

DOI: <https://doi.org/10.17650/1818-8346-2023-18-4-145-155>

Диагностический потенциал CD30(+)-нановезикул плазмы при лимфоме Ходжкина

К.Е. Кацуба¹, Л.А. Крамынин¹, М.А. Слюсаренко¹, А.В. Шалаев¹, В.В. Шаройко², А.А. Валитова¹,
А.С. Артемьева¹, П.И. Крживицкий¹, Л.В. Филатова¹, А.В. Малек¹

¹ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии им. Н.Н. Петрова» Минздрава России; Россия, 197758 Санкт-Петербург, пос. Песочный, ул. Ленинградская, 68;

²ФГБОУ ВО «Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет им. акад. И.П. Павлова» Минздрава России; Россия, 197022 Санкт-Петербург, ул. Льва Толстого, 6–8

Контакты: Анастасия Валерьевна Малек anastasia@malek.com.ru

Введение. В современной клинической практике нет надежных методов стратификации пациентов с высоким риском рецидива или с первично рефрактерной формой лимфомы Ходжкина. Количественная оценка CD30-положительных внеклеточных нановезикул (CD30(+))ВНВ в плазме представляется возможным методом решения этой задачи. Метод может быть реализован с помощью технологии AuNP-аптасенсора, основанной на фермент-миметических свойствах наночастиц золота и CD30-специфической аффинности ДНК-аптамеров.

Цель исследования – оценить концентрацию CD30(+))ВНВ в плазме пациентов с впервые установленным диагнозом лимфомы Ходжкина, исследовать связь измеряемого параметра с клинико-морфологическими характеристиками и эффектом 2 первых циклов полихимиотерапии.

Материалы и методы. С помощью AuNP-аптасенсора был проведен полуколичественный анализ CD30(+))ВНВ в плазме пациентов с лимфомой Ходжкина ($n = 55$). Исследована связь результатов анализа с данными стандартных диагностических методов путем расчета коэффициента корреляции r -Пирсона, критериев Манна-Уитни и Краскелла-Уоллиса.

Результаты. Концентрация CD30(+))ВНВ в плазме пациентов с лимфомой Ходжкина коррелирует с количеством CD30(+)-клеток в ткани лимфатических узлов, вовлеченных в патологический процесс ($r = 0,8$), и с показателем суммарной метаболической активности опухоли, оцененной с помощью позитронно-эмиссионной томографии, совмещенной с компьютерной томографией ($r = 0,9$). Для пациентов с относительно высокой концентрацией CD30(+))ВНВ характерны повышение скорости оседания эритроцитов и лейкоцитоз по сравнению с пациентами с меньшей концентрацией CD30(+))ВНВ плазмы. Проведение 2 циклов полихимиотерапии приводит к снижению концентрации CD30(+))ВНВ в плазме, причем этот эффект был более выражен в случае использования режима ABVD (доксорубин, блеомицин, винбластин, дакарбазин), чем режима BEACOPPesc (блеомицин, этопозид, доксорубин, циклофосфамид, винкристин, преднизолон, прокарбазин).

Заключение. AuNP-аптасенсор может быть использован для полуколичественной оценки CD30(+))ВНВ в плазме. Полученные результаты коррелируют с клинико-морфологическими параметрами пациентов с лимфомой Ходжкина и могут отражать тяжесть заболевания. Для оценки диагностического и/или прогностического потенциала разработанной технологии необходимо проведение масштабных многоцентровых исследований.

Ключевые слова: лимфома Ходжкина, внеклеточная нановезикула, аптамер, AuNP-аптасенсор

Для цитирования: Кацуба К.Е., Крамынин Л.А., Слюсаренко М.А. и др. Диагностический потенциал CD30(+)-нановезикул плазмы при лимфоме Ходжкина. Онкогематология 2023;18(4):145–55. DOI: <https://doi.org/10.17650/1818-8346-2023-18-4-145-155>

Diagnostic potential of plasma CD30(+) small extracellular vesicles in Hodgkin lymphoma

K.E. Katsuba¹, L.A. Kramynin¹, M.A. Slysarenko¹, A.V. Shalaev¹, V.V. Sharoyko², A.A. Valitova¹, A.S. Artem'eva¹,
P.I. Krzhivitskiy¹, L.V. Filatova¹, A.V. Malek¹

¹N.N. Petrov National Medical Research Center of Oncology, Ministry of Health of Russia; 68 Leningradskaya St., Pesochnyy, Saint Petersburg 197758, Russia;

²I.P. Pavlov First Saint Petersburg State Medical University, Ministry of Health of Russia; 6–8 L'va Tolstogo St., Saint Petersburg 197022, Russia

Contacts: Anastasiya Valer'evna Malek anastasia@malek.com.ru

Background. In current clinical practice, there are no reliable methods to stratify patients with a high risk of relapse or with a primary refractory form of Hodgkin lymphoma. Quantification of CD30-positive small extracellular vesicles (CD30(+)-SEV) in plasma seems to be a possible approach to solve this issue. CD30(+)-SEV can be quantified by the AuNP aptasensor technology based on the enzyme-mimetic properties of gold nanoparticles and the CD30-specific affinity of DNA aptamers.

Aim. To quantify CD30(+)-SEV in the plasma of patients with newly diagnosed Hodgkin lymphoma; to investigate the links between estimated parameter and clinical/morphological properties of disease and the effect of first two chemotherapy cycles.

Material and methods. A semi-quantitative analysis of CD30(+)-SEV in the plasma of patients with Hodgkin lymphoma ($n = 55$) was performed using the AuNP aptasensor. The relationship between the CD30(+)-SEV concentration and the data of standard diagnostic approaches was evaluated through the r -Pearson correlation coefficient, the Mann–Whitney and Kruskal–Wallis criteria.

Results. The plasma concentration of CD30(+)-SEV in patients with Hodgkin lymphoma correlates with the quantity of CD30(+) cells in tissues of biopsied lymph nodes ($r = 0.8$) and the total lesion glycolysis estimated by PET/CT ($r = 0.9$). Patients with a relatively high concentration of CD30(+)-SEV are characterized by an increase of erythrocyte sedimentation rate and leukocytosis compared with patients with a lower concentration of CD30(+)-SEV. Two cycles of chemotherapy reduced CD30(+)-SEV concentration, and this effect was more pronounced in patients treated with ABVD (doxorubicin, bleomycin, vinblastine, dacarbazine) regime than the BEACOPPesc (bleomycin, etoposide, doxorubicin, cyclophosphamide, vincristine, prednisolone, procarbazine).

Conclusion. AuNP-aptasensor can be used for semi-quantitative assessment of CD30(+)-SEV in plasma. The estimated CD30(+)-SEV concentration correlates with the clinical and morphological parameters of patients with Hodgkin lymphoma and may reflect the severity of the disease. To assess the diagnostic and/or prognostic potential of developed technology, large-scale multicenter studies are required.

Keywords: Hodgkin lymphoma, small extracellular vesicle, aptamer, AuNP-aptasensor

For citation: Katsuba K.E., Kramynin L.A., Slyusarenko M.A. et al. Diagnostic potential of plasma CD30(+) small extracellular vesicles in Hodgkin lymphoma. *Onkogematologiya = Oncohematology* 2023;18(4):145–55. (In Russ.). DOI: <https://doi.org/10.17650/1818-8346-2023-18-4-145-155>

Введение

Лимфома Ходжкина (ЛХ) — злокачественная опухоль лимфоидной ткани. В основе ее патогенеза лежит феномен клональной пролиферации В-клеток. Опухолевым субстратом ЛХ принято считать гигантские клетки Ходжкина и/или клетки Березовского—Рид—Штернберга (Hodgkin and Reed—Sternberg, HRS). Клетки HRS составляют от 1 до 10 % массы опухоли, которая преимущественно представлена реактивным полиморфноклеточным микроокружением [1].

