

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ  
НАУКИ «ИНСТИТУТ ХИМИЧЕСКОЙ БИОЛОГИИ И  
ФУНДАМЕНТАЛЬНОЙ МЕДИЦИНЫ»  
СИБИРСКОГО ОТДЕЛЕНИЯ РОССИЙСКОЙ АКАДЕМИИ НАУК

На правах рукописи

**Тамкович Светлана Николаевна**

**ЦИРКУЛИРУЮЩИЕ  
ДЕЗОКСИРИБОНУКЛЕОПРОТЕИНОВЫЕ КОМПЛЕКСЫ И  
ЭКЗОСОМЫ В КРОВИ БОЛЬНЫХ РАКОМ МОЛОЧНОЙ  
ЖЕЛЕЗЫ: ОСОБЕННОСТИ СОСТАВА, БИОЛОГИЧЕСКИЕ  
ФУНКЦИИ И ДИАГНОСТИЧЕСКИЙ ПОТЕНЦИАЛ**

1.5.4 – биохимия

ДИССЕРТАЦИЯ

на соискание ученой степени

доктора биологических наук

Научный консультант:  
доктор биологических наук, профессор,  
академик РАН  
Ткачук Всеволод Арсеньевич

Новосибирск – 2023

## ОГЛАВЛЕНИЕ

Список сокращений.....	6
<b>Введение</b> .....	<b>9</b>
<b>ГЛАВА 1. Особенности циркуляции нуклеопротеиновых комплексов и экзосом в крови здоровых доноров и онкологических больных (Обзор литературы)</b> .....	<b>17</b>
1.1. Циркулирующие дезоксирибонуклеопротеиновые комплексы и их роль в канцерогенезе .....	17
1.1.1. Эндогенные источники внДНК в крови.....	17
1.1.2. Форма циркуляции внДНК в крови.....	23
1.1.3. Влияние гидролаз крови на циркуляцию дезоксирибонуклеопротеиновых комплексов.....	30
1.1.4. Фрагментация и распределение внДНК в крови.....	34
1.1.5. Биологическая роль внДНК.....	37
1.2. Роль экзосом в развитии солидных опухолей.....	42
1.2.1. Происхождение и состав экзосом.....	42
1.2.1.1. Биогенез экзосом.....	42
1.2.1.2. Липидный состав экзосом.....	45
1.2.1.3. Белковый состав экзосом.....	46
1.2.1.4. Нуклеиновый состав экзосом.....	52
1.2.2. Минимальные экспериментальные требования для определения внеклеточных везикул и их функциональной активности.....	53
1.2.3. Роль экзосом в развитии онкологических заболеваний.....	54
1.2.3.1. Регуляция опухолевыми экзосомами функциональной активности иммунной системы.....	55
1.2.3.2. Стимуляция опухолевыми экзосомами ЭМП, миграции и инвазии.....	56
1.2.3.3. Стимуляция опухолевыми экзосомами ангиогенеза и метастазирования .....	59
1.3. Проблемы диагностики РМЖ и перспективы использования «жидкостной биопсии».....	61
1.3.1. Инструментальные методы диагностики.....	62
1.3.2. Молекулярные методы диагностики.....	65
1.3.2.1. Белковые маркеры.....	66
1.3.2.2. Генетические маркеры.....	69
1.3.2.3. Эпигенетические онкомаркеры.....	70
1.3.3. Перспективы использования «жидкостной биопсии» для диагностики, прогноза и мониторинга злокачественных новообразований.....	72

1.3.3.1. Опухолевые маркеры в составе внДНК крови больных РМЖ.....	72
1.3.3.2. Опухоло-ассоциированные микроРНК в составе экзосом плазмы крови больных РМЖ.....	76
1.3.3.3. Протеомные маркеры РМЖ в составе экзосом плазмы крови.....	78
1.3.4. Заключение.....	79
<b>ГЛАВА 2. Материалы и методы исследования (Экспериментальная часть).....</b>	<b>81</b>
2.1. Материалы.....	81
2.1.1. Реактивы, коммерческие наборы и препараты.....	81
2.1.2. Оборудование.....	82
2.1.3. Олигонуклеотиды.....	84
2.1.4. Клеточные культуры и лабораторные животные.....	84
2.1.5. Образцы крови условно здоровых женщин и больных РМЖ.....	85
2.2. Методы.....	87
2.2.1. Исследование дезоксирибонуклеиновой составляющей циркулирующих в крови НПК.....	87
2.2.1.1. Выделение внДНК из плазмы и элюатов с поверхности форменных элементов крови.....	87
2.2.1.2. Выделение и характеристика геномной ДНК.....	88
2.2.1.3. Определение концентрации внДНК.....	89
2.2.1.4. Исследование строения концов внДНК.....	89
2.2.1.5. Анализ фрагментации внДНК крови условно здоровых женщин и больных РМЖ.....	90
2.2.2. Исследование белковой составляющей циркулирующих в крови дезоксирибонуклеопротеиновых комплексов.....	91
2.2.2.1. Выделение НПК сорбцией на мелкодисперсном стекле и характеристика полученных комплексов из плазмы крови.....	91
2.2.2.2. Оценка уровня гистонов в плазме крови условно здоровых женщин и больных РМЖ.....	93
2.2.2.3. Выделение гистон-содержащих НПК аффинной хроматографией.....	94
2.2.3. Опухолевые маркеры в составе дезоксирибонуклеопротеиновых комплексов, циркулирующих в крови больных РМЖ.....	101
2.2.3.1. Распределение aberrантно метилированной формы гена <i>RARβ2</i> во внДНК крови больных РМЖ.....	101
2.2.3.2. Биоинформатический анализ опухоло-ассоциированных белков в составе НПК крови больных РМЖ.....	104

2.2.4. Выделение и характеристика экзосом из клеточных культур, плазмы и крови .....	104
2.2.4.1. Выделение экзосом и оценка лизиса форменных элементов крови.....	104
2.2.4.2. Крио-электронная микроскопия.....	105
2.2.4.3. Трансмиссионная электронная микроскопия.....	106
2.2.4.4. Трековый анализ.....	106
2.2.4.5. Типирование экзосом.....	107
2.2.5. Исследование белкового состава экзосом плазмы и экзосом крови.....	107
2.2.5.1. Определение концентрации экзосомального белка.....	107
2.2.5.2. Оценка уровня 20S протеасом в составе экзосом.....	108
2.2.5.3. Оценка уровня ADAM-10 на поверхности экзосом.....	108
2.2.5.4. Двумерный (2D) электрофорез и анализ гелей.....	108
2.2.5.5. Идентификация белков экзосом методом MALDI-TOF масс-спектрометрии...	110
2.2.5.6. Биоинформатический анализ экзосомальных белков.....	110
2.2.6. Биоинформатический анализ опухоли-ассоциированных белков в составе экзосом плазмы и экзосом крови больных РМЖ.....	110
2.2.7. Исследование роли экзосом в развитии РМЖ.....	111
2.2.7.1. Оценка локализации и доли экзосомальной ДНК от содержания вДНК в плазме крови.....	111
2.2.7.2. Формирование капилляро-подобных структур эндотелиоцитами.....	112
2.2.7.3. Оценка клеточной подвижности.....	112
2.2.7.4. Анализ пролиферативной активности.....	113
2.2.7.5. Иммунофлуоресцентное окрашивание межклеточных контактов.....	113
2.2.8. Методы статистической обработки данных.....	113
<b>ГЛАВЫ 3 – 5. Циркулирующие дезоксирибонуклеопротеиновые комплексы и экзосомы в крови больных раком молочной железы: особенности состава, биологические функции и диагностический потенциал (Результаты и обсуждение).....</b>	<b>115</b>
<b>ГЛАВА 3. Дезоксирибонуклеопротеиновые комплексы в крови условно здоровых женщин и больных РМЖ.....</b>	<b>118</b>
3.1. Характеризация дезоксирибонуклеиновой составляющей циркулирующих в крови НПК.....	118
3.1.1. Концентрация и фрагментация вДНК в крови условно здоровых женщин и больных РМЖ.....	118
3.1.2. Концы циркулирующей в крови вДНК.....	124
3.1.3. Распределение aberrантно-метирированной ДНК в составе короткой и длинной вДНК при РМЖ.....	126

3.2. Сравнительный анализ дезоксирибонуклеопротеиновых комплексов.....	131
3.2.1. НПК, выделенные сорбцией на мелкодисперсном стекле и аффинной хроматографией.....	131
3.2.2. Сравнительный протеомный анализ НПК в крови условно здоровых женщин и больных РМЖ.....	144
3.2.3. Опухоль-ассоциированные белки в составе НПК крови больных РМЖ.....	154
<b>ГЛАВА 4. Сравнительный анализ экзосом плазмы и экзосом крови условно здоровых женщин и больных РМЖ.....</b>	<b>158</b>
4.1. Характеризация экзосом плазмы и экзосом крови.....	158
4.2. Тетраспанин-ассоциированные и тетраспанин-неассоциированные протеазы в составе экзосом плазмы и экзосом крови условно здоровых женщин и больных РМЖ.....	166
4.3. Протеомный портрет экзосом плазмы и экзосом крови условно здоровых женщин и больных РМЖ.....	170
4.4. Опухолевые маркеры в составе экзосом плазмы и экзосом крови больных РМЖ.....	180
<b>ГЛАВА 5. Роль экзосом в развитии солидных опухолей.....</b>	<b>186</b>
5.1. Транспорт ДНК в составе экзосом.....	186
5.2. Влияние экзосом на формирование капилляро-подобных структур.....	192
5.3. Стимуляция экзосомами клеточной подвижности.....	194
5.4. Влияние экзосом на интенсивность клеточной пролиферации.....	197
5.5. Морфология адгезионных соединений клеток после обработки экзосомами.....	198
<b>ЗАКЛЮЧЕНИЕ.....</b>	<b>202</b>
<b>ВЫВОДЫ.....</b>	<b>209</b>
<b>ПРИМЕНЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ И НАУЧНЫХ ВЫВОДОВ.....</b>	<b>212</b>
<b>СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.....</b>	<b>213</b>
Приложение 1.....	268
Приложение 2 (список научных трудов, вошедших в диссертацию).....	320

## СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

- ADAMs – A Disintegrin And Metalloproteinases – протеазы семейства ADAM
- AI – Allelic Imbalance – аллельная нестабильность
- BRCA – белок восприимчивости к РМЖ
- BSA – бычий сывороточный альбумин
- dNTP – дезоксирибонуклеотидтрифосфат
- DTT – дитиотриетол
- EDTA – 2,2',2'',2'''-(этан-1,2-дидинитрило)тетрауксусная кислота
- EGF – эпидермальный фактор роста
- EGFR – (Epidermal Growth Factor Receptor) ген рецептора эпидермального фактора роста
- EMMPRIN – extracellular matrix metalloproteinase inducer – внеклеточный индуктор матричных металлопротеиназ
- ESCRT – Endosomal Sorting Complex Required for Transport – комплекс эндосомальной сортировки, необходимый для транспорта
- FBS – эмбриональная телячья сыворотка
- FDA – Food and Drug Administration – управление по санитарному надзору за качеством пищевых продуктов и медикаментов
- GO – Gene Ontology terms – термины генных онтологий
- HEPES – 4-(2-гидроксиэтил)-1-пиперазинэтансульфоная кислота
- HER-2 – рецептор человеческого эпидермального фактора роста 2 типа
- HUVEC – Human Umbilical Vein Endothelial Cells – первичные клетки пупочной вены человека
- IL – интерлейкин
- LOH – Loss Of Heterozygosity – феномен потери гетерозиготности
- MALDI-TOF масс-спектрометрия – матрично-активированная лазерная десорбция/ионизация
- MES – 2-(N-морфолино)этансульфоная кислота
- MFI – Mean Fluorescence Intensity – средняя интенсивность флуоресценции
- MMPs – Matrix metalloproteinases – матриксные металлопротеазы
- NETs – neutrophilic extracellular traps – нейтрофильные внеклеточные ловушки
- NK-клетки – Natural Killer cells – натуральные киллеры
- PAPP-A – Pregnancy-Associated Plasma Protein-A – ассоциированный с беременностью протеин-A плазмы
- PBS – фосфатно-солевой буфер (10 мМ фосфатный буфер, pH 7,5; 0,15 М NaCl)
- PMSF – фенилметилсульфонил фторид
- PSA – (Prostate-specific antigen) простатспецифический антиген

RAR $\beta$ 2 – (retinoic acid receptors) рецептор ретиноевой кислоты

SAM – S-аденозилметионин

scaРНК – (small Cajal RNA) малая РНК телец Кахаля

SDS – лаурилсульфат натрия

TBE – трис-боратный буфер pH8,3

TSP-1 – тромбоспондин-1

uPA – Plasminogen Activator, Urokinase – урокиназный активатор плазминогена

VEGF – Vascular Endothelial Growth Factor – Фактор роста эндотелия сосудов

БД – база данных

ВВ – внеклеточные везикулы

внДНК – внеклеточная ДНК

внНК – внеклеточные нуклеиновые кислоты

ВОЗ – Всемирная Организация Здравоохранения

ВЭЖХ – высокоэффективная жидкостная хроматография

днРНК - длинные некодирующие РНК

ЗЖ – здоровые женщины

ИФА – иммуно-ферментный анализ

ЛДГ – лактатдегидрогеназа

ЛПВП – липопротеины высокой плотности

МВТ – мультивезикулярное тельце

мРНК – матричная РНК

МРТ – магнитно-резонансная томография

мякРНК – малая ядрышковая РНК

мяРНК – малая ядерная РНК

НПК – нуклеопротеиновые комплексы

ПААГ – полиакриламидный гель

пиРНК – piРНК (piwiРНК)

ПО – программное обеспечение

ПСА – персульфат аммония

ПЦР – полимеразная цепная реакция

ПЭТ – позитронно-эмиссионная томография

РМЖ – рак молочной железы

рРНК – рибосомальная РНК

РЭА – раковый эмбриональный антиген

СА 15.3 – Cancer Antigen 15.3 – раковый антиген 15.3

TEA – триэтиламин

ТЕМЕД – тетраметилэтилендиамин

ТН-РМЖ – трижды-негативный подтип рака молочной железы

трис – 2-амино-2-гидроксиметил-пропан-1,3-диол

тРНК – транспортная РНК

ТЭМ – трансмиссионная электронная микроскопия

УЗИ – ультразвуковое исследование

ФЭК – форменные элементы крови

ЦОК – циркулирующие опухолевые клетки

ЧСА – человеческий сывороточный альбумин

ЭМП – эпителиально-мезенхимальный переход

ЭПР – эндоплазматический ретикулум



## ВВЕДЕНИЕ

**Актуальность темы исследования.** Поскольку биополимеры опухолевого происхождения могут попадать в различные биологические жидкости, минимально инвазивную процедуру выделения и анализа этих биополимеров для получения информации о клетках, в которых они возникли, все чаще называют «жидкостной биопсией». В настоящее время ведутся интенсивные исследования по разработке методов диагностики и прогноза злокачественных заболеваний, а также оценки эффективности противораковой терапии на основе анализа циркулирующих в крови внеклеточной опухолевой ДНК, некодирующих опухоле-ассоциированных РНК (днДНК, микроРНК, кольцевой РНК), опухолевых белков, а также биополимеров в составе внеклеточных везикул, в том числе экзосом.

Во внеклеточной ДНК (внДНК) выявляют характерные для опухолевых клеток точечные мутации, микросателлитную нестабильность, амплификации/делеции, а также эпигенетические изменения [1-3]. Одним из наиболее серьезных препятствий для широкого внедрения в прикладную онкологию тестов на основе внДНК является неудовлетворительное соотношение сигнал/шум [4]. Для повышения чувствительности и специфичности «жидкостной биопсии» необходимы знания о механизмах появления внДНК в кровотоке, ее циркуляции и выведении, в том числе форме циркуляции внДНК, ее первичной структуре и вкладе различных форм внДНК в общий пул.

На сегодняшний день известно, что внДНК крови находится преимущественно в виде нуклеопротеиновых комплексов (НПК), том числе в комплексах с гистонами [5, 6], амилоидом Р [7], белками крови и клеток [8–10], а также в составе апоптотических телец [11]. Строение, свойства и биологическая активность НПК, особенности их циркуляции и белкового состава в настоящее время недостаточно изучены, однако ряд исследований указывают на то, что с их помощью функционально активные ДНК могут транспортироваться в другие клетки; такие НПК необходимы для нормального функционирования многоклеточных организмов, а также могут быть связаны с развитием ряда патологических процессов [12]. Действительно, при развитии онкологических заболеваний происходит увеличение концентрации внДНК в крови [13], однако причины, механизмы и последствия этого явления до сих пор неизвестны. Более того, циркулирующая в крови онкологических больных внДНК имеет те же особенности, что и ДНК в клетках опухоли [14], а от гидролиза эндогенными нуклеазами эту ДНК защищают белки, имеющие ДНК-связывающие мотивы, формируя с ней НПК [15]. Таким образом, исследование распределения опухоле-специфических ДНК в пуле коротких и длинных фрагментов внДНК и сравнительный анализ белков в составе НПК, циркулирующих в крови здоровых женщин

(ЗЖ) и больных раком молочной железы (РМЖ), позволит расширить фундаментальные знания о механизмах, которые приводят к их появлению во внешней среде, обеспечивают их циркуляцию в крови и, возможно, опосредуют молекулярные механизмы, приводящие к распространению опухоли. Более того, идентификация ДНК-связывающих мотивов в составе белков НПК позволит в дальнейшем разработать подходы выделения опухолевой внДНК, а информация о протеомном портрете циркулирующих в крови онкологических больных НПК заложит основу для создания новых методов диагностики онкологических заболеваний и, возможно, заложит базу для разработки технологии получения на основе элементов природных транспортных систем векторов для генотерапии.

Помимо внДНК в рост и распространение опухоли вовлечены экзосомы - мембранные везикулы, транспортирующие в крови биологически-активные молекулы от клеток-доноров к клеткам-реципиентам [16]. Отличительной чертой экзосом от остальных малых везикул является наличие поверхностных маркеров-тетраспанинов CD9, CD63, CD81 [16]. Экзосомы секретируются всеми клетками организма, а их количество и состав существенно изменяется при развитии злокачественного новообразования [17, 18]. В работах последних пяти лет были получены убедительные доказательства, что эти малые везикулы (размером 30-150 нм) являются новыми медиаторами межклеточной коммуникации; в частности, экзосомы опухолевого происхождения стимулируют эпителиально-мезенхимальный переход (ЭМП) [19] и ангиогенез [20], клеточную пролиферацию [21], миграцию [22] и инвазию [23], вызывают иммуносупрессию [24]. Поскольку концентрация экзосом в биологических жидкостях значительно выше, чем опухолевых клеток ( $\sim 10^8$  против 10), экзосомы являются перспективными источниками биомаркеров для развития метода «жидкостной биопсии» злокачественных новообразований, в том числе РМЖ [25].

Несмотря на значительное сходство молекулярного портрета экзосом с родительскими клетками, эти малые везикулы остаются «темной лошадкой» благодаря специфическому сортированию различных биополимеров, в том числе РНК (микроРНК, днРНК, мРНК и др.) и белков (транскрипционные факторы, ферменты и др.) во время их биогенеза [26]. Таким образом, несмотря на активные исследования, до сих пор нет ясности как о составе переносимых экзосомами сигнальных молекул, так и их роли в распространении опухоли. Принимая во внимание, что при циркуляции в крови экзосомы контактируют с форменными элементами крови и после взаимодействия с плазматической мембраной часть экзосом не подвергается немедленному слиянию/интернализации, а какое-то время остается на поверхности клетки в виде ассоциированных с клетками везикул [27, 28], неясной остается биологическая роль и диагностическая ценность таких, ассоциированных с поверхностью клеток, экзосом.

Поскольку РМЖ является лидирующим онкологическим заболеванием среди женского населения по показателям заболеваемости и смертности и в России, и за рубежом [29], актуальным является исследование особенностей циркуляции и оценка диагностической значимости внеклеточных дезоксирибонуклеопротеиновых комплексов и экзосом в крови первичных больных РМЖ.

**Целью** данной работы являлось исследование распределения и состава дезоксирибонуклеопротеиновых комплексов и экзосом в крови больных РМЖ, установление диагностической значимости их анализа.

В ходе исследования решались следующие **задачи**:

1. Оценить фрагментацию и природу концов внеклеточной ДНК плазмы и ДНК, ассоциированной с форменными элементами в крови условно здоровых женщин и больных РМЖ.

2. Оценить частоту встречаемости аберрантно-метирированной ДНК в составе короткой и длинной ДНК плазмы и ДНК, ассоциированной с форменными элементами в крови условно здоровых женщин и больных РМЖ.

3. Охарактеризовать нуклеиновую и белковую составляющие нативных дезоксирибонуклеопротеиновых комплексов, циркулирующих в крови условно здоровых и больных РМЖ женщин, идентифицировать в их составе белки и провести сравнительный биоинформатический анализ ДНК-связывающих белков и белков-«пассажира».

4. Охарактеризовать суммарные экзосомы крови (включают экзосомы плазмы и экзосомы, ассоциированные с поверхностью форменных элементов крови) условно здоровых женщин и больных РМЖ, идентифицировать белки, входящие в их состав, и провести сравнительный биоинформатический анализ протеомов экзосом в норме и при РМЖ.

5. Провести сравнительный анализ уровней тетраспанин-ассоциированной шеддазы ADAM-10 и тетраспанин-неассоциированной 20S протеасомы в экзосомах плазмы и в экзосомах крови условно здоровых женщин и больных РМЖ.

6. Сопоставить влияние экзосом плазмы и экзосом крови на стимуляцию эпителиально-мезенхимального перехода, клеточную пролиферацию и миграцию, формирование капилляро-подобных структур в экспериментах *in vitro*.

7. Оценить частоты встречаемости известных опухоли-ассоциированных белков в составе нуклеопротеиновых комплексов и экзосом в крови условно здоровых женщин и больных РМЖ.

8. Сформировать панели маркеров для выявления РМЖ методом «жидкостной биопсии», основываясь на полученных данных о протеомах дезоксирибонуклеопротеиновых комплексов и экзосом крови.

**Научная новизна полученных результатов.** Настоящая работа представляет собой первое комплексное исследование циркулирующих дезоксирибонуклеопротеиновых комплексов и суммарных экзосом (экзосом плазмы и экзосом, ассоциированных с поверхностью форменных элементов крови, далее – экзосом крови) в крови условно ЗЖ и больных РМЖ.

Впервые установлены ряд характерных особенностей фрагментации и строения концов вДНК плазмы и ДНК, ассоциированной с форменными элементами крови у больных РМЖ, что указывает на различные механизмы генерации вДНК в норме и при онкологическом заболевании. Сравнительная количественная оценка фрагментации и метилирования вДНК в норме и при РМЖ выявила перспективность использования ДНК, ассоциированной с поверхностью форменных элементов крови онкологических больных, для разработки метода «жидкостной биопсии».

Впервые получены и охарактеризованы нативные гистон-содержащие дезоксирибонуклеопротеиновые комплексы, циркулирующие в крови условно ЗЖ и больных РМЖ. Впервые методом MALDI-TOF масс-спектрометрии идентифицирован протеом НПК, и с помощью биоинформатического анализа выявлены различные биологические функции белков НПК крови условно ЗЖ и больных РМЖ. Среди белков НПК выявлены ДНК-связывающие белки и белки-«пассажиры» (не связывают ДНК), обладающие наибольшей диагностической значимостью. Впервые выявленные уникальные для белков НПК больных РМЖ ДНК-связывающие белки и идентифицированные в их составе ДНК-связывающие мотивы могут быть использованы для выделения опухолевой вДНК, что может повысить эффективность выявления новообразований методом «жидкостной биопсии».

Установлено, что экзосомы не являются основными транспортерами вДНК – доля ДНК в короне экзосом не превышает 0,025% от содержания вДНК в плазме крови. Впервые показано увеличение концентрации и изменение морфологии как экзосом плазмы, так и экзосом крови у больных РМЖ по сравнению с условно ЗЖ.

Впервые выявлены различия в уровнях ферментов экзосом плазмы и экзосом крови у больных РМЖ по сравнению с условно ЗЖ: повышение 20S протеасом и ADAM-10 в CD9+ субпопуляции свидетельствует о вовлечении в канцерогенез как тетраспанин-ассоциированных, так и тетраспанин-неассоциированных протеаз как в составе экзосом плазмы, так и экзосом, ассоциированных с форменными элементами крови.

Впервые методом MALDI-TOF масс-спектрометрии идентифицирован протеом экзосом крови условно ЗЖ и больных РМЖ и выявлена наибольшая диагностическая значимость экзосом крови по сравнению с экзосомами плазмы.

С помощью биоинформатического анализа установлено, что экзосомы крови по сравнению с экзосомами плазмы больных РМЖ обогащены белками, стимулирующими ЭМП, миграцию и инвазию, при этом протеом экзосом крови условно ЗЖ обогащен белками, ингибирующими эти процессы.

Впервые установлено, что экзосомы крови больных РМЖ индуцируют ЭМП, стимулируют формирование капилляро-подобных структур и увеличивают количество пролиферирующих и мигрирующих псевдонормальных клеток молочной железы. Выявлено разнонаправленное влияние экзосом крови условно ЗЖ на распространение опухоли: они подавляют формирование капилляро-подобных структур, при этом стимулируют ЭМП, увеличивают количество мигрирующих псевдонормальных клеток и количество митозов, а также длину пути клеток карциномы молочной железы.

**Теоретическая и практическая значимость работы.** Значимость работы обусловлена полученным комплексом знаний о составе циркулирующих в крови НПК и экзосом, их роли в стимуляции роста и распространения опухоли и диагностическом потенциале маркеров в их составе. Фундаментальную значимость работы составляют результаты о представленности концов и профилю фрагментации вДНК плазмы и ДНК, ассоциированной с форменными элементами крови: в норме не менее 20% вДНК плазмы имеют апоптотическое происхождение, а присутствие вДНК свыше 1000 п.н. с повышенной представленностью 5'-выступающих концов в крови больных РМЖ свидетельствуют о том, что при развитии онкологического заболевания не менее трети вДНК высвобождается в кровь из некротических клеток. Данные об изменении представленности белков в составе НПК циркулирующих в крови онкологических больных являются уникальными и вносят значимый вклад в описание феномена вДНК. Информация об изменении концентрации и морфологии, а также протеома экзосом в крови онкологических больных расширяет фундаментальные знания об участии экзосом в канцерогенезе.

Впервые полученная информация о фрагментации и индексе метилирования вДНК плазмы и ДНК, ассоциированной с форменными элементами крови будет полезна для разработки диагностических ПЦР-систем для «жидкостной биопсии». Полученные данные о белках, участвующих в транспорте вДНК в составе НПК, и белках в составе экзосом, отвечающих за транспорт опухолевой микроРНК в кровотоке имеют принципиальное значение для понимания молекулярных механизмов процессов, обеспечивающих передачу генетической информации и сигналов между клетками. Полученная информация может быть использована для создания новых методов диагностики онкологических заболеваний и создания фундаментальных предпосылок для возможной оптимизации противораковой терапии.

**Методы исследования.** В работе были использованы современные молекулярно-биологические и физические методы и биоинформатические подходы: выделение, пересаживание и электроэлюция ДНК из геля, ПЦР в режиме «реального времени» и ПЦР, специфичная к метилированию, бисульфитная конверсия, ферментативная обработка (кинирование, лигирование и т.д.), капиллярный электрофорез, различные виды ИФА (пятенный, сэндвич), иммунизация животных и получение поликлональных антител, синтез аффинных сорбентов и конъюгатов антител с пероксидазой хрена, гель-фильтрация, аффинная хроматография, белковый градиентный электрофорез, вестерн-блот, ультрацентрифугирование, крио- и трансмиссионная электронная микроскопия, проточная цитометрия, трековый анализ, двумерный электрофорез, масс-спектрометрия, оценка клеточной подвижности и пролиферативной активности, иммуофлуоресцентное окрашивание межклеточных контактов, формирование капилляро-подобных структур эндотелиоцитами.

**Основные положения, выносимые на защиту:**

1. У больных РМЖ степень фрагментации и концы внеклеточной ДНК плазмы и ДНК, ассоциированной с форменными элементами крови, отличаются от внеклеточной ДНК условно здоровых женщин, что свидетельствует о различных механизмах их генерации и доступности для нуклеаз.
2. По сравнению с внеклеточной ДНК плазмы, внеклеточная ДНК, ассоциированная с форменными элементами крови больных РМЖ, является более перспективным источником aberrантно-метилованных маркеров, на основе которой могут быть созданы тест-системы для выявления РМЖ.
3. В составе циркулирующих в крови дезоксирибонуклеопротеиновых комплексов треть белков является ДНК-связывающими. При РМЖ изменяется состав как ДНК-связывающих белков, так и белков-«пассажира».
4. Экзосомы плазмы составляют менее половины экзосом крови и не являются основными транспортерами внеклеточной ДНК. У больных РМЖ возрастает концентрация и изменяется морфология как экзосом плазмы, так и экзосом крови. При РМЖ в составе экзосом повышается уровень протеаз: ADAM-10 на поверхности CD-9-положительных экзосом и 20S протеасомы.
5. При РМЖ изменяется состав экзосом: у онкологических больных экзосомы крови по сравнению с экзосомами плазмы обогащены белками, стимулирующими ЭМП, миграцию и инвазию, а у здоровых женщин – белками, ингибирующими эти процессы.
6. Экзосомы крови больных РМЖ стимулируют формирование капилляро-подобных структур, индуцируют ЭМП и увеличивают количество подвижных и пролиферирующих

псевдо-нормальных эпителиоцитов, а также общую длину пути клеток карциномы молочной железы. Экзосомы крови здоровых женщин подавляют формирование капилляро-подобных структур и уменьшают длину пути псевдо-нормальных клеток по сравнению с экзосомами плазмы, при этом стимулируют ЭМП, увеличивают количество подвижных и пролиферирующих псевдо-нормальных, а также длину пути раковых клеток.

7. Белки дезоксирибонуклеопротеиновых комплексов и экзосом крови можно рассматривать как источник потенциальных маркеров для выявления РМЖ методом «жидкостной биопсии».

**Обоснованность и достоверность полученных результатов.** Высокая степень достоверности полученных результатов обеспечивается достаточным числом больных РМЖ и условно ЗЖ, использованием современных методов исследования, адекватных поставленным задачам, и применением комплексных методов биоинформатического и статистического анализов.

**Апробация работы и публикации.** Результаты работы в виде устных и стендовых докладов были представлены автором лично на 65 российских и международных конференциях и конгрессах. По результатам работы опубликовано 31 статья в международных и отечественных реферируемых журналах, рекомендованных ВАК РФ, из них 6 – первой категории. По теме работы получено 3 патента РФ на изобретение и 1 свидетельство о государственной регистрации базы данных.

**Личный вклад автора.** Работа выполнена преимущественно в Лаборатории Молекулярной Медицины ИХБФМ СО РАН (Новосибирск, Россия). Результаты исследований были получены лично автором, либо совместно с сотрудниками сторонних организаций, либо сотрудниками Лаборатории молекулярной медицины ИХБФМ СО РАН под непосредственным руководством автора преимущественно в рамках выполнения проектов Российского фонда фундаментальных исследований, Российского научного фонда, а также Интеграционного проекта СО РАН с Белоруссией, в которых автор являлся руководителем.

Идентификацию белков MALDI-TOF масс-спектрометрией автор провел совместно с к.б.н. О. С. Тутановым (ИХБФМ СО РАН) в Лаборатории протеомики и метаболомики института “МТЦ” СО РАН (Новосибирск, Россия) под руководством проф. д.х.н. Ю. П. Центаловича. Крио-электронную микроскопию автор провел совместно с к.х.н. Р. Камышлинским в Ресурсном центре зондовой и электронной микроскопии НИЦ «Курчатовский институт» (Москва, Россия). Трековый анализ проведен автором совместно с к.б.н. Т. А. Штам в Лаборатории молекулярной биофизики и нейтронных исследований Петербургского института ядерной физики им. Б.П. Константинова ИЦ "Курчатовский

институт" (Гатчина, Ленинградская обл., Россия). Оценка ангиогенной активности экзосом проведена автором совместно с к.б.н. А. Ю. Ефименко на кафедре Биохимии и молекулярной медицины Факультета фундаментальной медицины Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова (Москва, Россия).

Трансмиссионная электронная микроскопия экзосом была проведена к.б.н. А. Е. Григорьевой (ГМИ, ИХБФМ СО РАН). Двумерный электрофорез экзосомальных белков и анализ гелей был выполнен к.б.н. Ю. С. Бакакиной (Институт биофизики и клеточной инженерии НАН Беларуси, Минск, Белоруссия). Диагностика больных РМЖ, включенных в исследование, проводилась сотрудниками Маммологического отделения Новосибирского областного клинического онкологического диспансера (Новосибирск, Россия).

В совместных работах автору принадлежит ключевая роль в постановке задач, выборе методов исследования, разработке методик и гипотез, анализе литературных данных и интерпретации полученных результатов. Автор принимал непосредственное участие в планировании и организации проведения экспериментов, систематизации и обобщении экспериментальных данных, подготовке публикаций, а также представлении результатов исследования на научных конференциях и конгрессах.

**Объем и структура диссертации.** Диссертация изложена на 332 страницах машинописного текста, состоит из введения, обзора литературы, материалов и методов исследования, результатов собственных исследований и их обсуждения, заключения, выводов, применение результатов и научных выводов, списка литературы и приложений. Работа иллюстрирована 61 рисунком и 32 таблицами. Библиографический указатель содержит 570 литературных источников.



