ОНТОГЕНЕЗ, 2023, том 54, № 3, с. 205–213

ОРИГИНАЛЬНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

УДК 616.22-006:577.112.7:577.218

РЕЗКОЕ УВЕЛИЧЕНИЕ ЭКСПРЕССИИ ГЕНОВ СУБЪЕДИНИЦ И АКТИВНОСТИ ПРОТЕАСОМ В ОНТОГЕНЕЗЕ ГОРТАНИ СВЯЗАНО С РАЗВИТИЕМ ПЛОСКОКЛЕТОЧНОГО РАКА

© 2023 г. И. В. Кондакова[a, *], Е. А. Сиденко[a, c], Т. М. Астахова[b], Г. В. Какурина[a, c], Е. Е. Середа[a, c], О. В. Черемисина[a], Е. Л. Чойнзонов[a, c], Н. П. Шарова[b]

[a] *Научно-исследовательский институт онкологии, Томский национальный исследовательский медицинский центр РАН, Томск 634050 Россия*

[b] *ФГБУН Институт биологии развития им. Н.К. Кольцова РАН, Москва 119334 Россия*

[c] *ФГБОУ ВО Сибирский государственный медицинский университет Минздрава России, Томск 634050 Россия*

**e-mail: kondakova@oncology.tomsk.ru*

Поступила в редакцию 03.11.2022 г.
После доработки 02.05.2023 г.
Принята к публикации 08.05.2023 г.

Протеасомы, важнейшие участники катаболизма белков, поддерживают протеостаз и обеспечивают регуляцию клеточных процессов в онтогенезе. Отклонения в функционировании протеасом связаны с развитием различных патологий, в том числе ряда онкологических заболеваний. В настоящей работе изучены изменения экспрессии генов субъединиц и активности протеасом в ткани рака гортани и эпителии больных хроническими гиперпластическими заболеваниями гортани, которые рассматриваются как облигатный предрак. Также исследована активность циркулирующих протеасом в тех же группах больных. Уровень экспрессии генов оценивали при помощи количественной обратно-транскриптазной ПЦР в режиме реального времени. Модифицирован метод оценки химотрипсинподобной (ХТП) и каспазаподобной (КП) активностей протеасом для анализа малых объемов биопсийных образцов. Показано увеличение уровня экспрессии генов протеасом (*PSMB6*, *PSMB7*, *PSMB5* и *PSMB4*) в тканях плоскоклеточного рака гортани по сравнению с предопухолевыми образцами. Также выявлено увеличение ХТП и КП активностей внутриклеточных протеасом в злокачественном эпителии гортани по сравнению с условно-нормальной тканью и с эпителием больных хроническими гиперпластическими заболеваниями гортани. В циркулирующих протеасомах наблюдалось повышение ХТП активности. Проведение ROC-анализа (Receiver Operating Characteristic) выявило связь экспрессии мРНК *PSMB5* и ХТП активности тканевых протеасом с развитием рака гортани у больных хроническими гиперпластическими заболеваниями гортани. В перспективе возможно использование этих показателей для разработки способа прогноза перехода предрака гортани в рак.

Ключевые слова: экспрессия генов субъединиц протеасом, химотрипсинподобная активность протеасом, каспазаподобная активность протеасом, рак гортани, хронические гиперпластические заболевания гортани

DOI: 10.31857/S0475145023030047, **EDN:** ZRFHYM

ВВЕДЕНИЕ

Нормальный онтогенез характеризуется сбалансированной активностью внутриклеточных и внеклеточных протеасом в тканях для поддержания динамического равновесия белкового состава (Зайкова и др., 2013; Дьяконов, Цимоха, 2019). Протеасомы являются важнейшими участниками катаболизма белков и не только обеспечивают нормальный белковый обмен, но и образуют регуляторные белки и пептиды. Неудивительно, что наиболее значительные изменения в протеасомном пуле происходят в перинатальный период и первый месяц постнатального развития, что связано с формированием органов и развитием адаптивных процессов (Karpova et al., 2013; Karpov et al., 2022).

Протеасомы представлены различными формами, отличающимися структурой и механизмами распознавания и утилизации белков. Присоединение 19S регуляторных частиц с одной или с двух сторон к 20S коровой субчастице приводит к образованию 26S протеасомы, осуществляющей, главным образом, АТФ- и убиквитин-зависимый протеолиз большинства клеточных белков (Budenholzer et al., 2017). 20S протеасома состоит из двух внешних колец, также называемых α-кольцами, которые образованы семью различными α-субъединица-

ми и служат “якорными станциями” для регуляторных частиц 19S. Каждое из двух внутренних β-колец образовано семью различными β-субъединицами. Три из этих β-субъединиц (β1, β2 и β5, кодируемые генами *PSMB6*, *PSMB7* и *PSMB5*, соответственно) проявляют специфическую субстратную каталитическую активность: каспазаподобную (КП), трипсинподобную и химотрипсинподобную (ХТП) соответственно (Sahu, Glickman, 2021). Кроме субъединиц, обеспечивающих функциональную активность протеасом, в поддержании их структуры принимает участие субъединица β7, кодируемая геном *PSMB4*. Установлено, что β7 регулирует сборку протеасомы, и изменение в работе *PSMB4* может нарушить каталитическую активность всех трех протеолитических субъединиц (Lee et al., 2014).

