

DOI: 10.21294/1814-4861-2020-19-2-49-61
УДК: 616.19-006.6+577.112+57.088.2

Для цитирования: Тутанов О.С., Бакакина Ю.С., Проскура К.В., Григорьева А.Е., Сяхович В.Э., Беляев С.А., Рябчикова Е.И., Центалович Ю.П., Лактионов П.П., Тамкович С.Н. Поиск протеомных маркеров рака молочной железы в составе суммарных экзосом крови. Сибирский онкологический журнал. 2020; 19(2): 49-61. – doi: 10.21294/1814-4861-2020-19-2-49-61.

For citation: Tutanov O.S., Bakakina Y.S., Proskura K.V., Grigoryeva A.E., Syakhovich V.E., Beliaev S.A., Ryabchikova E.I., Tsentalovich Y.P., Laktionov P.P., Tamkovich S.N. Search for breast cancer proteomic markers in total blood exosomes. Siberian Journal of Oncology. 2020; 19(2): 49-61. – doi: 10.21294/1814-4861-2020-19-2-49-61.

ПОИСК ПРОТЕОМНЫХ МАРКЕРОВ РАКА МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ В СОСТАВЕ СУММАРНЫХ ЭКЗОСОМ КРОВИ

О.С. Тутанов¹, Ю.С. Бакакина^{2,3}, К.В. Проскура^{1,4}, А.Е. Григорьева¹,
В.Э. Сяхович², С.А. Беляев², Е.И. Рябчикова^{1,6}, Ю.П. Центалович⁵,
П.П. Лактионов¹, С.Н. Тамкович^{1,6}

ФГБУН Институт химической биологии и фундаментальной медицины
Сибирского отделения Российской академии наук, г. Новосибирск, Россия¹
Россия, 630090, г. Новосибирск, пр. Лаврентьева, 8. E-mail: s.tamk@niboch.nsc.ru¹
УЗ «Национальная антидопинговая лаборатория», Минский район, аг. Лесной, Республика Беларусь²
Республика Беларусь, 223040, Минский район, аг. Лесной, 31²
Институт биофизики и клеточной инженерии Национальной академии наук Беларуси,
г. Минск, Республика Беларусь³
Республика Беларусь, 220072, г. Минск, ул. Академическая, 27³
ГБУЗ Новосибирской области «Новосибирский областной клинический онкологический диспансер»,
г. Новосибирск, Россия⁴
Россия, 630108, г. Новосибирск, ул. Плеханова, 2⁴
ФГБУН Институт «Международный томографический центр» Сибирского отделения Российской
академии наук, г. Новосибирск, Россия⁵
Россия, 630090, г. Новосибирск, ул. Институтская, 3⁵
ФГАОУ ВО «Новосибирский национальный исследовательский государственный университет»,
г. Новосибирск, Россия⁶
Россия, 630090, г. Новосибирск, ул. Пирогова, 2⁶

Аннотация

Актуальность. Актуальной задачей повышения эффективности ранней диагностики онкологических заболеваний является поиск высокоспецифичных опухолевых маркеров в биологических жидкостях организма. Значительная часть экзосом ассоциирована с поверхностью форменных элементов крови, однако белковый спектр таких экзосом ранее не исследовался. Использование суммарных экзосом крови (экзосом плазмы и экзосом, ассоциированных с поверхностью клеток крови) может не только значительно повысить специфичность и чувствительность существующих методов, но и выявить новые онкомаркеры для жидкостной биопсии. **Цель работы** – поиск кандидатных белковых онкомаркеров рака молочной железы (РМЖ) путем сравнения 2D-протеомных карт суммарных экзосом крови здоровых женщин и больных РМЖ. **Материал и методы.** Экзосомы выделены из крови здоровых женщин и больных РМЖ методом ультрафильтрации с последующим ультрацентрифугированием и охарактеризованы при помощи трансмиссионной электронной микроскопии и иммуноцитохимии. Концентрацию белка в экзосомах определяли при помощи коммерческого набора NanoOrange Protein Quantitation kit (Invitrogen). Протеом экзосом исследован с помощью 2D-электрофореза с последующей идентификацией белков методом масс-спектрометрии. **Результаты.** Получены высокоочищенные препараты микровезикул суммарной крови размером не более 100 нм, на поверхности которых иммуноцитохимически были выявлены специфические для экзосом маркеры (CD63, CD9 и CD24). Сравнительный анализ протеомных карт экзосомальных белков здоровых женщин и больных РМЖ, полученных с помощью 2D-электрофореза, позволил установить значимые различия в уровне экспрессии и наборе белков в норме и патологии. Методом пептидного фингерпринта идентифицировано 11 перспективных протеомных маркеров РМЖ, из них LRG и γ -цепь FGB выявлены в составе экзосом впервые (согласно

базе Exocarta). Методом MALDI-TOF масс-спектрометрии идентифицировано 99 белков в препаратах экзосом крови здоровых женщин и больных РМЖ, из них 35 % выявлены в составе экзосом впервые (согласно базе Exocarta). В составе суммарных экзосом крови онкологических больных выявлено 17 (53 %) белков, ассоциированных с РМЖ. **Заключение.** Полученные результаты свидетельствуют о том, что суммарные экзосомы крови являются перспективным источником диагностического материала для поиска протеомных маркеров РМЖ. Идентифицированные протеомные онкомаркеры в их составе требуют дальнейшей валидации.

Ключевые слова: экзосомы, трансмиссионная электронная микроскопия, масс-спектрометрия, протеомные маркеры, рак молочной железы.

SEARCH FOR BREAST CANCER PROTEOMIC MARKERS IN TOTAL BLOOD EXOSOMES

O.S. Tutanov¹, Y.S. Bakakina^{2,3}, K.V. Proskura^{1,4}, A.E. Grigoryeva¹,
V.E. Syakhovich², S.A. Beliaev², E.I. Ryabchikova^{1,6}, Y.P. Tsentalovich⁵,
P.P. Laktionov¹, S.N. Tamkovich^{1,6}

Institute of Chemical Biology and Fundamental Medicine, Siberian Branch of Russian Academy of Sciences, Novosibirsk, Russia¹

8, Lavrentiev Ave., Novosibirsk, 630090, Russia. E-mail: s.tamk@niboch.nsc.ru¹

National Anti-Doping Laboratory, Minsk reg., Belarus²

31, Lesnoy str., Minsk reg., 223040, Belarus²

Institute of Biophysics and Cell Engineering, National Academy of Sciences of Belarus, Minsk, Belarus³

27, Akademicheskaya str., Minsk, 220072, Belarus³

Novosibirsk Regional Oncological Dispensary, Novosibirsk, Russia⁴

2, Plakhotnogo str., Novosibirsk, 630108, Russia⁴

Institute «International Tomographic Center», Novosibirsk, Russia⁵

3, Institutskaya str., Novosibirsk, 630090, Russia⁵

Novosibirsk State University, Novosibirsk, Russia⁶

2, Pirogova str., Novosibirsk, 630090, Russia⁶

Abstract

To improve early detection of cancer, search for tumor markers in biological fluids is of great importance. A significant portion of exosomes is associated with the surface of blood cells, however, the protein spectrum of such exosomes has not been previously studied. The use of total blood exosomes (plasma exosomes and exosomes associated with the surface of blood cells) can not only significantly increase the specificity and sensitivity of existing methods, but also suggest new tumor markers for liquid biopsy. **Objective.** Search for candidate protein tumor markers of breast cancer by comparing 2D-proteomic maps of total blood exosomes of healthy females (HFs) and breast cancer patients (BCPs). **Methods.** Exosomes were isolated from plasma and total blood of HFs and BCPs by ultrafiltration followed by ultracentrifugation and were characterized using transmission electron microscopy (TEM) and immunocytochemistry. Protein concentration in exosomes was determined using the NanoOrange Protein Quantitation kit (Invitrogen) commercial kit. Proteomes of exosomes were studied using 2D electrophoresis followed by protein identification by mass spectrometry. **Results.** Highly purified samples of vesicles from plasma and total blood of no more than 100 nm in size were obtained, on the surface of which markers specific for exosomes were detected by monoclonal antibodies CD9. A comparative analysis of the proteomic maps of exosomal proteins of the HFs and BCPs obtained by 2D-electrophoresis allowed us to establish significant differences in the expression level and protein set in normal and pathological conditions. The 11 proteomic markers of breast cancer were identified by the peptide fingerprint method, of which LRG и γ -chain FGB were detected in the composition of exosomes for the first time (according to the Exocarta database). Using MALDI-TOF mass spectrometry, 99 proteins were identified in the exosome preparations of the blood of HFs and BCPs, of which 35% were detected in the composition of the exosomes for the first time (according to the Exocarta database). 17 (53%) proteins associated with breast cancer were detected in total blood exosomes of cancer patients. **Conclusion.** The results obtained indicate that total blood exosomes are a promising source of diagnostic material for the search for proteomic markers of breast cancer. The identified proteomic tumor markers require further validation.