## **ГЛАВА 1.**

### **Особенности циркуляции нуклеопротеиновых комплексов и экзосом в крови здоровых доноров и онкологических больных**

#### **(Обзор литературы)**

Согласно современным представлениям в биологических жидкостях постоянно находятся нуклеиновые кислоты, причем они могут быть связаны с биополимерами внеклеточной жидкости или упакованы в покрытые мембраной частицы. Строение, свойства и биологическая активность НПК и везикулярных структур, особенности их циркуляции и белкового состава в настоящее время недостаточно изучены, однако ряд исследований указывают на то, что с их помощью функционально активные РНК и ДНК могут транспортироваться в другие клетки, они необходимы для нормального функционирования многоклеточных организмов и могут быть связаны с развитием ряда патологических процессов.

В обзоре будут рассмотрены: циркулирующие дезоксирибонуклеопротеиновые комплексы и их роль в канцерогенезе; состав и роль экзосом крови в развитии солидных опухолей; проблемы современной диагностики РМЖ и перспективы использования «жидкостной биопсии».

#### **1.1. Циркулирующие дезоксирибонуклеопротеиновые комплексы и их роль в канцерогенезе**

Впервые существование внДНК у человека было описано в 1948 г [30], однако интенсивно феномен внНК стали исследовать только с начала нового тысячелетия. На настоящий момент большинство публикаций в области внеклеточных нуклеиновых кислот посвящено поиску специфичных к различным заболеваниям ДНК- и РНК-маркёров, однако до сих пор однозначно не установлены механизмы генерации и долговременной циркуляции внеклеточных нуклеиновых кислот в крови.

##### **1.1.1. Эндогенные источники внДНК в крови**

Процессы, приводящие к появлению эндогенных внеклеточных нуклеиновых кислот, могут определять удельное содержание различных последовательностей в составе внДНК. В литературе имеются лишь косвенные данные о том, что не все фрагменты геномной ДНК равно представлены во внДНК [31, 32]. Циркулирующая внДНК может появляться в кровотоке в результате гибели ядросодержащих клеточных элементов, созревания

эритроцитов и тромбоцитов, а также активной секреции нуклеиновых кислот во внеклеточное пространство. Кроме того, при развитии инфекционных заболеваний в крови пациентов обнаруживаются нуклеиновые кислоты возбудителей [33], а фетальная ДНК появляется в кровотоке уже на первом месяце беременности [34]. Несмотря на разнообразие предполагаемых источников ДНК, практически все авторы сходятся на эндогенной природе основной части внДНК крови. Уровень экзогенной ДНК в кровообращении больных, как правило, не превышает десятков пг/мл [35], что пренебрежимо мало по сравнению с приводимыми в литературе данными для нормального содержания внДНК (до 60 нг/мл) [13].

Появление внДНК в циркуляции *вследствие дифференцировки форменных элементов крови (ФЭК)* имеет место, например, при созревании эритроцитов и тромбоцитов. Поскольку в крови у взрослого человека циркулируют  $25\text{--}30 \times 10^{12}$  эритроцитов, 1% из которых ежедневно обновляется, то теоретически примерно 1,2 г ДНК может поступать в кровь в составе сконденсированных ядер. Общее количество тромбоцитов в крови взрослого человека составляет  $0,8\text{--}2,4 \times 10^{12}$ , 15% из которых ежедневно обновляется; поскольку из одного мегакариота образуется около десяти тромбоцитов, простой подсчёт показывает, что в результате ежедневного обновления тромбоцитов в кровоток может попадать в составе сконденсированных ядер около 80 мг ДНК. Таким образом, количество высвобождаемой в кровоток ДНК за счёт дифференцировки эритроцитов и тромбоцитов должно соответствовать концентрации не менее 260 нг/мл крови.

*Апоптоз* – наиболее широко представленная форма клеточной смерти, которая в организме человека приводит к ежедневной гибели от  $10^{11}$  до  $10^{12}$  клеток, что соответствует деградации ДНК в количестве 1–10 г [36]. В расщеплении нуклеиновых кислот в процессе апоптоза принимают участие специфические ферменты, в частности  $\text{Mg}^{2+}$ -зависимые эндонуклеазы, гидролизующие линкерную (межнуклеосомную) ДНК [37]. Апоптотические клетки и основные продукты их деградации – апоптотические тельца, поглощаются и перевариваются макрофагами, дендритными и эндотелиальными клетками, при этом не исключается возможность частичного «ускользания» генетического материала от фагоцитирования и как следствие, попадания его в кровь [37, 38]. Таким образом, апоптоз может являться источником циркулирующих в крови апоптотических телец, нуклеосом и олигонуклесом [39, 40].

В подтверждение апоптотического происхождения внДНК было показано, что ДНК в культурах лимфоцитов тимуса и селезёнки имеет размер, кратный нуклеосоме – 140–180 п.н. и находится в комплексе с коровыми гистонами: H2A, H2B, H3 и H4 [41]. Показано, что в плазме крови здоровых доноров циркулирует внДНК размером от 180 до 500 п. н. [38, 42, 43]. При развитии аутоиммунных [44] и онкологических заболеваний (рак лёгкого и

поджелудочной железы [45], РМЖ и прямой кишки [46]) на электрофореграмме также наблюдаются фрагменты ДНК, кратные нуклеосоме – «нуклеосомная лесенка». Сравнительное исследование уровня циркулирующих в крови нуклеосом методом ИФА с помощью коммерчески доступного набора «Cell Death Detection ELISA PLUS kit» (Boehringer Mannheim, Япония) показало, что у больных с не метастатическим и с метастатическим РМЖ уровень нуклеосом в плазме крови возрастал по сравнению со здоровыми донорами примерно в 15 и 12 раз, соответственно [47].

В более современных работах предприняты многочисленные попытки определения соотношения коротких и длинных форм циркулирующей ДНК при помощи количественной ПЦР с использованием в качестве уровня фрагментации ДНК индекса целостности (соотношения коротких и длинных фрагментов). В частности, в работе [48] для оценки доли апоптотической ДНК в общем пуле вДНК сыворотки крови больных раком мочевого пузыря и больных доброкачественной гиперплазией простаты методом количественной ПЦР авторами были подобраны две пары праймеров: на апоптотические (последовательность *PTGS2*, 124 п.н.) и некротические (последовательность *Reprimo*, 271 п.н.) фрагменты. Было показано, что при доброкачественной гиперплазии предстательной железы увеличивается концентрация длинных фрагментов амплифицированного гена *Reprimo*, а концентрация коротких фрагментов амплифицированного гена *PTGS2* повышается при раке мочевого пузыря и коррелирует с низкой выживаемостью больных. Было обнаружено, что опухолевая ДНК составляет малую часть (~ 1,9%) от общего пула циркулирующей ДНК, что свидетельствует о том, что главным источником ДНК в кровотоке является апоптоз. Высвобождение коротких фрагментов в кровеносное русло характерно для апоптотической гибели клеток, а увеличение апоптотического индекса (отношения концентраций фрагментов *PTGS2* / *Reprimo*) в данном случае свидетельствует о преобладании апоптотической гибели клеток над некротической.

Исследование вДНК плазмы крови здоровых доноров при помощи системы 454 GS-FLX System (Roche) [31] показало, что по составу различных классов повторяющихся элементов вДНК не отличается от геномной ДНК. Тем не менее, в составе вДНК более часто встречаются *Alu* элементы (11,4% от всего генома), а длинные повторяющиеся последовательности *L1* и *L2* встречаются реже, чем в геномной ДНК, что свидетельствует о том, что вДНК плазмы имеют преимущественно апоптотическое происхождение.

Сходные результаты по представленности *LINE*- и *SINE*-элементов были получены при исследовании вДНК апоптотических телец, выделенных из культуральной среды клеток HUVES [49]. Кроме того, было показано, что такая вДНК обогащена более специфическими последовательностями, например ДНК района 9q12. Выявленное

преимущественное расположение повторов *Alu* в областях эухроматина свидетельствуют о неоднородной деградации геномной ДНК во время апоптоза, ведущей к обогащению внДНК кодирующими последовательностями.

В норме некроз распространен значительно меньше, чем апоптоз [50]. При некротической гибели клеток активируются лизосомальные протеазы и нуклеазы, ядерная ДНК при этом может деградировать до моно- и олигонуклеотидов. Как и при апоптозе, незначительное количество геномной ДНК избегает полной деградации и поступает в кровотоки [51] (рисунок 1). Действительно, доля внДНК некротического происхождения существенно возрастает при травмах и больших дозах ионизирующего облучения [52], ишемии [53], развитии опухолей [13]. Показано, что при интенсивной радиационной терапии концентрация внДНК в крови онкологических больных зависит от дозы и количества циклов облучения. В частности, было показано, что в течение первых двух недель лучевой терапии концентрация внДНК в плазме крови повышалась до 900% по сравнению с исходной концентрацией, а затем снижалась до более низкой концентрации, чем до проведения терапии [52]. Авторы связывают эту динамику с интенсивной некротической гибелью раковых клеток в первые недели лучевой терапии. Действительно, при исследовании размера циркулирующей ДНК в плазме крови онкологических больных было показано, что высвобождаемая при некрозе ДНК имеет гораздо большие размеры, нежели при апоптозе – до 10 т. п. н. [38], а по некоторым данным – до 80 т.п.н. [54].

Другим источником внДНК в системной циркуляции является геномная ДНК нейтрофилов. NETs образуются активированными нейтрофилами в процессе «NETоза» [55], в котором содержимое ядра высвобождается во внеклеточное пространство, включая высокомолекулярные фрагменты ДНК, гистоны и ферменты гранул нейтрофилов, в том числе эластаза. Эти компоненты формируют сети, которые способны не только физически захватывать бактерии, но и обеспечивать повышенную концентрацию бактерицидных компонентов. В последние годы стало ясно, что NETs также могут образовываться в стерильных условиях при различных провоспалительных состояниях – тромбозе, онкологических заболеваниях, системной красной волчанке, атеросклерозе и диабете. NETоз может также быть стимулирован хемокинами [56] и факторами роста [57]. В зависимости от микроокружения в опухоли экспрессия данных факторов может быть повышена, тем самым обеспечивая связь между канцерогенезом и NETозом. С другой стороны, многие компоненты NETоза могут стимулировать рост новообразования, способствовать ангиогенезу и метастазированию [58].

Повышенное содержание онкоспецифических последовательностей ДНК в пуле циркулирующих в крови дезоксирибонуклеиновых кислот [59], а также увеличение

концентрации ДНК в культуре клеток содержащих ничтожные количества апоптотических и/или некротических клеток [60], позволяют предположить, что внДНК может *активно секретироваться* клетками. Большая часть работ, подтверждающих это явление, относится к 70–80-м годам. Было показано, что в первичной культуре лимфоцитов секретируемая геномная ДНК по размеру соответствует нескольким генам [61]. В пользу активной секреции ДНК свидетельствуют и результаты более современных исследований. В частности, в работе [62] на клетках цервикальной аденокарциномы (культура HeLa) и эндотелиальных клетках пупочной вены человека (культура HUVEC) показано накопление ДНК в культуральной среде в ходе лаг-фазы и в начале фазы экспоненциального роста клеточных культур; авторы работы полагают, что это не может свидетельствовать об апоптотическом происхождении внДНК, а обуславливается наличием механизмов активной секреции ДНК клетками.

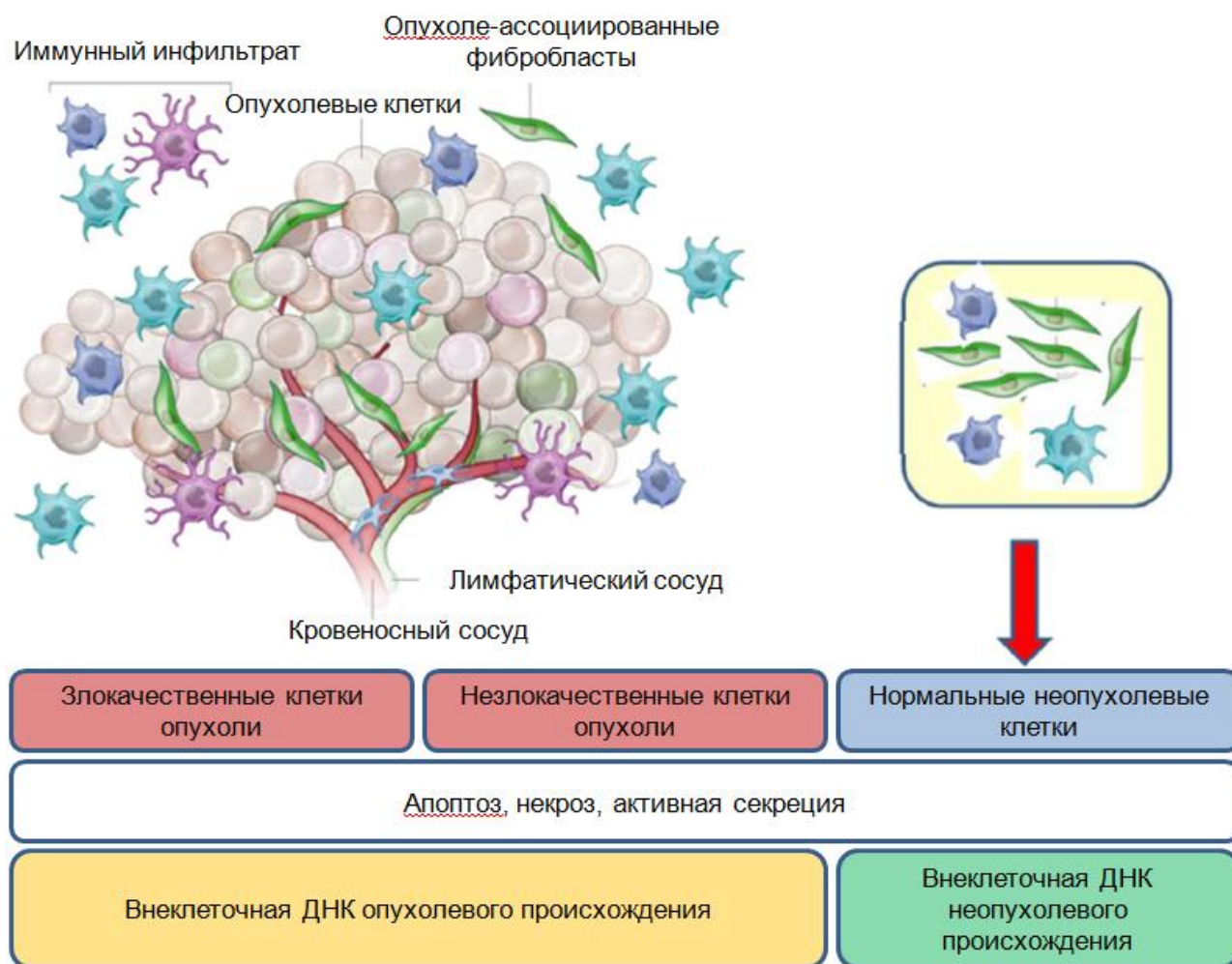


Рисунок 1 – Источники циркулирующих внеклеточных нуклеиновых кислот крови [51].

Другой группой авторов [63] на культуре мастоцитов НМС-1 продемонстрирована способность активно секретировать ДНК-содержащие комплексы в ответ на бактериальную инфекцию (*Streptococcus pyogenes*). В работе [64] показана активная секреция нуклеосом

нейтрофилами: после 30 минут инкубации человеческих нейтрофилов, активированных 12-о-тетрадеканоил-форбол-13-ацетатом и апротинином, с обогащённой тромбоцитами плазмой крови и коллагеном I типа было показано 11-кратное увеличение концентрации нуклеосом в культуральной среде. внДНК секретируется во внеклеточную среду в виде комплекса с гликолипопротеинами и РНК [64, 65]. На моделях семи клеточных линий в системе *in vitro* было показано, что существует статистически значимая корреляция между уровнем гликолиза и концентрацией внДНК. Фрагменты внДНК в культуральных средах были представлены как апоптотической лестницей, так и высокомолекулярными фрагментами с наиболее представленной длиной ~ 2000 п.н. В процессе культивирования клеток авторы наблюдали снижение представленности фрагментов, кратных нуклеосоме и увеличение представленности высокомолекулярной ДНК, что исключало апоптотическое или некротическое происхождение внДНК в среде [66].

С целью определения ингибиторов, наиболее эффективно влияющих на концентрацию внДНК клетки цервикальной аденокарциномы (культура HeLa) и эндотелиальные клетки пупочной вены человека (культура HUVEC) инкубировали в присутствии ингибиторов классического (Гольджи-зависимого) и неклассического (Гольджи-независимого) путей секреции, а именно: монензина, глибурида, метиламина, оуабаина, цитохалазина и хлорокина, и затем определяли концентрацию внДНК в культуральной среде и в трипсиновом элюате с поверхности клеток с помощью количественной ПЦР [67]. Было показано, что обработка обоих типов клеток этими ингибиторами не влияет на концентрацию внДНК в среде, за исключением хлорокина (повышает pH в эндосомах, лизосомах и везикулах Гольджи [68]), который в два раза увеличивал концентрацию внДНК в культуре HUVEC. Другие ингибиторы не влияли на концентрацию ДНК в культуральных средах HUVEC и HeLa. Показано, что на концентрацию ДНК, ассоциированной с клеточной поверхностью, в культурах первичных и раковых клеток влияли все ингибиторы. Наиболее значимые изменения в концентрации ДНК, ассоциированной с клеточной поверхностью, наблюдались в случае добавления монензина и глибурида. На культуре HUVEC было установлено, что влияние монензина на концентрацию внДНК в данной культуре демонстрирует участие Гольджи-зависимого пути секреции в транспорте ДНК из клетки, а глибурида – участие белков семейства ABC1 в транспорте ДНК. Белки семейства ABC1 участвуют в энергозависимом мембранном транспорте различных типов белков по Гольджи-независимому пути секреции. Это свидетельствует о существовании ДНК-связывающих белков, экскретируемых клетками подобно, в частности, ядерным белкам семейства HMG, которые принимают участие в связывании сайт-специфических ДНК-узнающих белков с хроматином [69]. Хлорокин

способен ингибировать вне- и внутриклеточный транспорт различных молекул и потенциально является индуктором апоптоза в активно пролиферирующих клетках. Инкубация клеток с данным ингибитором может повышать уровень внДНК за счёт высвобождения ДНК даже из небольшой части клеток, подвергающихся апоптозу. Таким образом, в генерацию внДНК вносят вклад как везикулярный, так и белковый транспорт. Различные ответы первичных и раковых клеток на добавление ингибиторов белковой секреции демонстрируют различия в механизмах генерации внДНК в первичных и раковых клетках.

### 1.1.2. Форма циркуляции внДНК в крови

Инкубация синтетических дезоксирибонуклеотидов с кровью и другими типами биологических жидкостей приводит к быстрому гидролизу нуклеиновых кислот [70]. Тем не менее, в норме поддерживается определенная концентрация внДНК в крови [13].

Одним из механизмов, обеспечивающих длительную циркуляцию ДНК в крови, по-видимому, может являться упаковка фрагментированного в результате апоптоза нуклеинового материала в окруженные клеточной мембраной апоптотические тельца [71]. На примере формирования апоптотических телец в культурах клеток HL-60 и MCF-7 было показано, что 90% апоптотических телец содержат либо только ДНК, либо только РНК и лишь 10% имеют смешанный состав [71]. При помощи флуоресцентной гибридизации *in situ* и массового параллельного секвенирования ДНК апоптотических телец культуральной среды клеток миелоидной лейкемии (культура K562) было показано, что ДНК микровезикул имеет повышенное содержание *Alu*-повторов и обеднена *L1* элементами, а также обогащена специфическими последовательностями, например, ДНК района 9q12 [49]. Авторы полагают, что это может быть обусловлено гидролизом апоптотическими нуклеазами некоторых районов деконденсированного гетерохроматина, а его упаковка в апоптотические тельца может предохранять деметилированную ДНК от дальнейшей деградации нуклеазами.

С помощью дифференциального ультрацентрифугирования (3 000g, 10 000g, 100000g) было показано, что длинные фрагменты внДНК (1-9 т.п.н.) со-выделяются с онкосомами (1-10 мкм) и экзосомами, а короткие фрагменты внДНК содержатся в супернатанте после ультрацентрифугирования при 100000g. Поскольку из культуральной среды клеток линий H226B, H838, H1975 авторами была получена только длинная ДНК, а на модели животных с использованием этих же линий из сыворотки получены длинная ДНК и короткая ДНК опухолевого происхождения, авторы делают вывод, что короткие фрагменты (120-265 п.н.) опухолевой ДНК являются результатом деградации длинных фрагментов внДНК [72].

По другим данным, внДНК крови не подвергается упаковке в какие-либо апоптотические тельца/микровезикулы. Эти выводы были сделаны на основании эксперимента, в котором авторы фильтровали плазму крови через поры различного диаметра (от 0,22 до 0,5 мкм) с последующей количественной оценкой ДНК гена  $\beta$ -глобина методом ПЦР в реальном времени. Было показано, что как в норме, так и при патологии концентрация ДНК в фильтрате не зависит от диаметра пор использованных фильтров [73].

Поскольку было показано, что ДНК-связывающей активностью обладает около 1,5 % сывороточных белков [8, 74], внДНК может циркулировать в составе комплексов с этими белками. В частности, было показано, что ДНК-связывающие белки обладают большей гетерогенностью: в сыворотке крови обнаруживалось более 20 фракций, основная масса (5 фракций) которых была представлена белками с довольно высокой молекулярной массой 700 - 200 кДа, а меньшая часть - низкомолекулярными белками с молекулярной массой 100 – 20 кДа [8]. В более поздних работах, с помощью аффинной хроматографии были идентифицированы мажорные белки, связывающие нуклеиновые кислоты сыворотки крови с молекулярной массой 126, 86, 73, 67, 54, 39 и 28 кДа [74].

При исследовании взаимодействия олигонуклеотидов с белками сыворотки крови *in vivo* было показано, что нуклеиновые кислоты в крови могут связывать альбумин ( $K_d = 2 \times 10^{-5}$  М) и иммуноглобулины классов А ( $K_d = 5 \times 10^{-6}$  М), М ( $4 \times 10^{-6}$  М) и G ( $K_d = 6 \times 10^{-6}$ ) [76]. Олигонуклеотиды в составе таких комплексов менее доступны для действия нуклеаз и способны длительно циркулировать в организме мышей [77].

Кроме иммуноглобулинов и альбумина, ДНК-связывающей активностью обладает белок системы комплемента C1q, причем связывание белка C1q с ДНК препятствует его взаимодействию с иммуноглобулинами G [78, 79].

Связывание ДНК с фибронектином ( $K_d = 4,6 \times 10^{-5}$  М) [80], который является мажорным белком плазмы (300-400 мкг/мл) и при этом гепарин-связывающим белком [81], позволяет предполагать, что нуклеиновые кислоты могут также связываться и с другими белками свертывающей системы крови, имеющими центры связывания гепарина и других полианионов.

ДНК-связывающей способностью обладает также лактоферрин ( $K_d = 5 \times 10^{-7}$  М) [82], концентрация которого в сыворотке крови составляет от 0,13 до 0,42 мг/мл.

Лизоцим также образует достаточно прочные комплексы с ДНК ( $K_d = 2 \times 10^{-6}$  М) и может также участвовать в циркуляции внДНК, однако концентрация данного белка в плазме не велика (5-9 мкг/мл) [83].

Поскольку среди нескольких основных белков плазмы крови, связывающих нуклеиновые кислоты, есть неидентифицированные белки с молекулярной массой 28 кДа



[74], можно предположить, что аполипопротеины, и в частности основной белковый компонент ЛПВП апоА-I с молекулярной массой 28 кДа, участвуют в транспорте вДНК. Действительно, было показано, что около 12% вДНК циркулирует в плазме крови в составе комплексов с липопротеинами, из них 7-8% - с ЛПВП [84].

Вероятно, часть белков плазмы крови, связывающих вДНК, опосредуют её опсонизацию, помечая нуклеиновую кислоту для удаления из кровяного русла и последующей деградации непаренхиматозными клетками, а часть белков обладает дис-опсонизационными функциями, повышая время циркуляции вДНК и понижая её поглощение гепатоцитами. Показано, что ДНК-связывающими дис-опсонизационными белками сыворотки крови являются platelet factor 4, histone 4, cytoplasmic  $\beta$ -actin,  $\beta$ 1-globin, albumin 1, thrombospondin 1 precursor, hemoglobin  $\alpha$ -chains, и histone-like proteins [85]. Функционирование ДНК-связывающих белков крови, обладающих опсонизационными и дис-опсонизационными свойствами может выступать в качестве регуляторного механизма циркуляции вДНК.

Сохранность вДНК в крови может также обеспечить упаковка нуклеинового материала в олигонуклеосомные частицы. Действительно, наличие нуклеосом в плазме крови было подтверждено при помощи электрофореза ДНК плазмы в агарозном геле [38, 43]. Размер вДНК в составе моно- и олигонуклеосом в плазме/сыворотке крови онкологических больных и с системной красной волчанкой преимущественно составляет 150-200 п.н, 400 п.н, 600 п.н и 800 п.н. [38, 86]. Способность линкерных и коровых гистонов напрямую проникать через плазматическую мембрану [87] позволяет предположить, что ДНК-гистоновые комплексы, вероятно, также способны переносить ДНК через мембраны внутрь клетки.

Кроме того, было показано, что увеличение количества клеток, вступающих в некроз и апоптоз, приводит к повышению концентрации нуклеосом в кровеносном русле [47, 64]. Действительно, при аутоиммунных заболеваниях [44], травмах и сепсисе [44, 88], ишемии [89], онкологических заболеваниях [88, 90] концентрация в крови внеклеточных нуклеосом существенно возрастает по сравнению со здоровыми донорами. В частности, методом ИФА при помощи коммерчески доступного набора «Cell Death Detection ELISA PLUS kit» («Boehringer Mannheim», Япония), основанного на использовании моноклональных антител против гистонов, показано, что концентрации нуклеосом в сыворотке крови больных с доброкачественными и злокачественными опухолями различных тканей составляют 146 и 190 у.е., соответственно, в то время как у здоровых доноров концентрация нуклеосом значительно ниже – 24 у.е. [88]. В другой работе [91] с использованием аналогичного аналитического подхода авторы отмечали повышение концентрации циркулирующих в крови нуклеосом в результате индуцированной гипоксии: уровень нуклеосом в плазме крови

мышей увеличивался с 0,44 до 1,35 у.е. С использованием указанного выше аналитического набора была также показана возможность определения абсолютной концентрации нуклеосом. В частности, было продемонстрировано статистически значимое увеличение концентрации (с 4,3 до 7,4 нг/мл) нуклеосом в сыворотке крови у больных псориазом при терапии по Геккерману [92]. Выявленная корреляция ( $R = 0,327$ ,  $p = 0,001$ ) концентрации внДНК в сыворотке крови здоровых доноров и больных РМЖ с концентрацией нуклеосом дополнительно подтверждает данные различных исследований о циркуляции части внДНК в виде нуклеосом [90].

Установлено, что нуклеосомы, содержащие в своём составе гистон H1, нерастворимы в физиологической ионной среде (при концентрации двухвалентных катионов 3 мМ), характерной для плазмы крови, однако сывороточный амилоид Р способен замещать гистон H1, повышая таким образом растворимость нуклеосом в крови [7]. Кроме того, наличие в составе внДНК локуса, ответственного за связывание ДНК с гистоном H3K27me2, по-видимому необходимо для экспорта и стабилизации внДНК [87].

На возможность циркуляции внДНК, ассоциированных с поверхностью ФЭК, указывают факты обнаружения аффинных к нуклеиновым кислотам белков на внешней поверхности клеточных мембран [93]. Учитывая, что поверхность 1 мл крови составляет не менее  $0,76 \text{ м}^2$ , а многоточечное взаимодействие протяженных молекул или надмолекулярных структур обеспечивает прочное связывание в случае, когда каждый из центров связывания имеет низкую аффинность, ФЭК могут транспортировать значительное количество биополимеров и их комплексов на своей поверхности, включая и внДНК.

Изучению вопроса о природе взаимодействий нуклеиновых кислот с поверхностью различных клеток посвящен ряд работ, в которых авторы исследовали связывание как экзогенных, так и эндогенных ДНК с клетками в экспериментах *in vitro* и *in vivo*. Полученные результаты свидетельствуют в пользу существования нескольких вариантов связывания ДНК с клеточной поверхностью.

#### *Неспецифическое связывание ДНК с поверхностью мембран*

Часть нуклеиновых кислот, как типичные полианионы, по-видимому, неспецифически взаимодействуют с фосфолипидами клеточных мембран с участием катионов двухвалентных металлов, в первую очередь  $\text{Ca}^{2+}$  и  $\text{Mg}^{2+}$  [94]. Белки клеточной поверхности, имеющие в своём составе Lys и Arg, могут также неспецифически взаимодействовать с нуклеиновыми кислотами и усиливать их связывание с мембраной. Действительно, было показано, что клетки миеломы линии P3X6 Ag8.653 и фибробласты линии A9 адсорбируют ДНК фага T7 и плазмидную ДНК pSKA2 в присутствии ионов магния, при этом связывание ДНК с поверхностью клеток зависит от концентрации  $\text{Mg}^{2+}$  в среде. Максимальное количество ДНК

связывается с клеточной поверхностью в присутствии 20 мМ  $MgCl_2$  и составляет 2500 молекул ДНК фага T7 на клетку. Авторы наблюдали, что добавление 0,15 М NaCl к клеткам после сорбции ДНК в присутствии  $MgCl_2$  приводит к освобождению основной части адсорбированной ДНК с поверхности клеток в среду, в то время как 10-15% ДНК остается необратимо связанной с клетками [94].

#### *Связывание ДНК опосредованное белками клеточной поверхности*

Специфическое связывание циркулирующих в крови НПК с клетками может обеспечиваться за счёт белковых и липопротеиновых компонентов [95]. Действительно, мягкая обработка клеток яичников китайского хомячка трипсином или папаином в условиях, не приводящих к уменьшению жизнеспособности клеток, приводит к высвобождению нуклеиновых кислот с поверхности клеток [96]. Позднее на поверхности клеток разных типов было обнаружено, описано и частично идентифицировано множество достаточно прочно и селективно связывающих ДНК белков, которые подробно описаны в обзоре [97]. Например, на поверхности мышинных фибробластов (культура L929) были обнаружены ДНК/РНК-связывающие белки с молекулярными массами 79 и 90 кДа с усредненной  $K_d = 2 \times 10^{-7}$  М. Количество таких специфических к ДНК рецепторов для клеток L929 составляет  $1,2 \times 10^5$  молекул на клетку [98]. На поверхности эндотелиальных клеток, непосредственно контактирующих с кровью, были обнаружены ДНК-связывающие субъединицы ДНК-зависимой протеин киназы, так называемые Ku70 и Ku80 белки, связывающие ДНК с высокой аффинностью ( $K_d = 5-25 \times 10^{-10}$  М) [99].

На плазматической мембране человеческих клеток линий KB, HepG2, HL-60 и H1 выявлены два ДНК-связывающих белка с молекулярными массами около 100 и 110 кДа с усредненной  $K_d = 6 \times 10^{-8}$  М. Количество таких специфических к ДНК рецепторов для клеток HepG2 составляет  $1,2 \times 10^6$  молекул на клетку [100].

Три высоко-аффинных ДНК связывающих белка с молекулярными массами 28, 59 и 79 кДа были выявлены на поверхности лимфоцитов [93]. Способность клеток связывать ДНК фага  $\lambda$  показана для разных типов лейкоцитов: моноцитов, Т- и В-лимфоцитов и нейтрофилов [101, 102]. ДНК-связывающий рецептор с молекулярным весом 30 кДа с  $K_d \sim 10^{-9}$  насыщаемо связывает ДНК:  $0,8 - 2,6 \times 10^6$  молекул на клетку в зависимости от типа лейкоцитов [102]. Методом проточной цитометрии данный белок был выявлен на 67% лимфоцитов и 98% моноцитов, а путём двойного мечения показана его экспрессия в 90% В-лимфоцитов и в 50% Т-лимфоцитов [103].

На моноцитах селезёнки мышей показано участие в связывании ДНК мембранных иммуноглобулинов классов М и D [104]. Помимо указанных белков в данной работе также

идентифицированы другие ДНК-связывающие мембранные белки лимфоцитов с молекулярными массами от 15 до 145 кДа, а инкубацией с аффинным реагентом определены значения  $K_d$  комплексов ДНК-белок:  $0,5-5 \times 10^{-6}$  М.

Путем скрининга библиотеки кДНК моноцитов человека с использованием вектора  $\lambda$ gt 11 и сыворотки пациентов с системной красной волчанкой, которая обладает способностью конкурентно ингибировать связывание ДНК с поверхностью клетки за счет взаимодействия с ДНК-связывающими белками, был обнаружен ген поверхностного ДНК-связывающего белка с молекулярной массой около 130 кДа. Анализ структуры белка выявил несколько функциональных доменов, таких как цинковый палец, расположенный примерно в центре белковой молекулы, RING-палец и возможный трансмембранный домен вблизи карбоксильного конца. Было показано, что константа связывания MNAB с ДНК составляет примерно  $4 \times 10^{-9}$  М, тогда как точечная мутация в консервативной области цинкового пальца снижает это значение на 50%. Используя проточную цитометрию, авторы локализовали белок MNAB на поверхности клеток [105].

Способность связывать ДНК характерна и для тромбоцитов, при этом максимальное связывание составляет 0,5-2,75 нг бактериальной одноцепочечной ДНК на миллион предварительно отмытых от ДНК клеток. Ассоциированная с тромбоцитами ДНК не разрушалась при обработке клеток ДНКазой I и препятствовала агрегации при активации тромбоцитов аспирином [106].

ДНК-связывающий рецептор описан и на эритроцитах человека – эритроцитарный поверхностный мембранный белок, молекулярная масса которого по данным различных авторов составляет 30 кДа [97] либо 42 кДа [107]. Поскольку у больных системной красной волчанкой по сравнению со здоровыми донорами наблюдается функциональный недостаток связывающей способности этого рецептора, предполагается, что это является причиной повышения уровня вДНК в крови при развитии данной патологии.

