18588>
13. Kralisch S, Ebert T, Lossner U, Jessnitzer B, Stumvoll M, Fasshauer M. (2015) Adipocyte fatty acid-binding protein is released from adipocytes by a non-conventional mechanism. *Int J Obes (Lond)*. 38(9):1251–1254. <https://doi.org/10.1038/ijo.2013.232>
14. Hubal MJ, Nadler EP, Ferrante SC, Barberio MD, Suh JH, Wang J, Dohm GL, Pories WJ, Mietus-Snyder M, Freishtat RJ (2017) Circulating adipocyte-derived exosomal Mi-

- croRNAs associated with decreased insulin resistance after gastric bypass. *Obesity* (Silver Spring). 25(1):102–110. <https://doi.org/10.1002/oby.21709>
15. Kranendonk ME, Visseren FL, van Balkom BW, Nolte-’t Hoen EN, van Herwaarden JA, de Jager W, Schipper HS, Brenkman AB, Verhaar MC, Wauben MH, Kalkhoven E (2014) Human adipocyte extracellular vesicles in reciprocal signaling between adipocytes and macrophages. *Obesity* (Silver Spring). 22(5):1296–1308. <https://doi.org/10.1002/oby.20679>
 16. Phoonsawat W, Aoki-Yoshida A, Tsuruta T, Sonoyama K (2014) Adiponectin is partially associated with exosomes in mouse serum. *Biochem Biophys Res Commun* 448:1–266. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2014.04.11447>

CONCENTRATION AND COMPOSITION OF CIRCULATING VESICLES OF ADIPOCYTIC ORIGIN IN PATIENTS WITH COLON POLYPS AND COLORECTAL CANCER

N. V. Yunusova^a, D. A. Svarovsky^{a, #}, E. S. Kolegova^b, O. V. Cheremisina^b, D. N. Kostromitsky^b,
I. V. Kondakova^b, E. A. Sidenko^b, A. Yu. Dobrodeev^b and A. E. Grigor’eva^c

^a *Siberian State Medical University, Department of Biochemistry and Molecular Biology
with a course of clinical laboratory diagnostics, Tomsk, Russia*

^b *Cancer Research Institute, Tomsk National Research Medical Center, Tomsk, Russia*

^c *Institute of Chemical Biology and Fundamental Medicine of Russian Academy of Science, Novosibirsk, Russia*

[#] *e-mail: svarovsky.d.a@gmail.com*

Extracellular vesicles (EVs) are a heterogeneous population of membrane particles less than 1 µm in size, secreted by various cell types. Most EVs circulating in human blood are particles of platelet, leukocyte, erythrocyte and endothelial origin. The composition of circulating adipocyte EVs in various pathological conditions has been virtually unknown. Small EVs from the blood plasma of patients with colorectal cancer (CRC) and colon polyps with obesity or metabolic syndrome were isolated by ultrafiltration with double ultracentrifugation. To study the composition of adipocyte EVs, immunoprecipitation in combination with Western blotting and flow cytometry were used. Vesicle fractions (FABP4- and CD11b-immunoprecipitated EVs, as well as EVs contained in the supernatant after removal of CD11b-positive EVs) contained a complex of adipocyte markers (FABP4, PPAR-γ and perilipin 1). EVs of monocyte-macrophage origin precipitated on CD11b-coated particles in CRC patients without obesity were characterized by combined overexpression of FABP4 and perilipin 1, while such overexpression was not typical for CRC patients with metabolic syndrome or obesity. The fraction of truly adipocyte vesicles (supernatant after removal of CD11b-positive EVs) was characterized by the presence in all patients of a complex of adipocyte markers with predominant expression of FABP4 in both patients with metabolic syndrome/metabolically healthy obesity and patients without metabolic disorders. To correctly characterize circulating EVs of patients without obesity, it is first necessary to remove the fraction of CD11b-positive monocyte-macrophage EVs from EV preparations by immunoprecipitation or similar methods, and in the supernatant after removal/sorption of precipitated EVs, the composition of adipocyte vesicles can be studied using a set of markers (FABP4, PPAR-γ, perilipin 1, etc.). Moreover, in patients with metabolic disorders, taking into account the insignificant expression of FABP4 in CD11b-immunoprecipitated EVs, preliminary depletion of vesicle preparations is apparently not so necessary.

Keywords: circulating extracellular vesicles, adipocyte markers, obesity, colorectal cancer, colon polyps