Специфическая морфология определяет трудности изучения биологии ЛХ. Гетерогенный клеточный состав опухоли осложняет проведение так называемых профайлинговых исследований, необходимых для формирования патогномоничного «профиля» генетических и/или эпигенетических изменений, формирующих злокачественный фенотип опухолевых клеток [2]. Новые аспекты природы ЛХ стали открываться с помощью технологии анализа «транскриптома» единичных клеток в составе полиморфноклеточной опухоли. Так, недавно в 2 независимых исследованиях была выделена и описана специфическая популяция Т-клеток (LAG3(+)-T-cell), которая участвует в патогенезе заболевания в дополнение к клеткам HRS [3, 4]. Так, идентификация новых клеточных популяций в составе «реактивного микроокружения» может изменить моноклональную концепцию патогенеза ЛХ. Кроме этого, феномен гетерогенности клеточного состава опухоли затрудняет поиск специфических для ЛХ молекулярных

маркеров, циркулирующих в плазме в детектируемых концентрациях.

Несмотря на недостаточность фундаментального понимания патогенеза ЛХ, современные лечебные подходы, основанные на сочетании полихимиотерапии (ПХТ) и лучевой терапии, обеспечивают относительно высокие показатели выживаемости пациентов. По данным Китайской академии медицинских наук (Cancer Hospital Chinese Academy of Medical Sciences, CHCAMS), 10-летняя выживаемость пациентов с ЛХ в 2022 г. составила 87,1 %. По данным аналогичной организации США (the Surveillance, Epidemiology, and End Results, SEER) — 79 % [5]. В нашей стране доступны показатели 5-летней выживаемости, определенные в 2003 г., — 71 % (у мужчин) и 83 % (у женщин) [6]. Представленные данные показывают, что в 10–20 % случаев течение заболевания имеет неблагоприятный характер, что в клинической практике проявляется как первичная рефрактерность или ранний рецидив. В таких случаях применяются относительно агрессивные схемы системной терапии с последующей аутологичной трансплантацией гемопоэтических стволовых клеток [7]. Используемые в настоящее время критерии оценки состояния пациентов на этапе первичной диагностики и/или эффекта стандартных режимов терапии 1-й линии не позволяют уверенно стратифицировать пациентов с первичной рефрактерностью или высоким риском раннего рецидива. Поэтому поиск новых маркеров, отражающих биологические особенности ЛХ, является актуальной задачей.

Технология жидкостной биопсии в контексте лимфопролиферативных заболеваний предполагает возможность анализа различных компонентов циркулирующей крови: клеток, субклеточных или везикулярных структур, молекул ДНК и РНК [8]. Например, инновационная технология оценки статуса пациентов с ЛХ путем обогащения специфических фрагментов циркулирующей в плазме ДНК и последующим глубоким секвенированием (next generation sequencing, NGS) была предложена группой испанских исследователей [9]. Авторы описали несколько характерных соматических мутаций и предложили показатель для количественной оценки циркулирующей ДНК, эквивалентный числу гаплоидных геномов в миллилитре плазмы, который коррелировал с рядом лабораторных (лактатдегидрогеназа, альбумин) и клинических (выраженность В-симптомов, стадия и др.) параметров. Авторы сделали вывод о скором внедрении разработанной технологии в клиническую практику, но высокая стоимость исследования и отсутствие алгоритма внятной клинической интерпретации результатов заставляют усомниться в этом.

Внеклеточные нановезикулы (ВНВ) представляются более перспективным объектом анализа [10]. В недавнем пилотном исследовании мы показали возможность полуколичественной оценки CD30-положительных ВНВ (CD30(+))ВНВ в плазме и выявили феномен корреляции количества таких везикул с показателем метаболической активности опухоли (total lesion glycolysis, TLG) [11].

В представленной работе мы расширили выборку пациентов и попытались оценить полученные результаты в контексте имеющихся данных стандартных методов диагностики: морфологических, биохимических, рентгенологических данных.

Цель исследования — оценить концентрацию CD30(+))ВНВ в плазме пациентов с впервые установленным диагнозом ЛХ, исследовать связь измеряемого параметра с клинико-морфологическими характеристиками и эффектом 2 первых циклов ПХТ.

Материалы и методы

Пациенты. В данное исследование были включены 55 пациентов, получавшие лечение в НМИЦ онкологии им. Н.Н. Петрова (Санкт-Петербург) с 2020 по 2022 г. Медиана возраста пациентов составила 31 (18–60) год.

Диагноз ЛХ (классический вариант) поставлен на основании данных гистологического и иммуногистохимического исследований биоптатов лимфатических узлов (ЛУ) в соответствии с критериями Всемирной организации здравоохранения. В целях стадирования и оценки распространенности заболевания была выполнена позитронно-эмиссионная томография, совмещенная с компьютерной томографией (ПЭТ/КТ), с [^{18}F] -фтор-2-дезоксид-Д-глюкозой (^{18}F -ФДГ). Индивидуальные характеристики пациентов, включая клинический статус, стадию

заболевания и лабораторные показатели, представлены в таблице.

Согласно международным клиническим рекомендациям в качестве 1-й линии пациенты получали стандартные курсы химиотерапии, выбор которых определялся возрастом, стадией заболевания и наличием факторов неблагоприятного прогноза: 8 (15 %) пациентов младше 21 года — лечение по протоколу ОЕРА (винкристин, этопозид, преднизолон, доксорубин),

Характеристика пациентов (n = 55)

Patient characteristics (n = 55)

Характеристика Characteristic	n (%)
Возраст ≥ 45 лет Age ≥ 45 years	6 (11)
Пол: Gender: мужской male женский female	26 (47) 29 (53)
Статус по шкале ECOG ≥ 2 ECOG status ≥ 2	15 (27)
Стадия заболевания по Ann-Arbor: Ann-Arbor disease stage:	
II	30 (56)
III	9 (16)
IV	16 (29)
В-симптомы B-symptoms	19 (35)
Bulky disease (≥ 10 см) Bulky disease (≥ 10 cm)	9 (16)
Гипоальбуминемия (< 40 г/л) Hypoalbuminemia (< 40 g/L)	25 (45)
Анемия (< 105 г/л) Anemia (< 105 g/L)	5 (9)
Лейкоцитоз ($> 15 \times 10^9$ /л) Leukocytosis ($> 15 \times 10^9$ /L)	9 (16)
Скорость оседания эритроцитов, мм/ч: Erythrocyte sedimentation rate, mm/h:	
> 30 (без В-симптомов) > 30 (without B-symptoms)	13 (24)
> 50 (с В-симптомами) > 50 (with B-symptoms)	6 (11)
Количество вовлеченных лимфатических зон по критериям GHSG: Number of lymphatic zones involved according to GHSG criteria:	
≤ 2	11 (20)
> 2	44 (80)
медиана вовлеченных лимфатических зон median of lymphatic zones involved	4 (2–11)
Факторы неблагоприятного прогноза по критериям GHSG ≥ 1 (для I и II стадий) Poor prognosis factors according to GHSG criteria ≥ 1 (for stages I and II)	22 (40)

Окончание таблицы
End of table

Характеристика Characteristic	n (%)
Риск по IPS (индекс Hasenclever) (для III и IV стадий): Risk according to IPS (Hasenclever index) (for stages III and IV): низкий (0–3) low (0–3) высокий (≥ 4) high (≥ 4)	21 (38) 4 (7)
Лактатдегидрогеназа выше верхней границы нормы (>220 Ед/л) Lactate dehydrogenase above the upper limit of normal (>220 U/L)	22 (40)
Гистологический подтип классической лимфомы Ходжкина: Histological subtype of classical Hodgkin lymphoma: смешанно-клеточный mixed-cellular нодулярный склероз G ₁ nodular sclerosis G ₁ нодулярный склероз G ₂ nodular sclerosis G ₂ неуточненный unspecified	3 (5) 38 (69) 5 (9) 9 (16)

Примечание. ECOG — Восточная кооперативная группа исследования рака; GHSG — Германская группа по изучению лимфомы Ходжкина; IPS — Международная прогностическая шкала.

Note. ECOG — Eastern Cooperative Oncology Group; GHSG — German Hodgkin Study Group; IPS — International Prognostic Score.

20 (36 %) пациентов с ранними стадиями без факторов неблагоприятного прогноза — по схеме ABVD (доксорубицин, блеомицин, винбластин, дакарбазин), 27 (49 %) пациентов с III/IV стадиями заболевания и/или с факторами неблагоприятного прогноза — по схеме BEACOPPesc (блеомицин, этопозид, доксорубицин, циклофосфамид, винкристин, преднизолон, прокарбазин). Противоопухолевый эффект после 2 курсов химиотерапии оценивали с помощью ПЭТ/КТ.