На клетках карциномы эпителия человека (культура A431) была выявлена группа поверхностных клеточных ДНК-связывающих белков с молекулярным весом ~68 кДа. В результате анализа выделенных белков методом масс-спектрометрического секвенирования, они были идентифицированы как альбумин и кератины K1, K10 и K2e [108].

Взаимодействие ДНК возможно с паттерн-распознающими рецепторами (TLR, RLR и др.) фибробластов, что выражалось в ингибировании продукции клетками IL-6 и IL-8 разными типами ДНК (геномной, плазмидной pсDNA3.1/Myc-His(-)/lacZ, вДНК и ассоциированной с клетками ДНК), при её одновременном введении с индуктором выработки IL – аналога двухцепочечной РНК – полиинозит-цистеина [109]. Причём степень связывания ДНК с рецепторами зависела от последовательности, поскольку ДНК

трипсинового элюата сильнее ингибировала выработку интерлейкинов, т.е. прочнее связывалась с рецепторами; сиквенс-специфичность авторы подтвердили, используя одно- и двухцепочечные дезоксирибоолигонуклеотиды различной длины и последовательности, стабилизированных фосфоротиоатными группировками.

Связывание вДНК с поверхностью клеток может обеспечиваться также рецепторами к полианионам. В частности, было показано, что белок Мас-1, представляющий собой гепарин-связывающий интегрин, присутствующий на поверхности лейкоцитов, моноцитов, макрофагов и НК, способен связывать фосфодиэфирные олигонуклеотиды [110]. Было показано, что фибриноген - природный лиганд для Мас-1 и моноклональные антитела против Мас-1 ингибируют связывание этого белка с ДНК, а в присутствии ионов  $\text{Ca}^{2+}$  или  $\text{Mg}^{2+}$  обе субъединицы Мас-1 – 95 кДа ( $\beta 2$ ) и 195 кДа ( $\alpha M$ ) - связывают ДНК с константами диссоциации  $8,8 \times 10^{-6}$  М и  $1,7 \times 10^{-5}$  М, соответственно.

Помимо рецепторов, связывающих нуклеиновые кислоты, в связывании НПК с клеточной поверхностью могут принимать участие рецепторы к белкам, входящим в состав НПК. Следует отметить, что в крови эндогенные ДНК циркулируют как правило в составе нуклеосом, однако в состав таких циркулирующих комплексов может входить сывороточный амилоид Р [7]) и ряд белков сыворотки крови, которые обладают достаточно высоким сродством к ДНК. К числу таких белков относятся лизоцим [83], лактоферрин [82], С1q-реактивный белок [78], иммуноглобулины [76], альбумин [76] и т.д.

Рецепторы к белкам, связывающим нуклеиновые кислоты, зачастую экспрессированы на поверхности ФЭК. В частности, рецепторы к Fc-фрагментам иммуноглобулинов описаны для всех пяти классов антител [111] и представлены на всех типах иммунных клеток: Т- и В-лимфоцитах, моноцитах, гранулоцитах и др. Рецепторы к лактоферрину обнаружены на поверхности различных типов лейкоцитов [112, 113]. В частности, в клеточной культуре моноцитов было идентифицировано четыре рецептора к этому белку с молекулярными массами 35, 35–37, 50 и 80 кДа [113]. На эндотелиальных клетках быка (культура ВРАЕС) обнаружен специфический рецептор (57–60 кДа) для ЧСА, способствующий связыванию ДНК [114].

Гистоны в комплексе с ДНК также принимают участие в формировании НПК, экспонирующихся на поверхности клеток, что, по-видимому, обеспечивается специфическими рецепторами к нуклеосомам. В частности, с помощью моноклональных антител против ДНК было показано, что за связывание нуклеосом с поверхностью фибробластов (культура CV-1) отвечает мембранный белок с молекулярной массой 94 кДа, а добавление ДНК или гистонов не приводит к связыванию с этим рецептором [115].

Другой группой авторов [116] с помощью меченных биотином нуклеосом на той же культуре выявлен рецепторный белок с молекулярной массой 50 кДа, проявляющий высокую аффинность к нуклеосомам ( $K_d \sim 7 \times 10^{-9}$  М,  $9 \times 10^7$  молекул на клетку). Было также показано, что связывание нуклеосом с клеточной поверхностью не происходит при предварительной обработке клеток протеазами (смесью химотрипсина и протеиназы К). Более того, связывание мононуклеосом может сопровождаться комплексообразованием с антителами против ДНК и антителами против гистонов (образование которых типично при системной красной волчанке) с образованием на поверхности клеток иммунных комплексов, которые в дальнейшем подвергаются эндоцитозу. В работе [117] на поверхности человеческих периферических мононуклеаров крови и мышечных Т-клеток (линия S49) выявлены два рецепторных белка (29 и 69 кДа), которые с равной эффективностью связывают как ДНК, так и нуклеосомы. Показано, что добавление нуклеотидов ингибирует связывание меченной биотином ДНК с клеточной поверхностью, а гистонов – увеличивает. Авторы не исключают, что найденные белки не являются самостоятельными, а являются нуклеосома/ДНК-связывающими компонентами более сложной молекулы, при этом гистоны, вероятно, могут выступать в роли посредников при связывании ДНК с клеточными рецепторами.

Таким образом, упакованная в белковые комплексы и/или мембранные структуры вДНК из родительских клеток сначала попадает в интерстициальное пространство, транспортируется в организме с током крови и лимфы и либо подвергается деградации и выведению, либо, минуя интерстициальное пространство, может проникать в клетки-мишени. Кроме того, циркулирующие в крови ДНК могут связываться с поверхностью ФЭК как неспецифически (ионные взаимодействия), так и при помощи специфических рецепторов к нуклеиновым кислотам и белкам, связывающим нуклеиновые кислоты в кровотоке.

### **1.1.3. Влияние гидролаз крови на циркуляцию дезоксирибонуклеопротеиновых комплексов**

При инкубации препаратов очищенных ДНК с сывороткой крови наблюдается быстрый гидролиз нуклеиновой кислоты [70], что может объясняться высокой нуклеазной активностью. По различным оценкам, интегральная нуклеазная активность крови составляет от  $4,4 \times 10^{-3}$  до 2,5 ед. акт./мл [118].

С другой стороны, циркулирующая вДНК экранирована от нуклеаз белками, липо- и гликопротеинами крови [8, 74]. Следовательно, гидролазы крови, способные разрушать биополимеры, связывающие нуклеиновые кислоты, также могут влиять на длительность

циркуляции нуклеиновых кислот, повышая доступность нуклеиновых кислот для нуклеаз. Поскольку в норме активность гидролаз крови тонко регулируются соотношением концентрации ферментов и их ингибиторов, основную роль играет не столько концентрация фермента, сколько суммарная ферментативная активность крови.

Действительно, при инъекции в хвостовую вену мыши синтетического одноцепочечного дезоксирибоолигонуклеотида TGAACACGCCATGTC через 5 мин он элиминируется более чем на 99,9%, а через 15 мин уже не детектируется [119]. В то же время, ДНК плазмы человека, введённая в мышинный кровоток, сохраняет стабильность гораздо более длительное время: через 5 мин детектируется около 6% от введённой ДНК, через 45 мин – 2%, однако затем уровень снова возрастает до примерно 6% и сохраняется более 4-х часов; такая динамика может быть связана с депонированием ДНК тканями и последующей её диффузией в кровеносное русло [120]. При исследовании длительности циркуляции фетальной ДНК в кровотоке родившей женщины методом количественной ПЦР показано, что время полу-жизни фрагментов Y-хромосомы составляет в среднем 16,3 мин [121].

С помощью экспериментов на мышах, дефицитных по ДНКазе I, ДНКазе 1L3 и DFFB (каспаза-активируемая ДНКазы) было показано, что внутриклеточная деградация ДНК идет с участием DFFB, а последующая внеклеточная в плазме крови – с участием ДНКазы I, ДНКазы 1L3 и других нуклеаз [122].

Нейтральная ДНКазы I (КФ 3.1.21.1) является одной из основных дезоксирибонуклеаз, присутствующих в крови человека; ее источники – поджелудочная железа, а также передняя и промежуточная доли гипофиза. Для этого фермента характерны зависимость от ионов двухвалентных металлов ( $Mg^{2+}$  и  $Ca^{2+}$ ), нейтральный pH-оптимум и образование в качестве продукта гидролиза фрагментов ДНК с фосфатом на 5'-конце [123]. ДНКазы I представляет собой секреторный белок, что подтверждается высоким уровнем гликозилирования и наличием сигнального пептида на N-конце [124]. По разным источникам концентрация этого фермента в плазме крови составляет от  $3,2 \pm 1,4$  нг/мл [125] до  $18,4 \pm 6,7$  нг/мл [126], при этом доля активной формы фермента составляет всего от  $4,4 \pm 1,8$  ед. акт./л [127] до  $(0,2-6,3) \times 10^3$  ед. акт./л [128] в связи с присутствием природного ингибитора актина (до 100 мкг/мл) [129]. Этот белок взаимодействует с ДНКазой I в мольном соотношении 1:1 с константой связывания  $5 \times 10^{-8}$  М, полностью инактивируя этот фермент [130]. При некоторых заболеваниях, например системной красной волчанке, активность нейтральной ДНКазы достоверно снижается, а содержание ингибитора увеличивается [131]. В связи с этим для лечения аутоиммунных больных было предложено использовать мутантную форму рекомбинантной ДНКазы I, которая не ингибируется актином и обладает высокой

эффективностью гидролиза ДНК по сравнению с природным ферментом [131]. Этот же фермент предлагается использовать для лечения муковисцидоза, хронического бронхита и пневмонии, при которых наблюдается значительное количество полимерной ДНК, повышающей вязкость мокроты [132]. Биологическое значение ингибирования ДНКазы I актином остаётся невыясненным. Предполагается, что это свойство актина может быть важным в процессе митоза и апоптоза [133]. В ходе нормального клеточного цикла в момент разрушения ядерной мембраны ДНКазы I инактивируется актином и накапливается в микросомальных пузырьках. По-видимому, этот механизм контроля может ослабляться в ходе апоптоза, что приводит к гидролизу ядерной ДНК. Кроме того, предполагается, что свободная ДНКазы I может оказывать влияние на организацию системы микрофиламентов и таким образом принимать участие в морфологических изменениях, наблюдаемых в процессе апоптоза [133].

Содержание кислой ДНКазы II (К.Ф. 3.1.22.1) в крови примерно в 30 раз ниже, чем ДНКазы I [127]. Для этого фермента характерны кислый рН-оптимум, отсутствие потребности в активаторах и образование в качестве продуктов реакции олигонуклеотидов с фосфатом на 3'-конце [134]. Активность кислой ДНКазы в сыворотке крови здоровых доноров составляет  $0,11 \pm 0,009$  усл. ед./мг белка [135].

К дезоксирибонуклеазам крови следует отнести также фосфодиэстеразу I (К.Ф. 3.1.4.1), которая относится к неспецифическим экзонуклеазам и может использовать в качестве субстрата как ДНК, так и РНК, отдавая предпочтение одноцепочечным или денатурированным субстратам. Для этого фермента характерны зависимость скорости реакции гидролиза от ионов двухвалентных металлов, щелочной рН-оптимум и образование в процессе гидролиза нуклеозид 5'-фосфата, отщепляемого с 3'-конца нуклеиновой кислоты [136, 137]. К настоящему времени известно, что мембранная форма фосфодиэстеразы I является одним из ключевых эктоэнзимов (наряду с 5'-нуклеотидазой и щелочной фосфатазой), отвечающих за распад фрагментов нуклеиновых кислот до нуклеозидов, которые затем транспортируются в клетку [138]. Также фермент выполняет защитную функцию, гидролизуя чужеродные ДНК и РНК [138]. Согласно данным иммуноферментного анализа, содержание фосфодиэстеразы I в крови здоровых людей варьирует от 2,5 до 82,5 нг/мл, составляя в среднем  $29,7 \pm 2,9$  нг/мл [139].

Недавно было показано, что лактоферрин и иммуноглобулины также могут гидролизовать нуклеиновые кислоты. Лактоферрин присутствует в крови в небольшом количестве ( $168 \pm 100$  нг/мл), является белком острой фазы и обеспечивает неспецифическую защиту от бактериальных патогенов [140]. Максимальная ДНКазная активность лактоферрина наблюдается при нейтральных значениях рН, наличии



двухвалентных ионов металлов ( $Mg^{2+}$ ,  $Ca^{2+}$ ,  $Mn^{2+}$ ,  $Cu^{2+}$ ) [141]. Кроме того, способность лактоферрина гидролизовать ДНК активируется  $NaCl$ , АТФ,  $NAD^+$ .

Иммуноглобулины класса G и/или M с ДНК-гидролизующей активностью были обнаружены в сыворотке крови больных с аутоиммунными заболеваниями (системная красная волчанка, рассеянный склероз, тиреоидит Хашимото, ревматоидный артрит и др.), а также при вирусных гепатитах и СПИДе [142]. При рассеянном склерозе наибольший уровень дезоксирибонуклеазной активности антител наблюдается при нейтральных или слабощелочных значениях pH, наличии ионов двухвалентных металлов ( $Mg^{2+}$  и  $Mn^{2+}$ ), при этом в процессе гидролиза могут образовываться продукты с фосфатом на 5'-конце, на 3'-конце или их смесь. Эффективность гидролиза плазмидной ДНК иммуноглобулинами в 3-5 раз выше, чем одноцепочечного ДНК-субстрата [142]. Антитела могут быть гетерогенны по ДНК-гидролизующей активности: они могут проявлять различные комбинации эндо- и экзонуклеазной активности, быть направлены против одно- и двухцепочечных молекул ДНК и нуждаться, либо не зависеть от наличия ионов металлов.

Несмотря на разнообразие присутствующих в плазме крови нуклеаз, основным ферментом, обуславливающим ДНК-гидролизующую активность крови, является ДНКаза I [127]. Показано, что при снижении суммарной активности ДНКаз крови уровень внДНК в плазме крови достоверно возрастает [143]. Таким образом, ДНКазы являются одним из факторов негативной регуляции концентрации не связанной с клетками свободно-циркулирующей внДНК. Можно предположить, что дезоксирибонуклеазная активность крови, также является одним из факторов, определяющих концентрацию ДНК, связанной с поверхностью ФЭК. С другой стороны, на примере культуры клеток первичных эндотелиоцитов было показано, что обработка ДНКазой I приводит к удалению приблизительно половины внДНК с клеточной поверхности [144]. В другой работе было показано, что ДНКазы практически не гидролизуют ДНК, которая находится в составе белковых комплексов на поверхности ФЭК, не вносят значимого вклада в процесс фрагментации ДНК и ее диссоциации с клеточной поверхности [143].

Помимо нуклеаз на концентрацию внДНК, размер её фрагментов и время циркуляции в крови влияет упаковка ДНК и активность протеаз крови [145]. Действительно, было показано, что протеазная активность коррелирует с каспазной активностью ( $R = 0,539$ ,  $p = 0,0001$ ), та в свою очередь - с уровнем циркулирующих в сыворотке крови нуклеосом ( $R = 0,268$ ,  $p = 0,008$ ), а вместе они - со стадией РМЖ ( $p = 0,009$ ) [90]. Однако остается неясным, могут ли протеазы и каспазы оказывать влияние на гидролиз поверхностных белков, опосредующих связывание внДНК с поверхностью клеток.

Наконец, нарушение общего метаболизма (в том числе и липидов), которое приводит к «ломкости» мембран эритроцитов и наблюдается на поздних стадиях развития онкологических заболеваний [146] может приводить к нарушению архитектоники мембран в целом, и вероятно, влиять на связывание внДНК с клетками.

#### **1.1.4. Фрагментация и распределение внДНК в крови**

Низкая концентрация циркулирующих нуклеиновых кислот в крови требует высокой чувствительности методов определения их концентрации с учетом их фрагментации. Наиболее распространёнными подходами к измерению внеклеточных нуклеиновых кислот является спектрофотометрические методы анализа с использованием флуоресцентных интеркалирующих красителей (например, PicoGreen, Hoechst 32258, SYBR Green II и др.) и разных типов количественного ПЦР-анализа (SYBR Green I, TaqMan и др.), обладающего большей чувствительностью и специфичностью. Однако данные разных авторов о концентрации внДНК в плазме/сыворотке крови здоровых доноров значительно отличаются друг от друга [13, 147], что связано, по-видимому, с использованием разных методов выделения и определения концентрации нуклеиновых кислот. Резюмируя литературные данные, можно сделать вывод, что концентрация циркулирующих ДНК в крови здоровых доноров не должна превышать 20 нг/мл, а увеличение концентрации может указывать на возможное развитие патологии [13, 147]. Кроме методов выделения и детекции ДНК на получаемые значения внДНК влияют размер выборки пациентов и пробоподготовка образцов крови, а также нормирование и выбор гена-мишени при использовании ПЦР-анализа, что затрудняет сопоставление данных различных исследований.

В одной из первых работ, с помощью электрофоретического анализа в агарозном геле было показано, что внДНК плазмы крови онкологических больных представлена фрагментами размером от 0,5 до 21 т.п.н. [148]. Позднее также с помощью электрофореза в агарозном геле было показано, что внДНК в плазме онкологических больных представлена в основном фрагментами 180 п.н., 360 и 540 п.н., т.е. по длине кратному размеру нуклеосомы, хотя в некоторых образцах была обнаружена длинная ДНК (более чем 10 т.п.н.) [38]. В другой работе также было показано, что короткие фрагменты ДНК (~100 п.н.) встречаются лишь в плазме крови онкологических больных, наряду с длинными (более 10 т.п.н.), в то время как в крови здоровых доноров отсутствует ДНК короткого размера [86]. Путем клонирования с последующим секвенированием было показано, что образцы плазмы здоровых доноров содержат преимущественно фрагменты ДНК около 176 п.н. и в меньшем

количестве фрагменты длиной менее 500 п.н. с выступающими 5'-концами, с высоким содержанием GC на 5'- и 3'-концах [42].

Стимулами для исследования связанных с поверхностью клеток вДНК послужили работы по изучению естественного транспорта нуклеиновых кислот в клетки и изучение патогенеза аутоиммунных заболеваний [149]. Исследование размера вДНК в культуре HUVES, первичных фибробластов и HeLa показало, что во всех клеточных культурах ДНК, выделенная из культуральной среды, представлена фрагментами длиной от 180 до 1000 п.н., в то время как вДНК из трипсинового элюата с клеточной поверхности – в основном фрагментами от 3,5 до 20 т.п.н. [150].

С использованием подхода DELFI (DNA evaluation of fragments for early interception) было проведена оценка распределения фрагментов генома в составе вДНК. Было показано, что в крови здоровых доноров преобладают короткие фрагменты вДНК длиной 100 – 500 п.н., при этом размер высокомолекулярных фрагментов составляет от 21 до 80 т.п.н. [151].

Большое количество работ посвящено определению соотношения коротких и длинных форм вДНК при помощи количественной ПЦР, с использованием в качестве уровня фрагментации ДНК индекса целостности (отношение коротких и длинных фрагментов). В частности, при помощи количественной ПЦР на ген  $\beta$ -актин было показано, что индекс целостности (рассчитанный как соотношение концентрации ампликонов длиной 400 п.н. и 100 п.н.) у онкологических больных, по сравнению со здоровыми донорами достоверно повышается (0,66 против 0,14,  $p < 0,0001$ ) и позволяет с чувствительностью 59% и специфичностью 100% дискриминировать больных с доброкачественными и злокачественными новообразованиями яичников [152]. Авторами не было обнаружено корреляции между индексом целостности и доброкачественными новообразованиями рака яичников, эндометрия и рака груди.

Похожие результаты были получены при исследовании индекса целостности вДНК с помощью количественной ПЦР на *Alu*-повторы, представленные длиной, как правило, 300 п.н. и составляющие более 10% генома. Увеличение индекса целостности вДНК, (рассчитанного как соотношение концентрации ампликонов 247 п.н. и 115 п.н.), по данным авторов может обладать прогностической значимостью, поскольку коррелирует с прогрессированием РМЖ и метастазированием в лимфатические узлы [153]. Аналогичные результаты были получены и при исследовании индекса целостности вДНК в плазме здоровых доноров и больных раком головы и шеи [154].

Противоположные данные были получены другой группой исследователей [155], при определении индекса целостности вДНК крови больных раком яичника, рака эндометрия и молочной железы. Авторы не нашли достоверных отличий индекса целостности вДНК

(рассчитанного как соотношение концентраций ампликонов длиной 137 п.н. и 347 п.н.), в крови больных с доброкачественными и злокачественными новообразованиями молочной железы, яичников и эндометрия, а также не обнаружили корреляции индекса целостности вДНК от стадии заболевания, наличия метастазов и размера опухоли. Полученные различия в работах [152-154] и [155] можно объяснить различной пробоподготовкой образцов крови, использованием различных коммерческих наборов для выделения ДНК, а также различным дизайном количественных ПЦР-систем.

Противоречивость литературных данных о размере вДНК крови может быть связана со способами приготовления образцов крови, хранения, скорости центрифугирования и методами выделения нуклеиновых кислот. В ряде исследований было показано, что в сыворотке крови концентрация вДНК значительно выше, чем в плазме, что может быть связано с повреждением клеток крови в процессе свёртывания [156]. Кроме того, известно, что разные коммерческие наборы для выделения ДНК имеют разную эффективность выделения короткой ДНК [157].

Помимо исследования вДНК в плазме/сыворотке крови, были предприняты попытки соотнести концентрацию и размер связанной с ФЭК ДНК с развитием различных патологий. В частности, было показано, что у больных иксодовым клещевым боррелиозом уже на ранних стадиях заболевания выявлено статистически значимое увеличение концентрации как вДНК плазмы, так и ассоциированной с ФЭК ДНК по сравнению со здоровыми донорами. По данным ПЦР-анализа концентрация повторяющихся последовательностей *LINE-1* в составе вДНК плазмы и ассоциированной с ФЭК ДНК составила  $2,7 \pm 2,5$  нг/мл и  $13,4 \pm 0,41$  нг/мл в норме и  $9,9 \pm 2,6$  нг/мл и  $98,5 \pm 14,5$  нг/мл у пациентов, соответственно [158].

В то же при развитии аутоиммунных патологий выявлено достоверное перераспределение между фракциями – у пациентов возрастает концентрация вДНК в плазме и снижается концентрация ассоциированной с ФЭК ДНК по сравнению со здоровыми донорами. В частности, при ревматоидном артрите концентрация повторяющихся последовательностей *LINE-1*, оцененная с помощью ПЦР в режиме «реального времени», в составе вДНК плазмы и ассоциированной с ФЭК ДНК составила  $8,4$  нг/мл и  $50,8$  нг/мл в норме и  $12$  нг/мл и  $24$  нг/мл у больных, соответственно [159]. При этом не выявлено корреляции концентрации вДНК в плазме и ассоциированной с ФЭК ДНК больных от клинических маркеров ревматоидного полиартрита с системным проявлением. Тем не менее, полученные данные позволяют авторам предположить, что измерение концентрации циркулирующей в крови ДНК (в плазме и связанной с поверхностью ФЭК) может быть использовано для формирования групп риска развития ревматоидного полиартрита.

Исследование распределения вДНК в крови онкологических больных показало отсутствие корреляции между концентрацией вДНК и локализацией опухоли. Тем не менее, при развитии злокачественных новообразований, как и в случае развития аутоиммунных заболеваний, зачастую повышается концентрация вДНК в плазме и снижается – на поверхности форменных элементов. В частности, при исследовании распределения вДНК в крови больных немелкоклеточным раком легкого методом ПЦР, специфичной к фрагментам однокопийного гена  $\beta$ -актина и повторяющихся последовательностей *LINE-1* было показано, что концентрация вДНК в плазме крови достоверно не отличается у здоровых доноров и онкологических больных, однако у пациентов достоверно снижается концентрация ассоциированной с ФЭК ДНК ( $163 \pm 20$  нг/мл и  $47 \pm 9$  нг/мл по  $\beta$ -актину и *LINE-1* у пациентов и  $294 \pm 56$  нг/мл и  $171 \pm 28$  нг/мл по  $\beta$ -актину и *LINE-1* в контрольной группе, соответственно) [160]. По-видимому, определение концентрации вДНК в крови может быть использовано для мониторинга эффективности хирургического лечения [161] и/или радио-[162], химио- или гормонотерапии [163]. Наибольший интерес вызывает именно динамика изменения, а не единичное значение концентрации циркулирующих в крови нуклеиновых кислот. Возрастание концентрации циркулирующих нуклеиновых кислот позволяет сделать заключение о прогрессировании заболевания, в частности, о появлении метастазов.

Таким образом, можно сделать вывод о том, что вДНК крови представлены как длинными, так и короткими фрагментами. Концентрация вДНК в плазме крови, как правило, не превышает 20 нг/мл, а остальная часть вДНК связана с поверхностью ФЭК. Низкая концентрация вДНК и высокая гетерогенность по размеру циркулирующих дезоксирибонуклеиновых фрагментов создаёт дополнительные трудности для исследования состава, концентрации отдельных последовательностей ДНК и, как следствие, трудности разработки неинвазивных диагностикумов на основе вДНК крови.

### **1.1.5. Биологическая роль вДНК**

В последнее время предприняты попытки прояснить биологическую роль вДНК, а также сформулирован ряд гипотез о возможных механизмах действия циркулирующей в крови ДНК в норме и при развитии патологических процессов.

На сегодняшний день получены убедительные данные об иммуностимулирующих свойствах дцДНК [39, 164]. Циркулирующая вДНК воспринимается иммунной системой как молекула, ассоциированная с повреждениями, что вовлекает ее в запуск антибактериального и противовирусного ответа [165]. Иммуностимулирующие эффекты напрямую зависят от природы и формы циркуляции вДНК. В частности, вДНК ядерного,

митохондриального и бактериального происхождения сходным образом стимулирует коагуляцию и активацию тромбоцитов, однако по-разному влияет на воспаление и стимуляцию иммунной системы [166]. Кроме того, циркулирующие нуклеосомы не обладают цитотоксическим эффектом [165, 167], хотя свободные гистоны являются цитотоксичными для эндотелия и могут вызывать макро- и микроваскулярный тромбоз и почечную дисфункцию [168]. Показано, именно в комплексе с гистонами вДНК индуцирует синтез антител против ДНК [169], а спонтанно высвобождающиеся в супернатант культуры нормальных спленоцитов или лимфоцитов тимуса мышей нуклеосомы приводят к поликлональной В-клеточной активации *in vitro* [41]. Также показано, что вДНК может активировать предварительно праймированные гранулоцитарно-макрофагальным колониестимулирующим фактором нейтрофилы крови человека [170]. вДНК может входить в состав так называемых ДНК-ловушек – ДНК-содержащих сетевидных структур, образованных клетками врожденной иммунной системы [171]. NETs являются механизмом, либо альтернативным, либо дополняющим фагоцитоз. NETs однозначно принимают участие в реакциях против внеклеточных патогенов, а недавно была также установлена их роль в противоопухолевом иммунитете. Более того, при проникновении в цитоплазму клетки вДНК запускаются сигнальные пути, опосредующие запуск иммунного ответа: активацию клеток врожденного иммунитета, усиление продукции интерферонов 1 типа и различных провоспалительных цитокинов [172]. Распознавание двухцепочечной вДНК может осуществляться по двум автономным сенсорным программам, одна из которых характерна для специализированных клеток иммунной системы через Toll-like рецепторы, другая – для большинства соматических клеток через недавно идентифицированные внутриклеточные сенсоры (STING, DAI, семейство NOD-like белков, RLN-геликазы, белки семейства HIN-200). В последнем случае вДНК в составе нуклеосом может проникать в клетку энерго-независимым способом, благодаря неспецифическим нековалентным ионным взаимодействиям комплексов отрицательно заряженной вДНК с положительно заряженными гистонами и белками плазматической мембраны [173].

Потенциальная возможность горизонтального переноса ДНК была показана на модели лимфоидных клеток, содержащих и не содержащих интегрированные копии вируса Эпштейна-Барра [174]. Было показано, что источником передачи вируса клеткам могут служить апоптотические тельца из В-лимфоцитов, содержащие интегрированные копии вируса. Позднее было показано, что не только вирусная ДНК, но и ДНК опухолевых клеток, поглощенная нормальными крысиными фибробластами посредством фагоцитоза, может приводить к их онкотрансформации *in vitro* и образованию опухолей *in vivo*. Таким образом

было доказано, что горизонтальный перенос онкогенов может осуществляться при помощи апоптотических телец [175].

Поскольку была показана возможность переноса ДНК в составе апоптотических телец от одной клетки к другой, появилось предположение, что опухолевая внДНК в составе апоптотических телец может интегрироваться в здоровые соматические клетки и вызывать развитие вторичного рака (метастазов). Эта гипотеза получила название «генометастазов» и была подтверждена на модели [176, 177]. Наличие опухолевой внДНК в плазме авторы подтверждали, используя экспериментальную модель, в которой в раковые клетки аденокарциномы кишечника DHD/K12-PROb (DHD) был введен при помощи плазмиды pCDNA3.1CAT маркерный устойчивый к неомицину ген. Трансфицированные клетки (DHD-CAT) вводили BD-IX крысам в грудину. Раковую ДНК в образцах детектировали при помощи ПЦР, специфичного к мутациям в K-ras онкогене. Через неделю после введения крысам DHD-CAT клеток авторы обнаружили раковую ДНК в легком, через три недели – в плазме крови, а через пять недель – после центрифугирования образцов крови в верхнем слое эритроцитов, обогащенном лейкоцитами. Кроме того, при введении внутривенно здоровым крысам плазмы от животных, содержащих DHD-CAT-клетки, маркер CAT обнаруживался в плазме крови реципиентов (рисунок 2).

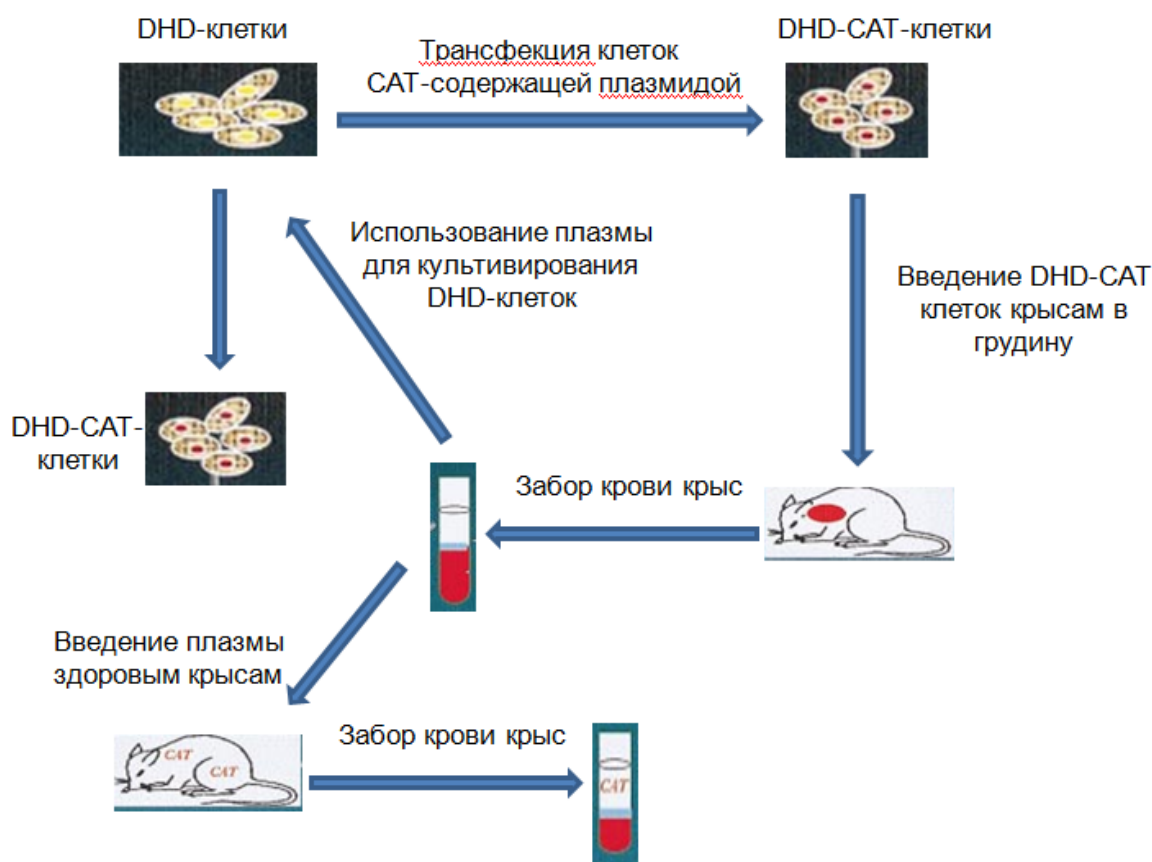


Рисунок 2 – Схема развития генометастазов [176].

Помимо инвазии и метастазирования в ряде исследований продемонстрировано потенциальное участие внДНК в ангиогенезе. В частности, показана способность нуклеосом к формированию комплексов с гепарин-связывающими ангиогенными факторами (FGF-1, FGF-2, VEGF и TGF $\beta$ -1), что приводило к стимуляции ангиогенеза *in vitro* и *in vivo* [178]. Также было показано, что посредством активации NF- $\kappa$ B/Rel-A нуклеосомы способствуют повышению экспрессии IL-8, участвующего на ранних стадиях ангиогенеза [179]. Эти данные могут объяснить, почему гипоксические и гиперваскуляризованные области часто находятся в непосредственной близости в опухолевых тканях, а также указывать на потенциальную роль нуклеосом в развитии прогрессирования заболевания [7].

Важно отметить, что в норме внДНК также обладает биологической активностью: внутривенное введение гомологичной ДНК, выделенной из тканей мозга крыс, приводило к ультраструктурным перестройкам нейронов новой коры, направленным на активацию синтеза белка, повышение синаптической передачи и усиление энергетического метаболизма [180].