Отклонения от нормального онтогенеза возникают при развитии различных патологических состояний и характеризуются дисбалансом в структуре и функции протеасом. Так, развитие онкологической патологии приводит к увеличению активности протеасом в опухолевой ткани по сравнению с соответствующей нормальной тканью, что обусловлено высоким уровнем метаболизма и интенсивностью таких процессов, как пролиферативная активность, инвазивный рост, метастазирование. Протеасомы принимают участие в реализации и контроле таких важнейших процессов как транскрипция, апоптоз, сигнальная трансдукция, которые играют важную роль злокачественной трансформации и дальнейшей опухолевой прогрессии (Kondakova et al., 2020; Abbas, Larisch, 2021; Jiang et al., 2021). Увеличение ХТП активности протеасом характерно для онкологических заболеваний различной локализации: рака щитовидной железы, эндометрия, яичников, молочной железы, прямой кишки (Sharova et al., 2011; Спирина и др., 2012; Kondakova et al., 2012; Erokhov et al., 2021). Повышенная экспрессия *PSMB4* характерна для многих типов рака, таких как рак молочной железы, гепатоцеллюлярная карцинома, рак яичников и рак предстательной железы (Lee et al., 2014; Wang et al., 2018). Недавние исследования показали, что *PSMB4* активируется во многих опухолях и участвует в процессе развития рака, что делает его потенциальным онкогеном и геном-драйвером рака (Lee et al., 2014). Показано, что развитие злокачественных опухолей приводит к появлению циркулирующих протеасом в сыворотке крови вследствие секреции, распада опухолевых клеток или в составе микровезикул (Wada et al., 1993; Шашова и др., 2015; Choi et al., 2021).

Одним из вариантов отклонения от нормального онтогенеза является развитие рака гортани из предопухолевых заболеваний. Плоскоклеточный рак гортани (ПРГ) является одной из наиболее распространенных патологий среди органов головы и шеи, преимущественно обнаруживается у мужского населения. В 2020 г. по данным мировой статистики число впервые выявленных случаев новообразований гортани составило более 180 тысяч человек, из которых летальных исходов около 100 тысяч (Siegel et al., 2020). За последнее десятилетие в лечении рака гортани были достигнуты большие успехи, однако, несмотря на относительную доступность и простоту обследования гортани в условиях современного развития эндоскопической техники, диагностические ошибки на догоспитальном этапе продолжают составлять большой процент. Так, рак *in situ* выявляется только в 2.3–6% случаев, I стадия процесса – в 23.9%, а III–IV стадии заболевания составляют 55–60% от первично выявленных опухолей гортани (Ciolofan et al., 2017; Obid et al., 2019; Nocini et al., 2020). Развитие рака гортани происходит на основе фоновых диффузных изменений ткани гортани в виде дистрофий, атрофий, хронического воспаления, которые приводят к структурно-функциональной дезорганизации слизистой оболочки гортани. Эти процессы создают фон для последующих очаговых гиперпластических и диспластических изменений, которые совершенно обоснованно можно трактовать как предопухолевые (Нажмудинов и др., 2018).

Дисплазия гортани может прогрессировать до инвазивной карциномы в зависимости от многих клинических, патологических и молекулярных факторов, поэтому выявление молекулярных механизмов развития рака гортани остается актуальной проблемой биологии и медицины (Luers et al., 2014). Решение данной проблемы позволит не только понять закономерности изменения клеточных процессов на молекулярном уровне при онкогенезе, но и применить полученные знания для диагностики и выявления пациентов с высоким онкологическим риском.

В связи с этим целью настоящей работы было изучение изменения экспрессии генов, кодирующих субъединицы протеасом (*PSMB4*, *PSMB5*, *PSMB6*, *PSMB7*) и активности внутриклеточных протеасом в развитии рака гортани с учетом промежуточной стадии – предопухолевых заболеваний гортани. В исследование вошли также циркулирующие протеасомы сыворотки крови.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В работе представлены результаты исследования 29 пациентов с морфологически верифицированным ПРГ ($T_{1-3}N_0M_0$) в возрасте от 40 до 71 года (средний возраст 59.6 ± 1.4 года), 11 пациентов с хроническими гиперпластическими заболеваниями гортани (хронический гиперпластический ларингит, папиллома), средний возраст которых составил 48.1 ± 3.2 года, а также 9 пациентов с хроническими гиперпластическими заболеваниями

Таблица 1. Последовательность праймеров исследованных генов

Ген	Последовательность
PSMB4 NM_002796.3	F 5'-CTGCTACCGTGACTAAGATGGA-3' R 5'-TGATTGGACCTCTGTAAAGTGC-3'
***PSMB5*(*isf.3*)** NM_001144932.3	F 5'-CATCTACCAAGCCACCTACAG-3' R 5'-GATGGAGGATGGGTCACTGT-3'
***PSMB6*(*isf.2*)** NM_001270481.2	F 5'-GGTATGATGGTAAGGCAGTCC-3' R 5'-GAAGAAAGCATTGGCAGTGA-3'
PSMB7 NM_002799.4	F 5'-TTGAGGTGCTGGAAGAAACA-3' R 5'-AATGCTCACCACCTTCCAG-3'
GAPDH NM_001256799.2	F 5'-GGAAGTCAGGTGGAGCGA-3' R 5'-GCAACAATATCCACTTTACCAGA-3'