Гистологическое исследование. Биопсию ЛУ и подготовку биопсийного материала проводили в соответствии с клиническими стандартами. В рамках данного исследования были использованы результаты оценки гистологического варианта образца ткани ЛУ, анализа количества CD30(+)–клеток HRS в hot spot в поле зрения при использовании объектива $\times 20$ ($\times 200$, диаметр поля зрения 1,2 мм), оценки наличия симпластов (солидных скоплений диагностических клеток HRS).

Подготовка пациентов перед ПЭТ/КТ включала голодание (6 ч), оптимальную гидратацию и измерение уровня глюкозы в крови непосредственно перед инъекцией ^{18}F -ФДГ. Доза вводимого радиофармацевтического препарата составила 3,7–4,0 МБк/кг. ПЭТ/КТ-сканирование выполняли в соответствии со стандартным протоколом (параметры сканирования: КТ 80 мА, 120 кВ, без

контрастного усиления, 3–4 мин/кровать-шаг 15 см). Изображения были интерпретированы двумя опытными врачами-радиологами и обрабатывались с помощью программного обеспечения Syngo.via (Siemens Healthineers, Германия). Для определения основных параметров MTV (metabolic tumor volume, метаболический объем опухоли) и TLG применяли специальный инструмент Multi-focus segmentation, который позволяет автоматически регистрировать контур каждого очага гиперметаболизма ^{18}F -ФДГ при использовании стандартного показателя захвата препарата в очаге (standardized uptake value, SUV_{max}). Порог поглощения ^{18}F -ФДГ составил 41 % SUV_{max} [12]. Во всех случаях контуры корректировали вручную, чтобы избежать включения областей физиологического повышенного накопления ^{18}F -ФДГ, а также добавляли в измеряемый объем поглощения очаги с низким (меньше, чем в печени) захватом ^{18}F -ФДГ, которые расценивались как злокачественные (например, ввиду небольшого размера поражения). Включение костного мозга в регистрируемый объем проводили при наличии фокального или мультифокального поглощения ^{18}F -ФДГ. Все параметры были рассчитаны автоматически с помощью указанной программы. Среднее значение SUV_{max} наиболее активных поражений у всех пациентов составило 12,4 (2,5–22,3). Медиана MTV и TLG всех суммарных очагов метаболически активной лимфомы составляла соответственно X (X1–X2) мл и Y (Y1–Y2) мл.

Выделение ВНВ из плазмы. Образец крови был получен из локтевой вены в вакутейнер с ЭДТА (этилендиаминтетрауксусная кислота), в течение 15 мин плазма была отделена от эритроцитарной массы с помощью центрифугирования 3000g (5 мин) и аликвотирована для хранения при температуре -80°C . Перед выделением ВНВ образцы плазмы были медленно разморожены до $+4^\circ\text{C}$. Выделение ВНВ проведено с использованием составной полимерной системы декстран-полиэтиленгликоль в соответствии с ранее описанной технологией [13]. Из каждого образца плазмы (1,5 мл) была получена суспензия ВНВ объемом 100 мкл. Концентрация и размер ВНВ были определены в каждом образце с помощью анализа траекторий наночастиц (NanoSight NS300, Великобритания). Концентрация ВНВ в суспензии колебалась от 2 до 4×10^{11} /мл, размер мажорной фракции — в диапазоне 90–130 нм. Поскольку характеристики ВНВ, выделенных из плазмы с помощью двухфазной полимерной системы, подробно представлены в описании патента [14] и методологической статьи [13], эта информация не приводится.

AuNP-аптасенсор. Метод полуколичественного анализа CD30(+)ВНВ основан на феномене фермент-миметической активности (ФМА) наночастиц золота (Au nanoparticles, AuNP). В данной работе были использованы частицы (диаметр 10 нм, ζ -потенциал -27 мВ), полученные путем синтеза Туркевича. Принцип работы сенсора заключается в обратимом угнетении ФМА наночастиц в результате абсорбции на их

поверхности полианионов, например ДНК. В качестве ДНК был использован аптамер (ACT GGG CGA AAC AAG TCT ATT GAC TAT GAG), специфическая третичная структура которого обеспечивает его взаимодействие с мембранным рецептором CD30 [10]. При добавлении в состав реакционной смеси CD30(+)ВНВ происходило перераспределение ДНК-аптамеров между поверхностью AuNP и CD30(+)ВНВ и, следовательно, восстановление ФМА AuNP. Оценку ФМА проводили путем цветной реакции окисления субстрата (тетрамилбензидина) и измерения интенсивности поглощения света с длиной волны 380 нм. Полученные показатели отражали концентрацию CD30(+)ВНВ. Подробное описание технологии AuNP-аптасенсора было представлено ранее [11].

Статистическая обработка. Оценку степени линейной корреляции 2 независимых параметров (например, суммарной TLG и концентрации CD30(+)ВНВ в плазме) проводили с помощью расчета коэффициента корреляции r -Пирсона. Оценку степени разброса результатов анализа концентрации CD30(+)ВНВ в группе образцов выполняли путем подсчета среднеквадратичного отклонения, статистическую значимость разницы изучаемых параметров между группами образцов определяли с помощью критериев Манна–Уитни или Краскела–Уоллиса.

Результаты

Гипотеза исследования, принцип работы и ограничения AuNP-аптасенсора. Гипотеза исследования была основана на 2 предположениях. Во-первых, CD30(+)–клетки HRS секретируют ВНВ, мембрана которых также «несет» этот маркер (CD30(+)ВНВ). Во-вторых, активность заболевания отражается количеством и метаболической активностью клеток HRS и, как следствие, количеством CD30(+)ВНВ в плазме. Первое пред-

положение было подкреплено данными научной литературы [15], второе – результатами собственного пилотного исследования [11]. На рис. 1 представлены объекты исследования и условная шкала их размерности. Если предположить, что количество и метаболическая активность клеток HRS в составе ткани пораженных ЛУ (см. рис. 1, а) определяют количество CD30(+)ВНВ в плазме, а количественная оценка CD30(+)ВНВ может быть проведена с помощью AuNP-аптасенсора, то результаты такой оценки должны отражать изменения активности заболевания.

С учетом принципа работы аптасенсора результаты измерений, проведенных с его помощью (поглощение света с длиной волны 370 нм), интегрально отражают количество CD30(+)ВНВ в составе суспензии и количество молекул CD30 на поверхности каждой такой везикулы. AuNP-аптасенсор не позволяет оценить вклад каждого параметра отдельно. Для оценки перспектив применения разработанной технологии в клинической практике встала задача поиска и оценки возможных корреляций между результатами полуколичественной оценки CD30(+)ВНВ в плазме с помощью AuNP-аптасенсора, результатами инструментальных исследований и клиническими характеристиками пациентов с ЛХ.

Корреляция морфологических данных и CD30(+)ВНВ.

До начала терапии всем пациентам, включенным в исследование, был проведен стандартный комплекс диагностических исследований: анализ биохимического состава плазмы, ПЭТ/КТ, биопсия пораженных ЛУ. Количественный анализ CD30(+)ВНВ плазмы был сделан в рамках диагностического исследования, которое длилось не более недели. Сопоставление результатов гистологического исследования с показателями AuNP-аптасенсора выявило корреляцию количества диагностических CD30(+)–клеток HRS в hot spot анализируемых срезов