Key words: exosomes, transmission electron microscopy, mass-spectrometry, proteomic markers, breast cancer.

Введение

Рак молочной железы (РМЖ) занимает первое место среди онкологических заболеваний женщин. Заболеваемость и смертность от него продолжают неуклонно возрастать во всех странах мира, в связи с чем проблема рака молочной железы приобретает социальное значение. Применение современных методов лечения позволяет в 96 % добиться 5-летней выживаемости при РМЖ I стадии [1]. Однако у значительного числа больных диагностируется распространенный рак молочной железы. В ряде исследований продемонстрирована эффективность маммографии при раннем выявлении РМЖ, однако критики метода указывают на высокую частоту ложнонегативных и ложнопозитивных результатов [1]. Таким образом, актуальной проблемой молекулярной медицины является разработка раннего неинвазивного диагностического метода, обеспечивающего выявление РМЖ на асимптоматической стадии.

В настоящее время ведутся разработки новых методов ранней диагностики рака, в том числе на основе анализа содержимого циркулирующих в крови экзосом [2]. К экзосомам относят внеклеточные везикулы диаметром 30–100 нм, секретируемые различными клетками во внеклеточное пространство [3]. В биологических жидкостях экзосомы являются стабильными структурами, при этом они несут уникальные белковые маркеры продуцирующих их клеток [2, 3], что определяет интерес к этим везикулам как к источнику диагностической информации [2, 4]. Действительно, анализ белкового состава циркулирующих в крови онкологических больных экзосом является перспективным направлением поиска опухолевоспецифических маркеров злокачественных новообразований [5]. Несомненным преимуществом исследования протеома экзосом является возможность удалить мажорные белки плазмы крови и повысить концентрацию опухолевоспецифических белков, в том числе и мембранных. Белки экзосом составляют менее 0,01 % общего протеома плазмы [6], и этого достаточно как для составления протеомных карт, так и для идентификации экзосомальных протеомных маркеров при помощи масс-спектрометрии.

Поскольку ранее было показано, что для осуществления межклеточной коммуникации экзосомы связываются с поверхностью клеток [7], мы предположили, что экзосомы могут быть связаны и с форменными элементами крови. Действительно, в пилотном исследовании нами получены данные о наличии экзосом на поверхности форменных элементов крови [8].

Целью исследования явился поиск кандидатных белковых онкомаркеров рака молочной железы путем сравнения 2D-протеомных карт суммарных экзосом крови здоровых женщин и больных РМЖ.

Материал и методы

Образцы крови 6 здоровых женщин, средний возраст 44 ± 4 года, были получены из Центральной клинической больницы СО РАН и 8 первичных больных РМЖ T1–2N0M0 – из Новосибирского областного онкологического диспансера (табл. 1). Исследование проводили с соблюдением принципов добровольности и конфиденциальности в соответствии с Основами законодательства РФ об охране здоровья граждан. Образцы крови после забора путем венепункции в вакутейнеры, содержащие K_2EDTA , хранили при $4^\circ C$ и обрабатывали в течение ближайшего часа.

Суммарные экзосомы выделяли из крови здоровых женщин и больных РМЖ путем ультрафильтрации с последующим ультрацентрифугированием. В частности, к образцу крови объемом 4,5 мл добавляли равный объем буфера, элюирующий экзосомы, ассоциированные с форменными элементами [9], и инкубировали на ротационной мешалке 10 об/мин в течение 5 мин при комнатной температуре. Форменные элементы осаждали центрифугированием в течение 20 мин при 290 g и $4^\circ C$, супернатант повторно центрифугировали в течение 20 мин при 1 200 g и $4^\circ C$. Для удаления клеточного дебриса образцы плазмы центрифугировали при 17 000 g $4^\circ C$ в течение 20 мин. Для удаления везикул размером более 100 нм супернатант разводили в 3 раза фосфатно-солевым буфером (10 mM фосфатный буфер, 0,15 M NaCl, pH 7,5) (ФБ) и фильтровали через фильтр с диаметром пор 100 нм (Minisart high flow, 16553-K, Sartorius). Экзосомы осаждали ультрацентрифугированием (100 000 g, 90 мин, $4^\circ C$), осадок ресуспендировали в 10 мл ФБ и дважды ультрацентрифугировали при тех же условиях. Экзосомы ресуспендировали в 200 мкл ФБ, замораживали в жидком азоте и хранили при $-80^\circ C$.

Для негативного контрастирования экзосомы сорбировали на медные сетки с формваровой подложкой, стабилизированной углеродом, в течение 1 мин и 10 сек контрастировали 2 % раствором фосфорно-вольфрамовой кислоты.

Для выявления специфических маркеров к 10 мкл суспензии экзосом добавляли 10 мкл 0,5 % бычьего сывороточного альбумина в ФБ, вносили по 3 мкл (100 мкг/мл) моноклональных антител к рецептору CD9 (Abcam) и инкубировали в течение 18 ч на шейкере Elpan 358S, затем сорбировали на сетки. Далее сетки промывали ФБ и инкубировали 2 ч с конъюгатом белка А и наночастиц золота во влажной камере при комнатной температуре, затем промывали ФБ в течение 2 мин и контрастировали фосфорно-вольфрамовой кислотой в течение 10 сек.

Подготовленные сетки изучали в просвечивающем электронном микроскопе JEM 1400 (Jeol, Japan) при ускоряющем напряжении 80 кВ. Изображения получали с помощью цифровой фотока-

меры Veleta (EM SIS, Germany). Размеры структур измеряли на мониторе цифровой фотокамеры с помощью программы iTEM (EM SIS, Germany).

Для оценки концентрации белка экзосом использовали коммерческий набор NanoOrange Protein Quantitation kit (Invitrogen) в соответствии с рекомендациями производителя.

Для гель-электрофоретического разделения белки экзосом осаждали смесью хлороформа с метанолом (1:4). Для этого к 100 мкл экзосом добавляли 300 мкл деионизированной воды, 400 мкл метанола, 100 мкл хлороформа, тщательно перемешивали и центрифугировали при 14 000 g в течение 1 мин. Затем верхнюю водно-метанольную фазу отделяли, вносили 400 мкл метанола, тщательно перемешивали и центрифугировали при 20 000 g в течение 15 мин. Осадок высушивали на воздухе при комнатной температуре и растворяли в буфере для 2D-электрофореза [8].

Для получения протеомных карт экзосом использовали метод 2D-электрофореза [10]. Разделение белков методом 2D-электрофореза проводили с использованием стрипов с иммобилизованным градиентом (IPG-стрипы, 7 см), pH 4-7 (Bio-Rad Laboratories, США), как было описано ранее [8]. В качестве стандартной смеси белков для определения масс и pI использовали набор маркеров для 2D-электрофореза «Markers for Two Dimensional Electrophoresis» (1789 кДа, pI-спектр 7,6–3,8, Sigma). Визуализацию белковых пятен в гелях после завершения второго направления 2D-электрофореза осуществляли методом окрашивания нитратом серебра тиосульфатом натрия [11].