гортани (ХГЗГ), ассоциированными с диспластическими изменениями – D (I–III) в возрасте от 36 до 70 лет (средний возраст 57 ± 4.1 года), проходивших обследование в клинике НИИ онкологии Томского НИМЦ. Набор материала осуществлялся при выполнении стандартной видеоларингоскопии, проводилось морфологическое исследование всех образцов. Во всех случаях опухоли имели гистологическое строение плоскоклеточной карциномы разной степени дифференцировки. Все пациенты до настоящего исследования не получали никакого специального лечения. Работа проведена в соответствии с Хельсинкской декларацией Всемирной медицинской ассоциации "Этические принципы проведения научных медицинских исследований с участием человека" с поправками 2000 г. и "Правилами клинической практики в Российской Федерации", утвержденными Приказом Минздрава РФ № 266, от 19.06.2003. Всеми пациентами было дано информированное согласие на проведение исследования.

Материалом для исследования служили образцы опухолевой ткани, эпителий гортани с гиперплазией и дисплазией и гистологически неизмененная ткань, взятая на расстоянии не менее 1 см от границы опухоли, а также сыворотка крови. Образцы тканей замораживали и хранили при –80°C.

Определение уровня экспрессии мРНК протеасом

Выделение РНК проводили с помощью лизирующего буфера "Лира" (Биолабмикс, Россия). Концентрацию и чистоту выделенной РНК оценивали на спектрофотометре NanoDrop 2000C (Thermo Scientific, USA). Концентрация РНК составила от 20 до 400 нг/мкл, A260/A280 = 1.95–2.50; A260/A230 = 1.90–2.30. Целостность РНК оценивалась при помощи капиллярного электрофореза на приборе TapeStation (Agilent Technologies, USA) по показателю RIN (RNA Integrity Number), который составил 5.6–7.8. Уровень экспрессии генов оценивали при помощи количественной обратно-транскриптазной ПЦР в режиме реального времени (RT-qPCR) на амплификаторе iCycler (Bio-Rad, USA). Для получения кДНК на матрице РНК проводили реакцию обратной транскрипции с помощью набора реактивов ОТ M-MuLV–RH (Биолабмикс, Россия) с олиго(dT)16 праймерами. Праймеры были подобраны с использованием программы Vector NTI Advance 11.5 и базы данных NCBI (табл. 1). В качестве гена-рефери использовали ген "домашнего хозяйства" фермента GAPDH (Glyceraldehydes-3-Phosphate Dehydrogenase). Количественный анализ экспрессии проведен по методу 2-ΔΔCT и результат выражали в условных единицах (Livak, Schmittgen, 2001). Для анализа проводили нормализацию значения CT исследуемого гена со значениями референсного (ref) гена, как для изучаемой пробы, так и для калибровочной кривой. Нормализацию ΔCT исследуемого образца проводили по отношению к ΔCT калибратора, в качестве которого использовалась РНК, выделенная из неизмененной ткани.

Определение активности внутриклеточных протеасом

Материалом для исследования явился эпителий гортани, полученный путем биопсии в малых количествах. Для определения активности протеасом в малых количествах (5–10 мг биопсийного материала вместо стандартных 30–50 мг образцов опухолевой ткани) был модифицирован стандартный метод определения активности протеасом. Для получения осветленных гомогенатов замороженные образцы ткани весом 5–10 мг гомогенизировали в 20 мМ Tris-HCl буфере (pH 7.5), содержащем 100 мМ NaCl, 1 мМ ЭДТА, 1 мМ дитиотрейтола, 5 мМ $MgCl_2$, 10% глицерол в соотношении 1 : 10 (вместо стандартного соотношения 1 : 6), затем добавляли 2 мМ АТФ. Гомогенат центрифугировали 60 мин при 10000 *g* и 4°C. ХТП активность про-

Таблица 2. Уровень экспрессии В-субъединиц протеасом, ХТП и КП активности протеасом в разных возрастных группах пациентов

Возраст	Активность		Уровень экспрессии, усл. ед.			
	ХТП	КП	***PSMB4***	***PSMB5***	***PSMB6***	***PSMB7***
40–59 лет	1.5 (1.0–2.0)	2.0 (1.0–4.0)	1.5 (1.0–2.0)	2.0 (1.5–4.0)	2.0 (2.0–4.0)	2.0 (1.0–2.0)
60–71 лет	2.0 (1.5–4.0)	3.0 (2.0–4.0)	2.0 (1.0–4.0)	3.0 (2.0–4.0)	4.0 (2.0–6.0)	1.0 (1.0–4.0)