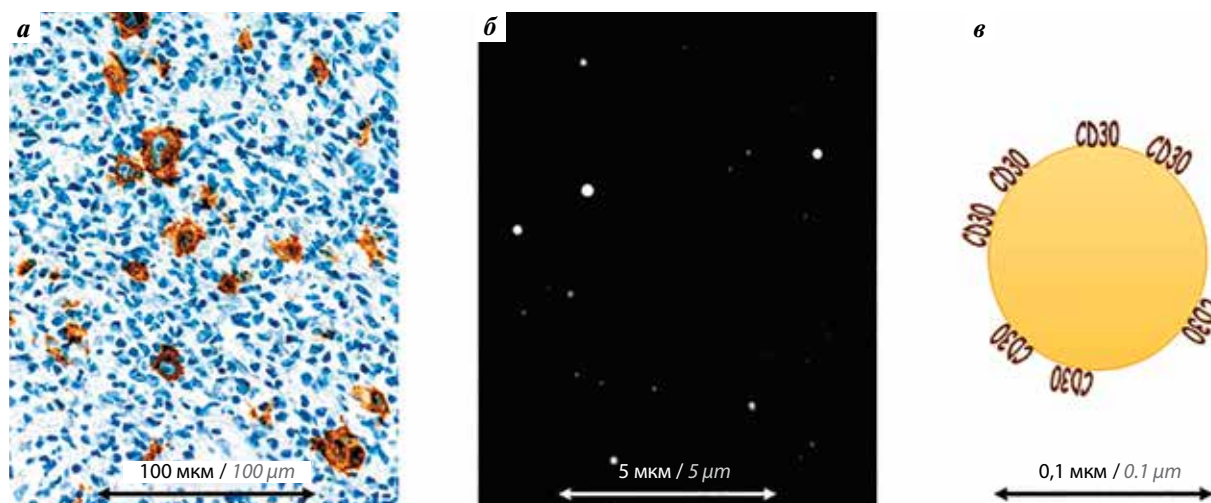


Рис. 1. Схематичное представление объекта исследования: а – лимфатический узел (иммуногистохимическое исследование, окраска гематоксилином, $\times 400$); б – плазма (анализ траектории наночастиц, $\times 8000$); в – внеклеточная нановезикула, размер 80–130 нм (схема)
Fig. 1. Schematic representation of the study object: а – lymph node (immunohistochemistry, hematoxylin staining, $\times 400$); б – plasma (analysis of small extracellular vesicles trajectory, $\times 8000$); в – small extracellular vesicles, size 80–130 nm (scheme)

ткани пораженных ЛУ с количеством циркулирующих в плазме CD30(+)ВНВ (рис. 2, а). Наличие или отсутствие симпластов не отражалось на концентрации CD30(+)ВНВ плазмы. Кроме этого, была выявлена разница средних значений показаний AuNP-аптасенсора между группами образцов разных гистологических вариантов ЛХ, но в связи с недостаточным количеством образцов смешанно-клеточного типа ЛХ наблюдаемая разница была статистически незначимой (рис. 2, б).

Полученные данные позволяют предполагать, что CD30(+)ВНВ плазмы являются продуктом секреции CD30(+)–клеток в составе пораженных ЛУ. Но количество циркулирующих ВНВ определяется еще рядом параметров (объем опухолевой ткани, метаболическая/секреторная активность CD30(+)–клеток опухоли и других тканей), поэтому наблюдаемая зависимость является статистически значимой ($p < 0,0005$), но не жесткой (коэффициент корреляции Пирсона $r = 0,77$).

Корреляция показателей TLG и CD30(+)ВНВ. Оценка корреляции результатов ПЭТ/КТ с показателями AuNP-аптасенсора позволила выделить 2 группы пациентов. В одной группе ($n = 29$) наблюдалась линейная корреляция 2 параметров (коэффициент корреляции Пирсона $r = 0,9$), т.е. у этих пациентов количество CD30(+)ВНВ в циркулирующей плазме соответствовало объему и метаболической активности патологических очагов (рис. 3, черные точки). У остальных пациентов ($n = 26$) взаимосвязи между значением TLG и концентрацией CD30(+)ВНВ не было, причем у этих

пациентов в большинстве случаев наблюдались относительно низкие значения TLG, но концентрация CD30(+)ВНВ варьировала в широком диапазоне (см. рис. 3, красные точки). Другими словами, в этой группе пациентов различные показатели концентрации CD30(+)ВНВ наблюдались при относительно малом объеме и низкой метаболической активности опухоли, т.е. вне зависимости от этого параметра. Можно предполагать, что у пациентов этой группы концентрация CD30(+)ВНВ определяется какими-то иными, пока не известными характеристиками опухолевого процесса, что может иметь самостоятельное диагностическое значение.

Связь клинических параметров и концентрации CD30(+)ВНВ. В целях поиска связи клинических или биохимических параметров с показателем концентрации CD30(+)ВНВ пациенты были распределены на 2 группы (рис. 4): с меньшим ($n = 24$; розовые точки на рис. 4) или большим ($n = 31$; красные точки на рис. 4) чем 0,5 показателем поглощения AuNP-аптасенсора при первом исследовании (до начала ПХТ). По ряду параметров (скорость оседания эритроцитов и количество лейкоцитов в циркулирующей крови) между сравниваемыми группами обнаружены статистически значимые различия. Отличалось также среднее значение количества вовлеченных лимфатических зон (по критериям GHSG (German Hodgkin Study Group, Германская группа по изучению лимфомы Ходжкина)) – 3,9 против 4,4, но эта разница не была статистически значимой.

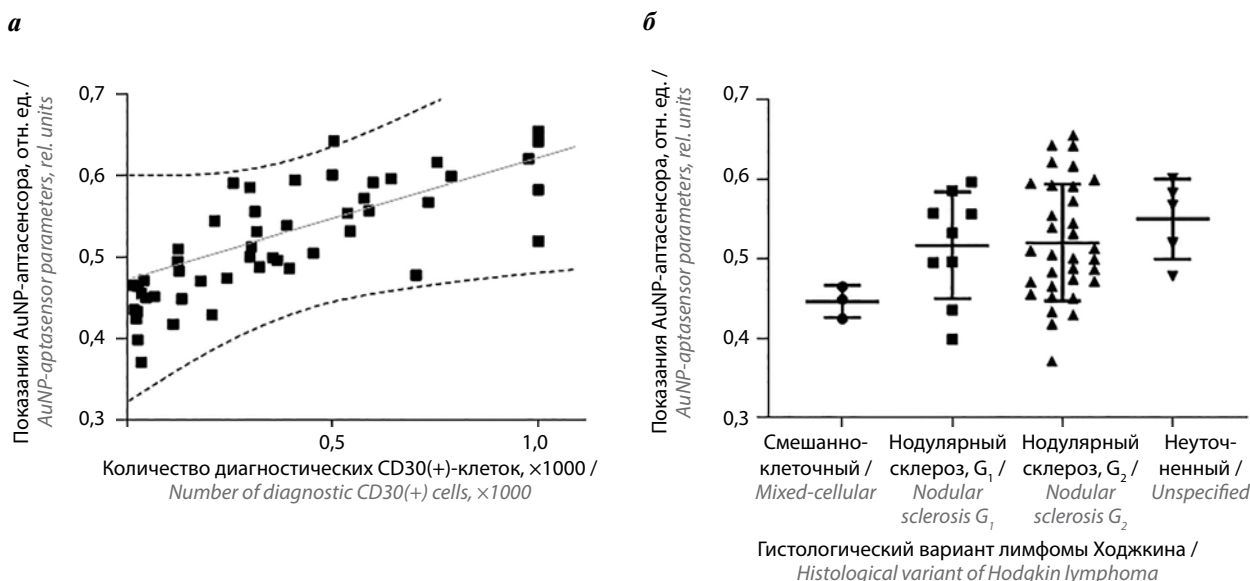


Рис. 2. Результаты сопоставления данных морфологического исследования и показателей AuNP-аптасенсора: а – корреляция количества диагностических CD30-положительных (CD30(+))–клеток, подсчитанных в участках hot spot при морфологическом анализе материала биопсии пораженных лимфатических узлов, и концентрации CD30(+)-внеклеточных нановезикул в плазме (значение поглощения света 370 нм) у пациентов с лимфомой Ходжкина до начала терапии ($n = 55$) (коэффициент корреляции Пирсона $r = 0,77$; $p < 0,0005$); б – значения показателей AuNP-аптасенсора в группах образцов разных гистологических вариантов лимфомы Ходжкина

Fig. 2. Data comparison results of morphological study and AuNP-aptasensor parameters: а – correlation of diagnostic CD30-positive (CD30(+)) cells number counted in hot spots during morphological analysis of affected lymph nodes biopsy material, and plasma concentration of CD30(+) small extracellular vesicles (light absorption value 370 nm) in patients with Hodgkin lymphoma before therapy ($n = 55$) (Pearson correlation coefficient $r = 0.77$; $p < 0.0005$); б – values of AuNP-aptasensor parameters in samples of different histological variants of Hodgkin lymphoma