Для анализа окрашенные серебром гели сканировали с разрешением 300 точек на дюйм при помощи калибровочного денситометра GS-800 (Bio-Rad Laboratories, США) и статистически анализировали с использованием программного обеспечения PDQuest (version 8.0, Bio-Rad Laboratories, США). Анализ белковых пятен состоял из следующих этапов: вычисление относительного объема белковых пятен, рассчитанного как отношение выраженной в пикселях интенсивности пятна к суммарной интенсивности всех пятен на геле; выравнивание гелей; сопоставление белковых пятен. Достоверность полученных результатов оценивали по t-критерию Стьюдента при $p < 0,05$.

Для масс-спектрометрической идентификации белков экзосом, по которым наблюдались отличия между исследуемыми группами, проводили их подготовку: вырезание из геля, деокрашивание от нитрата серебра, восстановление дисульфидных связей в молекуле белка и алкилирование остатков цистеина, расщепление белков на пептиды трипсином непосредственно в геле, экстракция пептидов из геля, очистка от солей и детергентов и концентрирование пептидов с помощью технологии ZipTip (фирмы «Milipore», США) согласно протоколу фирмы-производителя. Раз-

деление полученных в результате триптического гидролиза пептидов проводили методом ВЭЖХ с использованием высокоэффективного жидкостного хроматографа Agilent 1290 Infinity LC System (фирмы «Agilent Technologies», Inc., США). Масс-спектрометрическую детекцию осуществляли на квадруполь-времяпролетном масс-спектрометре высокого разрешения Agilent 6550 iFunnel Q-TOF (фирмы «Agilent Technologies», Inc., США).

Для определения первичной последовательности экзосомальных белков, препаративные количества белков разделяли при помощи 10–20 % SDS-диск электрофореза и окрашивали при помощи Кумасси R-250 (Sigma, USA). Фрагменты ПААГ, содержащие исследуемые белки, отмывали от Кумасси R-250 и SDS и подвергали трипсинолизу, как было описано ранее [12]. Пептидные фрагменты белков экстрагировали из геля, концентрировали и обессоливали на микроколонках C18 ZipTips (фирмы «Milipore», США). Смесь пептидов элюировали с микроколонки на мишень приборной пластины насыщенным раствором матрикса.

Получение и регистрацию масс-спектров производили на tandemном времяпролетном масс-спектрометре MALDI-TOF autoflex speed series LIFT («Bruker Daltonics», ФРГ). Идентификацию белков проводили путём поиска соответствующих кандидатов в аннотированных базах данных NCBI и SwissProt с использованием программы Mascot (Matrix Science Ltd., London, www.matrixscience.com/search_form_select.html), как было описано ранее [12]. Анализ идентифицированных белков проводили по методике Q. Yang et al. [13].

Результаты

Для поиска кандидатных белковых онкомаркеров РМЖ на первом этапе работы были сформированы группы клинически здоровых женщин и первичных больных РМЖ, выделены и охарактеризованы суммарные экзосомы крови.

Для подтверждения экзосомальной природы выделенных микровезикул «Обществом по изучению внеклеточных везикул» рекомендованы оценка размера и выявление экзосомальных мембранных или цитозольных белков [14]. Сочетание ультрафильтрации и двойного ультрацентрифугирования позволяет получить препараты везикул без примесей частиц более 100 нм, а форма и размер этих везикул соответствуют характеристикам экзосом, выделенных из других биологических жидкостей [15, 16]. В полученных нами препаратах основная часть везикул из крови здоровых женщин и онкологических больных имела размеры 40–100 нм и морфологические характеристики экзосом (рис. 1). Содержание везикул с поврежденной мембраной в препаратах не превышало 10 %, доля микровезикул (размером менее 30 нм) составила не более 15 %.

Для характеристики экзосом в текущей работе были использованы антитела к рецепторам семей-

ства тетраспанинов CD9, которые опосредуют адгезию экзосом на поверхности клетки-реципиента и являются обязательным структурным компонентом мембраны экзосом [14]. Практически все суммарные экзосомы крови связывались с антителами к CD9, частицы золота выявлялись на их поверхности (рис. 1).

Для сравнительного анализа протеома суммарных экзосом крови здоровых женщин и больных РМЖ были получены 2D-протеомные карты (по три 2D-электрофореграммы/образец) (рис. 2). Было установлено, что в составе экзосом присутствуют белки с молекулярной массой от 10 до 250 кДа. Наиболее значимые различия между протеомными картами суммарных экзосом крови здоровых женщин и больных РМЖ были найдены в одиннадцати областях электрофоретической карты. Выявленные различия заключались в появлении/исчезновении белков и изменении экспрессии

присутствующих в норме белков. В частности, наблюдалось появление белковых пятен (области 2, 9) и исчезновение пятна (область 1 (II)) при РМЖ. Белковые пятна (области 1 (I), 3, 4, 5, 6, 7, 8, 10, 11) имели больший относительный объем на протеомных картах больных РМЖ по сравнению с контрольной группой (рис. 2).

Идентифицированные при помощи пептидно-го фингерпринта экзосомальные белки наиболее отличающихся 11 областей протеомных карт представлены в табл. 2. Ранее в составе экзосом методом масс-спектрометрии уже были обнаружены 11 из 13 (85 %) идентифицированных нами белков, они аннотированы в базе данных Exocarta (www.exocarta.org). Лейцин-богатый γ -2-гликопротеин (LRG) и α -цепь фибриногена (FGB) обнаружены нами в составе экзосом впервые.

Ранее методом MALDI-TOF масс-спектрометрии были идентифицированы 54 и 45 белков в препара-

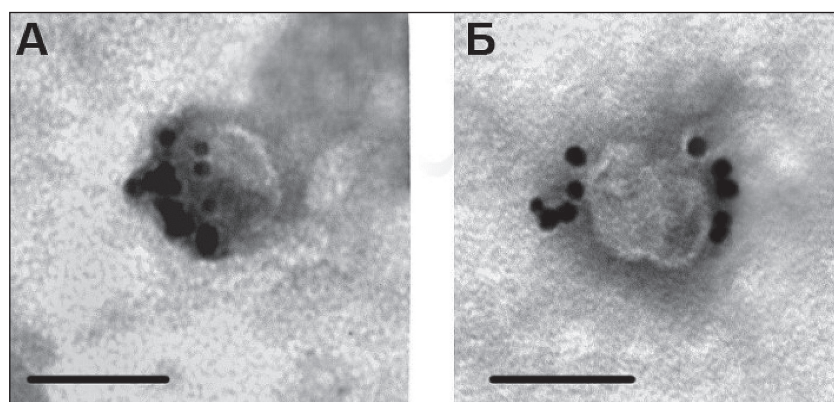


Рис. 1. Морфологическая характеристика суммарных экзосом, выделенных из крови здоровых женщин (а) и больных РМЖ (б). Экзосомы мечены антителами к рецептору CD9. Длина масштабной линии соответствует 100 нм. Трансмиссионная электронная микроскопия, негативное контрастирование фосфорновольфрамовой кислотой

Fig. 1. Morphological characteristics of total exosomes isolated from the blood of healthy women (a) and patients with breast cancer (b). Exosomes are labeled with antibodies to the CD9 receptor. The length of the scale line corresponds to 100 nm. Transmission electron microscopy, negative contrast with phosphoric tungsten acid