теасом определяли в осветленных гомогенатах по гидролизу флуорогенного олигопептида Suc-LLVY-AMC (Sigma, USA), специфичного для ХТП центров протеасом. КП активность – по гидролизу Z-Leu-Leu-Glu-AMC (Sigma, USA), специфичного для КП центров протеасом. Для оценки активности примесных протеаз применяли специфический ингибитор протеасом – MG132 (Sigma, USA). Реакционная смесь содержала 20 мМ Tris-HCl (pH 7.5), 1 мМ дитиотрейтола, 30 мкМ Suc-LLVY-AMC/Z-Leu-Leu-Glu-AMC, 5 мМ $MgCl_2$ и 1 мМ АТФ. Реакцию начинали внесением 5 мкл осветленного гомогената вместо стандартных 1–4 мкл до 200 мкл общего объема реакционной смеси и инкубировали при 37°C в течение 20 мин. Образовавшийся продукт регистрировали на микропланшетном ридере “Cytation 1” (BioTek, USA) при длине волны возбуждения 380 нм и эмиссии 440 нм. В указанных условиях проведения реакции значения активности протеасом находились на прямолинейном участке графика зависимости активности от количества осветленного гомогената. За единицу активности протеасом принимали количество фермента, при котором гидролизуется 1 нмоль флуорогенного олигопептида в течение 1 мин. Удельную активность протеасом выражали в единицах активности на 1 мг белка. Содержание белка определяли по методу Lowry.

Определение активности циркулирующих протеасом

Пробоподготовка включала разморозку сыворотки при комнатной температуре и ее активацию добавлением 10% SDS (Sodium Dodecyl Sulfate) до конечной концентрации 1% в течение 15 мин (Ma, 2008). Для определения ХТП и КП активностей циркулирующих протеасом в сыворотке крови, использовали флуорогенные субстраты Suc-LLVY-AMC (Sigma, USA) и Z-Leu-Leu-Glu-AMC (Sigma, USA), соответственно. Для оценки активности примесных протеаз применяли специфический ингибитор протеасом – MG132 (Sigma, USA). Реакционная смесь содержала 20 мМ Tris-HCl (pH 7.5), 1 мМ дитиотрейтола, 30 мкМ Suc-LLVY-AMC/Z-Leu-Leu-Glu-AMC, 5 мМ $MgCl_2$ и 1 мМ АТФ. Реакцию начинали внесением 100 мкл активированной сыворотки и проводили при 37°C в течение 20 мин. Образовавшийся продукт регистрировали на микропланшетном ридере “Cytation 1” (BioTek, USA) при длине волны возбуждения 380 нм и эмиссии 440 нм. Удельную активность циркулирующих протеасом выражали в единицах активности на 1 мл сыворотки.

Статистическая обработка результатов была проведена с применением пакета статистических программ STATISTICA 10. Результаты представлены в виде Me (Q1–Q3), где Me – медиана, Q1 и Q3 – нижний и верхний квартили, N – количество человек. Для оценки нормальности распределения выборки использовали критерий Шапиро–Уилка. Для оценки значимости различий между независимыми выборками при распределении, отличном от нормального, использовали критерий Манна–Уитни. Различия считались значимыми при $p < 0.05$. Чувствительность, специфичность и прогностическую значимость кандидатных маркеров определяли методом ROC-анализа по правилу расчета площадей под кривыми AUC (Area Under Curve).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Пациенты, материал которых вошел в исследование, относились к разным возрастным группам, соответствующим широкому отрезку онтогенеза: от репродуктивного возраста до пожилых. Исследование экспрессии мРНК субъединиц протеасом и активности протеасом показало, что возрастная разница не влияла на изучаемые показатели, так как статистический анализ не выявил значимых различий ($p \le 0.05$) между возрастными группами (табл. 2).

В табл. 3 приведены данные по экспрессии β-субъединиц протеасом у больных ПРГ по сравнению с больными с хроническими гиперпластическими заболеваниями гортани, ассоциированными с дисплазией (DI-III) и без дисплазии (D0). В представленном исследовании выявлено изменение уровня экспрессии генов протеасом в тканях ПРГ по сравнению как с образцами ХГЗГ без дисплазии, так и с дисплазией эпителия, которая считается предопухолевым состоянием.

Таблица 3. Уровень экспрессии В-субъединиц протеасом в группах больных в тканях плоскоклеточного рака гортани и эпителия больных хроническими гиперпластическими заболеваниями гортани, ассоциированными с дисплазией (ХГЗГ DI-III), без дисплазии (ХГЗГ D0), ME (Q1-Q3)

Группа больных	*n*	Уровень экспрессии, усл. ед.			
		PSMB4	***PSMB5***	***PSMB6***	***PSMB7***
ХГЗГ(D0)	11	0.25 (0.15–0.5)	0.5 (0.15–0.75)	0.5 (0.13–1.0)	0.25 (0.15–0.5)
ХГЗГ(DI-III)	9	0.75 (0.5–1.0)	1.0 (0.75–1.0)	1.0 (0.5–1.0)	0.5 (0.5–1.0)
ПРГ	29	**2.0*** (1.0–2.5)	**2.0*** (2.0–4.0)	**4.0*** (2.0–4.4)	**1.0*** (1.0–4.0)

Примечание: * – значимость различий по сравнению с ХГЗГ(D0) и ХГЗГ(DI-III).