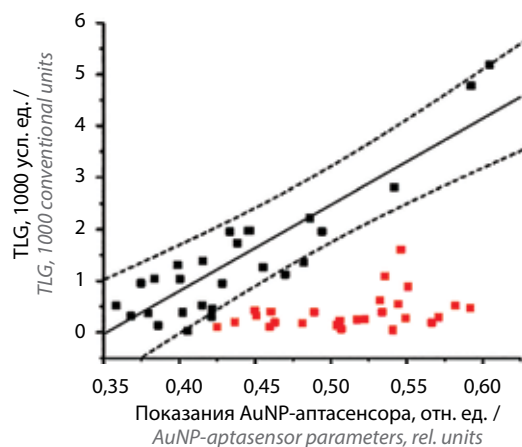


Рис. 3. Корреляция показателей суммарной метаболической активности опухоли (total lesion glycolysis, TLG) и концентрации CD30-положительных внеклеточных нановезикул в плазме (значение поглощения света 380 нм) у пациентов с лимфомой Ходжкина до начала терапии (n = 55). Черные точки — группа пациентов, для которых наблюдалась корреляция этих параметров (коэффициент корреляции Пирсона $r = 0,9$), красные точки — группа пациентов, у которых исследуемые параметры не коррелировали

Fig. 3. Correlation of total lesion glycolysis (TLG) and plasma concentration of CD30-positive small extracellular vesicles (light absorption value 380 nm) in patients with Hodgkin lymphoma before therapy (n = 55). Black dots — a group of patients for whom a correlation of these parameters was observed (Pearson correlation coefficient $r = 0,9$), red dots — a group of patients in whom the studied parameters did not correlate

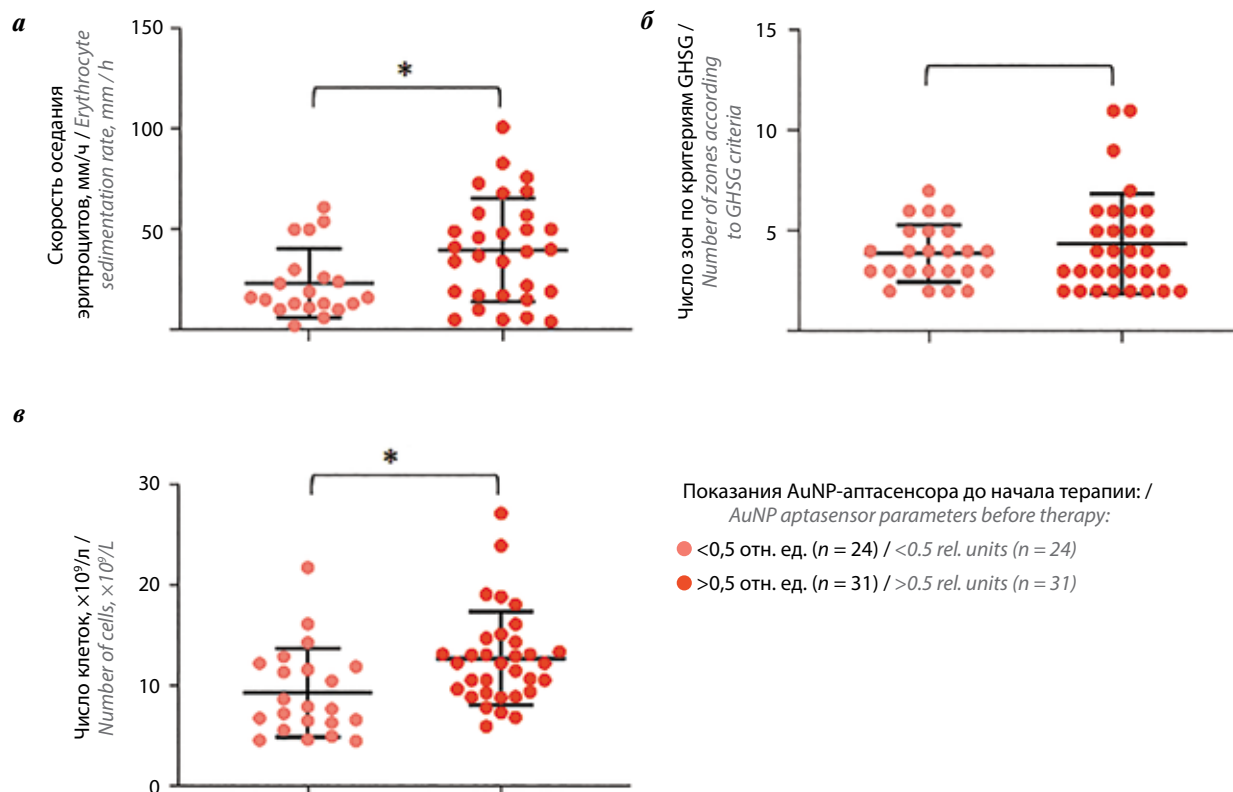


Рис. 4. Сравнение биохимических и клинических показателей пациентов с относительно высокой и низкой концентрацией CD30-положительных внеклеточных нановезикул в плазме: а — скорость оседания эритроцитов; б — количество вовлеченных в патологический процесс лимфатических зон; в — количество циркулирующих лейкоцитов. *Статистически значимые различия. GHSG — Германская группа по изучению лимфомы Ходжкина

Fig. 4. Comparison of biochemical and clinical parameters of patients with relatively high and low plasma concentrations of CD30-positive small extracellular vesicles: а — erythrocyte sedimentation rate; б — the number of lymphatic zones involved in the pathological process; в — number of circulating leukocytes. *Statistically significant differences. GHSG — German Hodgkin Study Group

Снижение концентрации CD30(+)-ВНВ после 2 циклов ПХТ. Повторное исследование концентрации CD30(+)-ВНВ в плазме у всех пациентов было проведено после завершения 2-го цикла ПХТ. Как и ожидалось с учетом результатов пилотного исследования [11], у всех пациентов после 2 циклов ПХТ наблюдалось отчетливое снижение измеряемого параметра. На рис. 5, а представлены результаты 2 измерений, проведенных с помощью AuNP-аптасенсора: красные линии отражают спектр поглощения реакционной смеси, содержащей ВНВ плазмы, до начала ПХТ, серые линии — результаты, полученные после 2 первых циклов. Высота пика (интенсивность поглощения AuNP-аптасенсором излучения с длиной волны 370 нм) отражает количество CD30(+)-ВНВ. В целях более объективной оценки результатов были подсчитаны средние значения для всех пациентов до начала ПХТ и после нее (рис. 5, б), при этом разница между группами (до и после ПХТ) оказалась статистически значимой ($p < 0,005$).

После получения результатов описательного характера была сделана попытка провести оценку эффекта ПХТ с помощью разработанного критерия путем определения степени роста/снижения концентрации CD30(+)-ВНВ. Степень изменения концентрации