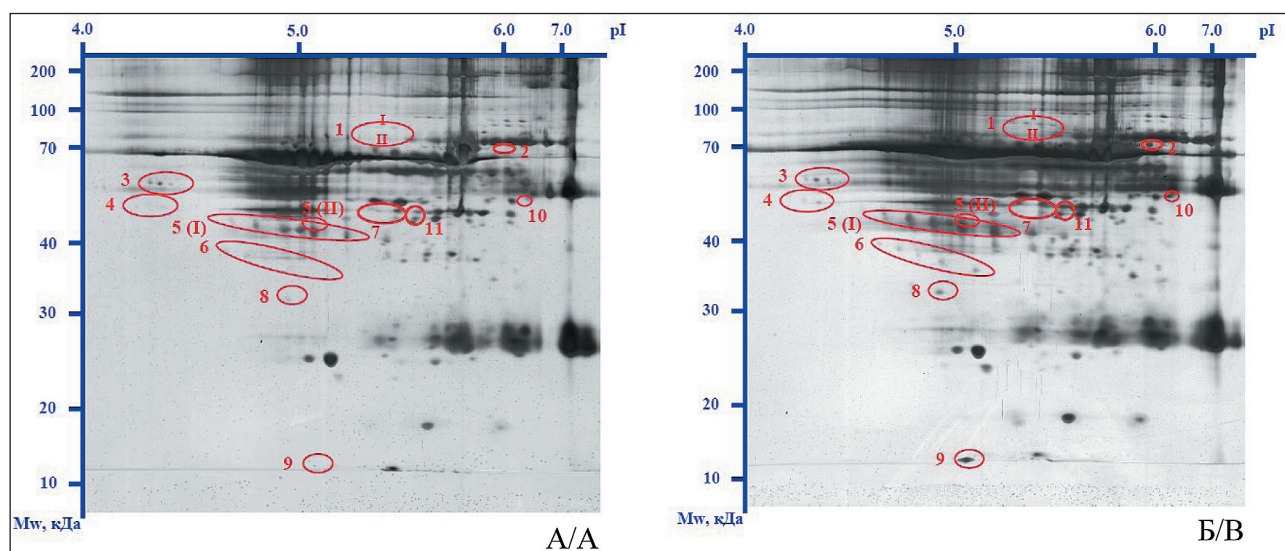


Рис. 2. Типичные протеомные карты суммарных экзосом крови здоровых женщин (а) и больных раком молочной железы (б). Двумерная электрофореграмма окрашена серебром. По оси абсцисс – изоэлектрическое фокусирование, по оси ординат – SDS-ПААГ-электрофорез. Молекулярные массы белков в кДа приведены слева. В окружности заключены белки, по относительному объему и наличию которых наблюдались отличия между исследуемыми группами

Fig. 2. Typical proteomic maps of the total blood exosomes of healthy women (a) and patients with breast cancer (b). Two-dimensional electrophoregram is painted silver. The abscissa axis is isoelectric focusing, the ordinate axis is SDS-PAGE electrophoresis. Molecular weights of proteins in kDa are given on the left. In the circle are proteins, according to the relative volume and presence of which differences were observed between the studied groups

Таблица 1/ Table 1

Характеристика больных РМЖ

Characteristics of patients with breast cancer

Параметр/Parameter		Количество больных/ Number of patients
Люминальный подтип/Luminal subtype		6 (75 %)
Трижды-негативный подтип/ Triple negative subtype		2 (25 %)
Ki67	10–15 %	8 (100 %)
	T1	4 (50 %)
	T2	4 (50 %)
Стадия/ Tumor stage	N0	8 (100 %)
	M0	8 (100 %)
	II	8 (100 %)
Степень злокачественности/ Tumor grade		II

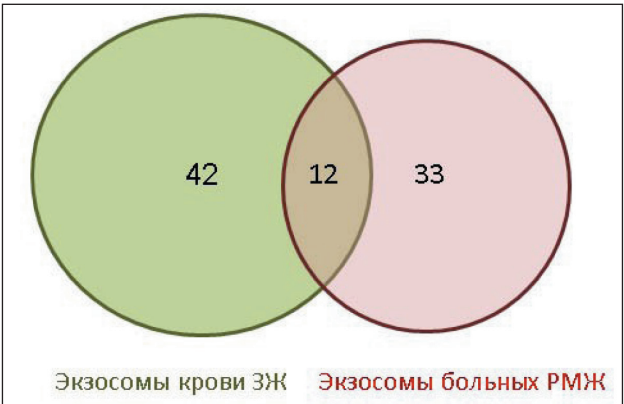


Рис 3. Диаграмма Венна – Эйлера идентифицированных белков суммарных экзосом крови
Fig. 3. Venn-Euler diagram of identified proteins of total blood exosomes

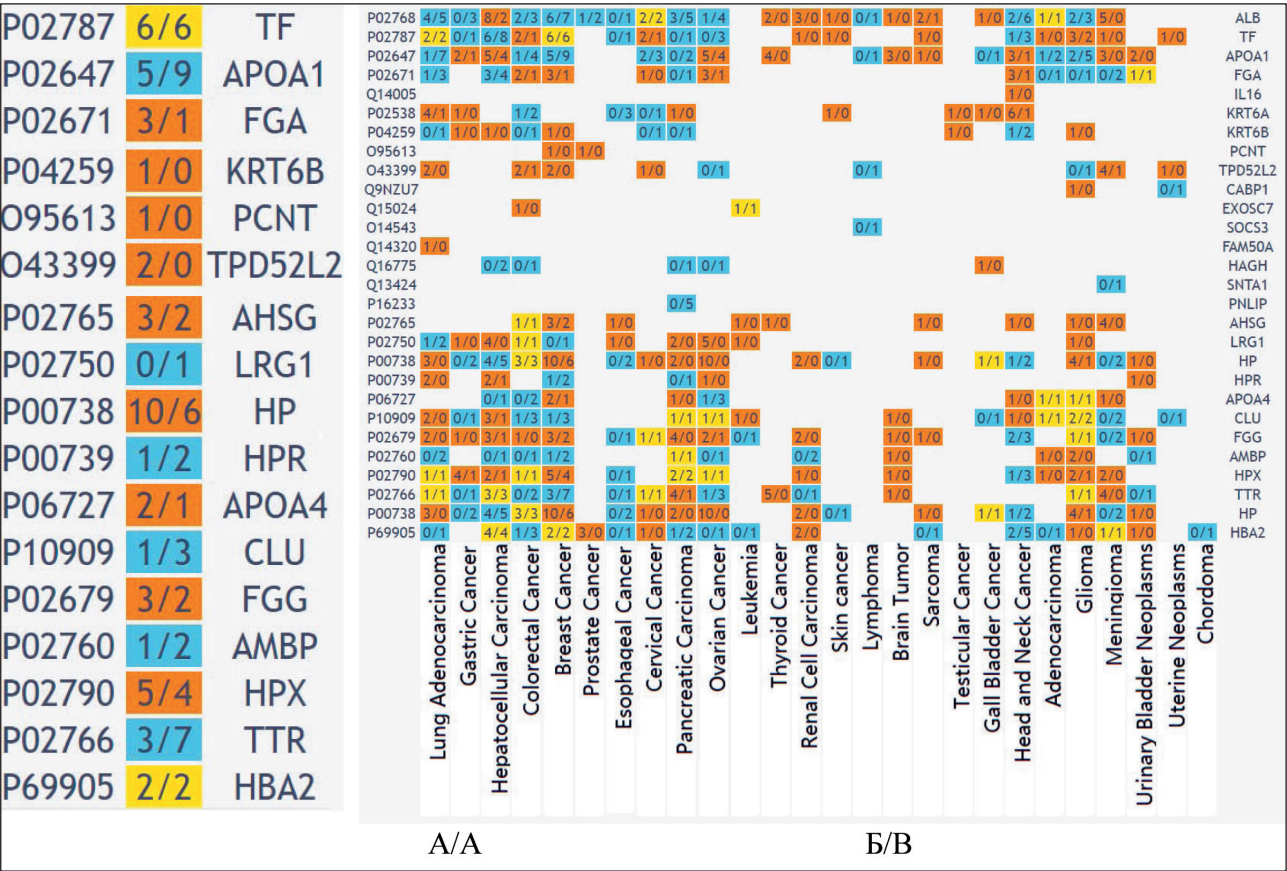


Рис. 4. Тепловая карта идентифицированных белков в составе суммарных экзосом крови больных РМЖ, ассоциированных с развитием злокачественных новообразований (а) и РМЖ в частности (б)
Fig. 4. The heat map of the identified proteins as a part of the common blood exosomes of breast cancer associated with the development of malignant neoplasms (a) and breast cancer in particular (b)