Таблица 4. Химотрипсинподобная (ХТП) и каспазаподобная (КП) активности протеасом в тканях плоскоклеточного рака гортани и эпителия больных хроническими гиперпластическими заболеваниями гортани, ассоциированными с дисплазией (ХГЗГ DI-III), без дисплазии (ХГЗГ D0), ME (Q1-Q3)

Группа больных	*n*	Активность протеасом, $\times 10^6$ ед./мг			
		ХТП	P	**КП**	P
Условно-нормальная ткань	49	70.3 (30.6–88.7)		101.2 (84.9–123.8)	
ХГЗГ(D0)	11	72.3 (50.4–88.7)		130.7 (111.6–208.3)	**P1 < 0.05**
ХГЗГ(DI-III)	9	81.7 (78.3–86.1)	**P1 < 0.05**	198.5 (117.8–205.4)	**P1 < 0.05**
ПРГ	29	168.7 (121.4–274.0)	**P1 < 0.05** **P2 < 0.05**	341.7 (245.8–435.7)	**P1 < 0.05** **P2 < 0.05**

Примечания: P1 – значимость различий больных ХГЗГ(D0), ХГЗГ(DI-III) и ПРГ по сравнению с условно-нормальной тканью; P2 – значимость различий больных ХГЗГ(D0), ХГЗГ(DI-III) с ПРГ.

Наблюдалось значимое повышение уровня экспрессии мРНК всех изучаемых β-субъединиц протеасом у пациентов с ПРГ. Так, уровень экспрессии *PSMB4* был в 8 и в 3 раза выше в опухолевых тканях гортани в сравнении с гиперпластически и диспластически измененным эпителием, *PSMB5* – в 4 и 2 раза, *PSMB6* – в 8 и 4 раза и *PSMB7* – в 4 и 2 раза соответственно.

Особый интерес представляет изучение активностей протеасом, что может свидетельствовать об их функциональном состоянии. В результате проведенного исследования выявлено увеличение ХТП и КП активностей внутриклеточных протеасом в злокачественном эпителии гортани по сравнению с условно-нормальной тканью в 2.4 и 3.4 раза, соответственно (табл. 4). В группе рака гортани ХТП и КП активности возрастают в 2.3 и 2.6 раза, соответственно, по сравнению с ХГЗГ(D0), а при сравнении с ХГЗГ(DI-III) – в 2.1 и 1.7 раза соответственно. Полученные данные могут свидетельствовать о том, что протеасомы принимают активное участие в развитие ПРГ.

На следующем этапе работы было проведено исследование активностей циркулирующих протеасом, которые присутствуют в крови пациентов. При опухолевых процессах раковые клетки могут секретировать протеасомы во внеклеточное пространство, также протеасомы могут выходить в циркуляцию при распаде опухолевых клеток. Кроме того, внеклеточные протеасомы могут появляться при разрушении микрочастиц, образованных в результате мембранного блеббинга или в составе экзосом (Choi et al., 2021).

Данные, представленные в табл. 5, демонстрируют значимые изменения активностей циркулирующих протеасом в сыворотке крови пациентов при ПРГ. ХТП и КП активности в 3.2 и 2.2 раза выше в ПРГ при сравнении с группой контроля.

Таблица 5. ХТП и КП активности циркулирующих протеасом в группах больных ХГЗГ(D0), ХГЗГ(DI-III) и ПРГ, ME (Q1-Q3)

Группа	*n*	Активность циркулирующих протеасом, $\times 10^6$ ед./мл			
		ХТП	P	**КП**	P
Группа контроля	10	307.3 (213.4–368.7)		837.0 (629.0–1545.7)	
ХГЗГ(D0)	11	398.3 (193.7–754.3)	**P2 < 0.05**	965.7 (765.7–1993.0)	
ХГЗГ(DI-III)	9	564.7 (385.3–595.3)	**P2 < 0.05**	1372.7 (984.7–1894.3)	
ПРГ	29	986.3 (578.3–1491.0)	**P1 < 0.05**	1924 (1333.0–3409.1)	**P1 < 0.05**

Примечания: P1 – значимость различий группы ПРГ по сравнению с группой контроля; P2 – значимость различий групп ХГЗГ(D0) и ХГЗГ(DI-III) по сравнению с ПРГ.

Также для циркулирующих форм характерно повышение ХТП активности в сыворотке крови пациентов с ПРГ по сравнению с больными ХГЗГ(D0) (в 2.5 раза) и ХГЗГ(DI-III) (в 1.8 раза).

Проведение ROC-анализа продемонстрировало перспективы определения уровней изучаемых показателей для различения больных ПРГ и ХГЗГ (D0-DIII), результаты которого представлены на рис. 1. При изучении значимости уровня экспрессии субъединиц и активностей тканевых и циркулирующих протеасом для прогнозирования перехода предрака в рак было выявлено, что можно классифицировать уровень экспрессии мРНК *PSMB5* и ХТП активность протеасом в качестве достаточно сильных предикторов для определения пациента в группу онкологического риска. Так, для уровня экспрессии мРНК *PSMB5* AUC (площадь под кривой) равна 0.934 ± 0.033, ($p < 0.05$, ДИ = 0.870–0.999), чувствительность – 79.3%, специфичность – 90%. Для ХТП активности протеасом в ткани AUC равна 0.953 ± 0.032 ($p < 0.05$, ДИ = 0.892–1.000), чувствительность 91.3%, специфичность 90%.