Позднее был сформулирован ряд гипотез, касающихся биологической роли внДНК [181]. Предполагается, что содержащая онкогены внДНК может трансфецировать нормальные клетки, приводя к метастазированию (рисунок 3).

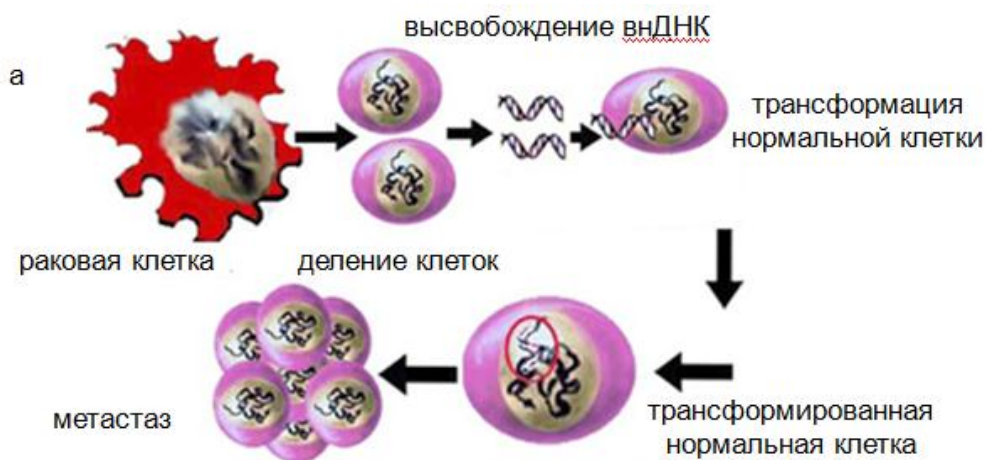


Рисунок 3 – Гипотетическое участие внеклеточной опухолевой ДНК в метастазировании [181].

Эта гипотеза расширяет понятие «генометастазирования», где источником онкотрансформации выступает ДНК в составе апоптотических телец. Более того, поскольку на поверхности клеток существуют ДНК-связывающие рецепторы [97], предполагается тканеспецифичное образование метастазов. Для осуществления подобной трансформации ДНК должна транспортироваться в ядра этих клеток, при этом связывание с плазматической мембраной является ключевым моментом транспорта ДНК [100]. Кроме этого, было



высказано предположение, что внДНК нормальных клеток (например ДНК, высвобождаемая в кровяное русло лимфоцитами в результате антигенной стимуляции) может трансфецировать клетки опухоли (рисунок 4А).

В частности, интеграция в геном опухолевой клетки внДНК, содержащей цитокин-кодирующую область, может приводить к экспрессии различных цитокинов, таких как ИЛ-2, ИЛ-12, макрофагальный колониестимулирующий фактор и т.д.; внДНК, содержащая немутированный онкоген (например *Ras*) или немутированный ген-онкосупрессор (например дикий тип *p53*), может приводить к нокауту посредством гомологичной рекомбинации соответствующего мутантного онкогена или гена-супрессора внутри раковой клетки и, как следствие, к апоптозу опухолевой клетки или даже спонтанной ремиссии рака (рисунок 4А) [181].

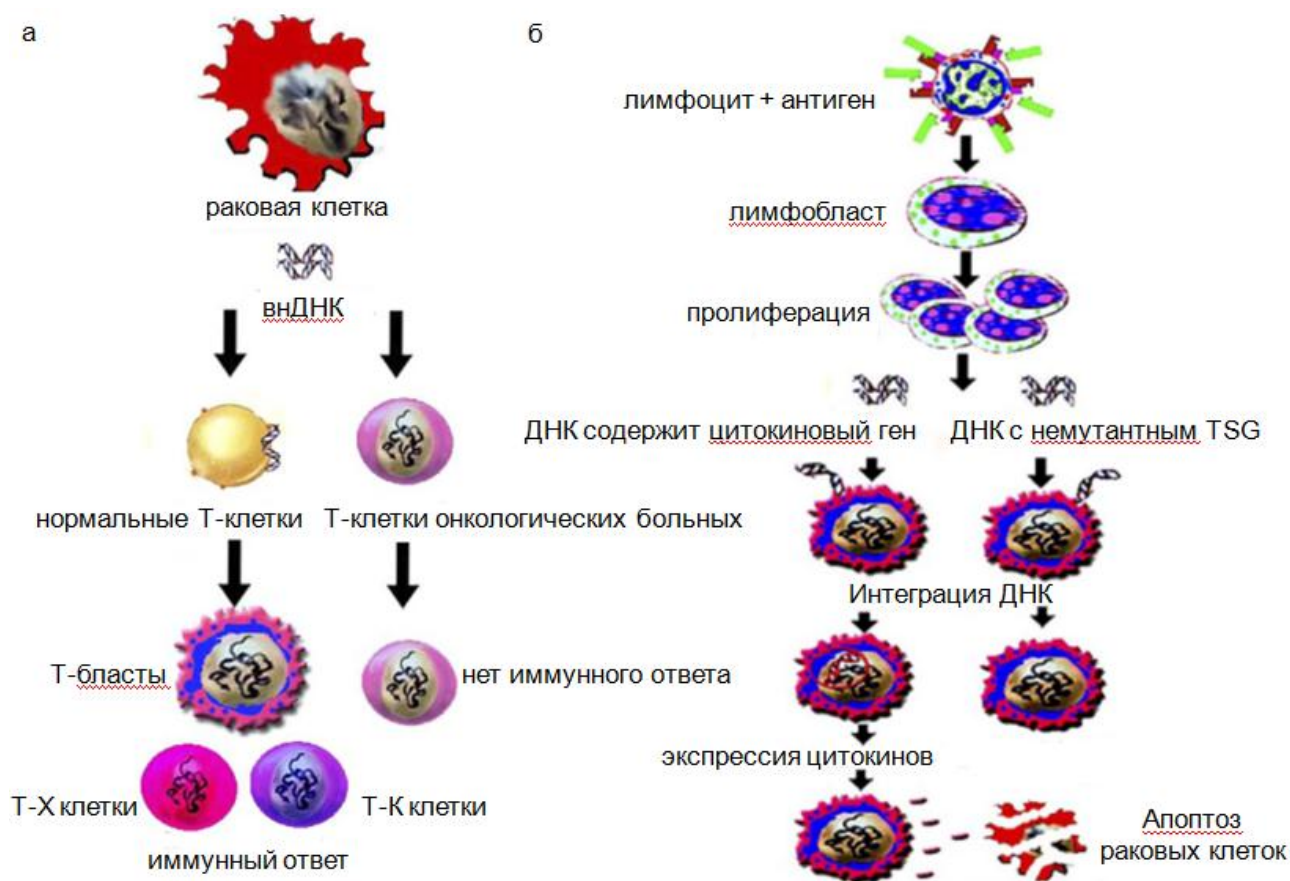


Рисунок 4 – Гипотетическое представление возможных путей взаимодействия ДНК лимфоцитов с раковыми клетками (а) и опухолевой внДНК и лимфоцитов (б) [181].

Феномен наличия внДНК на поверхности ФЭК у здоровых доноров авторы [181] объясняют способностью циркулирующей ДНК связываться с рецепторами на поверхности лейкоцитов [182], а снижение её содержания при развитии опухолевого процесса [183] объясняют отсутствием рецептора к ДНК на поверхности клеток крови онкологических больных или потерей ДНК-связывающих свойств в связи с мутацией (рисунок 4Б).

По-видимому, в кровотоке внДНК является сигнальной молекулой и ее связывание со специфическим рецептором на поверхности лимфоцитов может приводить к активации клеток и возникновению противоопухолевого иммунного ответа. Как следствие, мутация рецептора к ДНК на поверхности лимфоцитов может приводить к толерантности противоракового иммунного ответа.

Таким образом, детальное исследование связывания ДНК с клетками, а именно поиск последовательностей наиболее прочно связанных с поверхностными белками клеток и идентификация этих белков и их функций, возможно, позволит получить новые данные о биологической роли внДНК.

## **1.2. Роль экзосом в развитии солидных опухолей**

Клетки практически всех тканей организма секретируют во внеклеточное пространство разнообразные везикулярные структуры, среди которых особый интерес вызывают экзосомы — мембранные везикулы размером от 30 до 150 нм. В составе этих микровезикул были обнаружены липиды, метаболиты, ДНК, биологически активные разнообразные типы РНК и белки, которые могут транспортироваться в составе мембранных структур как между близлежащими клетками, так и между отдаленно расположенными клетками разных тканей с помощью физиологических жидкостей (кровь, моча, слюна и др.). Современные данные демонстрируют, что экзосомы необходимы для нормального функционирования организма, а их набор/состав изменяется при развитии патологий.

### **1.2.1. Происхождение и состав экзосом**

#### **1.2.1.1. Биогенез экзосом**

Большинство исследователей выделяют два различных подтипа ВВ – микровезикулы и экзосомы, существенно различающихся по морфологии, биофизическим характеристикам (форма, размер, плотность), биогенезу и функциям.

*Микровезикулы*, также называемые эктосомами, - это крупные ВВ диаметром от 100 до 1000 нм различной формы. Механизм формирования микровезикул включает формирование выпячиваний плазматической мембраны с последующим их отшнуровыванием во внеклеточное пространство. Полагают, что различные внутри- или внеклеточные стимулирующие метаболиты приводят к локальному изменению концентрации внутриклеточного кальция с последующей локальной асимметрией фосфадитилсерина,

трансмембранных рецепторов, модификации актин-миозиновых внутриклеточных взаимодействий, модификации межклеточных контактов, ремоделированием актинового цитоскелета, формированием специализированных микродоменов цитоплазматической мембраны, богатых тетраспанинами [184].

*Экзосомы* представляют собой достаточно гомогенную группу ВВ размерами от 30 до 150 нм с чашеподобной формы. Процесс формирования экзосом можно разделить на четыре стадии: инициация, эндоцитоз, формирование МВТ и секреция [185]. На первом этапе путём инвагинации мембраны клетки формируются ранние эндосомы. Судьба МВТ во многом определяется небольшими ГТФазами семейства Rab. Белок Rab5, регулирующий инвагинацию цитоплазматической мембраны и слияние мембран разных ранних эндосом, связывается со сформированной эндосомой, что позволяет начать работу эффекторным белкам: фосфоинозитолкиназе, раннему эндосомальному антигену 1, рабенозину-5. Последние формируют GDP/GTP обменный комплекс Rabex-5, стабилизирующий активную форму Rab5 и опосредующий инвагинацию и слияние мембран [186, 187]. Формирование микровезикул и их инвагинация в полость эндосомы инициируется убиквитинилированием цитоплазматических хвостов клеточных рецепторов на поверхности мембраны эндосомы и опосредована фосфатидилинозитол-3-фосфатом на поверхности эндосомы. Фосфатидилинозитол-3-фосфат связывается с FYVE-доменом белка, который является частью белкового комплекса ESCRT-0. Такое связывание приводит к сборке других частей ESCRT-0 комплекса, на сформированной эндосомальной мембране, что в свою очередь инициирует сборку комплексов ESCRT-I и ESCRT-II, опосредующих в дальнейшем инвагинацию мембраны во вновь сформированном МВТ и формирование комплекса ESCRT-III, ответственного за окончательное формирование микровезикул и их отшнуровывания в полость МВТ [188]. Кроме того, существует ESCRT-независимый путь формирования экзосом, однако этот механизм пока малоизучен [189]. Сформированное МВТ в процессе созревания может либо деградировать, включаясь в состав лизосом, либо перерабатываться аппаратом Гольджи, либо секретироваться в виде экзосом во внеклеточное пространство (рисунок 5). Эти процессы ингибируются действием других ГТФаз семейства Rab: транспортирующих белки и РНК (Rab4 и Rab11), ответственных за деградацию (Rab7) и транспорт МВТ в аппарат Гольджи (Rab6).

Дальнейшая судьба микровезикул — деградация или секреция — опосредована действием белков Rab27A и Rab27B, играющих значимую, но не определяющую роль в этих процессах. Инактивация обоих белков приводит к снижению секреции на 50%, но не к полной её блокировке [190], что указывает на существование альтернативных механизмов секреции и участие дополнительных факторов в этом процессе [191]. В частности, было

показано, что на секрецию экзосом также влияют белки Rab5A, Rab9A и Rab2 [190]. Кроме того, как в норме так и при развитии злокачественных новообразований показано, что секреция экзосом увеличивается при тепловом шоке [192], низких значениях pH среды [193], повышении внутриклеточной концентрации ионов кальция [194], потери адгезии [195] и пр. Секреция экзосом во внеклеточное пространство происходит за счет слияния сформированных МВЭ с цитоплазматической мембраной клетки.

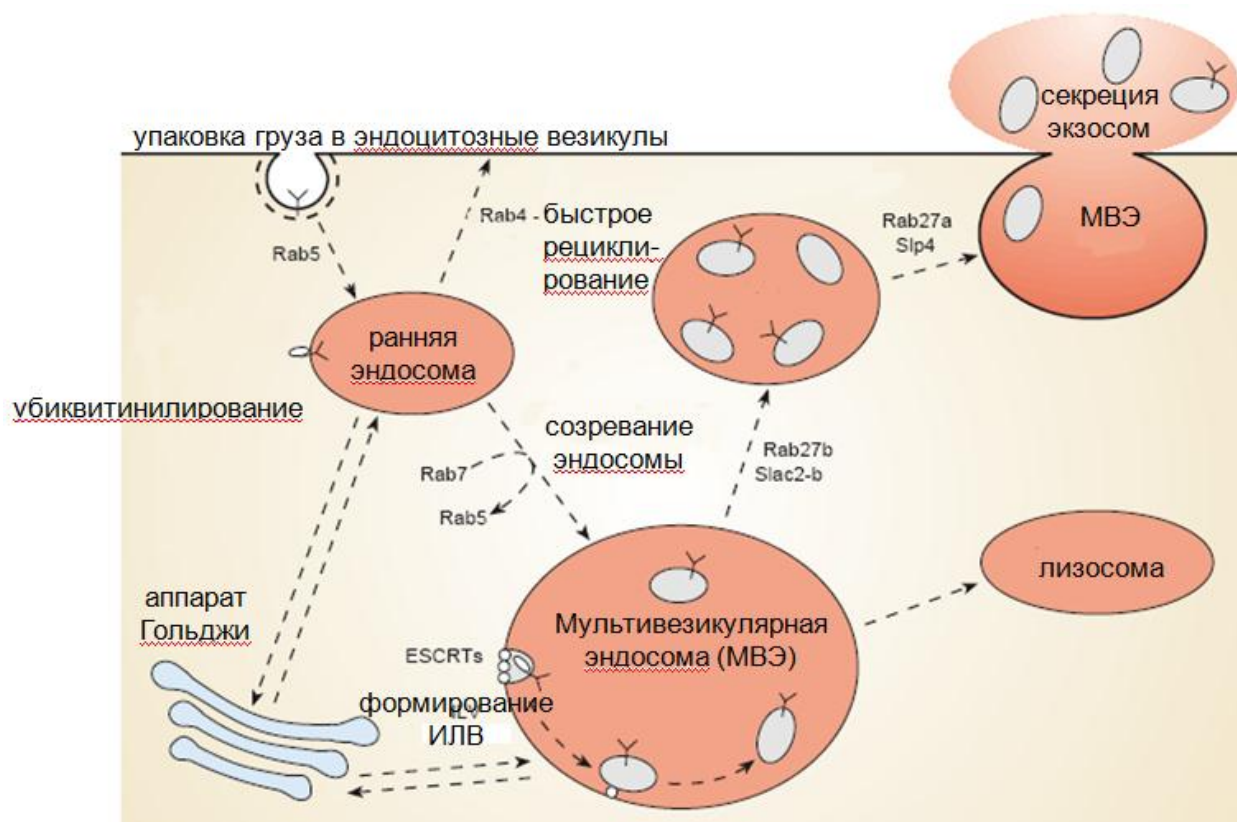


Рисунок 5 – Схематическое изображение путей мембранного переноса, лежащих в основе формирования микровезикулярных эндосом и высвобождения экзосом [191].

Экзосомы также обладают механизмом обратной связи, регулирующим высвобождение экзосом из нормальной молочной железы, это означает, что экзосомы, высвобождаемые из опухолевых клеток и из нормальных эпителиальных клеток молочной железы человека, регулируются экзосомами, происходящими из их собственных клеток [196]. Например, отслоение опухолевых клеток при РМЖ стимулирует секрецию экзосом [195]. Экзосомы вносят вклад в межклеточную коммуникацию путем непосредственной активации клеток с помощью экспрессируемых на поверхности лигандов, а также передачи сигнальных молекул между клетками [197, 198]. Экзосомы могут интернализироваться и посредством фагоцитоза или доменов липидных рафтов [199, 200].

По литературным данным, один мкл крови содержит около 3 миллионов экзосом. Теоретически в состав каждой экзосомы входят метаболиты, липиды,  $\leq 100$  белков, и  $\leq 10000$  дезокси- и рибонуклеотидов [201].

### 1.2.1.2. Липидный состав экзосом

Липидный состав экзосомальной мембраны отличается от такового в цитоплазматической мембране секретирующей клетки: соотношение фосфатидилхолина, фосфатидилэтаноламинов, фосфатидилинозитола, фосфатидилсерина и сфингомиелинов составляет 26:26:19:19:20 и 43:23:12:12:9, соответственно. Повышенное содержание сфингомиелина, фосфатидилинозитола и холестерина способствует повышенной устойчивости экзосомальных мембран в физиологическом диапазоне pH биологических жидкостей и защищает их от протеолитической или липолитической деградации в процессе циркуляции [203], в то время как ганглиозиды (преимущественно 3 класса) предотвращают потребление экзосом клетками ретикулоэндотелиальной системы [203]. Кроме того, сфингомиелин в составе экзосом обладает проангиогенными свойствами, индуцирует миграцию эндотелиальных клеток, формирование и ветвление сосудов [204]. Лизобифосфатидная кислота в составе экзосом индуцирует слияние и перестройку внутриклеточных мембран в процессе биогенеза ВВ [203]. В ряде исследований было продемонстрировано, что в мембране экзосом присутствуют липидные рафты, связанные с рядом белков (Src-тирозинкиназы, гликозилфосфатидилинозитол-содержащие белки и пр.) [205]. В БД ExoCarta, содержащей библиотеку обнаруженных в настоящий момент биополимеров в составе экзосом, на сегодняшний день внесено свыше 1116 липидов, состав которых в микровезикулах зависит от типа биологической жидкости и от состояния организма.

Мембраны экзосом легче подвержены «флип-флопу» и по этому показателю больше схожи с мембранными органеллами клетки, чем с плазматической мембраной. Такое поведение экзосомальных мембран может быть связано как с процессом созревания микровезикул (участие аппарата Гольджи в процессе формирования МВТ, работа LBPA в МВТ при их созревании), так и с отсутствием специфических ферментов, регулирующих «флип-флоп» клеточной мембраны, таких как флипаза [206].

Показано, что липиды в составе экзосом вовлечены в процесс опухолевой прогрессии и формирования химиорезистентности [207], а также в патогенез некоторых нейродегенеративных заболеваний. В частности, экзосомальные ганглиозиды 2 и 3 классов индуцируют олигомеризацию белка  $\alpha$ -синуклеина, который является токсичным для

нейронов и накопление его олигомерной формы ассоциировано с болезнью Паркинсона [208].

### 1.2.1.3. Белковый состав экзосом

Белковый состав экзосом разнообразен и включает в себя как общие везикулярные белки, так и специфические, которые отражают их происхождение из родительских клеток. По данным базы Exocarta, в составе экзосом на начало 2023 г уже идентифицировано 9769 белков. К общим белкам относятся такие, как белки высококонсервативного семейства тетраспанинов, необходимые для связывания и транспортировки микроРНК (CD63, CD81 и CD9), Alix и Tsg101 – белки для транспортировки и биогенеза экзосом, интегрины, а также белки теплового шока (HSP60, HSP70, HSP90) (рисунок 6). Экзосомы богаты белками цитоскелета (F- и G-актин) и актин-связывающими белками (кофилин-1, профилин-1, тубулины), несут ГТФ-азы семейства Rab и аннексины, которые способствующие слиянию мембран [209-212] (рисунок 6).

На гетерогенность белкового состава экзосом влияют:

- а) морфология секретирующих клеток,
- б) условия, в которых находятся клетки, секретирующие везикулы (тепловой шок, генотоксический стресс, оксидативный стресс, гипоксия и т.д.),
- в) биологическая жидкость, в которой циркулируют экзосомы,
- г) использованные методы выделения и очистки [214, 215].

#### 1.2.1.3. 1. Тетраспанины как важный компонент экзосом

Тетраспанины – семейство мембранных белков, включающее 33 представителя. Они содержат 4 трансмембранных фрагмента и две внеклеточные петли – EC1-короткую и EC2-длинную, и именно последняя отвечает за взаимодействие с другими белками. Тетраспанины формируют так называемые богатые тетраспанинами микродомены, взаимодействующие с большим количеством трансмембранных и цитозольных сигнальных белков. Их основными партнерами являются сами тетраспанины, интегрины, рецепторы адгезии, сигнальные рецепторы, MMPs [213]. Микродомены цитоплазматической мембраны, обогащенные тетраспанинами, необходимы для внутриклеточной передачи сигналов и регулирования многих процессов [216].

Тетраспанины CD9, CD63, CD81 относят к экзосомальным биомаркерам, поскольку в составе экзосомальных мембран их концентрация достаточно высока [184]. Взаимодействуя с различными молекулами и формируя надмолекулярные комплексы, они участвуют в биогенезе экзосом, сортировке экзосомальных белков, клеточной адгезии, поглощении экзосом клетками-реципиентами и презентации экзосомами антигенов с последующим

иммунным ответом [217]. В крови здоровых доноров наиболее часто встречаются экзосомы с экспрессией CD9 и CD24, секретируемые эндотелиоцитами и клетками крови. Другими важными тетраспанинами, экспрессирующимися как в тканях, так и в экзосомах, являются CD151 и Tspan8.



Рисунок 6 – Тетраспанины, тетраспанин-ассоциированные и тетраспанин-неассоциированные белки экзосом [213].

CD151 (GP-27, TSPAN-24) представляет собой белок плазматической мембраны, который образует тетраспаниновые сети с интегринами ( $\alpha 3\beta 1$ ,  $\alpha 6\beta 1$ ,  $\alpha 7\beta 1$  и  $\alpha 6\beta 4$ ), внутриклеточными сигнальными молекулами (PI4K и PKC), белками суперсемейства иммуноглобулинов и другими тетраспанинами, такими как CD9, CD81 и CD63 [218]. Основными функциями CD151 являются поддержание целостности эпителиальных клеток, агрегация тромбоцитов, регуляция слияния мембран, подвижность клеток, а также участие в ангиогенезе и метастазировании опухолей [219]. Чаще всего CD151 экспрессируется в эндотелиальных клетках и тромбоцитах, а также гиперэкспрессируется в ряде злокачественных опухолей (рак предстательной железы, рак желудка, рак эндометрия и немелкоклеточный рак легкого) [220, 221]. CD151 располагается внутриклеточно в эндосомальных и лизосомальных везикулах, следовательно, он может высвободиться из клеток в составе экзосом [222]. Действительно, было показано, что при раке предстательной железы высвобождаются экзосомы, обогащенные CD151 [223].

Tspan8 является одним из членов семейства тетраспанинов, который также образует тетраспаниновые сети с разными мембранными белками, например, интегринами. Tspan8 обнаружен в экзосомах, секретируемых клетками карциномы поджелудочной железы и колоректальных карцином [224, 225].

### *1.2.1.3. 2. Тетраспанин-ассоциированные белки экзосом*

В литературе нет четкого определения тетраспанин-ассоциированных белков. Чаще всего к этой группе относят белки, формирующие постоянные или динамично формирующиеся связи с тетраспанинами. Например, к тетраспанин-ассоциированным белкам относят CD36 и CD47.

CD36 представляет собой мультилигандный рецептор, встречающийся на поверхности тромбоцитов, эндотелиальных клеток, мононуклеарных фагоцитов, адипоцитов, гепатоцитов, миоцитов [226]. Изначально он был идентифицирован как гликопротеин IV на тромбоцитах. CD36 является также транслоказой жирных кислот, а связывание TSP1 с CD36 ингибирует поглощение миристана в эндотелиальные клетки и миристан-зависимую активацию Src-киназ и cGMP-сигнализацию [227]. На эндотелиальных клетках CD36 является рецептором TSP1 и функционирует как отрицательный регулятор ангиогенеза, играет роль в ингибировании роста опухоли, воспалении и других патологических процессах [228].

CD47 представляет собой мембранный гликопротеин суперсемейства иммуноглобулинов, содержащий IgV-подобный внеклеточный домен, пять трансмембранных мотивов и короткий внутриклеточный домен [229]. Он повсеместно экспрессируется на плазматической мембране всех гемопоэтических и большинства других типов клеток. CD47 участвует в ряде клеточных процессов, включая пролиферацию, апоптоз, адгезию, миграцию, а также играет важную роль в иммунной регуляции [230]. CD47 является единственным высокоаффинным рецептором TSP1, который опосредует ингибирование ангиогенеза при физиологических концентрациях [231]. Связывание с CD36 требует более высоких концентраций TSP1, которая превышает физиологическую практически в 100 раз [232]. Экспрессия TSP1 значительно увеличивается в опухоли и окружающих ее тканях, поэтому его функциональная активность может быть опосредована более сложным механизмом, включая CD36 и CD47 [233]. TSP1 представляет собой крупный гликопротеин, который, как известно, гиперэкспрессируется в опухолевой строме. Он является первым идентифицированным ингибитором эндогенного ангиогенеза, однако в опухолях его функция существенно изменена [234]. Нормальная плазма крови человека содержит низкие, но значимые уровни растворимой формы TSP1, которая является физиологическим регулятором передачи сигнала оксида азота [235].

Тетраспанин-ассоциированные белки CD36 и CD47 были идентифицированы в экзосомах, секретируемых клетками опухолей различной локализации [236]. Таким образом, тетраспанины являются важными клеточными и экзосомальными компонентами, поскольку



они, взаимодействуя с широким спектром молекул, участвуют в передаче сигналов и регулируют многие процессы, включая канцерогенез.

#### *1.2.1.3. 3. Тетраспанин-неассоциированные белки экзосом*

Кроме общих везикулярных белков, экзосомы несут специфические белки, отражающие их происхождение из определенного типа клеток. В частности, экзосомы, происходящие от клеток иммунной системы, богаты белками комплекса гистосовместимости II класса; экзосомы, происходящие из клеток меланомы содержат, например, опухолево-ассоциированный антиген MART; экзосомы эпителиального происхождения, например, асцитические экзосомы у больных с эпителиальным раком яичника – EpCAM [237]. Исследование смешанной слюны выявило 2 типа экзосом, различающихся по размеру и белковому составу. Везикулы данной биологической жидкости происходят из клеток эпителия выводных протоков слюнных желез, самих слюнных желез и клеток иммунной системы, локализованных в слюнных железах. Так показано, что мажорным компонентом экзосом смешанной слюны I типа является белок моэнзим, характерный для экзосом, происходящих из В-лимфоцитов, широко представленных во всех слюнных железах. В тоже время карбонил-ангидраза 6 выявлена только в экзосомах II типа. Иммуногистохимические исследования свидетельствуют о преимущественной экспрессии этого фермента в околоушной и подъязычной железе [238].

Экзосомы, секретлируемые гемопоэтическими стволовыми клетками, мультипотентными клетками стромы, мезенхимальными стволовыми клетками, стволовыми клетками сердца, способны защитить от апоптоза клетки, уцелевшие в поврежденных тканях, стимулировать их пролиферацию и образование сосудов. Эти свойства экзосом связывают с тем, что они несут антиапоптотические и пролиферативные ростовые факторы и цитокины [239].

#### *1.2.1.3. 4. Тетраспанин-ассоциированные и тетраспанин-неассоциированные протеазы экзосом*

Ферменты составляют до 32% белкового состава экзосом [213] (рисунок 7). Экзосомальные протеазы можно разделить на три группы: тетраспанин-ассоциированные (структурно и функционально связанные), тетраспанин-неассоциированные протеазы, а также протеазы с неизвестной локализацией в экзосомах.

К тетраспанин-ассоциированным протеазам относятся ADAMs, MMPs и EMMPRIN. ADAMs представляют собой многофункциональные белки, которые осуществляют шеддинг – ограниченный примембранный протеолиз белков, приводящий к отщеплению внеклеточного домена трансмембранных белков, тем самым регулируя клеточную адгезию, миграцию и межклеточные взаимодействия [240].



Рисунок 7 – Функциональные группы белков экзосом [213].

Семейство ADAM-протеаз состоит из 22 членов, идентифицированных в геноме человека, из которых только 12 (ADAM8, 9, 10, 12, 15, 17, 19, 20, 21, 28, 30 и 33) кодируют активные ферменты. ADAM10 и ADAM17 являются наиболее известными членами этого семейства. ADAM10 обнаруживается в экзосомах, секретируемых разными типами клеток. ADAM17 также идентифицируется в экзосомах из различных линий опухолевых клеток, ее протеолитическая активность вовлечена в процессинг CD44, TGF- $\alpha$  и амфирегулина [241, 242].

Субстратами шеддаз являются рецепторы ростовых факторов (EGFR1, HER2, TGF $\beta$ -III $\beta$ ), рецепторы адгезии L1-CAM, CD44, Fas-L рецептор апоптоза, E- и N-кадгерин. В результате шеддинга происходит модификация клеточных рецепторов с изменением сигналинга от рецепторов ростовых факторов и адгезии, а также появление в биологических жидкостях растворимых форм рецепторов: sCD44, sEGFR1, sHER2, sTGF $\beta$ -III $\beta$ , sFasL [243, 244]. Большинство растворимых форм этих рецепторов индуцируют клеточную подвижность, что может влиять на метастатический потенциал [245, 246].

В настоящее время идентифицировано более 23 членов семейства MMPs. Субстратами для MMPs являются коллаген IV типа, эластин, фибронектин и ламинин, а также белки клеточной поверхности - E-кадгерин, фибрин и IL-1, следовательно, они модулируют взаимодействие клеток и внеклеточного матрикса [247]. В нормальных физиологических условиях активность MMPs регулируется на уровне транскрипции, посттрансляционной модификации, а также ингибируются тканевыми ингибиторами MMPs,  $\alpha$ 2-макроглобулином и тромбоспондином [248]. Наиболее часто в составе экзосом обнаруживают MMP-2 и MMP-9, которые относятся к семейству секретируемых или мембрано-ассоциированных цинк-зависимых протеаз [249]. TSP-2 может регулировать активность MMP-2, образуя комплекс, облегчающий эндоцитоз. TSP-1 ингибирует активацию proMMP-2 и proMMP-9 и модулирует продукцию MMP-2 [250].

EMMPRIN (CD147, базигин) представляет собой гликопротеин клеточной поверхности, который принадлежит к суперсемейству иммуноглобулинов и высоко экспрессируется на

поверхности многих клеток [251]. Экзосомы, имеющие в своем составе EMMPRIN стимулируют проангиогенную активность эндотелиальных клеток пупочной вены человека в зависимости от его уровня экспрессии [252].

К тетраспанин-неассоциированным протеазам относятся RAPP-A и 20S протеасомы. RAPP-A представляет собой металлопротеиназу, которая модулирует активность и биодоступность инсулиноподобного фактора роста-1 путем расщепления его комплекса с белками, связывающими инсулиноподобный фактор роста IGFBP4 и IGFBP5 [253]. Первоначально высокая концентрация RAPP-A была обнаружена в плазме беременных женщин, впоследствии была доказана его роль в качестве модулятора ряда патологических процессов [254]. Протеомный анализ экзосом клеточных линий различных опухолей выявил наличие в них RAPP-A [236, 241].

Протеасомная система представлена двумя каталитическими комплексами: 20S- и 26S-протеасомами. Протеолиз происходит непосредственно в 20S-протеасоме, коровая (основная) часть которой состоит из 4 гептамерных колец и имеет структуру  $\alpha 1-7$ ;  $\beta 1-7$ ;  $\beta 1-7$ ;  $\alpha 1-7$  [255]. Активация 20S-протеасомы происходит путем присоединения к внешним  $\alpha$ -субъединицам регуляторных частиц (19S, PA28).  $\beta$ -субъединицы являются каталитическими компонентами протеасомы, в частности  $\beta 1$ ,  $\beta 2$  и  $\beta 5$  проявляют каспазоподобную, трипсиноподобную и химотрипсиноподобную активность, соответственно [256].

Выделяют два пула протеасом – внутриклеточный и циркулирующий. Одним из вариантов существования протеасом во внеклеточном пространстве может быть выход из экзосом, т.к. в этих внеклеточных везикулах были выявлены  $\alpha$  и  $\beta$ -цепи 20S-протеасомы [257]. При патологических состояниях количество внеклеточных циркулирующих протеасом (свободных и входящих в состав экзосом) в плазме крови повышается [258].

Кроме того, выделяют класс экзосомальных протеаз с неизвестной локализацией в экзосомах, куда включают гепараназу, uPA, калликреины и другие белки.

Гепараназа – расщепляющая гепарансульфат эндогликозидаза – участвует в деградации и ремоделировании внеклеточного матрикса. Белок синтезируется в качестве латентного предшественника (65 кДа), затем подвергается протеолитической обработке L-катепсином с образованием субъединиц 8 кДа и 50 кДа, которые гетеродимеризуются с образованием высокоактивного фермента. Гепараназа проявляет неферментативную активность: экспрессия гепараназы на поверхности клеток вызывает прочную клеточную адгезию и усиливает передачу сигналов Akt [259]. Данный фермент существует в мембрано-связанной и свободной форме, встречается в поздних эндосомах и лизосомах. Добавление гепараназы в клеточную культуру MCF-7 сопровождается усилением экспрессии CD63 на поверхности экзосом, в то время как экспрессия CD9 и CD81 остается неизменной [260].