Таблица 2/Table 2

Идентифицированные при помощи пептидного фингерпринта белки суммарных экзосом крови

Total blood exosome proteins identified with peptide fingerprint

Номер пятна/ Spot number	Номер белка в базе Uniprot/ Protein number in Uniprot base	Название белка/ Protein name	Теоретический мол вес белка, Da/ Theoretical protein weight (Da)	Теоретическая изоэлек- трическая точка белка/ Theoretical isoelectric point of protein
1 (I)	P02768	Serum albumin	71362	5,92
1 (II)	P06396	Gelsolin	86095	5,90
2	P02768	Serum albumin	71362	5,92
3	P02765	Alpha-2-HS-glycoprotein	40123	5,43
4	P02750	Leucine-rich alpha-2-glycoprotein	38405	6,46
5 (I)	P00738	Haptoglobin beta chain	27265	6,32
5 (I)	P00739	Haptoglobin-related protein	39029	6,63
5 (II)	P06727	Apolipo-protein A-IV	45398	5,28
6	P10909	Clusterin	53064	5,89
7 (I)	P02679	Fibrinogen gamma chain	52138	5,37
7 (II)	P02768	Serum albumin	71362	5,92
8	P02760	Alpha-1-microglycoprotein	20846	6,13
9	P00738	Haptoglobin alpha chain	15945	5,57
9	P02766	Transthyretin	13761	5,31
10	P02790	Hemopexin	52417	6,55

Таблица 3/Table 3

Идентифицированные при помощи MALDI-TOF масс-спектрометрии белки суммарных экзосом крови здоровых женщин

Total blood exosome proteins identified by MALDI-TOF mass-spectrometry in healthy women

Номер белка в базе/ Gene Name	Название белка/ Protein name	Аббревиатура белка/ Protein Abbreviation	Наличие в базе данных Ехо- Carta/ ExoCarta Database Availability
A0M8Q6	Immunoglobulin lambda constant 7	IGLC7	+
A6NCL7	Ankyrin repeat domain-containing protein 33B	ANKRD33B	—
A8MU93	Uncharacterized protein C17orf100	C17orf100	—
H0YGS3	Microfibrillar-associated protein 5	MFAP5	+
O14862	Interferon-inducible protein AIM2	AIM2	—
O15054	Lysine-specific demethylase 6B	KDM6B	+
O15520	Fibroblast growth factor 10	FGF10	—
O60832	H/ACA ribonucleoprotein complex subunit 4	DKC1	+
O95602	DNA-directed RNA polymerase I subunit RPA1	POLR1A	—
O95831	Apoptosis-inducing factor 1	AIFM1	-
P00738	Haptoglobin beta chain	HP	+
P00739	Haptoglobin-related protein	HPR	—
P01871	Ig mu chain C region	IGHM	+
P02545	Prelamin-A/C	LMNA	+
P02679	Fibrinogen gamma chain	FGG	+
P02750	Leucine-rich alpha-2-glycoprotein	LRG1	—
P02760	Alpha-1-microglycoprotein	AMBP	+
P02765	Alpha-2-HS-glycoprotein	AHSG	+
P02766	Transthyretin	TTR	+
P02768	Serum albumin	ALB	+

Окончание таблицы 3/End Table 3

P02787	Serotransferrin	TF	–
P02790	<i>Hemopexin</i>	<i>HPX</i>	+
P05976	Myosin light chain 1/3	MYL1	+
P06396	Gelsolin	GSN	–
<i>P06727</i>	<i>Apolipo-protein A-IV</i>	<i>APOA4</i>	+
P0DOX6	Immunoglobulin mu heavy chain	IGHM	+
<i>P10909</i>	<i>Clusterin</i>	<i>CLU</i>	+
P11801	Serine/threonine-protein kinase H1	PSKH1	–
P23109	AMP deaminase 1	AMPD1	–
P26440	Isovaleryl-CoA dehydrogenase	IVD	–
P31327	Carbamoyl-phosphate synthase [ammonia]	CPS1	+
P31749	RAC-alpha serine/threonine-protein kinase	AKT1	+
P48506	Glutamate-cysteine ligase catalytic subunit	GCLC	–
P49748	Very long-chain specific acyl-CoA dehydrogenase	ACADVL	–
P49763	Placenta growth factor	PGF	–
P53674	Beta-crystallin B1	CRYBB1	–
P61224	Ras-related GTP-binding protein B	RAP1B	+
P78356	Phosphatidylinositol 4-kinase type 2-beta	PIP4K2B	–
Q08426	Peroxisomal bifunctional enzyme	EHHADH	+
Q11201	CMP-N-acetylneuraminate-beta-galactosamide-alpha-2,3-sialyltransferase 1	ST3GAL1	–
Q49A33	Putative zinc finger protein 876	ZNF876P	–
Q49MG5	Microtubule-associated protein	MAP9	–
Q4LEZ3	Alanine and arginine-rich domain-containing protein	AARD	–
Q504T8	Midnolin	MIDN	–
Q69YQ0	Cytospin-A	SPECC1L	+
Q6P1J9	Parafibromin	CDC73	–
Q6ZS02	Putative GED domain-containing protein	DNM1P46	–
Q7Z553	MAM domain-containing glycosylphosphatidylinositol anchor protein 2	MDGA2	–
Q86VE0	Myb-related transcription factor, partner of profilin	MYPOP	–
Q8N8C0	Zinc finger protein 781	ZNF781	–
Q9H6Z4	Ran-binding protein 3	RANBP3	+
Q9HB15	Uncharacterized protein C3orf14	C3orf14	–
Q9UK05	Growth/differentiation factor 2	GDF2	+

Примечание: курсивом отмечены универсальные белки.

Notes: italics indicate universal proteins.

Таблица 4/Table 4

Идентифицированные при помощи MALDI-TOF масс-спектрометрии белки суммарных экзосом крови больных РМЖ

Total blood exosome proteins identified by MALDI-TOF mass-spectrometry in patients with breast cancer

Номер белка в базе/ Gene Name	Название белка/ Protein name	Аббревиатура белка/ Protein Abbreviation	Наличие в базе данных ExoCarta/ Availability in ExoCarta Database
O14543	Suppressor of cytokine signaling 3	SOCS3	–
O15050	TPR and ankyrin repeat-containing protein 1	TRANK1	+