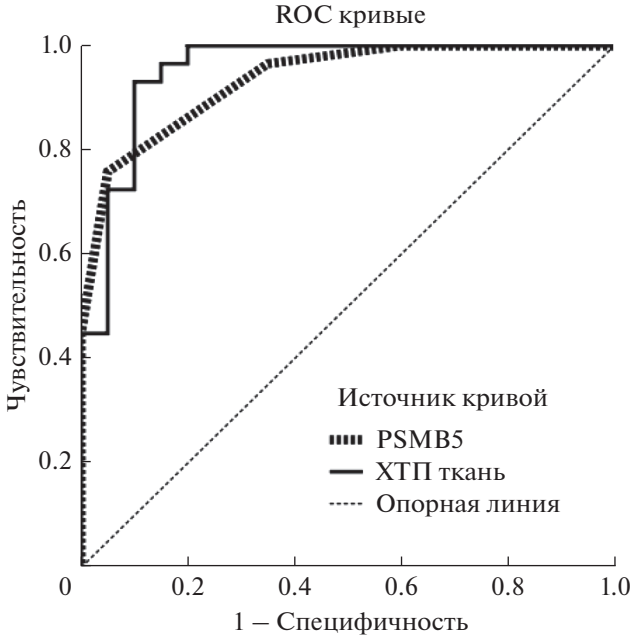

Рис. 1. ROC-кривые для определения оценки качества бинарной классификации *PSMB5*, ХТП активность протеасом в ткани предопухолевых и опухолевых заболеваний гортани.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Процесс неопластической трансформации, который включает переход эпителия от дисплазии до злокачественных новообразований, является отклонением от нормального онтогенеза и характеризуется сложными многоступенчатыми молекулярными процессами. Ярким примером опухолевой трансформации эпителия является развитие плоскоклеточного рака гортани. Непредсказуемость биологического поведения измененной ткани и возможности ее малигнизации в значительной степени обусловлена недостаточной изученностью сложных механизмов опухолевого роста и отсутствием данных о степени вовлеченности в эти процессы молекулярных и биохимических изменений, происходящих в клетках при переходе предрака в рак. Опухолевые клетки характеризуются высоким уровнем метаболизма, связанным с неконтролируемой пролиферацией и нарушением регуляции многих клеточных процессов. Быстрый обмен белков обеспечивается их деградацией протеолитическими системами, которые играют ключевую роль в сохранности клеточного

протеома. Изучение уровня экспрессии генов протеасом и определение их функциональной активности в опухолевых и предопухолевых тканях позволяет выяснить роль изучаемых показателей в развитии рака гортани.

Для определения показателей в биопсийных образцах был модифицирован метод анализа ХТП и КП активностей протеасом для малых объемов тканей. Было проведено исследование экспрессии генов субъединиц протеасом и определение ХТП и КП активностей в образцах диспластически измененных и злокачественных тканей гортани, полученных во время видеоларингоскопии. Также проведено сравнительное исследование активностей циркулирующих протеасом в тех же группах больных.

Полученные результаты свидетельствуют о повышении уровня экспрессии мРНК β-субъединиц, ХТП и КП активностей тканевых и ХТП активности циркулирующих протеасом у пациентов с ПРГ по сравнению с эпителием больных хроническими гиперпластическими заболеваниями гортани.

Следует отметить, что изменение активности протеасом в развитии ПРГ через стадию предрака имеет как сходство, так и отличие в сравнении с изменениями функционирования протеасом в раннем онтогенезе в норме. Так, ХТП активность возрастает в обоих процессах, в то время как изменение КП активности носит разнонаправленный характер. Увеличиваясь на первой и второй постнатальных неделях в процессе нормального онтогенеза ряда органов, КП активность резко падает к концу первого постнатального месяца (Karpova et al., 2013; Karpov et al., 2022). В развитии ПРГ отмечено только возрастание КП активности. Очевидно, нарезание белков после отрицательно заряженных аминокислотных остатков с помощью КП центров протеасом существенно для опухолевого процесса.

Ранее проводилось изучение уровня экспрессии β-субъединиц протеасом в ткани рака почки и показано его увеличение для опухолевых тканей по сравнения с условно-нормальными (Guo et al., 2022). Показано, что высокая экспрессия *PSMB5* наблюдалась в ткани рака молочной железы и предсказывала худшую выживаемость (Wang et al., 2017). Также ранее нами было показано увеличение ХТП активности протеасом в различных злокачественных новообразованиях по сравнению с неизмененной тканью (Спирина и др., 2012; Kondakova et al., 2012). Вероятно, изменение структуры и функции протеасом играет важную роль в развитии рака.

В представленной работе методом ROC-анализа показана связь экспрессии мРНК *PSMB5*, кодирующей ХТП активность протеасом и ХТП активности тканевых протеасом с развитием рака гортани у больных хроническими заболеваниями гортани. Эти показатели можно рассматривать в качестве кандидатных маркеров для прогноза развития рака гортани у больных предопухолевыми заболеваниями гортани, которые, в свою очередь, могут лечь в основу разработки нового перспективного способа оценки риска развития рака гортани.