Также гепараназа выявлена во внеклеточных везикулах, выделенных из асцитической жидкости больных раком яичников [241, 261].

uPA представляет собой сериновую протеазу широкого спектра действия, которая расщепляет многочисленные компоненты внеклеточного матрикса, включая фибрин, ламинин, фибронектин и витронектин. Первоначально uPA синтезируется как каталитически неактивный одноцепочечный полипептид, и только после протеолитического расщепления переходит в активную форму – двухцепочечный пептид. В опухолевых клетках происходит дисрегуляция uPA, изменяется его экспрессия и активность, что приводит к увеличению клеточной инвазии [262]. Протеолитически активная uPA обнаружена во ВВ, выделенных из асцита больных раком яичников [241].

Калликреин 2 (hK2) представляет собой сериновую протеазу, сходную с PSA (гомология последовательности ДНК 80%), но в отличие от PSA протеолитическая активность hK2 значительно выше [263]. Калликреин человека 11 (hK11) также является сериновой протеазой, повышенный уровень которого обнаружен в сыворотке у больных раком яичников [264] и раком предстательной железы [265]. Калликреин-2 и калликреин-11 выявлены в экзосомах мочи больных раком предстательной железы [266].

#### **1.2.1.4. Нуклеиновый состав экзосом**

С помощью секвенирования на платформе IonTorrentPGM было обнаружено, что экзосомы сыворотки/плазмы крови и мочи содержат различные типы РНК, а именно: мРНК, микроРНК, днРНК, кольцевая РНК, тРНК, рРНК, мяРНК, мякРНК, пиРНК и scaРНК [267, 268]. Поскольку в настоящее время получены прямые данные о переносе экзосомами микроРНК, днРНК и мРНК из клеток одного типа в клетки другого типа, где перенесённые РНК способны функционировать, именно эти типы экзосомальных РНК привлекают наибольшее внимание исследователей [267-269]. На начало 2023 г в БД ExoCarta ([www.exocarta.org](http://www.exocarta.org)) внесено свыше 2838 микроРНК и более 3408 мРНК. Перенос интактных мРНК в составе экзосом может служить для обмена фенотипическими признаками между клетками, поскольку в реципиентные клетки попадают мРНК белков, которые исходно не были в них экспрессированы; некодирующие РНК принимают участие в регуляции различных физиологических процессов, в том числе клеточной дифференцировки, деления, апоптоза, гематопоеза и морфогенеза различных органов [268]. Семейство днРНК является одной из самых больших и гетерогенных групп РНК с длиной более 200 н. ДнРНК представляют собой транскрипты РНК, которые могут вмешиваться на транскрипционном, трансляционном и посттрансляционном уровнях. Не смотря на то, что днРНК не кодируют

белки и пептиды, эти РНК необходимы для нормального функционирования таких клеточных процессов как рост, дифференцировка и т.д. [268, 270].

Кроме рибонуклеиновых кислот экзосомы могут также переносить в своём составе ДНК. В силу немногочисленности данных о переносе ДНК в составе экзосом долгое время экзосомальная ДНК рассматривалась скорее как артефакт, связанный с контаминацией полученных препаратов экзосом апоптотическими тельцами близкого размера, однако в последние годы появляется всё больше публикаций, позволяющих утверждать, что экзосомы действительно транспортируют в своём составе ДНК. Показано, что экзосомы, секретлируемые клетками глиобластомы и астроцитами, содержат фрагментированную митохондриальную ДНК [271], а экзосомы, секретлируемые клетками медуллобластомы и нормальными фибробластами - ретротранспозоны (*L1* и *HERV-K*) [272].

В 2014 г были опубликованы убедительные данные о присутствии длинной (более 10 т.п.н.) двухцепочечной геномной ДНК в составе экзосом, полученных из культуральной среды опухолевых линий клеток PANC-1 и ТЗМ-4, а также из сыворотки крови здоровых доноров и больных раком поджелудочной железы. С помощью секвенирования по Сэнгеру было показано, что в составе экзосомальной ДНК представлен генетический материал всех хромосом, а экзосомы крови онкологических больных содержат мутантные формы *KRAS* и *p53* опухолевой ДНК [273]. Таким образом, экзосомальная ДНК биологических жидкостей онкологических больных может служить дополнительным источником диагностического материала.

### **1.2.2. Минимальные экспериментальные требования для определения внеклеточных везикул и их функциональной активности**

В настоящее время сформулированы минимальные экспериментальные требования для идентификации экзосом и определения их функциональной активности и диагностической значимости биологических маркеров заболеваний в их составе. Тем не менее необходимо отметить, что «золотой стандарт» выделения и характеристики экзосом до сих пор не разработан [274].

Для выделения экзосом из биологических жидкостей используют различные методы. Наиболее распространенными являются метод дифференциального центрифугирования с последующей фильтрацией через фильтры с диаметром пор 100-220 нм, метод центрифугирования в градиенте сахарозы и метод на основе реакции иммунопреципитации. Необходимо отметить, что на эффективность выделения и функциональную активность экзосом влияют такие факторы, как использование ингибиторов ферментов и/или

консервантов при заборе биологического материала, условия центрифугирования (количество центрифугирований, скорость, длительность, тип ротора, температура и др.), размер пор при ультрафильтрации [275]. В связи с этим Общество по изучению ВВ настоятельно рекомендует предоставлять в статьях подробную информацию об использованных методологических подходах для выделения ВВ/экзосом, а также характеризовать выделенные везикулы методом электронной или атомно-силовой микроскопии в сочетании иммуноокрашиванием антителами CD63, CD9 или CD81 на частицах золота или без иммуноокрашивания. Трековый анализ частиц (nanoparticle-tracking analysis) или динамический анализ светорассеяния (dynamic lights cattering) также могут использоваться для характеристики выделенных частиц, однако эти методы должны подтверждаться данными электронной или атомно-силовой микроскопии. Для подтверждения экзосомальной природы выделенных везикул Обществом по изучению ВВ рекомендовано идентифицировать экзосомальные мембранные или цитозольные белки методами вестерн-блоттинга либо проточной цитофлуориметрии [274].

При проведении исследований *in vitro* по изучению функциональной активности ВВ/экзосом рекомендован количественный анализ выделенных везикул и оценка их дозозависимого эффекта (или белков, микроРНК, содержащихся в них) на различные клеточные процессы (пролиферация, апоптоз, секреторная активность и т.д.). Перспективными являются исследования с использованием экзосом, связанных с флуоресцентной меткой, инкубированных с клетками-реципиентами. Поскольку экзосомы реализуют свою функцию путем связывания, слияния или поглощения клетками-реципиентами, то возможна оценка функциональной активности в окрашенных флуоресцентной меткой клетках (ВВ-ассоциированные клетки) по сравнению с неокрашенными [274].

### **1.2.3. Роль экзосом в развитии онкологических заболеваний**

Экзосомы регулируют широкий спектр физиологических и патологических процессов, включая эмбриональное развитие, иммунные реакции, регенерацию тканей, поддержание популяции стволовых клеток, коагуляцию крови, нормальный и патологический ангиогенез и т.д. [276, 277]. Несмотря на экспоненциальный рост количества научных публикаций в области исследования ВВ за последние 10 лет, пока еще много «белых пятен» в понимании регуляции межклеточной коммуникации с помощью экзосом, включая динамику и регуляцию секреции экзосом клетками, механизмов внутриклеточной «сортировки» молекул в составе экзосом и адресного транспорта содержимого экзосом от клетки к клетке.

При РМЖ, помимо участия в начальной злокачественной трансформации, экзосомы могут передавать сигнальные молекулы клеткам микросреды опухоли, помогая опухолевым клеткам не только уклоняться от иммунного ответа, но способствуя инвазии и метастазированию опухоли путем реконструирования микросреды и стимулирования ангиогенеза (рисунок 8).

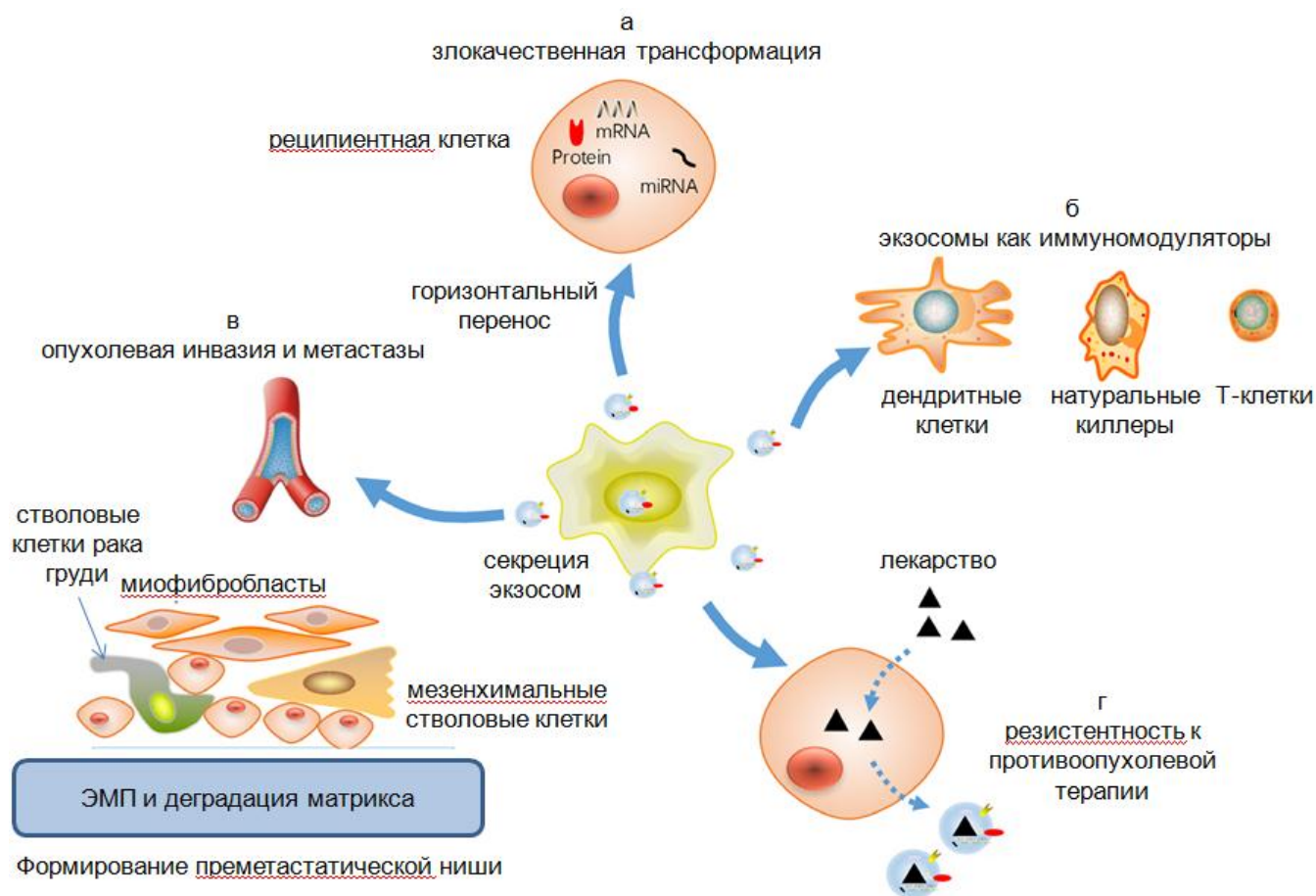


Рисунок 8 – Клеточные процессы, на которые влияет передача сигналов, опосредованных экзосомами, при РМЖ. Опухолевые клетки и стромальные клетки обмениваются экзосомами, белки и нуклеиновые кислоты которых могут влиять на функцию клеток-реципиентов посредством горизонтального переноса белка или РНК экзосомы могут способствовать распространению трансформированного фенотипа от опухолевых клеток к окружающим нормальным клеткам (а). Ингибирование иммунного ответа против опухолевых клеток путем ингибирования пролиферативного ответа иммунных клеток (дендритных клеток, НК-клеток и Т-клеток) (б). Экзосомы влияют на инвазию опухоли и метастазирование, поскольку стимулируют эндотелиальные ангиогенные реакции, ЭМП, активируют раковые стволовые клетки и подготавливают преметастатическую нишу (в). Индукция устойчивости к противоопухолевой терапии, включая химиорезистентность, радиационную устойчивость и эндокринную устойчивость к терапии (г) [285].

### 1.2.3.1. Регуляция опухолевыми экзосомами функциональной активности иммунной системы

Участие экзосом в иммуносупрессии путем формирования иммунопривилегированного состояния внутри опухоли показано во многих работах [278]. Раковые клетки продуцируют

большие количества экзосом, переносящих проапоптотические молекулы, такие как Fas-лиганд и TRAIL, способные индуцировать апоптоз в активированных Т-лимфоцитах, тем самым блокируя иммунный ответ [279, 280].

Также показано, что происходящие из опухолевых клеточных линий экзосомы содержат ряд молекул (MICA/B, ULBP3, TGF- $\beta$ , PI-9, некоторые микроРНК), способных модулировать функцию НК-клеток путем снижения уровня поверхностного рецептора NKG2D, в то время как протеазный ингибитор PI-9 деградирует гранзим В [281, 282]. Инкубация НК-клеток с опухолевыми экзосомами приводит к снижению в них уровня важного цитолитического белка перфорина. Механизм данного события до настоящего времени неизвестен, однако предполагают, что другие экзосомальные протеазы также могут принимать участие в регуляции функции НК-клеток. В частности было показано, что ассоциированный с лизосомами мембранный протеин (LAMP-1) является чрезвычайно важным белком для осуществления цитотоксической функции НК-клеток, а именно, влияет на движение литических гранул, содержащих перфорин и гранзим В, а уровень LAMP-1 регулируется протеасомами и его ингибиторами [283, 284].

Кроме того, секретлируемые карциномой молочной железы экзосомы способны блокировать опосредованную IL-2 активацию НК-клеток и их иммунный ответ на опухолевые клетки [286].

Опухолевые экзосомы могут также являться негативным модулятором функции антиген-презентирующих клеток. Показано, что именно экзосомы блокируют дифференциацию CD14<sup>+</sup> моноцитов в полноценные дендритные клетки – важнейшие антиген-презентирующие клетки организма, что приводит к разрастанию популяции CD14<sup>+</sup>HLA-DR<sup>neg/low</sup>, клетки которой тождественны миелоидным супрессорным клеткам [287].

Таким образом, опухолевые экзосомы оказывают комплексное иммуномодулирующее действие, способствующее ускользанию новообразования из под иммунного надзора.

### **1.2.3.2. Стимуляция опухолевыми экзосомами ЭМП, миграции и инвазии**

Известно, что секретированные раковыми клетками экзосомы несут в своем составе биологически активные молекулы, влияющие на апоптоз, ЭМП, пролиферацию, миграцию и инвазию клеток-реципиентов.

На сегодняшний день получены убедительные доказательства вовлечения содержимого экзосом (TGF $\beta$ , HIF $\alpha$ ,  $\beta$ -Catenin, IL-6, Caveolin-1, Vimentin и ЭМП-индуцирующие микроРНК и т.д.) во все стадии ЭМП - от индукции инвазивного фенотипа до отдаленного метастазирования [288, 289]. В частности, перенос экзосомами MMP-13



стимулирует ЭМП и способствует метастазированию назофарингеального рака [143]. Путем сравнения протеомов экзосом клеточных линий рака мочевого пузыря (неметастатической T24 и метастатических SLT4 и FL3), в агрессивных линиях были выявлены повышенные уровни участвующих в ЭМП белков, как на поверхности (HDGR и Vimentin) так и в полости (Casein kinase II  $\alpha$  и Annexin A2) везикул [290]. Более того, путем стимулирования ЭМП опухолевые экзосомы могут вызывать устойчивость злокачественных новообразований к терапии: экзосомы резистентных к платине субклонов клеточной линии рака яичников A2780 вызывали устойчивость у чувствительных к платине субклонов [291], а экзосомы, секретлируемые клетками глиобластомы и содержащие белки PTPRZ1-MET, вызывали устойчивость к темозоломиду [22]. Кроме того, опухолевые экзосомы переносят в своём составе ЭМП-ассоциированные микроРНК (miR-200, miR-122 и др.), трансформируя клетки-реципиенты [292, 293].

Известно, что миграция является нормальным физиологическим процессом и характерна для иммунокомпетентных, эндотелиальных клеток, фибробластов и др. Процесс движения клетки сложен, неоднозначен и имеет свою специфику в разных органах. При опухолевой трансформации нарушаются не только механизмы нормальной пролиферации клеток, но и их локомоторная активность, что приводит к таким проявлениям «асоциального» поведения опухолевых клеток, как инвазивный рост и метастазирование. Согласно современным исследованиям, главную роль в определении локомоторного фенотипа играет динамическое взаимодействие двух основных систем цитоскелета – микротрубочек и актин-миозиновой системы, создающей внутри клетки и в окружающем ее матриксе механическое напряжение, регулируемое молекулярной системой малых ГТФ-аз семейства Rho [294], при этом в секрецию экзосом вовлечен ассоциированный с микротрубочками белок GEF-H1 [295]. Высокий инвазивный потенциал ряда опухолевых клеток обусловлен динамичной перестройкой актинового цитоскелета актин-связывающими белками с формированием инвадоподий – специализированных инвазивных структур клетки, богатых актином и актин-связывающими белками. Показано, что, инвадоподии являются основными сайтами для экзосом-содержащих мультивезикулярных эндосом, а ингибирование формирования инвадоподий существенно снижает секрецию экзосом в инкубационную среду [296]. Таким образом, отмечается определенный синергизм в процессах формирования и функционирования инвадоподий и секреции экзосом в высокоинвазивных опухолевых линиях. Таким образом, данные о ремоделировании цитоскелета в высокоинвазивных опухолевых и нормальных клетках свидетельствует о существенной роли белков цитоскелета в секреции экзосом с одной стороны и о влиянии экзосом на клеточную подвижность – с другой.

В процессах клеточной миграции также участвует связанный с ламинин-связывающими интегринами CD151; в ассоциации с MMP-14 он регулирует шеддазную активность ADAM-10 и ADAM-17 [297]. Нокдаун CD151 снижает интегрин-опосредованную миграцию и инвазию клеток через FAK и Rac1-опосредованную сигнализацию [298]. Кроме того, CD151 в сочетании с TGF- $\beta$  способствует инвазии и метастазированию посредством активации сигнальных путей Smad2/3, c-Akt, Erk1/2, JNK, JUN и MMP-9 [299]. CD151 усиливает пролиферацию кератиноцитов путем активации транскрипционного фактора STAT3, регулятора клеточной пролиферации и апоптоза [300].

В экзосомах структурный тетраспанин CD151 в наибольшей степени связан с экспрессией и активностью тетраспанин-ассоциированных ADAM-протеаз и MMPs. Показано, что в экзосомах преобладают зрелые формы ADAM-10 и ADAM-17 [301], однако механизм включения зрелых MMPs во ВВ и активация их проформ до сих пор остаются неизвестными. ADAM-10 способствует шедингу E-кадгерина, наличие растворимой формы которого во внеклеточной среде приводит к потере межклеточных контактов, что облегчает миграцию клеток, тем самым увеличивает метастатический потенциал [302]. Экзосомальные EpcAM и CD46 из асцитической жидкости больных раком яичников расщепляются ADAM-шеддазами, что приводит к появлению их растворимых форм [303]. Примембранный протеолиз CD23, L1CAM и CD44, опосредованный ADAM-10, может происходить в МВТ внутри клеток, а также в экзосомах, высвобождающихся из RPMI 8866 В-клеточной линии хронической миелоидной лейкемии, OVMz, SKOV3ip клеточных линий карцином яичников [304]. Данный протеолиз в МВТ может объясняться повышенной доступностью сайта связывания ADAM-10 в CD23 в условиях эндосомального pH [301]. Активность ADAM-10 также модулируется за счет взаимодействия с тетраспанинами CD9, CD81 и CD82 [305]. Данные тетраспанины присутствуют в экзосомах и могут регулировать включение зрелой ADAM-10 в экзосомы и ее протеолитическую активность.

Повышенная активность MMP-2 и MMP-9 в составе экзосом метастатической гепатоклеточной карциномы способна также инициировать сигнальные пути PI3K/AKT и MAPK, опосредуя миграцию и инвазию неподвижных ранее гепатоцитов [306]. Увеличение адгезии раковых клеток к эндотелию и фибриногену достигается также посредством переноса секретиромыми тромбоцитами экзосомами интегрина CD41, что приводит к увеличению экспрессии ряда генов, ответственных за инвазию (MT1-MMP) и ангиогенез (VEGF, IL-8, HGF) [185]. В своём составе экзосомы раковых клеток могут нести лиганды к EGFR-рецепторам (амфирегулин, гепарин-связывающий эпидермальный фактор роста (Hb-EGF) и TGF- $\alpha$ ), которые затем связываются с EGFR-рецепторами клеток-мишеней.

Показано, что обработанные опухолевыми экзосомами клетки линии MDCK обладают большим инвазивным потенциалом, чем необработанные [307].

Экзосомальные микроРНК (miR-301a, miR-130a, miR-34a, miR-106b, miR-328 и т. д.) из некоторых линий клеток РМЖ также вовлечены в стимуляцию инвазии и миграционной способности опухолевых клеток [308]. Также показано, что экзосомальная miR-10b подавляет уровень белка генов-мишеней, таких как HOXD 10 и KLF4, и индуцирует способность к инвазии в клетках РМЖ [309], а экзосомальная miR-105 регулирует миграцию клеток РМЖ посредством нацеливания на ZO-1 [310]. Кроме того, секретлируемая различными клеточными линиями РМЖ экзосомальная miR-9, известная как прометастатическая микроРНК, может поглощаться нормальными фибробластами и переключать их фенотип на опухоли-ассоциированный, способствуя таким образом опухолевому росту [311].

Помимо стимуляции инвазии и миграционной способности, экзосомальные некодирующие РНК также влияют на клеточную пролиферацию. В частности, было показано, что экзосомальные miR-130a и miR-425 влияют на жизнеспособность клеток линии MCF-7, пролиферация которых была связана с такими сигнальными путями, как TOR, ErbB, MAPK и TGF- $\beta$  [312]. Инкубация экзосом из культуральной среды линии HCC1806 (ТН-РМЖ) с неканцерогенной линией MCF10A приводила к индукции клеточной пролиферации, что возможно было опосредовано изменениями в 138 генах и экспрессии 70 микроРНК, влияющих на PI3K/AKT, MAPK и HIF1A [313]. Показано, что при РМЖ уровень экзосомальной miR-222 достоверно повышен в плазме больных на поздних стадиях и коррелирует с высокой агрессивностью клеточных линий РМЖ [314]. Инкубация экзосом, содержащих miR-222, с различными клеточными линиями РМЖ способствовала увеличению клеточной миграции и инвазии реципиентных клеток путем подавления экспрессии PDLIM2 [314].

### **1.2.3.3. Стимуляция опухолевыми экзосомами ангиогенеза и метастазирования**

Секретлируемые раковыми клетками экзосомы вовлечены в активный ангиогенез, сопровождающий развитие опухоли. Наиболее известным проангиогенным фактором является VEGF, однако MMP также являются необходимыми факторами для создания условий прорастания капилляров при деградации базальной мембраны, а также для высвобождения и индукции транскрипции ангиогенных факторов [315]. Недавно появились данные о том, что тетраспанины в составе экзосом, приводят к индукции ряда ангиогенных факторов (VEGF, VEGFR1, VEGFR2, uPA, MMP-2, MMP-9) и ингибированию экспрессии антиангиогенных факторов в перитонеальных макрофагах и клетках мезотелия [316]. Эти

данные согласуются с работой по стимуляции экзосомами экспрессии вовлечённых в ангиогенез генов (VEGF, IL-8 и HGF) на клеточных линиях рака лёгких человека (A549, CRL 2066, CRL 2062, НТВ 183, НТВ 177) и карциномы лёгких Льюиса (LCC) [317]. Более того, в составе экзосом был обнаружен ангиогенный фактор Dll4 и транспорт этого белка от опухолевых клеток U87 к эндотелиальным клеткам-реципиентам. Транспорт Dll4 приводил к изменению клеточного фенотипа: эндотелиальные клетки линии HUVEC продуцировали Dll4-содержащие экзосомы. Введение Dll4-содержащих экзосом в U87 ксенографтных мышей приводило к ветвлению сосудистого русла, увеличению длины и размеров сосудов [318].

В литературе также представлен обширный ряд свидетельств индукции ангиогенеза при развитии злокачественных новообразований экзосомальными микроРНК: miR-31 [319], miR-125a [320], miR-126 [321, 322], miR-150 [323], miR-214 [324], miR-296 [322].

Показано, что секретируемые раковыми клетками экзосомы играют центральную роль в метастазировании, “подготавливая” участок к метастазу и могут даже привлекать опухолевые клетки в нишу, функционируя как первые медиаторы формирования метастатического узла [325]. Опухолевые экзосомы переносят молекулы, позволяющие опухоли активно расти и метастазировать – такие как ADAM-10, ADAM-17, Cadherin-11 [326]. Кроме того, секретируемые опухолевыми клетками экзосомы могут опосредовать метастазирование за счёт транспорта в своём составе молекул адгезии, таких как Fibronectin 1 и Laminin gamma 1 [327].

При РМЖ опухолевые клетки преимущественно метастазируют в определенные органы, формируя «органотропные метастазы». Перекрестное взаимодействие между опухолевыми клетками первичного очага и органом-мишенью способствует образованию преметастатических ниш и усиливается различными факторами (в том числе экзосомами), секретируемыми раковыми клетками. Действительно, было показано, что экзосомы, секретируемые клетками линии T47D-CXCR4, были обогащены специфическими мРНК, связанными со стволовостью и метастазированием, что подтверждает мнение о том, что клетки РМЖ имеют предрасположенность к метастазированию, и именно экзосомы стимулируют прогрессирование опухоли и метастазирование [328].

ТН-РМЖ имеет тенденцию метастазировать в легкие и мозг, что отличает его от других подтипов, которые обычно метастазируют в кости и мягкие ткани. Показано, что в высокометастатических клетках ТН-РМЖ и секретируемых ими экзосомах гиперэкспрессированы miR-9, miR-20a-5p и miR-155 [329, 330], а перенос опухолевыми экзосомами miR-20a-5p в первичные макрофаги костного мозга мыши способствует остеокластогенезу [330]. В другой работе установлена достоверная корреляция между

повышенным уровнем экзосомальной miR-210 и наличием метастазов в лимфатических узлах у больных РМЖ. На секрецию данной микроРНК влияла нейтральная сфингомиелиназа 2 (nSMase2), способствуя также метастазированию раковых клеток за счет индукции ангиогенеза в микроокружении опухоли путем усиления миграции эндотелиальных клеток и образования капилляров [331]. В других работах отмечена роль экзосомальной miR-210 как одного из ключевых факторов ангиогенеза опухоли и метастазирования в мозг, а высокая экспрессия miR-210 коррелирует с плохой выживаемостью у больных РМЖ с метастазами в мозг [332, 333].

Таким образом, экзосомы являются новыми медиаторами межклеточной коммуникации как внутри первичного опухолевого микроокружения, так и метастатических ниш.

### **1.3. Проблемы диагностики РМЖ и перспективы использования «жидкостной биопсии»**

Злокачественные новообразования молочной железы занимают лидирующее место в структуре онкологических заболеваний женщин. По данным ВОЗ в 2020 г в мире было выявлено 2 261 419 новых случаев РМЖ и установлено 684 996 случаев смертей от него [29]. В России РМЖ также занимает первое место по показателям заболеваемости (21,7%) и смертности (15,9%) среди злокачественных заболеваний женщин в возрасте 40-85 лет, при этом за 10 лет отмечен значительный прирост заболеваемости РМЖ – 13,75% (с 45,75 в 2010 г. до 47,39 на 100 тыс. населения в 2020 г.) [334].

Проблема своевременного выявления РМЖ заключается не только в его бессимптомном развитии, но и в отсутствие надёжных маркёров, способствующих раннему выявлению неопластического процесса. По статистике, 80% больных сами случайно обнаруживают у себя опухоль, которая в половине случаев относится к распространенной стадии. Большинство больных выявляют на индивидуальных профилактических осмотрах врачи разных специальностей, значительно меньше - при проведении массовых профосмотров [335]. К сожалению, небольшие опухоли до 2 см и расположенные глубоко в ткани молочной железы практически не поддаются клинической диагностике [335]. Если диагноз устанавливается на ранней стадии развития, когда болезнь ограничена молочной железой, 5-летняя относительная выживаемость составляет 98,6%, по сравнению с 84,9% для РМЖ с вовлечением регионарных лимфатических узлов и 25,9% при метастатической форме РМЖ [336].

Современным трендом в развитие диагностики РМЖ является разработка неинвазивных/малоинвазивных диагностических процедур. К их числу в первую очередь

относятся различные инструментальные (маммография, УЗИ, МРТ, ПЭТ) методы анализа. Инструментальный контроль используется и для повышения эффективности биопсии. Современное диагностическое использование методов молекулярного анализа так же в первую очередь ориентировано на неинвазивный анализ – анализ биологических жидкостей, и, в первую очередь циркулирующих в крови опухолевых маркеров. Действительно, такой анализ не требует материала, полученного непосредственно из опухолевой ткани, а значит, не зависит от локализации/выявления опухоли, подразумевает раннее выявление первичных опухолей или вторичных очагов и, как следствие, остро востребован современной диагностической медициной.

### **1.3.1. Инструментальные методы диагностики**

Основным современным методом диагностики злокачественных новообразований груди является маммография, позволяющая с достоверностью от 80 до 96% выявить новообразования молочной железы размером более 10 мм в диаметре. Скрининговая маммография проводится ежегодно с профилактической целью всем женщинам старше 40 лет, однако, несмотря на высокую эффективность, имеет ряд существенных недостатков. Например, получаемые дозы облучения не позволяют использовать рентгенологический метод для динамического наблюдения. Кроме того, маммография не даёт возможности дифференцировать кистозные и солидные образования, менее чувствительна для обнаружения рака *in situ* [337], инвазивных лобулярных карцином и диффузных опухолей [338]. К другим недостаткам рентгенологического метода можно отнести низкую выявляемость пальпируемых злокачественных новообразований (до 40% ложноотрицательных результатов) у молодых женщин, что объясняется большей плотностью молочной железы и, как следствие, меньшей вероятностью обнаружения мелких и плотных очагов роста новообразования [337]. Более того, каждая вторая женщина, ежегодно проходящая маммографию, получает как минимум один ложноположительный результат в своей жизни, что приводит к нежелательной биопсии и тревоге.

Наиболее широкое распространение у молодых женщин в возрасте до 35 лет получил метод УЗИ (ультразвукового исследования), способный отличить более плотную ткань опухоли от окружающей нормальной ткани. Однако в процессе диагностики участки жировой инволюции могут быть ошибочно приняты за патологические структуры, что увеличивает риск получения ложноположительных результатов, а ложноотрицательные результаты могут быть связаны с тем, что не все формы

злокачественных новообразований груди визуализируются этим методом. Кроме того, методом УЗИ невозможно выявлять микрокальцинаты, которые встречаются при раке в 42-50% случаев. При проведении ультразвукового сканирования молочных желез 10 000 пациенток с доброкачественными и злокачественными новообразованиями, чувствительность УЗИ в выявлении рака составила 92%, специфичность метода – 65%. Показано, что чувствительность метода была прямо пропорциональна размеру выявляемого очага и обратно пропорциональна количеству жировой ткани в молочной железе [338]. Считается, что ложноотрицательные результаты ранних опухолей молочной железы при УЗИ могут достигать 60% [335,337]. К недостаткам всех типов эхо-сканирований можно причислить зависимость интерпретации результатов от опыта врача и субъективность трактовки результатов.

Одним из новых неинвазивных методов обследования молочных желез является МРТ. Наиболее часто для обследования молочных желез используются высокопольные МР-томографы, позволяющие дифференцировать доброкачественные и злокачественные поражения с чувствительностью 94% и специфичностью 65%, оценить размер и локализацию любого патологического образования более 5 мм в диаметре [339-341]. Однако диагностика метастатических лимфоузлов такими томографами осуществляется менее уверенно, что связано в первую очередь с отсутствием в массовой практике катушек, которые бы обеспечивали одновременно возможность естественной визуализации молочных желез в положении лежа на животе и в то же время – визуализацию структур подмышечных впадин и грудной клетки [342]. Относительная дешевизна низкопольных МР-томографов, а также наличие помехоустойчивых катушек, позволяющих визуализировать структуры грудной клетки с высоким качеством, послужили толчком к исследованию с их помощью возможности одновременной визуализации первичного очага и оценке распространенности лимфогенного метастазирования. Было показано, что контрастированная низкопольная МРТ позволяет с большей чувствительностью и специфичностью дифференцировать доброкачественные и злокачественные поражения молочных желез (93% и 89%, соответственно), оценить размер и локализацию любого патологического образования более 7 мм в диаметре, а также достоверно выявить опухолевые поражения лимфатических узлов (в аксиллярной области, расположенных медиально, на уровне и латеральнее малой грудной мышцы) размером более 5 мм [342]. Однако на сегодняшний день существенными недостатками любой МРТ являются дороговизна и недостаток квалифицированных специалистов [335, 340].

Одним из новейших методов, является ПЭТ. Принцип этого метода заключается в избирательном накоплении позитрон-излучающих изотопов (чаще всего  $^{18}\text{F}$ -дезоксиглюкозы) в опухолевой ткани, с последующей регистрацией излучения и реконструкцией томографического изображения. В зависимости от стадии заболевания, чувствительность метода при первичном выявлении рака молочной железы составляет от 48% до 96%, специфичность – от 73% до 100% [343]. Как и при МРТ, чувствительность ПЭТ зависит от размеров патологического очага. Опухоли менее 10 мм в диаметре зачастую являются ложноотрицательными, так как их выявление ограничено пространственным разрешением современных ПЭТ-сканеров. Таким образом, кроме общих с МРТ, недостатками ПЭТ, являются низкая чувствительность прибора.