Окончание таблицы 4/End Table 4

O43399	Tumor protein D54	TPD52L2	+
O95243	Methyl-CpG-binding domain protein 4	MBD4	-
O95613	Pericentrin	PCNT	-
P69905	Haptoglobin alpha chain	HBA1	+
<i>P00738</i>	<i>Haptoglobin beta chain</i>	<i>HP</i>	+
<i>P00739</i>	<i>Haptoglobin-related protein</i>	<i>HPR</i>	-
P02538	Cytokeratin-6A	KRT6A	+
P02647	Apolipoprotein A-I	APOA1	+
P02671	Fibrinogen alpha chain	FGA	+
<i>P02679</i>	<i>Fibrinogen gamma chain</i>	<i>FGG</i>	+
P02750	Leucine-rich alpha-2-glycoprotein	LRG1	-
P02760	Alpha-1-microglycoprotein	AMBP	+
P02765	Alpha-2-HS-glycoprotein	AHSG	+
P02766	Transthyretin	TTR	+
P02768	<i>Serum albumin</i>	<i>ALB</i>	+
<i>P02787</i>	<i>Serotransferrin</i>	<i>TF</i>	-
<i>P02790</i>	<i>Hemopexin</i>	<i>HPX</i>	+
P04259	Cytokeratin-6B	KRT6B	+
<i>P06727</i>	<i>Apolipo-protein A-IV</i>	<i>APOA4</i>	+
<i>P10909</i>	<i>Clusterin</i>	<i>CLU</i>	+
P16233	Pancreatic triacylglycerol lipase	PNLIP	-
P55199	RNA polymerase II elongation factor	ELL	-
P62987	Ubiquitin-60S ribosomal protein L40	UBA52	-
Q13424	Alpha-1-syntrophin	SNTA1	+
Q13522	Protein phosphatase 1A	PPP1R1A	+
Q14005	Pro-interleukin-16	IL16	-
Q14320	Protein FAM50A	FAM50A	-
Q15024	Exosome complex component	EXOSC7	+
Q15776	Zinc finger protein with KRAB and SCAN domains 8	ZKSCAN8	-
Q16775	Hydroxyacylglutathione hydrolase	HAGH	+
Q4G0S7	Coiled-coil domain-containing protein 152	CCDC152	+
Q52M93	Zinc finger protein 585B	ZNF585B	-
Q5M9N0	Coiled-coil domain-containing protein 158	CCDC158	+
Q68J44	Dual specificity phosphatase	DUPD1	-
Q8IUS5	Epoxide hydrolase 4	EPHX4	-
Q8IYE0	Coiled-coil domain-containing protein 146	CCDC146	-
Q8N9H8	Exonuclease mut-7 homolog	EXD3	-
Q8NDD1	Uncharacterized protein C1orf131	C1orf131	-
Q8NEQ6	Steroid receptor-associated and regulated protein	SRARP	-
Q8WXS5	Voltage-dependent calcium channel gamma-8 subunit	CACNG8	-
Q9NZU7	Calcium-binding protein 1	CABP1	+
Q9UKW4	Guanine nucleotide exchange factor VAV3	VAV3	-
Q9Y4E5	E3 SUMO-protein ligase ZNF451	ZNF451	+

Примечание: курсивом отмечены универсальные белки.

Notes: italics indicate universal proteins.

тах суммарных экзосом крови здоровых женщин и больных РМЖ соответственно, из них 12 белков являются универсальными (рис. 3). Ранее в составе экзосом методом масс-спектрометрии уже были обнаружены 35 % идентифицированных нами белков, они аннотированы в базе данных Exocarta (www.exocarta.org) (табл. 3, 4). С использованием базы данных dbDEPC 3.0 (database of Differently Expressed Proteins in Human Cancer) [13] установлено, что в составе суммарных экзосом крови больных РМЖ 28 (88 %) белков ассоциировано со злокачественными новообразованиями (рис. 4а), из них 17 (53 %) – с развитием РМЖ (рис. 4б). Согласно литературным данным, из идентифицированных с помощью MALDI-TOF масс-спектрометрии белков, ассоциированных с развитием РМЖ, гиперэкспрессированными являются 9 (53 %) белков, гипоекспрессированными – 6 (35 %), экспрессия не изменяется у 2 (12 %) белков.

Обсуждение

Малоинвазивная процедура взятия венозной крови представляет альтернативу традиционной биопсии. Именно поэтому на сегодняшний день анализ белкового состава циркулирующих в крови экзосом является перспективным направлением поиска опухолеспецифичных маркеров злокачественных новообразований.

Представленная работа является пилотной в поиске протеомных опухоле-ассоциированных маркеров в составе суммарных экзосом крови, пул которых формируется из экзосом плазмы и экзосом, ассоциированных с поверхностью форменных элементов. В литературе широко представлены данные по поиску протеомных опухолевых маркеров в составе экзосом плазмы [17, 18], обсуждаются достоинства использования белков экзосом плазмы по сравнению с белками плазмы [19], однако данные об ассоциированных с клеточной поверхностью экзосомах немногочисленны. На сегодняшний день известно, что экзосомы несут на своей поверхности специфические рецепторы, которые обеспечивают их взаимодействие с клетками-мишенями. В то же время клетки различных типов могут связывать и интернализировать циркулирующие экзосомы [20–23]. Пул циркулирующих в крови экзосом формируют экзосомы, секретируемые лейкоцитами, эритроцитами, тромбоцитами и эндотелиоцитами (т.е. либо форменные элементы крови или клетки, непосредственно

взаимодействующие с кровью), а также тканевые клетки, такие как фибробласты, эпителиальные клетки и опухолевые клетки [24, 25].

Поскольку было обнаружено, что экзосомы, ассоциированные с поверхностью форменных элементов крови онкологических больных содержат больше опухолевой микроРНК [26], в текущей работе нами была предпринята попытка идентификации опухоле-ассоциированных белков в составе суммарных экзосом крови больных РМЖ. Использование суммарных экзосом крови без разделения на подфракции (экзосомы плазмы, экзосомы, ассоциированные с поверхностью эритроцитов, экзосомы, ассоциированные с поверхностью лейкоцитов) позволяет сократить время и трудозатраты при пробоподготовке образца перед анализом, а также увеличить количество анализируемого материала, что является крайне важным аспектом для дальнейшего введения разработок в практику.

В текущей работе нами было идентифицировано 99 белков в составе суммарных экзосом крови, треть из которых ранее уже обнаруживали в экзосомах, полученных из кондиционных сред различных линий клеток и биологических жидкостей человека (www.ExoCarta.org). Выявленные впервые 2/3 экзосомальных белков позволяют не только расширить фундаментальные знания об ассоциированных с форменными элементами экзосомах, но и заложат базу для создания новых вариантов диагностики онкологических заболеваний и позволят создать фундаментальные предпосылки для возможной оптимизации противоопухолевой терапии.

Заключение

Сравнительный анализ протеомного спектра суммарных экзосом крови ЗЖ и больных РМЖ позволил установить значимые различия в наборе белков в норме и при патологии (12 универсальных белков из 99 идентифицированных). В составе суммарных экзосом крови онкологических больных на начальных стадиях заболевания идентифицировано 17 уникальных белков, ассоциированных с РМЖ. Выявленные потенциальные белковые онкомаркеры требуют дальнейшей валидации. Возможно практическое использование полученных знаний для разработки методов малоинвазивной диагностики опухолей на доклинических стадиях, прогнозирования течения болезни и создания фундаментальных предпосылок для возможной оптимизации противораковой терапии.

ЛИТЕРАТУРА/REFERENCES

1. Witten M., Parker C.C. Screening mammography: recommendations and controversies. *Surg Clin North Am.* 2018 Aug; 98(4): 667–75. doi: 10.1016/j.suc.2018.03.003.
2. Tamkovich S.N., Tutanov O.S., Lakhtonov P.P. Exosomes: generation, structure, transport, biological activity, and diagnostic application. *Biochemistry (Moscow), Supplement Series A: Membrane and Cell Biology.* 2016 Oct; 10(3): 163–73. doi: 10.1134/S1990747816020112.
3. Yanez-Mo M., Siljander P.R., Andreu Z., Zavec A.B., Borra F.E., Buzas E.I., Buzas K., Casal E., Cappello F., Carvalho J., Cola E., Silva A.C.,

- Fais S., Falcon-Perez J.M., Ghobrial I.M., Giebel B., Gimona M., Graner M., Gursel I., Gursel M., Heegaard N.H.H., Hendrix A., Kierulff P., Kokubun K., Kosanovic M., Kralj-Iglic V., Kramer-Albers E.-M., Laitinen S., Lasser S., Lener T., Ligeti E., Line A., Lipps G., Llorente A., Lotvall J., Mancek-Keber M., Marcilla A., Mittelbrunn M., Nazarenko I., Hoen E.N.M., Nyman T.A., O'Driscoll L., Olivan M., Oliveira C., Pallinger E., del Portillo H.A., Reventos J., Rigau M., Rohde E., Sammar M., Sanchez-Madrid F., Santarem N., Schallmoser K., Ostendorf M.S., Stoorvogel W., Stukelj R., Van der Grein S.G., Vasconcelos M.H., Wauben M.H.M., De Wever O. Biological properties of extracellular vesicles and their