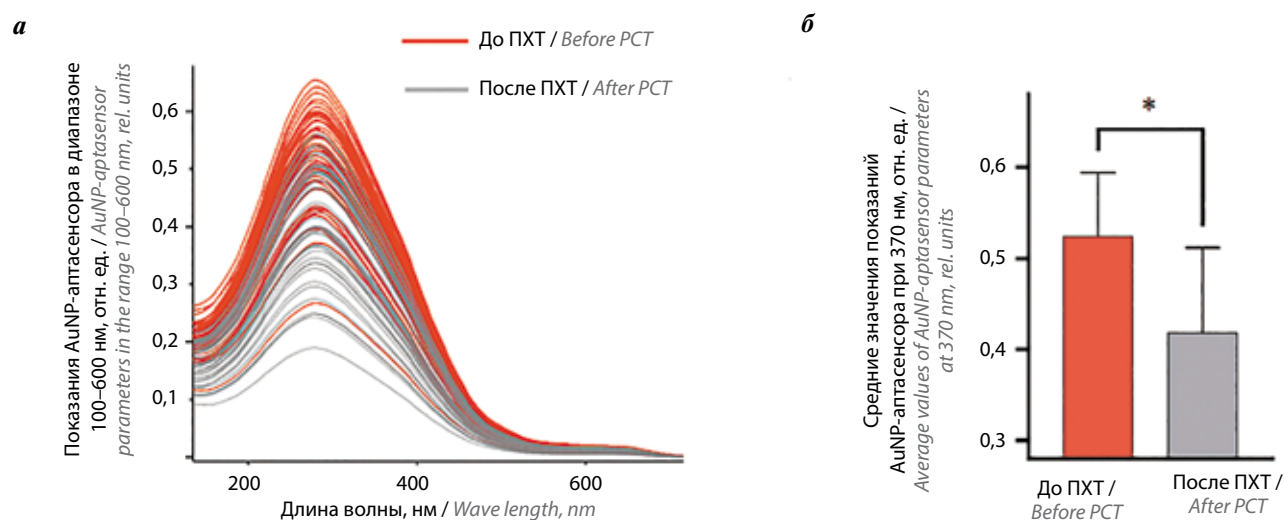


Рис. 5. Эффект 2 циклов полихимиотерапии (ПХТ) на концентрацию CD30-положительных внеклеточных нановезикул в плазме пациентов с лимфомой Ходжкина. Измерение проведено с помощью AuNP-аптасенсора. Результаты анализа образцов внеклеточных нановезикул плазмы до начала ПХТ представлены красным цветом, после завершения 2-го цикла ПХТ – серым: а – результаты измерения спектра поглощения света реакционной смесью в диапазоне 100–700 нм, проведенного для всех образцов (n = 55); б – результаты измерения поглощения света 370 нм; представлены средние значения и стандартные отклонения для всех образцов до начала терапии (n = 55) и после завершения 2-го цикла (n = 55). *Статистически значимые различия между 2 сравниваемыми группами (критерий Манна–Уитни $p < 0,005$)

Fig. 5. Effect of 2 polychemotherapy (PCT) cycles on CD30-positive small extracellular vesicles plasma concentration in patients with Hodgkin lymphoma. The measurement was carried out using an AuNP aptasensor. The results of plasma small extracellular vesicles before PCT are presented in red, after completion of the 2nd PCT cycle – in gray: a – results of light absorption spectrum of the reaction mixture in the range of 100–700 nm, carried out for all samples (n = 55); б – results of measuring light absorption at 370 nm; means and standard deviations are presented for all samples before therapy (n = 55) and after completion of the 2nd cycle (n = 55). *Statistically significant differences between the 2 compared groups (Mann–Whitney test $p < 0.005$)

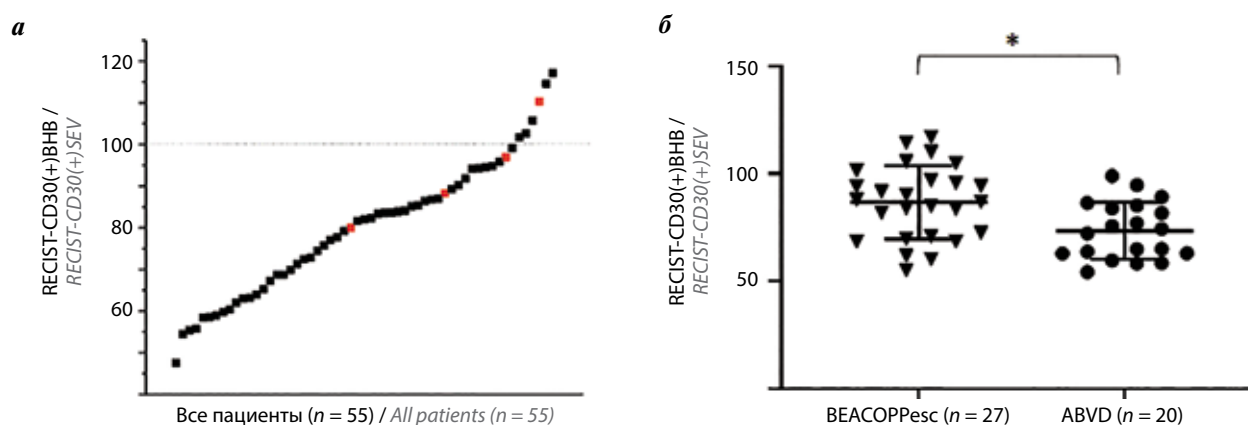


Рис. 6. Оценка эффекта 2 циклов полихимиотерапии на концентрацию CD30-положительных внеклеточных нановезикул (CD30(+)BHB) в плазме путем вычисления параметра $RECIST-CD30(+)BHB = AuNP(2) \times 100 / AuNP(1)$, где 100 – отсутствие изменений концентрации CD30(+)BHB после проведения 2 циклов полихимиотерапии: а – результат всех пациентов в порядке возрастания концентрации CD30(+)BHB; красным отмечены пациенты с ранним рецидивом лимфомы Ходжкина; б – сравнение пациентов, получивших лечение по схемам BEACOPPesc (блеомицин, этопозид, доксорубин, циклофосфамид, винкристин, преднизолон, прокарбазин) (n = 27) и ABVD (доксорубин, блеомицин, винбластин, дакарбазин) (n = 20). *Статистически значимые различия между 2 сравниваемыми группами (критерий Манна–Уитни $p < 0,005$)

Fig. 6. Effect of 2 polychemotherapy (PCT) cycles on CD30-positive small extracellular vesicles (CD30(+)SEV) plasma concentration based on calculation of $RECIST-CD30(+)SEV = AuNP(2) \times 100 / AuNP(1)$ parameter, where 100 is no change in CD30(+)SEV concentration after 2 PCT cycles: a – the result of all patients in increasing order of CD30(+)SEV concentration; patients with early relapse of Hodgkin lymphoma are marked in red; б – comparison of patients who received BEACOPPesc (bleomycin, etoposide, doxorubicin, cyclophosphamide, vincristine, prednisolone, procarbazine) (n = 27) and ABVD (doxorubicin, bleomycin, vinblastine, dacarbazine) (n = 20) regimens. *Statistically significant differences between the 2 compared groups (Mann–Whitney test $p < 0.005$)

CD30(+)BHB была выражена в процентах от исходного значения для каждого пациента по аналогии с методом оценки ответа солидных опухолей на системную терапию (Response Evaluation Criteria In Solid Tumors, RECIST) и обозначена как «RECIST-CD30(+)BHB» (рис. 6). Такой подход позволил нивелировать разницу

в непосредственных (абсолютных) показателях концентрации CD30(+)BHB в группе пациентов и выполнить сравнительную оценку эффекта проведенной ПХТ.

На рис. 6, а представлены данные всех пациентов, включенных в исследование, в порядке роста концентрации CD30(+)BHB, «остаточной» после завершения

2-го цикла ПХТ. Видно, что этот показатель изменяется в диапазоне от 47,5 до 117,2 %, причем в большинстве случаев ($n = 49$) ПХТ привела к относительному снижению концентрации CD30(+)ВНВ, но у 6 пациентов наблюдался рост концентрации CD30(+)ВНВ, несмотря на лечение, эффективность которого была подтверждена данными ПЭТ/КТ.

Мы не смогли выявить каких-либо особенностей статуса пациентов, которые бы коррелировали с эффектом ПХТ на концентрацию CD30(+)ВНВ в плазме. Ранний рецидив заболевания наблюдался у 4 пациентов, показатель RECIST-CD30(+)ВНВ у них оказался выше среднего значения (см. рис. 6, а, красный цвет), т. е. в этих случаях терапия не привела к существенному снижению концентрации CD30(+)ВНВ, а в 1 случае концентрация CD30(+)ВНВ увеличилась. Допустив, что воздействие ПХТ на CD30(+)–клетки HRS может изменять активность секреции ими ВНВ, мы сравнили значение показателя RECIST-CD30(+)ВНВ в группах пациентов, получивших 2 цикла BEACOPPesc, и пациентов, получивших 2 цикла ABVD. Это сравнение выявило статистически значимую разницу: режим ABVD приводил к более выраженному снижению концентрации CD30(+)ВНВ в плазме (см. рис. 6, б). Этот феномен может отражать как исходно более тяжелый статус пациентов, для которых был выбран более агрессивный режим BEACOPPesc, так и реальную разницу между эффектом, который оказывают 2 режима терапии на метаболическую активность и/или интенсивность секреции клетками CD30(+)ВНВ.