ВЫВОДЫ

Таким образом, протеасомы вовлечены в процессы отклонения от нормального онтогенеза и играют важную роль в развитии рака гортани, обуславливая переход предрака в рак. Уровни показателей экспрессии мРНК субъединиц протеасом и активность протеасом в тканях и в сыворотке крови претерпевали существенные изменения в группах ПРГ по сравнению с предопухолевыми заболеваниями. Выявленные изменения в уровне субъединиц протеасом и активности протеасом в ткани рака гортани по сравнению с предопухолевыми заболеваниями могут стать основой для разработки новых прогностических маркеров для формирования групп повышенного онкологического риска.

БЛАГОДАРНОСТИ

Авторы выражают благодарность сотрудникам ЦКП ФГБУН Института биологии развития им. Н.К. Кольцова РАН за предоставление оборудования для исследований.

ФИНАНСИРОВАНИЕ

Работа выполнена в рамках Государственного задания № 075-01184-22-04 в Томском НИМЦ и в рамках Государственного задания № 0088-2021-0008 в ФГБУН Институте биологии развития им. Н.К. Кольцова РАН.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

При выполнении данного исследования все манипуляции с биологическим материалом пациентов соответствовали международным нормам по биоэтике.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

Дьяконов Е.Е., Цимоха А.С. Посттрансляционные модификации протеасом и их функциональное значение // Цитология. 2019, Т. 61. № 3. С. 175–184. https://doi.org/10.1134/S0041377119030039

Зайкова Ю.Я., Евтеева И.Н., Цимоха А.С. Протеасомы и их возможная роль во внеклеточном пространстве // Цитология. 2013. Т. 55. № 11. С. 753–760.

Нажмудинов И.И., Серебрякова И.Ю., Магомедова К.М. и др. Применение современных технологий в лечении предраковых заболеваний гортани // Вестник оториноларингологии. 2018. Т. 83. № 5. С. 45–48.

Спирина Л.В., Бочкарева Н.В., Кондакова И.В. и др. Регуляция инсулиноподобных факторов роста и NF-κB протеасомной системой при раке эндометрия // Молекулярная биология. 2012. Т. 46. № 3. С. 452–460.

Шашова Е.Е., Колегова Е.С., Кондакова И.В., Завьялов А.А. Внутриклеточный и циркулирующий пулы протеасом: значение при злокачественных новообразованиях различных локализаций // Сибирский онкологический журн. 2015. № 6. С. 76–82.

Abbas R., Larisch S. Killing by degradation: regulation of apoptosis by the ubiquitin-proteasome-system // Cells. 2021. V. 10. № 12. P. 3465. https://doi.org/10.3390/cells10123465

Budenholzer L., Cheng C.L., Li Y. et al. Proteasome structure and assembly // Mol. Biol. 2017. V. 429. № 22. P. 3500–3524. https://doi.org/10.1016/j.jmb.2017.05.027

Choi W.H., Kim S., Park S. et al. Concept and application of circulating proteasomes // Experimental & Molecular Medicine. 2021. V. 53. № 10. P. 1539–1546. https://doi.org/10.1038/s12276-021-00692-x

Ciolofan M.S., Vlăescu A.N., Mogoantă C.A. et al. Clinical, histological and immunohistochemical evaluation of larynx cancer // Curr Health Sci. J. 2017. V. 43. P. 367–375. https://doi.org/10.12865/CHSJ.43.04.14

Erokhov P.A., Kulikov A.M., Karpova et al. Proteasomes in patient rectal cancer and different intestine locations: where does proteasome pool change? // Cancers. 2021. V. 13. P. 1108. https://doi.org/10.3390/cancers13051108

Guo J.-Y., Jing Z.-Q., Li X.-J. et al. Bioinformatic analysis identifying PSMB 1/2/3/4/6/8/9/10 as prognostic indicators in clear cell renal cell carcinoma // Int. J. Med. Sci. 2022. V. 19. № 5. P. 796–812. https://doi.org/10.7150/ijms.71152

Jiang T.X., Ma S., Han X. et al. Proteasome activator PA200 maintains stability of histone marks during transcription and aging // Theranostics. 2021. V. 11. № 3. P. 1458–1472. https://doi.org/10.7150/thno.48744

Karpov N.S., Erokhov P.A., Sharova N.P. et al. How is the development of the rat's small intestine related to changes in the proteasome pool? // Rus. J. Dev. Bio. 2022. V. 53. № 1. P. 41–50.

Karpova Ya.D., Lyupina Yu.V., Astakhova T.M. et al. Immune proteasomes in the development of rat immune system // Bioorg. Khim. 2013. V. 39. P. 400–410. https://doi.org/10.1134/s1068162013040092

Kondakova I.V., Shashova E.E., Sidenko E.A. et al. Estrogen receptors and ubiquitin proteasome system: Mutual regulation // Biomolecules. 2020. V. 10. № 4. P. 500. https://doi.org/10.3390/biom10040500

Kondakova I.V., Spirina L.V., Shashova E.E. et al. Proteasome activity in tumors of the female reproductive system // Russian J. Bioorganic Chemistry. 2012. V. 38. № 1. P. 106–110. https://doi.org/10.1134/s106816201201013x

Lee G.Y., Haverty P.M., Li L. et al. Comparative oncogenomics identifies PSMB4 and SHMT2 as potential cancer driver genes // Cancer Research. 2014. V. 74. № 11. P. 3114–3126. https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-13-2683