- physiological functions. *J Extracell Vesicles*. 2015 May; 4: 27066. doi: 10.3402/jev.v4.27066.
4. Aghebati-Maleki A., Nami S., Baghbzadeh A., Karzar B.H., Noorolyai S., Fotouhi A., Aghebati-Maleki L. Implications of exosomes as diagnostic and therapeutic strategies in cancer. *J Cell Physiol*. 2019 Jun. doi: 10.1002/jcp.28875.
 5. Clark D.J., Fondrie W.E., Liao Z., Hanson P.I., Fulton A., Mao L., Yang A.J. Redefining the breast cancer exosome proteome by tandem mass tag quantitative proteomics and multivariate cluster analysis. *Anal Chem*. 2015 Oct; 87(20): 10462–9. doi: 10.1021/acs.analchem.5b02586.
 6. Pant S., Hilton H., Burczynski M.E. The multifaceted exosome: biogenesis, role in normal and aberrant cellular function, and frontiers for pharmacological and biomarker opportunities. *Biochem Pharmacol*. 2012 Jun; 83(11): 1484–94. doi: 10.1016/j.bcp.2011.12.037.
 7. Koumangoye R.B., Sakwe A.M., Goodwin J.S., Patel T., Ochieng J. Detachment of breast tumor cells induces rapid secretion of exosomes which subsequently mediate cellular adhesion and spreading. *PLoS One*. 2011 Sep; 6(9): e24234. doi: 10.1371/journal.pone.0024234.
 8. Tamkovich S.N., Bakakina Y.S., Tutanov O.S., Somov A.K., Kirushina N.A., Dubovskaya L.V., Volotovskii I.D., Laktionov P.P. Proteome analysis of circulating exosomes in health and breast cancer. *Russian Journal of Bioorganic Chemistry* 2017 Jul; 43(2): 126–34. doi: 10.1134/S1068162017020157.
 9. Лактионов П.П., Скворцова Т.Э., Морозкин Е.С., Бондарь А.А., Милейко В.А., Власов В.В.; ООО «ЦСБ Геномика». Способ получения суммарной фракции внеклеточных нуклеиновых кислот из крови. Патент № 2554746 РФ, МПК G01N 33/48. № 2014120562/15; Заявл. 21.05.14; Опубл. 01.06.15.
 10. Gorg A., Weiss W. Horizontal SDS-PAGE for IPG-Dalt. *Meth Mol Biol*. 1999; 112: 235–44.
 11. Blum H., Beier H., Gross H.J. Improved silver staining of plant proteins, RNA and DNA in polyacrylamide gels. *Electrophoresis*. 1987 Feb; 8(2): 93–9. doi: 10.1002/elps.1150080203.
 12. Tamkovich S.N., Serdukov D.S., Tutanov O.S., Duzhak T.G., Laktionov P.P. Identification of proteins in blood nucleoprotein complexes. *Russian Journal of Bioorganic Chemistry*. 2015; 41(6): 617–25. doi: 10.1134/S1068162015060163.
 13. Yang Q., Zhang Y., Cui H., Chen L., Zhao Y., Lin Y., Zhang M., Xie L. dbDEPC 3.0: the database of differentially expressed proteins in human cancer with multi-level annotation and drug indication. *Database (Oxford)*. 2018; 2018: bay015. doi: 10.1093/database/bay015.
 14. Théry C., Witwer K.W., Aikawa E., Alcaraz M.J., Anderson J.D., Andriantsiotohaina R., Antoniou A., Arab T., Archer F., Atkin-Smith G.K. Minimal information for studies of extracellular vesicles 2018 (MISEV2018): a position statement of the International Society for Extracellular Vesicles and update of the MISEV2014 guidelines. *J Extracell Vesicles* 2018 Nov; 7(1): 1535750. doi: 10.1080/20013078.2018.1535750.
 15. Tamkovich S.N., Yunusova N.V., Somov A.K., Afanas'ev S.G., Kakurina G.V., Kolegova E.S., Tugutova E.A., Laktionov P.P., Kondakova I.V. Comparative subpopulation analysis of plasma exosomes from cancer patients. *Biochemistry (Moscow) Supplement Series. B. Biomedical Chemistry*. 2018 Oct; 12(2): 151–5. doi: 10.1134/S1990750818020130.
 16. Tamkovich S., Grigor'eva A., Eremina A., Tupikin A., Kabilov M., Chernykh V., Vlassov V., Ryabchikova E. What information can be obtained from the tears of a patient with primary open angle glaucoma? *Clin Chem Acta* 2019 Aug; 495: 529–37. doi: 10.1016/j.cca.2019.05.028.
 17. Wu A.Y., Ueda K., Lai C.P. Proteomic analysis of extracellular vesicles for cancer diagnostics. *Proteomics*. 2019 Jan; 19(1–2): e1800162. doi: 10.1002/pmic.201800162.
 18. Cufaro M.C., Pieragostino D., Lanuti P., Rossi C., Cicalini I., Federici L., De Laurenzi V., Del Boccio P. Extracellular vesicles and their potential use in monitoring cancer progression and therapy: the contribution of proteomics. *J Oncol*. 2019 Jun; 2019: 1639854. doi: 10.1155/2019/1639854.
 19. Boukouris S., Mathivanan S. Exosomes in bodily fluids are a highly stable resource of disease biomarkers. *Proteomics Clin Appl*. 2015 Apr; 9(3–4): 358–67. doi: 10.1002/prca.201400114.
 20. Nazarenko I., Rana S., Baumann A., McAlear J., Hellwig A., Trendelenburg M., Lochnit G., Preissner K.T., Zoller M. Cell surface tetraspanin Tspan8 contributes to molecular pathways of exosome-induced endothelial cell activation. *Cancer Res*. 2010 Feb; 70(4): 1668–78. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-09-2470.
 21. Mathivanan S., Ji H., Simpson R.J. Exosomes: extracellular organelles important in intercellular communication. *J Proteomics* 2010 Sep; 73(10): 1907–20. doi: 10.1016/j.jprot.2010.06.006.
 22. Calzolari A., Raggi C., Deaglio S., Sposi N.M., Stafnes M., Fecchi K., Parolini I., Malavasi F., Peschle C., Sargiacomo M., Testa U. TfR2 localizes in lipid raft domains and is released in exosomes to activate signal transduction along the MAPK pathway. *J Cell Sci*. 2006 Nov; 119: 4486–98.
 23. Clayton A., Turkes A., Dewitt S., Steadman R., Mason M.D., Hallett M.B. Adhesion and signaling by B cell-derived exosomes: the role of integrins. *FASEB J*. 2004 Jun; 18(9): 977–9.
 24. Danesh A., Inglis H.C., Jackman R.P., Wu S., Deng X., Muench M.O., Heitman J.W., Norris P.J. Exosomes from red blood cell units bind to monocytes and induce proinflammatory cytokines, boosting T-cell responses in vitro. *Blood* 2014 Jan; 123(5): 687–96. doi: 10.1182/blood-2013-10-530469.
 25. Minciacci V.R., Freeman M.R., Di Vizio D. Extracellular vesicles in cancer: exosomes, microvesicles and the emerging role of large oncosomes. *Semin Cell Dev Biol*. 2015 Apr; 40: 41–51. doi: 10.1016/j.semcdb.2015.02.010.
 26. Tamkovich S., Tutanov O., Efimenko A., Grigor'eva A., Ryabchikova E., Kirushina N., Vlassov V., Tkachuk V., Laktionov P. Blood circulating exosomes contain distinguishable fractions of free and cell-surface-associated vesicles. *Curr Mol Med*. 2019 Mar; 19(4): 273–85. doi: 10.2174/1566524019666190314120532.