Обсуждение

Представленные результаты указывают на взаимосвязь между количеством CD30(+)ВНВ в плазме пациентов с ЛХ и рядом стандартных диагностических показателей: количеством CD30(+)–клеток в ткани пораженных ЛУ, показателем суммарной метаболической активности опухоли (TLG), количеством вовлеченных в патологический процесс зон ЛУ, скоростью оседания эритроцитов и количеством циркулирующих лейкоцитов. Непосредственный механизм каждой из описанных корреляций требует дополнительного изучения. Как минимум полученные данные подтверждают диагностический потенциал CD30(+)ВНВ. Кроме этого, было выявлено снижение концентрации CD30(+)ВНВ в плазме после 2 циклов ПХТ, причем этот эффект был более выражен у пациентов, получивших лечение по схеме ABVD, чем у пациентов, пролеченных по схеме BEACOPPesc.

Полученные результаты прежде всего указывают на перспективы использования везикулярных технологий для создания новых методов так называемой жидкостной биопсии, применимых для динамического наблюдения и/или прогнозирования течения заболевания у пациентов с ЛХ. Поиск новых маркеров и совершенствование аналитических технологий, безусловно, определяют возможность создания иннова-

ционных диагностических методов, но особое значение имеет формирование концепции участия ВНВ в патогенезе ЛХ. Понимание патологической роли ВНВ вообще и CD30(+)ВНВ в частности представляется необходимым условием для разработки клинически обоснованных диагностических и/или лечебных технологий.

Например, в экспериментах *in vitro* было показано, что воздействие ВНВ, секретируемых клетками HRS, на фибробласты стимулирует миграционный потенциал последних, активирует продукцию фибробластами провоспалительных цитокинов (интерлейкинов 1 α , 6, фактора некроза опухоли α) и факторов роста (гранулоцитарно- и гранулоцитарно-макрофагального колониестимулирующих факторов, фактора роста эндотелия сосудов) и в целом ведет к формированию специфического фенотипа так называемых опухоль-ассоциированных фибробластов [16]. В другом исследовании была описана роль CD30(+)ВНВ и свободной формы CD30 в формировании механизмов патологического взаимодействия клеток HRS и различных иммунных клеток [17]. Эти данные указывают на участие ВНВ, секретируемых клетками HRS, в процессе развития и прогрессии ЛХ, что определяет целесообразность использования таких везикул в качестве диагностических маркеров.

На основе представления об участии CD30(+)ВНВ в патогенезе ЛХ логично предполагать, что эти везикулы или их компоненты (белки или нуклеиновые кислоты) могут иметь диагностический или прогностический потенциал. Например, группой итальянских исследователей под руководством проф. Valli De Re (Centro di Riferimento Oncologico, Италия) были идентифицированы белки, которыми «обогащены» ВНВ пациентов с высоким риском рецидива (например, транстиретин), и белки, содержание которых в ВНВ таких пациентов снижено (например, компонент системы комплемента C4b, γ -цепь фибриногена) [10]. Серия работ, проведенных под руководством проф. Michiel Pegtel (VU University Medical Center, Амстердам), выявила корреляцию концентрации ряда молекул микроРНК (miR-24-3p, -127-3p, -21-5p, -155-5p и let7a-5p) в ВНВ плазмы с эффектом ПХТ, который был оценен традиционным методом ПЭТ/КТ [18, 19]. Эти данные согласуются с нашими результатами с той существенной технологической разницей, что AuNP-аптасенсор предполагает анализ специфической ЛХ-ассоциированной фракции ВНВ, а в цитируемых работах был проведен анализ отдельных «маркерных» молекул в составе всех везикул плазмы. Интуитивно представляется, что патогенетическая связь CD30(+)ВНВ с ЛХ должна определять более высокий диагностический потенциал (специфичность и чувствительность) методов анализа этого маркера по сравнению с методами анализа молекул, концентрация которых оценивается в составе тотальной популяции везикул плазмы, а роль в развитии ЛХ не изучена. Однако это

предположение должно быть подтверждено экспериментально.

В дополнение к перспективам использования разработанной технологии в качестве метода оценки эффекта ПХТ и/или прогноза течения ЛХ определение концентрации CD30(+)ВНВ может иметь клинический интерес в случае применения лекарственных средств, таргетный характер которых обеспечивается путем конъюгации цитостатика и антитела к CD30. К этой группе препаратов относится, например, брентуксимаб ведотин, который тестируется в настоящее время в целях поиска оптимального «места» в стандартных лечебных схемах [20]. Активно развивается ряд других стратегий CD30-направленной терапии, включая анти-CD30-CAR-T (CAR – chimeric antigen receptor, химер-

ный антигенный рецептор) [21]. Во всех этих случаях CD30(+)ВНВ могут играть роль «ложных мишеней», снижая эффект терапии. Концентрация CD30(+)ВНВ в плазме может оказаться важным критерием отбора пациентов для любых вариантов CD30-направленной терапии.

Заключение

Оценка CD30(+)ВНВ с помощью AuNP-аптасенсора является перспективным методом оценки степени тяжести и мониторинга эффекта терапии у пациентов с ЛХ. Для оценки диагностического потенциала этого метода и определения области его применения в рамках современных алгоритмов лечения необходимо проведение масштабных многоцентровых исследований.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