Livak K.J., Schmittgen T.D. Analysis of relative gene expression data using Real-Time Quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method // Methods. 2001. V. 25. № 4. P. 402–408. https://doi.org/10.1006/meth.2001.1262

Luers J.C., Sircar K., Drebber U. et al. The impact of laryngeal dysplasia on the development of laryngeal squamous cell carcinoma // Eur. Arch Otorhinolaryngol. 2014. V. 71. № 3. P. 539–545. https://doi.org/10.1007/s00405-013-2670-2

Ma W., Kantarjian H., O'Brien S. et al. Enzymatic activity of circulating proteasomes correlates with clinical behavior in patients with chronic lymphocytic leukemia // Cancer. 2008. V. 12. № 6. P. 1306–1312. https://doi.org/10.1002/cncr.23301

Nocini R., Molteni G., Mattiuzzi C. Updates on larynx cancer epidemiology // Chin. J. Cancer Res. 2020. V. 32. P. 18–25. https://doi.org/10.21147/j.issn.1000-9604.2020.01.03

Obid R., Redlich M., Tomeh C. The treatment of laryngeal cancer // Oral and Maxillofacial Surgery Clinics of North America. 2019. V. 31. № 1. P. 1–11. https://doi.org/10.1016/j.coms.2018.09.001

Sahu I., Glickman M.H. Structural insights into substrate recognition and processing by the 20S proteasome // Biomolecules. 2021. V. 11(2). P. 148. https://doi.org/10.3390/biom11020148

Sharova N.P., Astakhova T.M., Karpova Ya.D. et al. Changes in proteasome pool in human papillary thyroid carcinoma development // Cent. Eur. J. Biol. 2011. V. 6. № 4. P. 486–496.

Siegel R.L., Miller K.D., Jemal A. Cancer statistics, 2020 // CA Cancer J. for Clinicians. 2020. V. 70. № 1. P. 7–30. https://doi.org/10.3322/caac.21590

Wada M., Saito S. et al. Serum concentration and localization in tumor cells of proteasomes in patients with hematologic malignancy and their pathophysiologic significance // J. Lab. Clin. Med. 1993. V. 121. № 2. P. 215–223.

Wang C.-Y., Li C.-Y., Hsu H.-P. et al. PSMB5 plays a dual role in cancer development and immunosuppression // American J. Cancer Research. 2017. V. 7. № 11. P. 2103–2120.

Wang H., He Z., Xia L. et al. PSMB4 overexpression enhances the cell growth and viability of breast cancer cells leading to a poor prognosis // Oncol. Rep. 2018. V. 40. № 4. P. 2343–2352. Epub 2018 Jul 20. https://doi.org/10.3892/or.2018.6588

Sharp Increase in Expression of Subunit Genes and Activity of Proteasomes in Laringeal Ontogeny Is Associated with the Development of Squamous Cell Carcinoma

I. V. Kondakova[1, *], E. A. Sidenko[1, 3], T. M. Astakhova[2], G. V. Kakurina[1, 3], E. E. Sereda[1, 3], O. V. Cheremisina[1], E. L. Choynzonov[1, 3], and N. P. Sharova[2]

[1]Cancer Research Institute, Tomsk National Research Medical Center of the Russian Academy of Sciences, Tomsk, 634050 Russia

[2]Koltzov Institute of Developmental Biology of Russian Academy of Sciences, Moscow, 119334 Russia

[3]Siberian State Medical University, Tomsk, 634050 Russia

**e-mail: kondakova@oncology.tomsk.ru*

Proteasomes, the most important participants in protein catabolism, maintain proteostasis and regulate cellular processes in ontogeny. Deviations in the functioning of proteasomes are associated with the development of various pathologies, including a number of oncological diseases. In this work, we studied changes in subunit gene expression and proteasome activity in laryngeal cancer tissue and epithelium of patients with chronic hyperplastic diseases of the larynx, which are considered obligate precancer. The activity of circulating proteasomes was also studied in the same groups of patients. The level of gene expression was assessed using quantitative reverse transcriptase PCR in real time. A method for assessing chymotrypsin-like (CTL) and caspase-like (CL) activities of proteasomes has been modified for the analysis of small volumes of biopsy samples. An increase in the level of expression of the proteasome genes (*PSMB6*, *PSMB7*, *PSMB5*, and *PSMB4*) in the tissues of squamous cell carcinoma of the larynx was shown compared to pre-tumor samples. An increase in CTL and CL activities of intracellular proteasomes in the malignant epithelium of the larynx was also found in comparison with the conditionally normal tissue and with the epithelium of patients with chronic hyperplastic diseases of the larynx. An increase in chymotrypsin-like activity was observed in circulating proteasomes. ROC-analysis (Receiver operating characteristic) revealed the relationship between *PSMB5* mRNA expression and CTP activity of tissue proteasomes with the development of laryngeal cancer in patients with chronic hyperplastic diseases of the larynx. In the future, it is possible to use these indicators to develop a method for predicting the transition of precancer of the larynx to cancer.

Keywords: proteasome subunit gene expression, proteasome chymotrypsin-like activity, proteasome caspase-like activity, laryngeal cancer, chronic hyperplastic diseases of the larynx