К сожалению, высокая чувствительность и недостаточная специфичность вышеописанных методов приводят к большому числу ложноположительных результатов, которые требуют выполнения инвазивной диагностической процедуры - забора образца ткани и его исследования методами микроскопического анализа. Достоверность цитологического исследования злокачественных новообразований молочной железы, полученных с помощью пункционной тонкоигольной аспирационной биопсии под контролем УЗИ - 72% [344, 345]. Отрицательные результаты цитологического исследования, несмотря на точное попадание иглы в новообразование, могут быть связаны с примесью ФЭК в анализируемом образце; недостаточным количеством забранного материала (что может быть связано с высокой плотностью узла либо высоким удельным весом соединительной ткани в структуре опухоли); забор материала из зон некроза. Достаточное количество биопсийного материала для исследования можно получить при использовании режущей иглы под УЗИ-контролем; как следствие, достоверность анализа возрастает до 86%. Наличие отрицательных результатов при заборе материала с помощью режущей иглы под УЗИ-контролем связано с неточным попаданием в патологический объект и с малым размером полученных образцов ткани из-за их фрагментации [344]. Таким образом, отрицательный результат тонкоигольной аспирационной биопсии и биопсии режущей иглой под УЗИ-контролем не говорит об отсутствии злокачественной опухоли и не может быть использован как показатель отрицательного прогноза в отношении РМЖ.

Таким образом, используемые в настоящее время методы инструментальной диагностики и связанные с ними диагностические процедуры не являются совершенными. Общим ограничением инструментальных методов является неоднозначность интерпретации результатов, связанная с многообразием индивидуальных особенностей строения и морфологией молочной железы. Кроме того, дороговизна наиболее



чувствительных методов МРТ и ПЭТ не позволяет использовать их в скрининговых программах. В связи с вышеперечисленным, необходимы поиски новых методов диагностики, обладающих высокой специфичностью, чувствительностью, низкой стоимостью и позволяющие выявлять ранние стадии развития опухолевого процесса.

### **1.3.2. Молекулярные методы диагностики**

Лабораторная онкодиагностика объединяет методы детекции онкомаркеров – веществ, детектируемых в крови или моче при развитии патологического процесса. В настоящее время выделяют несколько типов онкомаркеров: метаболомные, протеомные, генетические, эпигенетические, иммуногистохимические и биохимические. Давно используемые иммуногистохимические и биохимические маркеры имеют диагностическое значение при уже сформировавшейся опухоли, которая секретирует в кровь достаточное для измерения количества антигенов. Таким образом, основной областью применения этих маркеров является мониторинг онкологического заболевания и оценка эффективности противоопухолевой терапии. Недостатком иммунохимических и биохимических маркеров является то, что они встречаются в небольших количествах в норме и при неонкологических заболеваниях, что приводит к ложноположительным результатам и тем самым уменьшает диагностическую ценность.

Развитие методов масс-спектрометрии и ядерного магнитного резонанса индуцировало поиск в кровотоке онкологических больных метаболомных маркеров РМЖ. Метаболомные маркеры – это низкомолекулярные вещества (с мол. массой не более 1 кДа), характерные для трансформированных клеток, или концентрация которых повышается в таких клетках [346]. Недавно была установлена панель маркеров, выявленных в сыворотке крови, позволяющая достоверно дискриминировать больных с локализованным и метастатическим РМЖ: His, Glu, Phe, ацетоацетат, глицерол, пируват, N-ацетилгликопротеин и манноза [347]. Однако поскольку вышеперечисленные метаболомные маркеры не обладают высокой специфичностью (в силу того, что они обнаруживаются как в нормальных, так и в трансформированных клетках), требуется валидация их диагностической ценности с использованием больших групп как клинически здоровых доноров, пациентов группы риска развития онкологических заболеваний, так и больных с доброкачественными и злокачественными новообразованиями молочной железы.

В идеале опухолевые маркеры должны удовлетворять нескольким требованиям:

- присутствовать или синтезироваться только в опухолевых клетках;

- концентрация в крови должна коррелировать с размером опухоли;
- маркеры должны обнаруживаться до клинического проявления опухоли или её рецидивов.

Наиболее полно данным требованиям соответствуют протеомные, генетические (точечные мутации, микросателлитная нестабильность, амплификация некоторых геномных последовательностей) и эпигенетические маркеры, ассоциированные с онкотрансформацией клеток.

### **1.3.2.1. Белковые маркеры**

Генетические нарушения, имеющиеся в опухолевых клетках, приводят к изменению синтеза белков, в том числе синтезу мутантных форм, нарушениям экспрессии – повышению или снижению синтеза того или иного белка, появлению белков, характерных для эмбрионального периода развития. Качественная и количественная оценка этих белковых молекул обычно проводится иммунохимическими методами, где они выступают в качестве антигенов, однако чувствительность иммунохимических методов в тысячи раз меньше, чем у молекулярно – генетических методов ( $10^{-12}$  –  $10^{-14}$  г). Количество биомаркеров, реально используемых и рекомендуемых международными организациями для диагностики и мониторинга РМЖ весьма ограничено.

РЭА представляет собой гликопротеин и продуцируется в очень ограниченном количестве эпителиальными клетками молочной железы, бронхов и кишечного тракта, а метаболизируется в печени. В норме сывороточный уровень РЭА не превышает 3 нг/мл. Повышенная концентрация этого антигена в крови наблюдается у 30-50% больных при карциномах молочной железы, головы и шеи, у 50-90% больных с карциномой пищеварительного тракта и дыхательных путей, а также у 23% больных злокачественных новообразований соединительнотканного происхождения. Очень высокие начальные концентрации РЭА до оперативного лечения могут указывать на метастазирование в регионарные лимфатические узлы [348].

СА 15.3 представляет собой муциноподобный гликопротеин. Этот маркер используется для обнаружения и мониторинга течения РМЖ, контроля над эффективностью противоопухолевой терапии, выявления рецидива (часто в комбинации с РЭА). Границы нормы – не выше 28 Ед/мл у здоровых небеременных женщин. Повышенные концентрации СА 15.3 обнаруживаются при карциноме молочной железы (10% случаев при I стадии заболевания, 20% - при II стадии, 40% - при III стадии, 75% - при IV стадии) [349], в то время как при доброкачественных новообразованиях молочной железы его концентрация не увеличивается [350]. В результате тестирования 535

пациентов с опухолями различных локализаций было показано, что наибольший процент повышенной концентрации данного маркера (74%) выявлялся у больных с метастатическим РМЖ, в то время как при локализованном РМЖ – всего в 16%, при раке легкого – 17,8%, при неопухолевых поражениях печени – 16,7% [348].

Специфичность дифференциальной диагностики злокачественных опухолей с использованием обоих маркеров относительно доброкачественных заболеваний молочной железы составляет 95%, однако это не приводит к повышению чувствительности, которая составляет 31% для первичной диагностики и 71% в случае диагностики метастазирующей карциномы молочной железы [339].

Несмотря на перечисленные недостатки РЭА и СА 15.3, за отсутствием лучшего метода клинической диагностики, эти маркеры широко используют на практике в сочетании с маммографией и ультразвуковым исследованием.

С развитием протеомных технологий открылись совершенно новые перспективы по выявлению более чувствительных и специфичных опухолевых белковых маркеров в крови. Анализ протеома плазмы/сыворотки крови при помощи двумерных электрофорезов с последующей оцифровкой и идентификацией пятен осложнен присутствием в ней мажорных белков в очень высокой концентрации. Поскольку для сравнительных протеомных исследований наибольший интерес представляют именно минорные белки, для снижения концентрации альбумина и иммуноглобулина используют иммуноаффинную хроматографию [351] либо температурную обработку [352]. В последние несколько лет двумерный электрофорез был практически полностью вытеснен более производительными и точными масс-спектрометрическими методами [353]. В настоящее время идентифицировано более 400 перспективных протеомных маркеров РМЖ: гаптоглобин альфа-1, компонент комплемента С3а, трансферрин, аполипопротеин А-I и С-I, гистидин-богатый гликопротеин и др. (таблица 1) [354-365].

Интересно отметить, что большинство идентифицированных белков не является продуктом опухолевых клеток, а относится к неспецифическим белкам воспаления. Вопрос о том, насколько могут быть применимы такие белки для онкодиагностики, является предметом острой дискуссии.

Увеличить специфичность протеомных маркеров РМЖ позволит, по-видимому, исследование белкового спектра циркулирующих в крови НПК и экзосом опухолевого происхождения, а бурно развивающиеся протеомные исследования позволят увеличить набор таких маркеров и выявить их комбинации, наиболее ценные с диагностической точки зрения.

Таблица 1 – Перспективные протеомные маркеры, идентифицированные в сыворотке крови больных РМЖ методами MALDI- и SELDI-TOF MS

Маркер	Платформа (масса/заряд)		Функция белка	Ссылка
	MALDI	SELDI		
аполипопротеин А-I		28284	Метаболизм липидов	355
аполипопротеин А-II		9285		356
аполипопротеин А-IV	2508			357
аполипопротеин С-I		6647		355
Брадикинин (фрагменты)		904 1061	Медиатор воспаления	357
С-концевой фрагмент компонента комплемента С3а		8100	Активация комплемента	358
		8116		359
		8129		359, 360
С3а des-R анафилатоксин		8900	Активация комплемента	357
		8926		359
		8919		360
		8941		361
		8936		355
С3f (фрагменты)	942-1865		Активация комплемента	357
С4а (фрагменты)	1627- 2704		Активация комплемента	357
Фактор XIII	2602		Свертывание крови	357
Фибриноген альфа (фрагменты)	2379, 2659		Свертывание крови	357
		2661		362
Фибринопептид А (фрагменты)	905-1537		Свертывание крови	357
Гаптоглобин (альфа 1)		9192	Связывание гемоглобина	355, 363, 364
ITIN4		4300	Функция не ясна	358, 359
		4286		360
		4276		362
	998-2358			357
Кининоген HMW		7790	Свертывание крови, выброс брадикинина	356
Трансферрин		81763	Белок острой фазы, связывание и транспорт	355

			железа, клеточная пролиферация	
Транстиретин (фрагменты)	2451		Участник острой фазы, тиреоидный гормон-связывающий белок	357, 364
Гистидин-богатый гликопротеин	+		Функция не ясна	364
Лактотрансферрин	+		Противовирусная активность, активатор иммунного ответа	364
Кластерин (аполипопротеин J)			Регуляция апоптоза	364
Zn <sup>2+</sup> -альфа-2-гликопротеин	+		Функция не ясна	364
альфа1-антихимотрипсин	+		Ингибитор протеаз	364
альфа1-антитрипсин	+		Белок острой фазы, ингибитор протеаз	365

+ - данные по массе/заряду идентифицированных пептидов авторами не приведены.

### 1.3.2.2. Генетические онкомаркеры

К генетическим маркерам относят все нарушения, которые изменяют структуру ДНК. Например, в опухолевой ДНК онкологических больных были обнаружены точечные мутации, микросателлитная нестабильность, амплификация некоторых геномных последовательностей.

В большинстве случаев мутации возникают в результате инсерции/делеции или замещения нуклеотидов. Самыми частыми дефектными генами при РМЖ являются *BRCA1* и *BRCA2* [338, 366, 367], в меньшей степени – *p53*, *CHEK2*, *K-ras*, *PTEN*, *ATM* [147, 368].

Повышенная амплификация *HER-2* при РМЖ выявляется всего в 20 % случаев [369-371], но определение статуса этого маркера входит в число обязательных исследований опухолевого материала. Показано, что амплификация *HER-2* коррелирует с агрессивным течением заболевания и коротким безрецидивным периодом [372]. Неблагоприятным прогностическим показателем РМЖ (высокая пролиферативная активность опухоли РМЖ и более короткая продолжительность жизни пациентов) является амплификация генов *c-myc* [373, 374]. По данным мета-анализа, не менее чем трехкратная амплификация гена *c-myc* наблюдается от 1% до 94% случаев, составляя в среднем 15,5% [375].

По литературным данным, микросателлитные маркеры РМЖ (например, такие как *D8S135*, *UGT1A1*, *D3S1611*) выявляются в опухолевой ткани не чаще 17 % случаев [376, 377]. Позднее было установлено, что встречаемость и частота выявления ЛОН достоверно

выше в *HER2*-положительных образцах (56,3, 26,7%), чем в *HER2*-негативных (32,0, 12,2%) [378].

Суммируя результаты многочисленных исследований, стоит отметить, что генетические изменения, выявленные на сегодняшний момент, не являются специфичными и данные, представленные в этой области, весьма разнообразны и противоречивы. Однако развитие современных методов анализа, таких как метод гибридизации ДНК на олигонуклеотидных чипах, полногеномное секвенирование, позволяющие расширить и интенсифицировать сравнительный анализ генетических изменений в норме и при патологии, вселяют большие надежды на то, что в обозримом будущем тканеспецифичные генетические ДНК-маркёры будут выявлены и найдут широкое применение для ранней диагностики злокачественных новообразований молочной железы.

### **1.3.2.3. Эпигенетические онкомаркеры**

В последние годы наблюдается значительный прогресс в исследовании новой группы потенциальных опухолевых маркеров – aberrантно-метилованных ДНК и микроРНК.

Изменения профиля метилирования ДНК генов-супрессоров опухолевого роста являются одним из наиболее ранних и часто встречающихся эпигенетических событий, наблюдаемых при развитии опухолей различной локализации [379], включая РМЖ [380]. Такая модификация цитозинов в составе CpG-динуклеотидов промоторных областей генов опухолевой супрессии стимулирует неопластические процессы, блокируя транскрипцию генов опухолевой супрессии, и отвечают за начальные этапы индукции опухолевого роста [381].

Использование aberrантно метилированных форм генов в качестве онкомаркеров имеет ряд преимуществ по сравнению с вышеописанными генетическими изменениями ДНК. Во-первых, на сегодняшний день известно, что aberrантное метилирование ДНК является одним из наиболее распространённых и ранних событий, приводящих к опухолевой трансформации клетки [382, 383]. Во-вторых, чувствительность детекции aberrантно метилированного гена в условиях избытка неметилованного аллеля выше, чем для мутантного аллеля и составляет 1 метилированный аллель на 1000 неметилованных [384]. В-третьих, по сравнению с мутациями, которые могут возникнуть в любом месте гена, функционально-значимое метилирование локализовано только в CpG-богатых районах промоторных областей генов, что позволяет оптимизировать первичный скрининг маркерных участков, которые в дальнейшем будут

детектированы при помощи специфичной к метилированию количественной ПЦР. Следует отметить, что используя панель генов, можно многократно повысить чувствительность и специфичность выявления опухолей [384].

При исследовании опухолевой ДНК биоптатов было обнаружено, что при РМЖ вследствие гиперметиличирования нарушена экспрессия более чем 40 генов. К таким генам относятся: регуляторы клеточного цикла (*CDKN2A*, *CDKN2B*, *p14/ARF*, *RBI*, циклины *D1* и *D2*), гены, ответственные за апоптоз (*TP53*, *CDKN1*, *HOX5*, *MDM2*, *DAPK1*, *TWIST1*, *YTMS1*, *FHIT*, *RASSF1A*, *HIC-1*, *HIN-1*), гены, ответственные за инвазию и метастазирование опухолевых клеток (*CDH1*, *CDH13*, *CTNB*), гены гормон- и рецептор-опосредованной передачи сигналов (*ESR1*, *PR*, *ER*, *RAR*, *NORE1*), а также гены систем репарации ДНК (*BRCA1*, *MGMT*) и детоксикации ксенобиотиков (*GSTP1*) [385-389].

МикроРНК представляют собой некодирующие РНК длиной от 19 до 24 н. Предшественниками микроРНК являются эндогенные короткие шпилечные структуры, а их мишенями – другие локусы со сходной, но не идентичной нуклеотидной последовательностью, где микроРНК вызывает репрессию трансляции [390]. Большинство микроРНК консервативны и располагаются в районах, наиболее часто вовлеченных в структурные перестройки хромосом или в ломких сайтах, что, как уже установлено, имеет значение в развитии онкологических заболеваний [384]. В норме микроРНК участвуют во многих клеточных процессах, включая пролиферацию, дифференцировку, апоптоз, иммунную регуляцию. Экспрессию некоторых микроРНК связывают с инициацией и прогрессией многих типов рака [391]. Показано, что такие онкогенные микроРНК могут выполнять роль как онкогенов, так и генов-супрессоров опухолевого роста, активно регулируя процессы роста и деления клеток, опухолевой инвазии и метастазирования [392, 393]. Поскольку уже на самых ранних стадиях развития канцерогенеза опухоли имеют уникальный профиль экспрессии микроРНК, поиск таких тканеспецифических маркеров является крайне перспективным [392].

Сравнительный анализ профиля экспрессии микроРНК в нормальной и злокачественной ткани молочной железы показал серьезные различия – экспрессия miR-195, miR-21, miR-155, miR-17~92 была значительно повышена и коррелировала с такими характеристиками опухоли как стадия, пролиферативный индекс, экспрессия эстрогеновых и прогестероновых рецепторов, HER-2 статус, активный ангиогенез [391, 394, 395].

### 1.3.3. Перспективы использования «жидкостной биопсии» для диагностики, прогноза и мониторинга злокачественных новообразований

Поскольку биополимеры опухолевого происхождения могут попадать в различные биологические жидкости, минимально инвазивную процедуру выделения этих биополимеров для получения информации о клетках, в которых они возникли, все чаще называют «жидкостной биопсией». В настоящее время ведутся интенсивные исследования по разработке методов диагностики и прогноза злокачественного заболевания, а также оценки эффективности противораковой терапии на основе анализа циркулирующих в крови вДНК в составе НПК и микроРНК и белков в составе экзосом (рисунок 9).

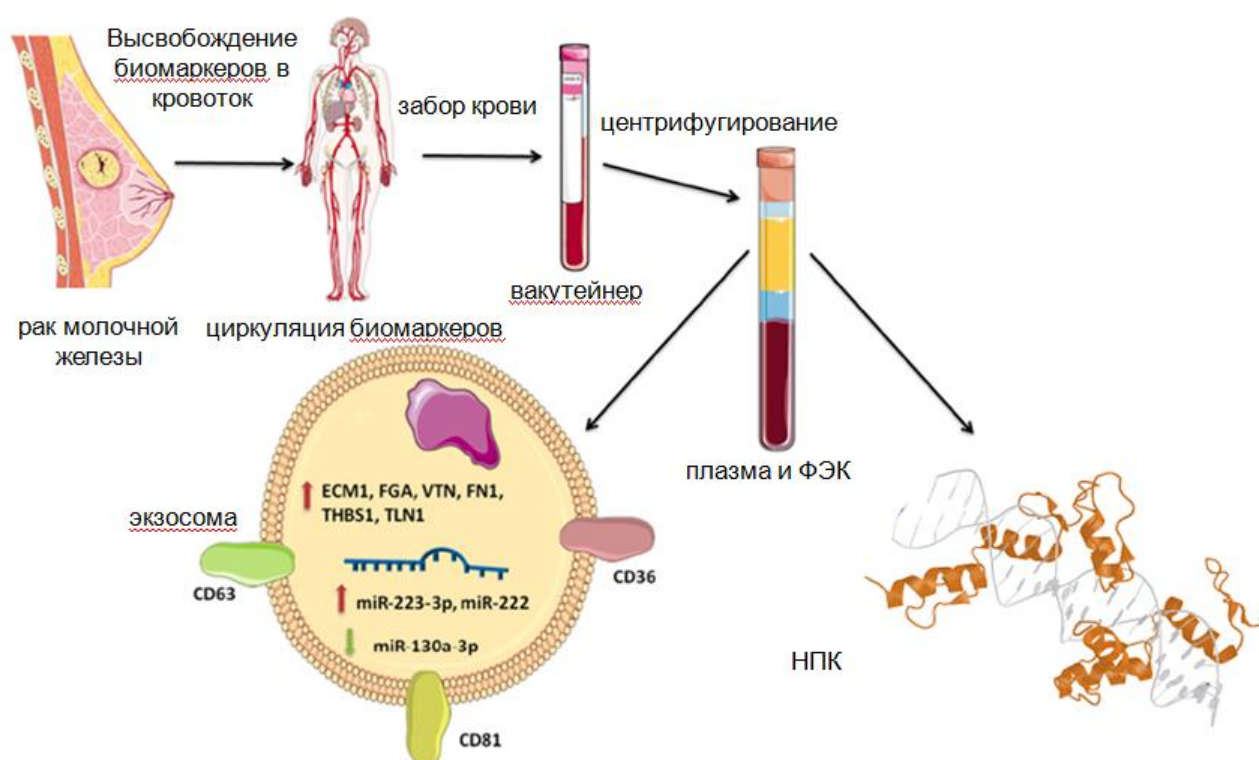


Рисунок 9 – Принцип «жидкостной биопсии» и перспективные опухолевые маркеры в ее составе.

#### 1.3.3.1. Опухолевые маркеры в составе вДНК крови больных РМЖ

Поскольку в появление вДНК в кровотоке вносят вклад различные процессы в организме, доля вДНК опухолевого происхождения обычно составляют 0,01-2% от общей концентрации вДНК в крови онкологических больных [13]. Тем не менее, методы ПЦР-анализа позволяют обнаружить в плазме крови онкоспецифические последовательности, характерные для этих клеток, даже при наличии в организме опухолей размером в 100-1000 клеток [396]. Другим серьезным аргументом в пользу поиска опухолевых маркеров в составе вДНК является отражение внутриопухолевой



гетерогенности, поскольку все раковые клетки вносят вклад в появление ДНК в биологических жидкостях [47, 89].

Для онкодиагностики РМЖ, основанной на ПЦР-анализе внДНК было использовано выявление мутаций в онкогенах и опухолевых супрессорных генах [397], нарушение хромосомного баланса (повторы и микросателлитные перестройки [398]), амплификации [399], а также нарушение профиля метилирования генов [400, 401].

Ген *p53* поддерживает целостность генома путем запуска взаимосвязанных процессов контроля состояния ДНК [402]. При РМЖ установлена достоверная корреляция наличия мутации в гене *p53* с неблагоприятным прогнозом течения заболевания [403], однако частота выявления этого онкомаркера на ранних стадиях заболевания в опухолевых тканях значительно выше, чем в плазме. В частности, мутации в ДНК опухолевой ткани детектируется в 14% случаев, а во внДНК плазмы - в 5% случаев [404]. В другой работе было показано, что мутации в гене *p53* в тканях первичной опухоли детектируются у 36% онкологических больных, в то время как в плазме – лишь у 24% больных РМЖ [405].

Несмотря на растущее число новых потенциальных молекулярно-генетических маркеров для диагностики злокачественных новообразований и ответа на противоопухолевую терапию, уровень их детекции в составе внДНК плазмы остаётся крайне низким. Основной проблемой выявления мутаций в составе циркулирующей в крови ДНК является многократный избыток фрагментов ДНК дикого типа, что значительно снижает чувствительность анализа мутантной ДНК и ограничивает использование их в качестве отдельных диагностических маркеров опухолей.

Одним из признаков инициации опухолевого процесса может служить микросателлитная нестабильность, которая является следствием повышенной частоты возникновения мутаций в некодирующей области ДНК, связанной главным образом с системой репарации. Человеческий геном содержит несколько тысяч микросателлитных последовательностей, большинство из которых находится в некодирующей области ДНК. Микросателлитные перестройки проявляются как аллельная нестабильность или как феномен потери гетерозиготности [406]. Потеря гетерозиготности может приводить к активации онкогенов и инактивации опухолевых генов-супрессоров, которые могут, в свою очередь, приводить к неконтролируемому росту клеток и метастазированию [407].

Аллельная нестабильность и потеря гетерозиготности выявлены в ДНК биоптатов пациентов с различными неоплазиями, в том числе РМЖ [408]. Наиболее частый аллельный дисбаланс наблюдается на хромосомах *7q*, *16q*, *17p* и *17q* [409]. Такие же микросателлитные перестройки могут быть выявлены и в составе внДНК крови. Например,

опухолевоспецифичные микросателлитные перестройки при карциноме молочной железы *in situ* детектируют в составе ДНК плазмы крови с частотой от 6% (*AR(X)*, *FgA*, *GGAA4D07*, *TH2*) до 33% (*D11S488*, *DM1*, *D17S654*) [404, 410, 411]. При использовании панели маркеров (LOH на 17-ой (*D17S855* и *D17S654*), 11-ой (*TH2*), 10-й (*D10S197*) и 9-ой (*D9S161*) хромосомах) чувствительность анализа составила от 10% для *TH2* до 21% для *D17S855* в тканях молочной железы и от 10% для *TH2*, *D10S197*, *D9S161* до 18% для *D17S654* в плазме онкологических больных [406]. Анализ двух полиморфных маркера тринуклеотид-DM-1 (LOH) и динуклеотид-D16S400 (AI) в сыворотке больных с начальной и терминальной стадиями РМЖ показал, что частота выявления данных маркеров в плазме крови составила 31,3% для *DM-1* и 11,6% для *D16S400*. Несмотря на отсутствие корреляции наличия маркёров с прогрессированием заболевания, было показано отсутствие ложноположительных результатов [412]. Таким образом, в настоящее время опубликованы противоречивые данные различных исследовательских групп [406, 408]: в то время как одна группа не находит связи между стадией опухоли и потерей гетерозиготности, идентифицируемых в ДНК плазмы больных РМЖ [408], другие демонстрируют наличие корреляции между молекулярными перестройками ДНК плазмы и клинико-патологическими характеристиками опухоли и выживаемостью пациентов [406].

Теоретически, анализ LOH в сочетании с одним или несколькими белковыми маркерами может быть полезным в создании диагностического теста, специфичного для конкретного типа рака, однако одновременный анализ LOH и маркера CA-15.3 в плазме крови пациентов с РМЖ не показал достоверной корреляции между этими величинами [413]. Таким образом, микросателлитные маркёры, по-видимому, могут быть использованы для детекции злокачественных новообразований, однако поиск оптимальных мишеней остаётся актуальной задачей.

Одним из основных процессов, приводящих к активации онкогенов, является амплификация генов. При этом в системе контролей роста, деления и дифференцировки клеток происходят серьёзные нарушения. Амплификация участков ДНК может привести к активации онкогенов за счет усиления их экспрессии и, как следствие, к нерегулируемому клеточному росту. Иногда толчком к злокачественному перерождению является повышение уровня экспрессии протоонкогена.

*HER-2* кодирует рецептор человеческого EGF. Он является уникальным представителем семейства трансмембранных тирозинкиназ, поскольку, не имея собственного лиганда и не взаимодействуя ни с одним из известных факторов роста, активирующих родственные рецепторы, он является ключевым звеном передачи митотических сигналов всех EGF-подобных пептидов и необходим для усиленного функционирования всей системы клетки. Повышенная экспрессия и амплификация *HER-2* выявляется при разных видах рака.

Анализ амплификации *HER-2* (последовательностей локуса *17q21.1*) в плазме крови больных с метастатическим РМЖ позволил выявить 50% больных (14 из 28) [414], при этом данная амплификация не обнаружена в плазме крови у контрольной группы и у пациенток с начальной стадией заболевания.

Суммируя результаты многочисленных исследований, стоит отметить, что генетические изменения, выявленные на сегодняшний момент, не являются специфичными, и данные, представленные в этой области, весьма разнообразны и противоречивы. Однако развитие современных методов анализа, таких как метод гибридизации ДНК на олигонуклеотидных чипах, полногеномное секвенирование, позволяющих расширить и интенсифицировать сравнительный анализ генетических изменений в норме и при патологии, вселяет большие надежды на то, что в обозримом будущем тканеспецифичные ДНК-маркёры будут выявлены и найдут широкое применение в диагностике злокачественных новообразований молочной железы.

Метилирование промоторных областей генов опухолевой супрессии и протоонкогенов является одним из основных механизмов их регуляции, которая происходит на самых ранних этапах онкотрансформации [380]. Таким образом, анализ профиля метилирования циркулирующих в ДНК крови представляется весьма перспективным для ранней диагностики рака, поскольку позволяет выявлять первичные изменения в генетическом аппарате клеток, которые впоследствии и приводят к развитию опухоли. Немаловажным является тот факт, что количественный специфичный к метилированию ПЦР позволяет выявлять 0,1% метилированной ДНК в общей массе неметилированной ДНК [147].

При исследовании опухолевой ДНК биоптатов было показано, что экспрессия многих генов нарушается вследствие гиперметилирования их промоторной области при РМЖ. Позднее гиперметилирование промоторных областей различных генов было так же обнаружено в сыворотке/плазме больных РМЖ, а при сравнении уровня метилирования ДНК, полученной из клеток тканей опухоли и образцов крови того же пациента установлена достоверная корреляция [415]. На сегодняшний день отсутствуют эпигенетические маркеры, обладающие 100% чувствительностью и специфичностью к определённому типу рака. Для улучшения аналитических характеристик разрабатываемых диагностических тестов, многие авторы рассматривают панель генов, метилирование которых чаще всего приводит к развитию определённой неоплазии [416].

Анализ статуса метилирования комбинации генов супрессоров опухолевого роста *RARβ2*, *RASSF1A*, *APC* и *GSTP1* в тканях больных РМЖ, а также в сыворотке крови здоровых женщин и онкологических больных показал, что метилированные формы промоторных

областей генов в образцах опухолевой ткани присутствовали с частотой 23%, 44%, 42% и 14%, соответственно, причём в 57% образцах опухолевой ткани хотя бы у одного из генов промоторная область была метилирована. Частота метилирования промоторной области опухолевых супрессорных генов в плазме крови больных РМЖ была ниже, чем в ткани (82% - для *GSTP1*, 47% - для *RARβ2*, по 34% - для *APC* и *RASSF1A*) В плазме крови метилированная форма как минимум одного из генов детектируется в 62% у больных РМЖ и у 13% ЗЖ [388].

Аналогичные результаты получены на другой панели маркеров: промоторные области генов *Cyclin D2*, *RARβ2*, *Twist* и *HIN-1* метилированы в тканях первичной опухоли молочной железы с частотой 53%, 56%, 41% и 77%, соответственно; в составе вДНК плазмы крови - в 6%, 16%, 36% и 54%, соответственно. Метилирование хотя бы одного из перечисленных генов в ДНК плазмы крови онкологических больных выявлено в 67% образцов, при этом не обнаружено корреляции между клинико-патологическими характеристиками опухоли; специфичность анализа при дискриминации ЗЖ и больных РМЖ составила 87% [389].

Тем не менее, несмотря на успешное выявление опухолевой ДНК в плазме крови больных РМЖ, авторы не находят корреляции наличия метилированной вДНК с размером опухоли и наличием метастазов [147].

Онкоспецифические последовательности нуклеиновых кислот могут быть обнаружены в пуле циркулирующих нуклеиновых кислот более эффективно, если в качестве источника нуклеиновых кислот наряду с вДНК плазмы крови использовать вДНК, ассоциированные с поверхностью ФЭК. В частности, индекс метилирования промоторных областей генов *RASSF1A* и *RARβ2*, определенный как отношение концентрации метилированных копий гена к сумме концентраций метилированных и неметилированных копий в крови, позволяет дискриминировать больных раком легкого от здоровых лиц с чувствительностью 90% и специфичностью 82% [417]. Полученные данные демонстрируют, что при определении маркеров в суммарных вДНК (вДНК плазмы крови и ассоциированной с ФЭК ДНК) чувствительность выявления метилированных форм промоторных областей генов сопоставима с чувствительностью детекции этих маркеров в образцах опухолевой ткани.

### **1.3.3.2. Опухоль-ассоциированные микроРНК в составе экзосом плазмы крови больных РМЖ**

Помимо вДНК, диагностическая значимость была подтверждена и для микроРНК в плазме/сыворотке крови онкологических больных. В частности, на репрезентативной группе (170 больных РМЖ и 100 ЗЖ) было обнаружено достоверное повышение концентрации miR-16, miR-21, miR-451 в плазме крови больных РМЖ [418]. Поскольку основная часть микроРНК крови содержится в экзосомах или комплексах с ЛПВП, использование

предварительной пробоподготовки образцов крови путем выделения и концентрирования экзосом или липопротеиновых комплексов позволяет повысить чувствительность и специфичность детекции тканеспецифичных микроРНК.

Учитывая, что примерно у 20-25% женщин с локализованным РМЖ первой линией терапии является неoadъювантная терапия, скрининг эффективных биомаркеров в составе «жидкостной биопсии» для диагностики и прогнозирования ответа на лечение является крайне важным. Сравнительный анализ ЦОК и экзосомальных микроРНК, выделенных из образцов крови до и после проведения неoadъювантной терапии, показал, что повышенный уровень экзосомальных miRNA-21, miRNA-222 и miRNA-155 достоверно коррелировал с присутствием ЦОК, что указывает на то, что как экзосомальные микроРНК, так и ЦОК могут быть дополнительными инструментами для улучшения диагностики и прогноза пациентов, получающих неoadъювантную терапию [419].

Многообещающим биомаркером для диагностики и прогнозирования РМЖ может быть уровень в крови экзосомальной miR-148a. В частности, уровень этого маркера был значительно снижен у больных РМЖ и коррелировал с неблагоприятным прогнозом заболевания [420]. Уровень экзосомальной miR-223-3p также может быть полезен в качестве дополнения к традиционным методам диагностики РМЖ: уровень miR-223-3p в составе экзосом плазмы достоверно повышается у больных с протоковой карциномой молочной железы уже на I стадии заболевания [421].