- Weniger M.A., Küppers R. Molecular biology of Hodgkin lymphoma. *Leukemia* 2021;35(4):968–81. DOI: 10.1038/s41375-021-01204-6
- Santesteban-Espejo A., Bernal-Florindo I., Perez-Requena J. et al. The Need for standardization in next-generation sequencing studies for classic Hodgkin lymphoma: a systematic review. *Diagnostics* 2022;12(4):963. DOI: 10.3390/diagnostics12040963
- Aoki T., Chong L.C., Takata K. et al. Single-cell transcriptome analysis reveals disease-defining T-cell subsets in the tumor microenvironment of classic Hodgkin lymphoma. *Cancer Discov* 2020;10(3):406–21. DOI: 10.1158/2159-8290.CD-19-0680
- De Kanter J.K., Margaritis T., Beishuizen A. et al. Single-cell RNA sequencing reveals that childhood classical Hodgkin Lymphoma resembles normal inflammation except for T cell exhaustion. *Blood Cancer Discov* 2022;3:Abstract A37. DOI: 10.1158/2643-3249.LYMPHOMA22-A37
- Shi Y.K., Tao X.H., He Y. et al. Survival and prognosis analysis of patients with Hodgkin lymphoma treated with standard treatment paradigm. *Zhonghua Yi Xue Za Zhi* 2022;102(41):3295–303. DOI: 10.3760/cma.j.cn112137-20220420-00864
- Мерабишвили М.В. Выживаемость онкологических больных. Выпуск 2. Том I. СПб., 2011.
- Merabishvili M.V. Survival of cancer patients. Issue 2. Volume I. Saint Petersburg, 2011. (In Russ.).
- Мамедова А.А., Мочкин Н.Е., Саржевский В.О. и др. Комбинированная иммунохимиотерапия у больных рефрактерной/ рецидивирующей классической лимфомой Ходжкина как лечение 2-й линии перед аутологичной трансплантацией кроветворных стволовых клеток (предварительные результаты). *Онкогематология* 2022;17(3):40–7. DOI: 10.17650/1818-8346-2022-17-3-40-47
- Mamedova A.A., Mochkin N.E., Sarzhevskiy V.O. et al. Combined immunochemotherapy in patients with refractory/relapsed classical Hodgkin's lymphoma as a 2nd line treatment before autologous hematopoietic stem cell transplantation (preliminary results). *Onkogematologiya = Oncohematology* 2022;17(3):40–7. (In Russ.). DOI: 10.17650/1818-8346-2022-17-3-40-47
- Savino F.D., Rigali F., Giustini V. et al. Liquid biopsy in cancer: focus on lymphoproliferative disorders. *Cancers (Basel)* 2022;14(21):5378. DOI: 10.3390/cancers14215378
- Alcoceba M., García-Álvarez M., Chillón M.C. et al. Liquid biopsy: a non-invasive approach for Hodgkin lymphoma genotyping. *Br J Haematol* 2021;195(4):542–51. DOI: 10.1111/bjh.17719
- Repetto O., Lovisa F., Elia C. et al. Proteomic exploration of plasma exosomes and other small extracellular vesicles in pediatric Hodgkin lymphoma: a potential source of biomarkers for relapse occurrence. *Diagnostics* 2021;11(6):917. DOI: 10.3390/diagnostics11060917
- Slyusarenko M., Shalaev S., Valitova A. et al. AuNP Aptasensor for Hodgkin lymphoma monitoring. *Biosensors* 2022;12(1):23. DOI: 10.3390/bios12010023
- Boellaard R., O'Doherty M.J., Weber W.A. et al. FDG PET and PET/CT: EANM procedure guidelines for tumour PET imaging: version 1.0. *Eur J Nucl Med Mol Imaging* 2010;37(1):181–200. DOI: 10.1007/s00259-009-1297-4
- Slyusarenko M., Nikiforova N., Sidina E. et al. Formation and evaluation of a two-phase polymer system in human plasma as a method for extracellular nanovesicle isolation. *Polymers (Basel)* 2021;13(3):458. DOI: 10.3390/polym13030458
- Слюсаренко М.А., Сидина Е.И., Назарова И.В. и др. Способ выделения экзосом из плазмы крови. Патент RU 2 741 776 C1. 2021. Slyusarenko M.A., Sidina E.I., Nazarova I.V. et al. Method for isolation of exosomes from blood plasma. Patent RU 2 741 776 C1. 2021. (In Russ.).
- Hansen H.P., Trad A., Dams M. et al. CD30 on extracellular vesicles from malignant Hodgkin cells supports damaging of CD30 ligand-expressing bystander cells with Brentuximab-Vedotin, *in vitro*. *Oncotarget* 2016;7(21):30523–5. DOI: 10.18632/oncotarget.8864
- Dörsam B., Bösl T., Reiners K.S. et al. Hodgkin lymphoma-derived extracellular vesicles change the secretome of fibroblasts toward a CAF phenotype. *Front Immunol* 2018;9:1358. DOI: 10.3389/fimmu.2018.01358
- Hansen H.P., Engels H.M., Dams M. et al. Protrusion-guided extracellular vesicles mediate CD30 trans-signalling in the microenvironment of Hodgkin's lymphoma. *J Pathol* 2014;232(4):405–14. DOI: 10.1002/path.4306
- Drees E.E.E., Roemer M.G.M., Groenewegen N.J. et al. Extracellular vesicle miRNA predict FDG-PET status in patients with classical Hodgkin Lymphoma. *J Extracell Vesicles* 2021;10(9):e12121. DOI: 10.1002/jev.12121
- Van Eijndhoven M.A.J., Zijlstra J.M., Groenewegen N.J. et al. Plasma vesicle miRNAs for therapy response monitoring in Hodgkin lymphoma patients. *JCI Insight* 2016;1(19):e89631. DOI: 10.1172/jci.insight.89631
- Ueda N., Kato H., Kato S. et al. Brentuximab vedotin plus AVD followed by involved-node radiotherapy in a patient with classic Hodgkin lymphoma following gray zone lymphoma after autologous stem-cell transplantation failure. *Hematology* 2023;28(1):2207946. DOI: 10.1080/16078454.2023.2207946
- Veyri M., Spano J.P., Le Bras F. et al. CD30 as a therapeutic target in adult haematological malignancies: Where are we now? *Br J Haematol* 2023;201(6):1033–46. DOI: 10.1111/bjh.18841

Вклад авторов

К.Е. Кацуба: разработка и оптимизация технологии AuNP-аптасенсора, синтез наночастиц золота, выделение внеклеточных нановезикул из образцов плазмы, проведение измерений, анализ результатов, участие в написании текста статьи;
Л.А. Крамынин: подбор пациентов, сбор и анализ клинической информации, участие в написании текста статьи;
М.А. Слюсаренко: разработка и оптимизация технологии AuNP-аптасенсора, выделение внеклеточных нановезикул из образцов плазмы, проведение измерений, анализ результатов, участие в написании текста статьи и подготовка иллюстраций;
А.В. Шалаев: выделение внеклеточных нановезикул из образцов плазмы, проведение измерений;
В.В. Шаройко: разработка технологии, руководство работой по синтезу и анализу характеристик наночастиц золота;
А.А. Валитова: подготовка и анализ данных позитронно-эмиссионной томографии, совмещенной с компьютерной томографией;
А.С. Артемьева: морфологический анализ материала биопсий;
П.И. Крживицкий: разработка методологии, руководство работой по анализу данных позитронно-эмиссионной томографии, совмещенной с компьютерной томографией;
Л.В. Филатова: руководство работой по подбору пациентов, сбору и анализу клинической информации;
А.В. Малек: обзор публикаций по теме статьи, разработка дизайна исследования, анализ результатов, написание текста статьи.

Authors' contributions

K.E. Katsuba: development and optimization of AuNP aptasensor technology, synthesis of gold nanoparticles, isolation of small extracellular vesicles from plasma samples, measurements, analysis of results, article writing;
L.A. Kramynin: selection of patients, collection and analysis of clinical information, article writing;
M.A. Slyusarenko: development and optimization of AuNP-aptasensor technology, isolation of small extracellular vesicles from plasma samples, measurements, analysis of results, article writing and preparing illustrations;
A.V. Shalaev: isolation of small extracellular vesicles from plasma samples, measurements;
V.V. Sharoyko: development of technology, management of synthesis and analysis of gold nanoparticles characteristics;
A.A. Valitova: analysis of positron emission tomography combined with computed tomography data;
A.S. Artem'eva: morphological analysis of biopsy material;
P.I. Krzhivitskiy: development of methodology, management of positron emission tomography data analysis;
L.V. Filatova: management of patient selection, collection and analysis of clinical information;
A.V. Malek: review of publications on the article topic, study design development, analysis of the results, article writing.

ORCID авторов / ORCID of authors

К.Е. Кацуба / K.E. Katsuba: <https://orcid.org/0000-0002-7373-5206>
Л.А. Крамынин / L.A. Kramynin: <https://orcid.org/0000-0003-4542-8353>
М.А. Слюсаренко / M.A. Slyusarenko: <https://orcid.org/0000-0002-3677-1558>
А.В. Шалаев / A.V. Shalaev: <https://orcid.org/0000-0002-6148-6994>
В.В. Шаройко / V.V. Sharoyko: <https://orcid.org/0000-0002-3717-0471>
А.А. Валитова / A.A. Valitova: <https://orcid.org/0000-0002-1279-4667>
А.С. Артемьева / A.S. Artem'eva: <https://orcid.org/0000-0002-2948-397X>
П.И. Крживицкий / P.I. Krzhivitskiy: <https://orcid.org/0000-0002-6864-6348>
Л.В. Филатова / L.V. Filatova: <https://orcid.org/0000-0002-0728-4582>
А.В. Малек / A.V. Malek: <https://orcid.org/0000-0001-5334-7292>

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Conflict of interest. The authors declare no conflict of interest.

Финансирование. Работа выполнена при финансовой поддержке Минздрава России в рамках Государственного задания по теме «Разработка и клиническая апробация методов выделения, анализа и модификации состава циркулирующих нановезикул плазмы в целях персонализированного выбора и повышения эффективности стандартных режимов системной терапии онкологических заболеваний».

Funding. The work was carried out with financial support from the Russian Ministry of Health within the State assignment on the topic "Development and clinical testing of methods for isolating, analyzing and modifying the composition of circulating plasma nanovesicles for the purpose of personalized selection and efficacy increasing of standard regimens for oncological diseases therapy".

Соблюдение прав пациентов и правил биоэтики

Протокол исследования одобрен локальным этическим комитетом ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии им. Н.Н. Петрова» Минздрава России. Выписка из протокола № 28/28 от 28.01.2021.

Все пациенты подписали информированное согласие на участие в исследовании.

Compliance with patient rights and principles of bioethics

The study protocol was approved by the local ethics committee of N.N. Petrov National Medical Research Center of Oncology, Ministry of Health of Russia. Protocol No. 28/28 dated 28.01.2021.

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

Статья поступила: 16.09.2023. **Принята к публикации:** 25.10.2023.

Article submitted: 16.09.2023. **Accepted for publication:** 25.10.2023.