Поступила/Received 31.07.2019
Принята в печать/Accepted 19.07.2019

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ

Тутанов Олег Сергеевич, старший лаборант, Институт химической биологии и фундаментальной медицины Сибирского отделения Российской академии наук (г. Новосибирск, Россия). Researcher ID (WOS): R-3938-2016. Author ID (Scopus): 56971591700.

Бакакина Юлия Сергеевна, кандидат биологических наук, старший научный сотрудник, УЗ «Национальная антидопинговая лаборатория» (Минский район, аг. Лесной, Республика Беларусь). SPIN-код: 9927-9534, Author ID (Scopus) 37064346900.

Проскура Ксения Викторовна, аспирант, Институт химической биологии и фундаментальной медицины Сибирского отделения Российской академии наук (г. Новосибирск, Россия). Author ID (Scopus): 57205562492.

Григорьева Алина Евгеньевна, кандидат биологических наук, младший научный сотрудник, Институт химической биологии и фундаментальной медицины Сибирского отделения Российской академии наук (г. Новосибирск, Россия). SPIN-код: 1191-6659. Researcher ID (WOS): I-3881-2014. Author ID (Scopus): 57189510749. ORCID: 0000-0001-9853-223X.

Сяхович Виталий Эдуардович, начальник отдела исследований и разработок в допинг-контроле, УЗ «Национальная антидопинговая лаборатория» (Минский район, аг. Лесной, Республика Беларусь). SPIN-код: 7646-8360. Author ID (Scopus): 6504187425.

Беляев Сергей Александрович, директор, УЗ «Национальная антидопинговая лаборатория» (Минский район, аг. Лесной, Республика Беларусь).

Рябчикова Елена Ивановна, доктор биологических наук, заведующая группой, Институт химической биологии и фундаментальной медицины Сибирского отделения Российской академии наук (г. Новосибирск, Россия). SPIN-код: 623-4112. Researcher ID (WOS): G-3089-2013, Author ID (Scopus): 6701791174. ORCID: 0000-0003-4714-1524.

Центалович Юрий Павлович, доктор химических наук, заведующий лабораторией, Институт «Международный томографический центр» Сибирского отделения Российской академии наук (г. Новосибирск, Россия). Author ID (Scopus): 57193617761.

Лактионов Павел Петрович, кандидат биологических наук, заведующий лабораторией, Институт химической биологии и

фундаментальной медицины Сибирского отделения Российской академии наук (г. Новосибирск, Россия). Researcher ID (WOS): G-9804-2013. Author ID (Scopus): 7003559490. ORCID: 0000-0003-4714-1524.

Тамкович Светлана Николаевна, кандидат биологических наук, старший научный сотрудник, Институт химической биологии и фундаментальной медицины Сибирского отделения Российской академии наук (г. Новосибирск, Россия). E-mail: s.tamk@niboch.nsc.ru. SPIN-код: 6462-3700. Researcher ID (WOS): G-9790-2013. Author ID (Scopus) 7801643574. ORCID: 0000-0001-7774-943X.

ВКЛАД АВТОРОВ

Тутанов Олег Сергеевич: экспериментальная работа.

Бакакина Юлия Сергеевна: экспериментальная работа.

Проскура Ксения Викторовна: экспериментальная работа.

Григорьева Алина Евгеньевна: экспериментальная работа.

Сяхович Виталий Эдуардович: статистическая обработка.

Беляев Сергей Александрович: статистическая обработка.

Рябчикова Елена Ивановна: критический пересмотр с внесением ценного интеллектуального содержания.

Центалович Юрий Павлович: критический пересмотр с внесением ценного интеллектуального содержания.

Лактионов Павел Петрович: критический пересмотр с внесением ценного интеллектуального содержания.

Тамкович Светлана Николаевна: разработка концепции научной работы, составление черновика рукописи, анализ научной работы, критический пересмотр с внесением ценного интеллектуального содержания.

Финансирование

Исследование выполнено при финансовой поддержке РФФИ и Правительства Новосибирской области в рамках научного проекта № 18-415-540012 р_а.

Конфликт интересов

Авторы объявляют, что у них нет конфликта интересов.

Благодарность

Авторы признательны В.Е. Войцицкому (Новосибирский областной онкологический диспансер, г. Новосибирск) за содействие в исследованиях.

ABOUT THE AUTHORS

Oleg S. Tutanov, Senior Assistant, Institute of Chemical Biology and Fundamental Medicine, Siberian Branch of Russian Academy of Sciences (Novosibirsk, Russia). Researcher ID (WOS): R-3938-2016. Author ID (Scopus): 56971591700.

Yulia S. Bakakina, PhD, Senior Researcher, National Anti-Doping Laboratory (Minsk reg., Lesnoy, Belarus). Author ID (Scopus): 37064346900.

Ksenia V. Proskura, PhD-student, Institute of Chemical Biology and Fundamental Medicine, Siberian Branch of Russian Academy of Sciences (Novosibirsk, Russia). Author ID (Scopus): 57205562492.

Alina E. Grigoryeva, Junior Researcher, Institute of Chemical Biology and Fundamental Medicine, Siberian Branch of Russian Academy of Sciences (Novosibirsk, Russia). Researcher ID (WOS): I-3881-2014. Author ID (Scopus): 57189510749. ORCID: 0000-0001-9853-223X.

Vitaly E. Syakhovich, Head of Doping Control Research and Development Department, National Anti-Doping Laboratory (Minsk reg., Lesnoy, Belarus). Author ID (Scopus): 6504187425.

Sergey A. Beliaev, Director, National Anti-Doping Laboratory (Minsk reg., Lesnoy, Belarus).

Elena I. Ryabchikova, Head of Group, Institute of Chemical Biology and Fundamental Medicine, Siberian Branch of Russian Academy of Sciences (Novosibirsk, Russia). Researcher ID (WOS): G-3089-2013. Author ID (Scopus): 6701791174. ORCID: 0000-0003-4714-1524.

Yuri P. Tsentalovich, Head of Laboratory, Institute "International Tomographic Center" (Novosibirsk, Russia). Author ID (Scopus): 57193617761.

Pavel P. Laktionov, Head of Laboratory, Institute of Chemical Biology and Fundamental Medicine, Siberian Branch of Russian Academy of Sciences (Novosibirsk, Russia). Researcher ID (WOS): G-9804-2013. Author ID (Scopus): 7003559490. ORCID: 0000-0003-4714-1524.

Svetlana N. Tamkovich, Senior Researcher, Institute of Chemical Biology and Fundamental Medicine, Siberian Branch of Russian Academy of Sciences (Novosibirsk, Russia). E-mail: s.tamk@niboch.nsc.ru. SPIN-код: 6462-3700. Researcher ID (WOS): G-9790-2013. Author ID (Scopus): 7801643574. ORCID: 0000-0001-7774-943X.

AUTHOR CONTRIBUTION

Oleg S. Tutanov: experimental study.

Yulia S. Bakakina: experimental study.

Ksenia V. Proskura: experimental study.

Alina E. Grigoryeva: experimental study.

Vitaly E. Syakhovich: statistical analysis.

Sergey A. Beliaev: statistical analysis.

Elena I. Ryabchikova: critical revision of manuscript for important intellectual content.

Yuri P. Tsentalovich: critical revision of manuscript for important intellectual content.

Pavel P. Laktionov: critical revision of manuscript for important intellectual content.

Svetlana N. Tamkovich: development of study conception and design, original drafting of manuscript, data analysis and interpretation, critical revision of manuscript for important intellectual content.

Funding

This work was supported by the Russian Foundation for Basic Research and Government of Novosibirsk region of the Russian Federation, grant 18-415-540012.

Conflict of interest

The authors declare that they have no conflict of interest.

Acknowledgements

The authors thank V.E. Voytsitskiy (Novosibirsk Regional Oncological Dispensary) for help in research.