Комбинации определенных микроРНК экзосом в сочетании с другими клиническими биомаркерами позволяют повысить аналитические характеристики диагностических систем «жидкостной биопсии». Например, панель из четырех микроРНК экзосом (miR-424, miR-423, miR-660 и let7-i) позволяет дифференцировать здоровых доноров от больных РМЖ с 98,6% чувствительностью и 100% специфичностью [422]. NGS-секвенирование микроРНК экзосом сыворотки крови ЗЖ и больных РМЖ с последующей верификацией полученных данных методом ПЦР в режиме «реального времени» позволили выявить высокоэффективную панель маркеров для дифференциальной диагностики новообразований молочной железы: комбинация miR-142-5p и miR-320a позволяют отличать люминальный А подтип от трижды-негативного подтипа с чувствительностью 100% и специфичностью 93,8% [423].

На начало 2023 г согласно БД ExoCarta в составе экзосом идентифицировано более 2838 микроРНК. Какое количество этих микроРНК участвует в механизмах канцерогенеза, предстоит еще выяснить. Однако становится ясно, что профиль экспрессии тканеспецифичных микроРНК может быть использован для разработки ранней диагностики злокачественных заболеваний, в том числе и РМЖ.

В 2016 г на рынок США от компании Exosome Diagnostics поступил первый тест ExoDX, позволяющий оценить необходимость традиционной биопсии и последующей терапии рака предстательной железы, используя мРНК ERG, PCA3 и SPDEF в составе экзосом мочи [424]. На данный момент он отмечен FDA статусом прорывного устройства (Breakthrough Device Designation), но ещё не одобрен для рутинного массового использования в клинике.

### **1.3.3.3. Протеомные маркеры рака молочной железы в составе экзосом плазмы крови**

Поскольку состав экзосом отражает белковый состав родительской клетки, анализ протеома циркулирующих в биологических жидкостях экзосом является перспективным направлением поиска опухолеспецифичных маркёров злокачественных новообразований. Показано, что белки экзосом составляют менее 0,01 % общего протеома плазмы [425]. Тем не менее, выделение экзосом позволяет значительно снизить/убрать балластные белки плазмы крови, что повышает содержание опухолеспецифических белков, а значит и чувствительность диагностики заболеваний [425]. Кроме того, благодаря защите двуслойной мембраной содержимого (тканеспецифичные белки и РНК) экзосом от воздействия протеаз и нуклеаз, препараты ВВ пригодны для длительного хранения в лабораторных условиях. В тоже время, серьёзную проблему представляет высокая индивидуальная вариабельность протеома экзосом даже в группе здоровых доноров. При сравнении протеомных профилей экзосом плазмы крови пятнадцати клинически здоровых доноров лишь 9 из 109 выявленных экзосомальных белков присутствовали во всех образцах: Complement C4 B, Alpha 2 macroglobulin, Pregnancy zone protein, Actin cytoplasmic 1, Galectin 3 binding protein, Hemoglobin subunit alpha, Haptoglobin, Serotransferrin, CD5 antigen like [426].

Информация о белковом составе экзосом постоянно пополняется. На начало 2023 г БД Exocarta содержит информацию о 9 769 экзосомальных белках, однако большинство работ по поиску опухолевых протеомных маркеров в составе экзосом выполнены на клеточных культурах. Например, среди идентифицированных экзосомальных белков клеток карциномы молочной железы линии MDA-MB-231 выявлены 14-3-3-ε и PDC6I — регуляторы пролиферации, клеточного цикла и запрограммированной смерти. Предположительно экзосомы переносят эти белки в нетрансформированные клетки-реципиенты, что приводит к их последующей малигнизации [427].

Более того, белковый состав экзосом позволяет дифференцировать опухоли по их склонности к метастазированию и степени злокачественности. При исследовании протеомов экзосом, секретлируемых различными по метастатическому потенциалу клеточными линиями РМЖ, выделено 1950, 1399, 1496 и 1706 белков для неметастатической 67NR, слабо

метастатической б6с14 и высокометастатических 4Т1 и 4Т1.2 линий, соответственно [428]. Показано, что экзосомы высокометастатических клеточных линий 4Т1 и 4Т1.2 по сравнению с неметастатическими экзосомами 67NR были более обогащены опухоле-ассоциированными белками. В частности, наблюдалось повышенное содержание факторов роста (FGFR обогащение выше в 14.7 раз, FGFR2 – в 14.7 раз, TGFBR1 – в 4.7 раз, IGF1R – в 2.2 раза и др.), белков ангиогенеза (Metadherin – в 8.4 раза, Ddah1 – в 9.2 раза) и инвазии (Plau – в 9.2 раза). Таким образом, экзосомы высокометастатических клеточных линий 4Т1 и 4Т1.2 обогащены белками, участвующими в миграции и инвазии, а также мембранными белками, а экзосомы неметастатической клеточной линии 67NR обогащены белками, опосредующими клеточную полярность и адгезию.

В 2020 г в результате масштабного межлабораторного исследования были выделены как новые специфические маркерные белки экзосом – ACTB, MSN, RAP1B, так и отдельные панели опухолеспецифичных белков экзосом, характерных для экзосом, выделяемых из тканей и из плазмы больных РМЖ, колоректальным раком, меланомой, мезотелиомой, раком лёгкого и панкреатического рака. На основе данных 426 образцов из тканей, плазмы и других биологических жидкостей, а также анализа полученных данных с помощью машинного обучения авторы заявляют о чувствительности и специфичности данных панелей как 90% и 94%, соответственно [429].

Результаты вышеописанных и других перспективных протеомных исследований экзосом позволяют выделить ряд претендентов на роль белковых онкомаркеров в составе экзосом (Таблица 2).

Бурно развивающиеся протеомные исследования экзосом позволят увеличить набор таких маркёров и выявить их комбинации, наиболее ценные с диагностической точки зрения. Однако для широкого применения в медицине необходимы обширные исследования, которые действительно подтвердят диагностическую ценность новых протеомных экзосомальных маркёров.

### 1.3.4. Заключение

Несмотря на эффективность инструментальных методов диагностики РМЖ, существует ряд ограничений для выявления этими методами заболевания на I стадии и рака *in situ*, дискриминацию доброкачественных и злокачественных новообразований, скрининговые исследования здоровых женщин и онкологических больных после курсов терапии. Анализ большинства вышеописанных генетических и эпигенетических нарушений опухолевой ДНК в ткани также не позволяет с достаточной чувствительностью и специфичностью выявлять непластический процесс.

Таблица 2 – Потенциальные протеомные маркеры злокачественных новообразований в составе экзосом крови больных РМЖ

Кандидатные биомаркеры	UniprotID	Gene name	Ref
Fibrinogen beta chain	P02675	FGB	[429]
Fibrinogen alpha chain	P02671	FGA	
Fibrinogen gamma chain	P02679	FGG	
Complement factor H	P08603	CFH	
Plasminogen	P00747	PLG	
Immunoglobulin heavy variable 3-53	P01767	IGHV3-53	
Serum amyloid P-component	P02743	APCS	
Complement factor H-related protein 1	Q03591	CFHR1	
Immunoglobulin heavy variable 3-48	P01763	IGHV3-48	
Complement factor H-related protein 2	P36980	CFHR2	
Immunoglobulin heavy variable 4-59	P01825	IGHV4-59	
Immunoglobulin heavy variable 3-11	P01762	IGHV3-11	
Complement factor H-related protein 3	Q02985	CFHR3	
Immunoglobulin heavy constant gamma 3	P01860	IGHG3	[430]
Carcinoembryonic antigen-related cell adhesion molecule 5	P06731	CEACAM5	
Mucin-1	P15941	MUC1	

На сегодняшний день в области молекулярной онкологии накоплены убедительные данные о перспективности анализа опухолевых белков в составе экзосом плазмы крови, а также анализа уровня циркулирующих в крови экзосомальных микроРНК и статуса метилирования промоторных областей генов опухолевой супрессии в составе вДНК для ранней диагностики РМЖ методом «жидкостной биопсии». В тоже время до сих пор не ясны биологические функции и диагностическая значимость белков, участвующих в формировании циркулирующих в крови дезоксирибонуклеопротеиновых комплексов и белков в составе экзосом, ассоциированных с поверхностью ФЭК. Вполне вероятно, что выявление таких протеомных маркеров в крови пациентов в комбинации с инструментальными методами диагностики позволит эффективно выявлять РМЖ на ранних стадиях заболевания.



## ГЛАВА 2.

### Материалы и методы исследования

#### (Экспериментальная часть)

#### 2.1. Материалы

##### 2.1.1. Реактивы, коммерческие наборы и препараты

В работе были использованы следующие реактивы:  $\text{NaN}_3$ , SDS, ТЕМЕД, BSA, DTT, ПСА, ТЕА, PBS (10 мМ фосфатный буфер, 0,15 М NaCl, pH 7,5), EDTA,  $\text{CaCl}_2$ ,  $\text{MgCl}_2$ , NaCl, KCl,  $\text{NaIO}_4$ ,  $\text{NaMoO}_4$ , NaF, MES, йодацетамид, HEPES, PMSF, 2-меркаптоэтанол, ингибитор трипсина T9003, апротинин, трис, акриламид, N-N'-метилен-бис-акриламид, полный и неполный адъювант Фрейнда, бикарбонат аммония, трипаневый синий, легкоплавкая агароза, мочевиная, культуральные среды IM и DMEM/F12, мелкодисперсное стекло S-5631, борная кислота, бромистый этидий, натрия ацетат тригидрат, бычий фибронектин, Кумасси R-250, сефадекс G-25 «Superfine», гуанидин тиоцианат, 3-[(3-холамидопропил)диметиламмоний]-1-пропаносульфат, EGF, набор маркеров для 2D-электрофореза (17 кДа – 89 кДа, pI-спектр 7.6–3.8), DAPI (Sigma, США); глицерин,  $\text{LiClO}_4$ , Nonidet P-40, авидин (Fluka, Швейцария);  $\text{NaNH}_4$  (Serva, Германия); Tween-20 (Merck, Германия); флуоресцеин, пепстатин А, лейпептин, глицерин, эмбриональная телячья сыворотка (ICN, США); Lymphocyte Separation Medium, глицин, агароза для электрофореза (MP Biomedicals, Франция); 4% латексные частицы, SYBR Green I (Invitrogen, США); сефароза CL-4B, бромфеноловый синий (Pharmacia, Швеция); тритон X-100 (ЛКВ, Швеция); гликоген R0561 (ThermoScientific, США); кислота борная (Panreac, Испания); глутаровый альдегид, уранилацетат, культуральная среда EBM-2 (Lonza, США), холерный токсин, инсулин, антибиотики пенициллин и стрептомицин, гентамицин («ПанЭко», Россия); 4-хлоро-1-нафтол, BrCN (БИОСАН, Россия); Матригель (Growth factor reduced Matrigel) (BD BioSciences, США); ЧСА, ксиленианол, бромистый этидий («Reanal», Венгрия); белковые маркеры PageRuler SM-0661 (10–200 kDa) и SM-0671 (10–170 kDa) (Fermentas, Литва); маркеры длины дц-ДНК 100 п.н. до 1000 п.н. (M16), от 8 п.н. до 955 п.н. (pUC19/Kz09I), от 925 п.н. до 19329 п.н. (M05) (СибЭнзим, Россия).

Неуказанные реактивы являются препаратами отечественного производства с квалификацией ОСЧ или ХЧ.

В работе были использованы следующие ферменты: эндонуклеазы рестрикции Sau3A и Bsh1236I, ДНКза I (без РНКазной активности), РНКза А (без ДНКазной активности), лигаза, полинуклеотид киназа фага T4, Taq-полимераза (Fermentas, Литва); CpG-метилаза

M.Sss I (New England BioLabs, Великобритания); коллагеназа (Gibco, США); трипсин T4799 и T6567 (Sigma, США).

В работе были использованы следующие антитела: иммуноглобулин G, изотипические антитела, моноклональные мышинные антитела против человеческого E-кадгерина, флуоресцентно меченные моноклональные мышинные антитела против человеческих CD9, CD24, CD63, CD81 (BD Bioscience, США); моноклональные мышинные антитела против человеческого тетраспанина CD9, против человеческого гистона H1, поликлональные антитела кролика против человеческих гистонов H2A, H2B и H3, против человеческой шеддазы ADAM-10, антитела против человеческих 20S- $\alpha$  и  $\beta$ -протеасом (Abcam, Англия); конъюгат IgA с пероксидазой хрена (Santa Cruz Biotechnology, США); моноклональные мышинные антитела против человеческого  $\beta$ -катенина, меченные Alexa 488 анти-мышинные козы IgG (Sigma-Aldrich, США); меченные Alexa Fluor 594 анти-мышинные козы IgG (Jackson Immuno Research, США). Кроличьи анти-мышинные антитела и козы антикроличьи антитела были ранее получены и охарактеризованы в Лаборатории молекулярной медицины ИХБФМ СО РАН.

В работе были использованы следующие наборы: набор для определения концентрации белка «NanoOrange Protein Quantification kit» (Molecular Probes, США); раствор для блоттинга iBind (Invitrogen, США); раствор детекции Amersham ECL (Amersham, США); набор для выделения ДНК «BPD-100» (БиоСилика, Россия); набор для оценки уровня активности лактатдегидрогеназы «LDH kit» (ВекторБест, Россия); набор для бисульфитной конверсии метилированной ДНК (Zymo Research, США); наборы для оценки длины ДНК «Agilent High Sensitivity DNA Kit» (Agilent Technologies Inc., США).

$\gamma$ -[ $^{32}$ P]-АТФ с удельной активностью  $\sim 5 \cdot 10^3$  Кю/ммоль (лаборатория радиохимии ИХБФМ СО РАН).

В работе были использованы следующие материалы: ДЭФЭ-целлюлоза, PVDF-мембрана, фильтрующие системы «Centricon 3 kDa», микроколонки C18 ZipTips (Immobilon, Millipore, США); фильтры с диаметром пор 100 нм (Minisart high flow, Sartorius); стрипы с иммобилизованным градиентом pH 4-7 (IPG-стрипы, 7 см) (Bio-Rad Laboratories, США); нитроцеллюлозная мембрана D-3354 («Schleicher & Schuell», Германия); индикаторные полоски для определения pH («Lachema», Чехия).

### 2.1.2. Оборудование

В работе использовали амплификаторы Mastercycler gradient (Eppendorf, Германия) и ICycler iQ5 (Bio-Rad, США); планшетный и кюветный спектрофотометры Multiskan FC

Genesys 10UV (Thermoscientific, США); планшетный Fluoroskan Ascent (Thermoscientific, США) и кюветный VersaFluor (Bio-Rad, США) флуориметры; pH-метр (Heidolph, Германия); iBind Western Device (Thermo Fisher Scientific, США); счетчик радиоактивности Canberra Packard (США); центрифуги Eppendorf 5810R, Eppendorf mini-spin (Eppendorf, Германия) и Biofige pico Heraeus (Thermoscientific, США), ультрацентрифуга OptimaXP (Beckman Coulter, США) с роторами SW-40 и SW-60 (Beckman, Германия); анализатор частиц NanoSight LM10 (Malvern Instruments Ltd, Великобритания); просвечивающий электронный микроскоп JEM 1400 (Jeol, Japan); ультратом Leica EM UC7 (Leica, Германия); цифровая камера Veleta (Olympus Corporation, Япония); спектрофотометр Nanodrop ND-1000 (Thermo Scientific, США); проточный цитофлуориметр BD FACS Canto II (BECTON DICKINSON, США); система гель-документации VersaDoc и калибровочный денситометр GS-800 (Bio-Rad Laboratories, США); прибор для 2D-электрофореза Protean IEF Cell (Bio-Rad Laboratories, США); электрофоретическая камера Mini-Protean 3 Cell (Bio-Rad Laboratories, США); роботизированная протеомная станция «Xcise» (Shimadzu Biotech, Япония); масс-спектрометр MALDI-TOF autoflex speed series LIFT (Bruker Daltonics, ФРГ); Bioanalyzer 2100 (Agilent, США); низкотемпературный (-80°C) морозильник Sanyo (Sanyo, Япония); криохранилище Arpege 110 (Arpege, Германия); шейкер для пробирок Eppendorf MIXER 5432 (Eppendorf, Германия) и для планшетов Heidolph titramax 1000 (Heidolph, Германия); трансиллюминатор MacroVue 2011 (LKB, США).

Для работы с клетками использовали ламинарный бокс (BDSL, США) и CO<sub>2</sub>-инкубатор (Sanyo, Япония). Для экспериментов по миграции использовали 8-луночные планшеты (Nunc™ Lab-Tek™, ThermoScientific, Великобритания), по межклеточным контактам - 24-луночные культуральные чашки (Corning, США). Для наблюдения за клетками использовали микроскопы Carl Zeiss MicroImaging и LSM 5 PASCAL (Jena, Германия), микроскоп Nikon Eclipse-Ti, оснащенный камерой ORCA-ER Hamamatsu, управляемой программным обеспечением NIS-Elements AR2.30 (Nikon, Япония), микроскоп Zeiss AxioPlan, оснащенный объективом Plan Neofluar × 63. Изображения были получены с помощью цифровой камеры Olympus DP70 с программным обеспечением DP Controller (Olympus, Япония); криоэлектронный микроскоп Titan Krios 60-300 ТЕМ/STEM (FEI, США) с высокочувствительным DED (Direct electron detector) детектором электронов Falcon II (FEI, США) и корректором сферических aberrаций (CEOS, Германия); установка для получения гидрофильной поверхности Pelco easi Glow (FEI, США); установка для мгновенной заморозки образцов в жидком этане Vitrobot Mark IV (FEI, США).

Кровь собирали в вакуумные пробирки Vacuette 455036 (Greinerbio-one, Австрия).

Для приготовления всех буферных растворов и реакционных проб использовали воду, очищенную на установке MilliQ (Millipore, США). Все растворы среды фильтровали через фильтры с диаметром пор 0,22 и 0,45 мкм (TPP, Швейцария).

Для обработки полученных результатов использовали следующее специальное ПО: Microsoft Excel 2010; Adobe Photoshop CS3; ImageJ; GraphPad PRISM 5; Statistica 6.0; PDQuest (version 8.0, Bio-Rad Laboratories, США); NTA analytical software version 2.3 (NanoSight Ltd., Великобритания); iTEM (Olympus, SIS, Германия); CytExpert 2.0 Software (Beckman Coulter, USA); ChemiDoc Touch с использованием ImageLab, MetaMorph 5.0 software (Universal Imaging), FunRich (version 3.1.3 software package) [431]; flexAnalysis, flexControl, BioTools (Brucker Daltonics, Германия); Mascot Daemon (Matrix Science Ltd., London, [www.matrixscience.com/search\\_form\\_select.html](http://www.matrixscience.com/search_form_select.html)); Cytoscape v 3.7.1 [432], binGO (<https://cytoscape.org/>) [433]; а также следующие базы и библиотеки данных: Uniprot (<https://www.uniprot.org/>); NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein/>); SwissProt (<https://www.uniprot.org/>); Vesiclepedia ([www.microvesicles.org](http://www.microvesicles.org/)); ExoCarta (<http://www.exocarta.org/>); dbDEPC 3.0 [434]; PROSITE (<https://prosite.expasy.org/>); Interpro (<https://www.ebi.ac.uk/interpro/>); Pfam (<http://pfam.xfam.org/>); Conserved Domain Database (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/cdd/>); SMART (<http://smart.embl-heidelberg.de/>); Reactome ([www.reactome.org](http://www.reactome.org/)); NCI-Nature Pathway Interaction Database ([www.ndexbio.org](http://www.ndexbio.org/)); Human Protein Atlas (<http://www.proteinatlas.org/>) [435]; GTEX (<https://gtexportal.org/home/>); FANTOM5 (<https://fantom.gsc.riken.jp/5/>). Фрагменты нуклеиновых кислот анализировали при помощи программного обеспечения Agilent's 2100. Для анализа данных использовали интернет-ресурсы: QuickGO (<https://www.ebi.ac.uk/QuickGO/>) [436] и STRING (<https://string-db.org/>) [437].

### 2.1.3. Олигонуклеотиды

Олигодезоксирибонуклеотиды были синтезированы в лаборатории биомедицинской химии ИХБФМ СО РАН и выделены с помощью обращено-фазовой ВЭЖХ.

### 2.1.4. Клеточные культуры и лабораторные животные

Клетки HUVES, полученные из пуповины человека (n = 3), получены из биобанка Института регенеративной медицины МГУ им. М.В. Ломоносова, идентификатор коллекции: MSU\_HUVES (<https://human.depo.msu.ru>). Клетки культивировали на покрытом желатином пластике в среде для роста эндотелия (EGM-2, Lonza) и использовали для экспериментов

после 2-3 пассажей. В эксперименте клетки HUVES культивировали в EGM-2 с 10%-ой FBS, 100 ед/мл пенициллина, 100 ед/мл стрептомицина в атмосфере 5% CO<sub>2</sub> при 37°C. Клетки пересаживали через 2-3 дня, используя для диссоциации клеток 0.25% раствор трипсина. После нейтрализации трипсина, клетки ресуспендировали в среде EGM-2 и рассаживали на чашки Петри или 24-луночные планшеты из расчета 10<sup>4</sup> клеток/см<sup>2</sup>. После 5 пассажей размораживали новые клетки из заранее замороженных стоковых.

Псевдо-нормальные эпителиальные клетки MCF10A (ATCC® CRL-10317™) культивировали в среде DMEM/F12 с добавлением 5% лошадиной сыворотки, 10 мкл/мл GlutaMAX-I, 20 нг/мл EGF, 0,5 мкг/мл гидрокортизона, 100 нг/мл холерного токсина, 10 мкг/мл инсулина, 32,5 мкг/мл NaHCO<sub>3</sub>, 100 ед/мл пенициллина и 100 мкг/мл стрептомицина.

Клетки линии карциномы молочной железы SKBR-3 (ATCC® HTB-30™) культивировали в DMEM с 10%-ой FBS, 100 ед/мл пенициллина, 100 ед/мл стрептомицина в атмосфере 5% CO<sub>2</sub> при 37°C, и регулярно пассировали для поддержания экспоненциального роста.

Монослойные культуры клеток использовали в плотности не более 80% от монослоя. Жизнеспособность клеток определяли окрашиванием клеток трипановым синим. Подсчет клеток проводили в камере Горяева.

Для получения поликлональных антител были использованы кролики породы Шиншилла.

### **2.1.5. Образцы крови условно здоровых женщин и больных РМЖ**

Образцы крови условно здоровых женщин (n = 190, 28-80 лет) были получены из Медицинского научно-образовательного центра Института медицины и психологии им. В. Зельмана Новосибирского государственного университета (МНОЦ ИМПЗ НГУ, г. Новосибирск) и Центра новых медицинских технологий (г. Новосибирск). Группа доноров была сформирована на основе анкетирования, а также клинического обследования. Всем женщинам было проведено ультразвуковое обследование молочных желез и органов малого таза, маммография и низкодозная компьютерная томография легких, а также проведен общий и биохимический анализ крови. Из исследования были исключены женщины с нарушениями функционирования репродуктивной системы организма, наличием эндокринно-метаболических факторов, наличием генетических и экзогенных факторов, которые могут повлиять на интерпретацию полученных результатов:

- нарушение функционирования репродуктивной системы организма (всего 9 пунктов, например, наличие гиперпластических и воспалительных заболеваний яичников, матки, молочных желез (мастопатия, эндометриоз и т.д.);

- наличие эндокринно-метаболических факторов, обусловленных сопутствующими и предшествующими заболеваниями (всего 10 пунктов, например, дефицит прогестерона в крови);

- наличие генетических факторов (всего 7 пунктов, например, РМЖ у кровных родственников (бабушка, мать, родная сестра));

- наличие экзогенных факторов (всего 7 пунктов, например, ионизирующее излучение, курение).

Образцы крови первичных больных РМЖ ( $T_{1-2}N_{0-1}M_0$ ) были получены из Новосибирского областного клинического онкологического диспансера. Всего в исследование было включено 194 пациентки (возраст 27-74 года) с первично операбельным РМЖ ( $T_{1-2}N_{0-1}M_0$ ), при этом люминальный РМЖ был диагностирован у 101 больной (78%), ТН-РМЖ – у 29 (22%).

Критерии исключения онкологических больных из исследования:

- пациенты с наличием гематогенных метастазов на момент операции ( $M_1$ ),

- пациенты, получавшие неoadъювантную терапию.

Клинико-морфологическая характеристика всех вовлеченных в исследование больных РМЖ представлена в таблице 3, в таблицах соответствующих подразделов Главы 3 приведена характеристика онкологических больных, вовлеченных в определенные эксперименты.

Распространенность заболевания определяли согласно международной классификации по системе TNM (7 издание, 2010 год) (оценка размера первичного опухолевого очага, распространенность опухолевого процесса на регионарные лимфоузлы и наличие отдаленных метастазов).

Работу 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 Vacuette 455036, содержащие  $K_3$ ЭДТА, перемешивали на ротационной мешалке 10 об/мин в течение 5 мин. и хранили при 4°C. Обработывали полученные образцы крови в течение ближайшего часа.

## 2.2. Методы

### 2.2.1. Исследование дезоксирибонуклеиновой составляющей циркулирующих в крови НПК

#### 2.2.1.1. Выделение вДНК из плазмы и из элюатов с поверхности ФЭК

Для получения плазмы образцы крови разделяли на плазму и клеточную фракцию центрифугированием при 4°C в течение 15 мин при 1200 об/мин на центрифуге Eppendorf 5810R. Плазму крови отбирали в новую пробирку и повторно центрифугировали в течение 20 мин при 2400 об/мин на центрифуге Eppendorf 5810R при 4°C. Полученный супернатант хранили при -20°C и использовали для выделения вДНК.

Таблица 3 – Клинико-морфологическая характеристика группы больных РМЖ, вовлеченных в исследование\*

Клинико-морфологическая характеристика		РМЖ, n = абсолютное количество больных, (относительное, %)		
		Люминальный n = 165 (85%)	ТН n = 29 (15%)	Общая группа рака, n = 194 (100%)
Размер первичной опухоли	T1	78 (47%)	7 (24%)	85 (44%)
	T2	87 (53%)	22 (76%)	109 (56%)
Распространенность на регионарные лимфоузлы	N0	114 (69%)	20 (69%)	134 (69%)
	N1	51 (31%)	9 (31%)	60 (31%)
Удаленные метастазы	M0	165 (100%)	29 (100%)	194 (100%)
Степень злокачественности	II	160 (97%)	25 (86%)	185 (95%)
	III	3 (2%)	4 (14%)	7 (4%)
	неизвестно	2 (1%)	0 (0%)	2 (1%)
Гистологический подтип		Инвазивная протоковая карцинома		194 (100%)

\*TNM – международная классификация стадий рака 1997 г.: Т – первичная опухоль; N – регионарные лимфатические узлы; M – отдаленные метастазы.

Для получения элюатов с клеточной поверхности, ФЭК инкубировали в течение 5 мин при комнатной температуре с 9-ю объемами буфера PBS с 5 мМ EDTA при перемешивании на ротационной мешалке при 10 об/мин в течение 5 мин. Клетки осаждали центрифугированием в течение 15 мин при 1200 об/мин на центрифуге Eppendorf 5810R при 4°C. Супернатант отбирали в новую пробирку и повторно центрифугировали в течение

20 мин при 2400 об/мин. Полученный PBS-EDTA элюат с поверхности ФЭК хранили при -20°C и использовали для выделения вДНК.

Затем к осадку клеток добавляли равный объемом 0,25% раствора трипсина в PBS с 5 мМ EDTA буфере и инкубировали в течение 5 мин при перемешивании на ротационной мешалке при 10 об/мин. Трипсин инактивировали добавлением ингибитора трипсина (из расчёта 143 мкг ингибитора/мг фермента). Клетки осаждали центрифугированием в течение 15 мин при 1200 об/мин на центрифуге Eppendorf 5810R при 4°C. Супернатант отбирали в новую пробирку и повторно центрифугировали в течение 20 мин при 2400 об/мин на центрифуге Eppendorf 5810R при 4°C. Полученный трипсиновый элюат хранили при -20°C и использовали для выделения вДНК.

вДНК из образцов из плазмы и из элюатов с поверхности ФЭК выделяли с помощью коммерческого набора для выделения ДНК «BPD-100» в соответствии с рекомендациями производителя. Супернатант, содержащий ДНК, собирали и хранили при -20°C.

Для концентрирования препарата ДНК к ДНК-содержащему раствору добавляли 1/10 объема 50 мМ ТЕА, 5 мкл гликогена и 5 объемов ацетона и инкубировали в течение 24 ч при -20°C. ДНК осаждали центрифугированием при 13000 об/мин в течение 20 мин при 4°C на центрифуге Eppendorf 5810R, ротор F45-30-11. Супернатант удаляли, осадок ДНК высушивали при комнатной температуре и затем растворяли в MilliQ. Растворы ДНК хранили при -20°C.

### **2.2.1.2. Выделение и характеристика геномной ДНК**

Геномную ДНК из ядер лейкоцитов крови условно ЗЖ выделяли с помощью сорбции на мелкодисперсное активированное стекло [439]. Для этого клетки лизировали буфером, содержащим 0,6 % NP-40, 50 мМ трис-НСl, 0,15 М NaCl, 5 мМ NaF, 1 мМ PMSF, 2 мМ EDTA, 1 мМ Na<sub>3</sub>MoO<sub>4</sub> при 4°C в течение 10 мин (60 мкл лизис-буфера/млн клеток). Ядра клеток осаждали центрифугированием при 13000 об/мин течение 15 мин на центрифуге Heraeus Biofuge Pico. Супернатант, представляющий собой мембранно-цитозольную фракцию, удаляли, ядерную фракцию ресуспендировали в MilliQ. Затем к ядерной фракции добавляли 2 объёма буфера для сорбции (6,75 М гуанидин тиоционат, 15 мМ EDTA, 15 мМ трис-ацетат, рН 6,5) и мелкодисперсное активированное стекло (из расчета 1 мг стекла/мкг ДНК) [432]. После инкубации на шейкере Eppendorf MIXER 5432 в течение 10 мин, образцы центрифугировали при 13000 об/мин в течение 30 сек на центрифуге Biofuge pico Heraeus. Супернатант удаляли, осадок стекла дважды промывали отмывом-1, содержащим 4,5 М гуанидин тиоционат, 10 мМ EDTA, 10 мМ трис-ацетат, рН 6,5, а затем дважды промывали отмывом-2, содержащим 70% этанол, 100 мМ NaCl, 10 мМ трис-НСl, рН 8. Элюировали



ДНК с мелкодисперсного стекла элюирующим буфером-1 [432] на шейкере Eppendorf MIXER 5432 при комнатной температуре в течение 5 мин. После центрифугирования при 13000 об/мин в течение 2 мин на центрифуге Biofuge pico Heraeus, супернатант, содержащий ДНК, переносили в пробирку, pH раствора нейтрализовали буфером для элюции-2 [439].

Для удаления примесей РНК из полученных препаратов ДНК к супернатанту добавляли 1 мкл 10 мг/мл РНКазы А и инкубировали при 37°C в течение 1 ч. Затем к раствору ДНК добавляли 1/10 объема 3 М ацетата натрия и 3 объема 96% этанола и инкубировали в течение 24 ч при -20°C. ДНК осаждали центрифугированием при 13000 об/мин в течение 20 мин при 4°C на центрифуге Eppendorf 5810R, ротор F45-30-11. Супернатант удаляли, осадок ДНК дважды промывали 80% этанолом и повторно центрифугировали в тех же условиях, высушивали при комнатной температуре и затем растворяли в MilliQ. Растворы геномной ДНК хранили при -20°C.

Концентрацию выделенной ДНК определяли спектрофотометрически по оптической плотности на спектрофотометре GENESYS 10UV, на длине волны 260 нм. Степень чистоты полученной ДНК оценивали по соотношению оптической плотности  $A_{260}/A_{280}$ . Длину выделенной ДНК оценивали при помощи электрофореза в 1% агарозном геле, содержащем 0,001% бромистого этидия. Электрофорез проводили в 1xTBE буфере. В качестве маркера длины фрагментов ДНК использовали маркер M05. Электрофорез проводили 1,5 ч при напряжённости 4 В/см. Флуоресцирующие комплексы бромистого этидия с ДНК наблюдали при помощи трансиллюминатора Macro Vue 2011.

### **2.2.1.3. Определение концентрации вДНК**

Для проведения ПЦР в режиме «реального времени» использовались праймеры и флуоресцентные пробы, последовательности которых представлены в работе [440]. Для построения калибровочной кривой использовали геномную ДНК лейкоцитов.

Аmplификацию проводили в реакционной смеси объёмом 30 мкл, содержащей буфер для Taq-полимеразы (65 mM трис-HCl pH 8,8, 16 mM  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , 0,05% Tween-20), 0,3 mM dNTP, 8 mM  $\text{MgCl}_2$ , 1 е.а. Taq-полимеразы, по 0,6 мкМ праймеров, пробы до конечной концентрации 0,3 мкМ, раствор ДНК-матрицы не более 50 нг в реакцию. Измерение проводили в дублях. В качестве негативного контроля использовали воду. ПЦР в режиме «реального времени» проводили на амплификаторе с оптическим модулем iCycler5 (Bio-Rad, США). Данные анализировали при помощи ПО iQ5 (Bio-Rad, США).

### **2.2.1.4. Исследование строения концов вДНК**

Пулированные препараты вДНК из плазмы и суммарного элюата (PBS-EDTA элюат и трипсиновый элюат) обрабатывали полинуклеотидкиназой фага T4 в течение 1 ч при 37°C в

обменном буфере. Фосфорилированную вДНК выделяли и пересаждали как описано в п. 2.2.1.1. Затем 100 нг вДНК лигировали с 50 рМ биотинилированными двухцепочечными адаптерами, имеющими рандомные выступающие концы (таблица 4) в течение 24 ч при 16°C. После инкубации лигаза была инактивирована нагреванием (65°C, 10 мин), продукты реакции были выделены с использованием стрептавидин-сефарозных шариков в соответствии с рекомендациями производителя. ВДНК отделяли от шариков с помощью гидролиза адаптеров рестриктазой *Sau* IIIA при 37°C в течение 1 ч. После инактивации рестриктазы при 65°C в течение 10 мин, количество выделенной вДНК оценивали с помощью ПЦР в режиме «реального времени» (п. 2.2.1.3).

Таблица 4 – Олигонуклеотиды, использованные в работе

Обозначение	Последовательность (5'-3')
-3 5' вДНК	biotin-TAC CAT TTT GAT CCA AAC NNN-OH HO-GTT TGG ATC AAA ATG GTA-OH
-2 5' вДНК	biotin-TAC CAT TTT GAT CCA AAC NN-OH HO-GTT TGG ATC AAA ATG GTA-OH
-1 5' вДНК	biotin-TAC CAT TTT GAT CCA AAC N-OH HO-GTT TGG ATC AAA ATG GTA-OH
0 5' вДНК	biotin-TAC CAT TTT GAT CCA AAC TTA-OH HO-TAA GTT TGG ATC AAA ATG GTA-OH
+1 5' вДНК	biotin-TAC CAT TTT GAT CCA AAC TTA-OH HO-N TAA GTT TGG ATC AAA ATG GTA-OH
+2 5' вДНК	biotin-TAC CAT TTT GAT CCA AAC TTA-OH HO-NN TAA GTT TGG ATC AAA ATG GTA-OH
+3 5' вДНК	biotin-TAC CAT TTT GAT CCA AAC TTA-OH HO-NNN TAA GTT TGG ATC AAA ATG GTA-OH

#### 2.2.1.5. Анализ фрагментации вДНК крови условно здоровых женщин и больных РМЖ

Для подготовки к разделению вДНК на приборе Bioanalyzer 2100 использовали коммерческий набор Agilent High Sensitivity DNA Kit в соответствии с инструкцией производителя. При помощи шприца на чипы наносили под давлением 9 мкл смеси геля с красителем. В каждую лунку были добавлены образец исследуемой ДНК, внутренние маркеры и в отдельную лунку в качестве калибровки наносили ДНК-маркер, длиной от 50 п.н. до 7 т.п.н. После встряхивания на шейкере в течение 1 мин чип был помещён в Bioanalyzer 2100. Время электрофореза ДНК в геле составило 45 мин. Фрагменты

анализировали при помощи ПО Agilent's 2100 в Центре коллективного пользования «Геномика» СО РАН.

## **2.2.2. Исследование белковой составляющей циркулирующих в крови дезоксирибонуклеопротеиновых комплексов**

### **2.2.2.1. Выделение НПК сорбцией на мелкодисперсном стекле и характеристика полученных комплексов из плазмы крови**

#### 2.2.2.1.1. Оптимизация выделения нативных НПК

Радиоактивную метку  $^{32}\text{P}$  вводили в геномную ДНК лейкоцитов, полученную как описано в п. 2.2.1.2, обменом 5'-концевого фосфата с помощью T4-полинуклеотидкиназы. Для подбора оптимального связывания НПК за нуклеиновую составляющую с мелкодисперсным стеклом, на первом этапе формировали комплексы ДНК с ДНК-связывающим белком - лактоферрином, а именно: 100 мкг/мл лактоферрина инкубировали в 100 мкл среды ДМЕМ в течение 1 ч при комнатной температуре в присутствии 10, 50 либо 100 мкг/мл  $^{32}\text{P}$ -меченой ДНК. Сформированные НПК инкубировали с 3,5 мг мелкодисперсного стекла [439] в буфере, содержащем 10 мМ трис-ацетат, в отсутствие или в присутствии 2 мМ  $\text{CaCl}_2$ , 0,5% Tween-20, 1-4,5 М тиоцианата гуанидина при pH 4,5-6,5. После инкубации в течение 5 мин при комнатной температуре на качалке, мелкодисперсное стекло осаждали центрифугированием в течение 30 сек при 1000 g. Супернатант удаляли, осадок мелкодисперсного стекла промывали 5 раз буфером для сорбции. Элюировали НПК с поверхности мелкодисперсного стекла на качалке в течение 5 мин как описано [439].

#### 2.2.2.1.2. Выделение нативных НПК из плазмы крови

Плазму крови условно ЗЖ и больных РМЖ получали, как описано в п. 2.2.1.1. НПК из плазмы крови выделяли сорбцией на мелкодисперсном стекле. К 100 мкл плазмы добавляли 200 мкл буфера, содержащего 15 мМ трис-ацетат, 3 мМ  $\text{CaCl}_2$ , 0,75% Tween-20, pH 5,0 и 3,5 мг мелкодисперсного стекла [439]. После инкубации в течение 5 мин, мелкодисперсное стекло осаждали, промывали и элюировали НПК с поверхности мелкодисперсного стекла на качалке в течение 5 мин как описано выше.

#### 2.2.2.1.3. Характеристика ДНК-составляющей НПК из плазмы крови

Выделение ДНК из НПК проводили при помощи набора для выделения ДНК «BPD-100» по протоколу, рекомендованному производителем. Выделенную ДНК концентрировали переосаждением ацетоном в присутствии ТЕА и гликогена как описано в п. 2.2.1.1. ДНК растворяли в 15 мкл деионизированной воды. Концентрацию ДНК в составе НПК

определяли методом количественной ПЦР как описано в п. 2.2.1.3. Размер ДНК в составе НПК определяли с помощью системы капиллярного электрофореза как описано в п. 2.2.1.5.

#### 2.2.2.1.4. Характеризация белковой составляющей НПК из плазмы крови

Концентрацию белка НПК определяли с помощью набора «NanoOrange Protein Quantification Kit» по протоколу, рекомендованному производителем. Образец смешивали с рабочим раствором и инкубировали при 95°C в течение 10 мин, затем охлаждали до комнатной температуры в защищённом от света месте, центрифугировали 5 мин при 17000 g и измеряли флуоресценцию на приборе VersaFluor Fluorometer при длине волны возбуждения и испускания 480 и 580 нм, соответственно.

Для белкового электрофореза готовили разделяющий градиентный 10–20% SDS-ПААГ (соотношение акриламида к N,N'-метиленабисакриламиду 30:1), поверх которого наносили буфер для наслаивания (375 мМ трис-НСl, 0,1% SDS pH 8,8). После полимеризации разделяющего геля буфер удаляли, гель промывали 4,5% полиакриламидом и формировали концентрирующий 4,5% ПААГ; после полимеризации карманы дважды промывали электродным буфером (433 мМ трис-глицин, 0,1% SDS, pH 8,6). Образцы НПК инкубировали при 95°C в течение 5 мин в буфере (62,5 мМ трис-НСl, 10% глицерин, 0,5% SDS, 2,5% β-меркаптоэтанол, pH 6,8), содержащем бромфеноловый синий и затем центрифугировали 5 мин при 17000 g. Разделение биополимеров в геле осуществляли при напряжении 70 В в течение 30 мин, а затем при напряжении 200 В в течение 2,5 ч. Электрофорез прекращали после выхода бромфенолового синего из геля. По завершению электрофореза белки с геля переносили на нитроцеллюлозную мембрану электроблоттингом в буфере (217 мМ трис-глицин, 9,5% этанол, pH 8,6) при силе тока 250 мА в течение 45 мин. Затем нитроцеллюлозную мембрану промывали водой и окрашивали белки на мембране раствором коллоидного серебра, приготовленного последовательным смешиванием 550 мг цитрата натрия, 188 мг сульфата железа (II) и 40 мг нитрата серебра в 20 мл воды. Для определения молекулярных масс исследуемых белков использовали калибровочный график зависимости подвижностей белков-маркеров от логарифмов их молекулярных масс, линеаризованный по методу наименьших квадратов.

Для определения первичной последовательности белков в составе НПК, НПК также разделяли при помощи 10–20% SDS-диск электрофореза. Серии образцов наносили в двух повторах. Белки в аналитических количествах переносили на нитроцеллюлозную мембрану и окрашивали коллоидным серебром, другую часть геля, содержащую белки в препаративных количествах, – Кумасси R-250. Фрагменты геля, содержащие минорные и мажорные белки, вырезали с шагом 3 мм для определения первичной аминокислотной последовательности белков при помощи MALDI TOF масс-спектрометрии.

Масс-спектрометрический анализ с последующей идентификацией белков был проведён в Центре коллективного пользования «Масс-спектрометрические исследования» СО РАН вместе с к.б.н. О.С. Тутановым под руководством проф., д.х.н. Ю.П. Центаловича. После отмывки красителя в растворе 50% ацетонитрила и 0,1% трифторуксусной кислоты сульфгидрильные группы белков восстанавливали 45 мМ DTT 0,2 М бикарбонате аммония при +60°C в течение 30 мин с последующим алкилированием белков 100 мМ йодацетамидом в 0,2 М бикарбонате аммония при комнатной температуре в течение 30 мин. Затем кусочки геля обезвоживали в 100% ацетонитриле. Далее для гидролиза белков к каждому кусочку геля добавляли по 20 мкл 0,2 мМ раствора модифицированного трипсина T6567 ( $\geq 10000$  Е/мг) в 40 мМ бикарбонате аммония и 5 мкМ  $\text{CaCl}_2$  и инкубировали 30 мин при комнатной температуре. После этого к кусочкам геля добавляли по 60 мкл буфера для экстракции пептидов и инкубировали 16–18 ч при +37°C. Пептидные фрагменты белков, экстрагированные из геля, концентрировали и обессоливали на микроколонках C18 ZipTIPS, согласно рекомендациям производителя. Масс-спектры снимали на тандемном времяпролетном масс-спектрометре MALDI-TOF autoflex speed series LIFT («Bruker Daltonics», ФРГ) с использованием в качестве матрицы 4-гидроксицианоциннамоновой кислоты.

Идентификацию белков проводили путём поиска соответствующих кандидатов в аннотированных БД NCBI и SwissProt с использованием программы Mascot (Matrix Science Ltd., London, [www.matrixscience.com/search\\_form\\_select.html](http://www.matrixscience.com/search_form_select.html)). При поиске в БД были заданы следующие параметры: допустимое отклонение массы заряженного пептида (50 ppm) 0,05 Да, допустимое число пропущенных сайтов разрезания 6, наличие окисленных остатков метионина и карбоксилированных остатков цистеина, ацетилированных N-концов и метилированных C-концов, достоверность идентификации не менее 95%.

#### **2.2.2.2. Оценка уровня гистонов в плазме крови условно здоровых женщин и больных РМЖ**

Количественное определение концентрации гистонов H2a и H4 проводилось с использованием высокочувствительных коммерческих наборов ELISA Kit for Histone H2B и ELISA Kit for Histone H4 производства Cloud-Clone Corp. (Китай) согласно инструкции производителя. В анализ брали 10 мкл плазмы крови, результаты анализа регистрировали с помощью планшетного спектрофотометра, измеряя оптическую плотность на длине волны 450 нм.

### 2.2.2.3. Выделение гистон-содержащих НПК аффинной хроматографией

#### 2.2.2.3.1. Получение лейкоцитов из цельной крови и выделение и характеристика гистонов человека

Лейкоциты здоровых доноров ( $n = 4$ ) отделяли от других форменных элементов при помощи среды для разделения лимфоцитов: клеточную массу разводили PBS в соотношении 1:1,5 и наслаивали полученный раствор клеток на среду в соотношении 1,5:1; затем центрифугировали при 400 g в течение 40 мин при  $+4^{\circ}\text{C}$ . Полученные лейкоциты промывали 9-кратным объёмом PBS и осаждали при 400 g в течение 20 мин при  $+4^{\circ}\text{C}$ . Осадок клеток ресуспендировали в PBS и количество клеток оценили путём подсчёта в камере Горяева. Полученную клеточную суспензию замораживали в жидком азоте и хранили при  $-80^{\circ}\text{C}$ .

Гистоны из лейкоцитов выделяли методом кислотной экстракции [441]. В частности, к 3 мл клеточной суспензии (примерно  $10^8$  клеток/мл) добавляли 60 мл лизис-буфера (10 mM трис-HCl, 1 mM KCl, 1,5 mM MgCl<sub>2</sub>, 1 mM DTT, pH 8) и инкубировали на льду в течение 30 мин. Ядра осаждали центрифугированием при 10000 g в течение 10 мин при  $+4^{\circ}\text{C}$ . Осадок ресуспендировали в 24 мл 0,2 M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> и инкубировали в течение ночи на ротационной мешалке при 10 об/мин,  $+4^{\circ}\text{C}$ . Затем осаждали нуклеиновые кислоты и осколки ядер при 16000 g в течение 10 мин при  $+4^{\circ}\text{C}$ . Супернатант, содержащий гистоновые белки, переносили в новую пробирку, добавляли 7,92 мл 100% ТХУ, мягко перемешивали и инкубировали на льду в течение 30 мин. Гистоны осаждали при 16000 g в течение 10 мин при  $+4^{\circ}\text{C}$ , затем дважды промывали осадок ледяным ацетоном. Белковый осадок высушивали при комнатной температуре, растворяли в 2,3 мл воды и хранили при  $-20^{\circ}\text{C}$ .

В полученных образцах концентрацию белка определяли спектрофотометрически [442]. Выделенные гистоны были охарактеризованы при помощи электрофореза по Лэммли и пятенного ИФА. В частности, препарат гистонов сорбировали на нитроцеллюлозу в количестве 250 нг и высушивали в течение 20 мин при комнатной температуре. Неспецифическую сорбцию блокировали буфером (10 mM трис-HCl, 0,15 M NaCl, 10% FBS, pH 7,5) на шейкере Titramax 1000 при скорости 700 об/мин в течение 20 мин. После высушивания нитроцеллюлозу разрезали на квадраты, разносили по лункам 96-луночного планшета и вносили по 100 мкл раствора моноклональных антител мыши против гистона H1 (1 мкг/мл) и поликлональных антител кролика против гистонов H2A, H2B и H3 (2,5 мкг/мл) в рабочем буфере (10 mM трис-HCl, 0,15 M NaCl, 10% FBS, 0,05% Tween-20, pH 7,5). Комплексы антиген-антитело формировали инкубацией на шейкере при 700 об/мин в течение 4 ч. Затем лунки с образцами последовательно промывали пять раз рабочим буфером и сформированные комплексы выявляли инкубацией с конъюгатом пероксидазы хрена кроличьих антител против антител мыши либо с конъюгатом пероксидазы хрена козых

антител против антител кролика в разведении 1:1000. Инкубацию с конъюгатами осуществляли в течение 4 ч на шейкере при 700 об/мин. Лунки промывали дважды по 2 мин рабочим буфером и трижды по 2 мин 10 мМ трис-НСl, рН 7,5, после чего визуализировали комплексы антител с антигенами при помощи субстратной смеси (50 мМ трис-НСl, 0,018% 4-хлор-1-нафтол, 0,03% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, рН 7,5).

Синтез конъюгатов антивидовых антител с пероксидазой хрена проводили как описано [443] с некоторыми модификациями протокола. В частности, к раствору пероксидазы хрена с концентрацией 12 мг/мл добавляли 4,2% раствор периодата натрия в соотношении 2,36:1 и инкубировали на ротационной мешалке при 10 об/мин в течение 10 мин. Обессоливание фермента проводили при помощи гель-фильтрации на колонке с сефадексом G-25 «Superfine» в присутствии 1 мМ натрий-ацетатного буфера, рН 4,0. К раствору окисленной пероксидазы добавляли раствор кроличьих антител против антител мыши или козьих антител против антител кролика из расчёта 1 мг антител на 0,55 мг пероксидазы. Синтез конъюгатов антител с пероксидазой хрена проводили в присутствии 0,15 мМ NaCl, 0,5 М бикарбонатного буфера, рН 9,5, инкубируя на ротационной мешалке при 10 об/мин в течение 2 ч.

Непрореагировавшие активные центры пероксидазы блокировали 50 мМ глициновым буфером, рН 9,5, инкубируя на ротационной мешалке при 10 об/мин в течение 10 мин. Образовавшиеся основания Шиффа восстанавливали 0,04% боргидридом натрия на ротационной мешалке при 10 об/мин в течение 10 мин. Полученные конъюгаты антител с пероксидазой хрена осаждали насыщенным раствором сульфата аммония (на 1 мл раствора конъюгата – 0,7 мл (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) и центрифугировали при 17000 г в течение 5 мин. Осадок растворяли в воде из расчёта 100 мкл воды на 1 мг антител. Полученные растворы конъюгатов центрифугировали при 17000 г в течение 5 мин, фильтровали через стекловату и повторно осаждали конъюгаты насыщенным сульфатом аммония. Полученные конъюгаты антител с пероксидазой хрена хранили при +4°C.

Способность синтезированных конъюгатов антител с пероксидазой хрена связывать антитела тестировали методом пятенного ИФА как описано выше. Для этого на нитроцеллюлозу в качестве антигенов отдельно сорбировали суммарные антитела мыши и антивидовые антитела кролика против антител мыши в количестве 250 нг. Инкубация с различными разведениями конъюгатов осуществлялась на шейкере при 700 об/мин в течение 4 ч. Затем лунки с образцами последовательно промывали дважды по 2 мин рабочим буфером и трижды по 2 мин 10 мМ трис-НСl, рН 7,5, после чего визуализировали комплексы антител с антигенами.

### 2.2.2.3.2. Иммунизация животных гистонами и выделение суммарных антител против гистонов из кроличьих антисывороток

Для получения поликлональных специфических антител против гистонов в качестве антигенов использовали выделенные и охарактеризованные гистоны лейкоцитов человека. Подкожную иммунизацию кроликов породы шиншилла проводили по стандартной схеме [444]: 0,5 мл раствора белка с концентрацией 1 мг/мл эмульгировали с равным объёмом полного/неполного адьюванта Фрейнда, иммунизировали с периодичностью 7 суток при разовом введении антигена в количестве 0,5 мг (первичную иммунизацию осуществляли эмульсией в полном адьюванте, все последующие – в неполном).

Забор крови из краевой ушной вены в количестве 40–50 мл осуществлялся на 40-й, 47-й и 53-й дни после первого введения антигена. Собранную кровь инкубировали при +37°C в течение 30 мин, образовавшийся тромб механически измельчали. Сыворотку отделяли от фибринового сгустка при 300 g в течение 15 мин при +4°C, супернатант повторно центрифугировали при 800 g в течение 20 мин при +4°C. Полученную антисыворотку против гистонов хранили при -20°C.

Титр антител в антисыворотке определяли с помощью пятенного ИФА. На нитроцеллюлозу сорбировали суммарную фракцию выделенных гистонов в количестве 250 нг и инкубировали с антисывороткой кролика. Комплексы антиген-антитело инкубировали с конъюгатом пероксидазы хрена с козьими антителами против антител кролика в разведении 1:1000 в течение 4 ч на шейкере при 700 об/мин. Лунки промывали и визуализировали комплексы антиген-антитело, как описано в п. 2.2.2.3.1.

Антисыворотки от разных животных объединяли и центрифугировали при 6800 g в течение 10 мин при +4°C. Супернатант переносили в новые пробирки и осаждали суммарную фракцию антител добавлением насыщенного раствора сульфата аммония из расчёта 0,7 мл раствора соли на 1 мл антисыворотки с последующей инкубацией в течение 30 мин при +4°C. Осадок иммуноглобулинов отделяли центрифугированием при 6800 g в течение 10 мин при +4°C, супернатант удаляли и осадок растворяли в 1–2 мл PBS. Раствор иммуноглобулинов диализовали против трёх смен 0,15 M NaCl, затем центрифугировали при 17000 g в течение 10 мин. Концентрацию белка определяли спектрофотометрически; полученные препараты суммарных антител хранили при -20°C.

### 2.2.2.3.3. Синтез сорбентов и выделение антител против гистонов методом аффинной хроматографии

Аффинные сорбенты с иммобилизованными гистонами, с ЧСА и с суммарными антителами неиммунизированного кролика синтезировали на основе активированной бромцианом сефарозы [445].



Сефарозу CL-4В в количестве ~10 г последовательно промывали ~300 мл дистиллированной воды, 60 мл 30% и 60 мл 60% холодного ацетона. Сефарозу ресуспендировали в 60% холодном ацетоне из расчёта 0,5 мл на 1 г геля, охлаждали до -13°C и добавляли 1 М BrCN в ацетоне в количестве 3 мл. Затем при помешивании по каплям вносили 3 мл 1 М TEA в ацетоне и инкубировали 3 мин. Для нейтрализации BrCN добавляли равный объём 0,1 М HCl в ацетоне. Последующие операции проводили при комнатной температуре. Сорбент последовательно промывали 50 мл ледяной 0,1 М HCl в ацетоне, 50 мл 30%, 50 мл 60% ацетона и 200 мл дистиллированной воды. К 2,8–3,0 г активированной сефарозы добавляли 2,4 мг суммарного препарата гистонов, либо 2,8 мг ЧСА либо 5 мг суммарных антител кролика, доводили pH до 9,5 добавлением 0,5 М бикарбонатного буфера, pH 9,5 и инкубировали в течение 1 ч при медленном перемешивании на планшетном втягивателе при скорости 200 об/мин и амплитуде 5 у.е. Оставшиеся реакционные центры блокировали внесением 0,5 М глицинового буфера, pH 9,6 и инкубировали в течение 30 мин при перемешивании в тех же условиях.

Параллельно оценивали эффективность активации сефарозы бромцианом и ковалентной сшивки белка с носителем путём добавления ~ 1 мг гемоглобина к 0,1 г активированной сефарозы с последующей промывкой сорбента и визуальным контролем.

Синтезированные аффинные сорбенты последовательно промывали 100 мл PBS, 60 мл 0,1 М глицинового буфера, 0,5 М NaCl, pH 2,5, затем 60 мл 0,5 М боратного буфера, pH 8,6 и затем снова 100 мл PBS. После этого сорбенты переносили в хроматографическую колонку и повторно последовательно промывали PBS, глициновым буфером, боратным буфером и снова PBS. Колонки с аффинными сорбентами хранили в PBS при +4°C.

Для выделения поликлональных антител против гистонов человека проводили аффинную хроматографию с использованием синтезированного сорбента с иммобилизованными гистонами. В частности, на колонку с антигеном наносили 1 мл раствора суммарных антител (~64 мг/мл), полученных из антисыворотки против гистонов и инкубировали в течение 1 ч при +4°C, затем нанесение антител и инкубацию повторяли. Затем колонку последовательно промывали 20 мл PBS с 10 мМ EDTA, 20 мл PBS с 10 мМ EDTA, 0,05% Tween-20 и снова 20 мл PBS с 10 мМ EDTA. Специфические антитела элюировали с колонки в обратном направлении 0,1 М глициновым буфером, 0,5 М NaCl, pH 2,5; элюат нейтрализовали 0,5 М боратным буфером, pH 8,6 из расчёта 0,2 мл буфера на 1 мл элюата. После проведения аффинной хроматографии сорбент регенерировали, последовательно пропуская через него по 20 мл каждого раствора: PBS с 10 мМ EDTA, PBS с 10 мМ EDTA, 0,05% Tween-20, PBS с 10 мМ EDTA.

Собранные антитела пересаждали сульфатом аммония (из расчёта 0,56 г/мл раствора) и инкубировали в течение ночи при +4°C. Осадок белка отделяли центрифугированием при 10 000 g в течение 15 мин при +4°C, растворяли в 2 мл PBS и диализовали против трёх смен 0,15 М NaCl; затем денатурированный белок удаляли центрифугированием при 17 000 g в течение 10 мин.

Для получения антител со строгой специфичностью к гистонам (не дающих перекрёстной реакции с ЧСА) иммуноглобулины против гистонов истощали на сорбенте с иммобилизованным ЧСА. На колонку наносили 3 мг антител и инкубировали 2 ч при +4°C. Несвязавшиеся с сорбентом иммуноглобулины элюировали PBS с 10 mM EDTA. Связавшийся с сорбентом ЧСА удаляли с колонки, пропуская в обратном направлении 0,1 М глициновый буфер, 0,5 М NaCl pH 2,5; сорбент регенерировали как описано выше.

Концентрацию антител против гистонов определяли спектрофотометрически, антитела характеризовали пятенным ИФА с некоторыми модификациями. В частности, на нитроцеллюлозу сорбировали суммарный препарат гистонов в количестве 250 нг и инкубировали с антителами против гистонов. Комплексы антиген-антитело выявляли с помощью конъюгата с пероксидазой хрена антител козы против антител кролика в разведении 1:200. Препараты антител против гистонов хранили при -20°C.

#### 2.2.2.3.4. Синтез сорбента с иммобилизованными антителами против гистонов и выделение гистон-содержащих НПК из плазмы крови методом аффинной хроматографии

Для выделения методом аффинной хроматографии циркулирующих в крови гистон-содержащих НПК был синтезирован на основе активированной бромцианом сефарозы сорбент с иммобилизованными антителами против гистонов. Сефарозу активировали, как описано в п. 2.2.2.3.3, используя на 10 г сорбента 0,75 мл 1 М BrCN в ацетоне. К 3,1–3,2 г активированной сефарозы добавляли 4 мг антител против гистонов, доводили pH до 9,5, проводили инкубацию, блокировку оставшихся реакционных центров и промывание сорбента, как описано в п. 2.2.2.3.3.

Для выделения гистон-содержащих НПК из плазмы крови на колонку наносили 0,6–0,8 мл плазмы крови и инкубировали 2 ч при +4°C. Промывание колонки и специфическую элюцию НПК проводили, как описано в п. 2.2.2.3.3. Полученные образцы гистон-содержащих НПК из плазмы крови хранили при -20°C.

#### 2.2.2.3.5. Характеризация ДНК-составляющей гистон-содержащих НПК крови

Образцы НПК концентрировали в ~ 20 раз на фильтрах «Centricon 3 kDa» в течение 4 ч при 4000 g, +4°C. Выделение ДНК из гистон-содержащих НПК и из плазмы крови проводили при помощи набора для выделения ДНК «BPD-100» по протоколу, рекомендованному производителем. Выделенную ДНК концентрировали пересаживанием ацетоном в

присутствии ТЕА и гликогена как описано в п. 2.2.1.1. ДНК растворяли в 15 мкл деионизированной воды.

Концентрацию вДНК и ДНК в составе НПК определяли методом количественной ПЦР, размер ДНК в составе НПК определяли с помощью системы капиллярного электрофореза как описано в п. 2.2.3.1.

#### 2.2.2.3.6. Идентификация белковой составляющей гистон-содержащих НПК крови

Концентрацию белка и молекулярные массы белков в составе НПК определяли коммерческим набором и электрофорезом по Лэммли с последующим вестерн-блоттингом как описано в п. 2.2.2.1.4, предварительно концентрируя образцы НПК в ~ 100 раз на фильтрах «Centricon 3 kDa» в течение 8 ч при 7500 g, +4°C и затем обессоливая их в ~ 250 раз на тех же фильтрах в течение 2 ч при 7500g, +4°C.

Для определения первичной последовательности белков в составе НПК, образцы НПК предварительно концентрировали в ~ 400 раз на фильтрах «Centricon 3 kDa» в течение 9 ч при 7500 g, +4°C и затем обессоливали в ~ 250 раз на тех же фильтрах в течение 2 ч при 7500 g, +4°C. Белки НПК разделяли при помощи 10-20% SDS-диск электрофореза. Серии образцов наносили в двух повторах. Белки в аналитических количествах переносили на нитроцеллюлозную мембрану и окрашивали коллоидным серебром, другую часть геля, содержащую белки в препаративных количествах, – Кумасси R-250. Фрагменты геля, содержащие минорные и мажорные белки, вырезали с шагом 3 мм для определения первичной аминокислотной последовательности белков при помощи MALDI-TOF масс-спектрометрии. Масс-спектрометрический анализ с последующей идентификацией белков был проведён в Центре коллективного пользования «Масс-спектрометрические исследования» СО РАН вместе с к.б.н. О. С. Тутановым под руководством проф., д.х.н. Ю.П. Центаловича.

Фрагменты ПААГ, содержащие исследуемые белки, обрабатывали по модифицированному методу Розенфельд [446]. В частности, вырезанные кусочки ПААГ с белками отмывали от Кумасси R-250 и SDS в растворе 50% ацетонитрила и 0,1% трифторуксусной кислоты. Содержавшиеся в геле белки восстанавливали 45 mM DTT 0,2 M бикарбонате аммония при +60°C в течение 30 мин с последующим алкилированием белков 100 mM йодацетамидом в 0,2 M бикарбонате аммония при комнатной температуре в течение 30 мин. Затем кусочки геля обезвоживали в 100% ацетонитриле. Для ацилирования лизинов к образцам добавляли по 5 мкл уксусного ангидрида и 40 мкл 0,1 M бикарбоната аммония и инкубировали в течение 40 минут при +37°C [447]. Далее белки подвергали трипсинолизу как описано в п. 2.2.2.1.4, пептиды экстрагировали из геля, концентрировали и обессоливали на микроколонках C18 ZipTips как описано в п. 2.2.2.1.4. Смесь пептидов

элюировали с микроколонок на мишени приборной пластины насыщенным раствором матрикса. Получение и регистрацию масс-спектров производили на тандемном времяпролетном масс-спектрометре MALDI-TOF autoflex speed series LIFT («Bruker Daltonics», ФРГ) в режиме положительных ионов в диапазоне масс 700-3000 Да с использованием в качестве матрицы 4-гидроксицианоциннамоновой кислоты. Идентификацию белков проводили путём поиска соответствующих кандидатов в аннотированных БД NCBI и SwissProt с использованием ПО Mascot (Matrix Science Ltd., London, [www.matrixscience.com/search\\_form\\_select.html](http://www.matrixscience.com/search_form_select.html)). При поиске в БД были заданы следующие параметры: допустимое отклонение массы заряженного пептида (50 ppm) 0,05 Да, допустимое число пропущенных сайтов гидролиза 6, наличие окисленных остатков метионина и карбоксилированных остатков цистеина, ацетилированных N-концов и метилированных C-концов, достоверность идентификации не менее 95%.

#### 2.2.3.2.7. Биоинформатический анализ белков в составе НПК плазмы крови

Анализ универсальности белков НПК, а также происхождение этих белков, молекулярные функции и вовлечение в биологические процессы и пути проводили с помощью ПО FunRich (version 3.1.3 software package) и БД Reactome ([www.reactome.org](http://www.reactome.org)) и NCI-Nature Pathway Interaction Database ([www.ndexbio.org](http://www.ndexbio.org)) [448]. Профилирование белков НПК, вовлечённых в миграцию и подвижность клеток, иммунный ответ и ангиогенез выполняли с использованием аннотаций QuickGO. Для этого среди полученных белков осуществляли поиск по следующим терминам: клеточная подвижность (cell motility (GO:0048870)), клеточная миграция (cell migration (GO:0016477)) и негативная регуляция клеточной подвижности (negative regulation of cell motility (GO:2000146)); иммунный ответ (immune response (GO:0006955)) и негативная регуляция иммунного ответа (negative regulation of immune response (GO:0050777)); ангиогенез (vasculature development (GO:0001944)) и негативная регуляция ангиогенеза (negative regulation of vasculature development (GO:1901343)) [449]. Участие белков НПК в клеточной инвазии и ЭМП анализировали путем поиска в БД PubMed соответствующих публикаций для каждого белка. Профилирование универсальных белков экзосом крови проводили с помощью ПО STRING ([www.string-db.org](http://www.string-db.org)). Анализ наличия ДНК-связывающих мотивов в составе белков осуществляли с помощью веб-платформы Interpro с использованием БД Interpro (<https://www.ebi.ac.uk/interpro/>), PROSITE, Pfam (<http://pfam.xfam.org/>), SMART (<http://smart.embl-heidelberg.de/>) и CDD (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/cdd.shtml>) [382].

## **2.2.3. Опухолевые маркеры в составе дезоксирибонуклеопротеиновых комплексов, циркулирующих в крови больных РМЖ**

### **2.2.3.1. Распределение aberrантно метилированной формы гена *RARβ2* во вДНК крови больных РМЖ**

2.2.3.1.1. Выделение вДНК и получение фрагментов ДНК длиной от 100 п.н. до 1000 п.н.

вДНК из плазмы и элюатов с поверхности ФЭК условно ЗЖ и больных РМЖ выделяли как описано в п. 2.2.1.1. Индивидуальные препараты вДНК в количестве от 30 до 794 нг разделяли при помощи электрофореза в 6% ПААГ (сшивка 30:1) в буфере ТВЕ. Электрофорез проводили в буфере ТВЕ, напряжённость электрического поля составила от 100 В до 250 В. В качестве маркера длины ДНК использовали М16 (от 100 п.н. до 1000 п.н.). Флуоресцирующие комплексы бромистого этидия с ДНК-маркером наблюдали при помощи трансиллюминатора LKB Macrovue 2011. Фрагмент геля, содержащий вДНК длиной от 100 п.н. до 1000 п.н. вырезали и выделяли ДНК из геля при помощи электроэлюции - электропереноса на ДЭАЭ-целлюлозу при напряжении 200 В в течение 2 часов в 1/20х ТВЕ. ДНК элюировали с ДЭАЭ-целлюлозы пятью сменами по 20 мкл 3 М перхлората лития в воде и осаждали 10-ю объемами 2% раствора перхлората лития в ацетоне. Осадок собирали центрифугированием при 13000 об/мин в течение 10 мин, промывали осадок от остатка солей ацетоном. Осадок ДНК высушивали и растворяли в 70 мкл MilliQ.

Для оценки эффективности выделения фрагментов ДНК длиной от 100 п.н. до 1000 п.н. были использованы ДНК-маркер М16 в количестве 3 мкг и ПЦР-продукт (161 п.н.) в количестве 1 нг и 40 нг. Количество выделенной ДНК оценивали спектрофотометрически в случае ДНК-маркера и при помощи ПЦР в режиме «реального времени» для ПЦР-продуктов как описано в п. 2.2.1.3.

2.2.3.1.2. Получение ПЦР-продуктов промоторной области гена *RARβ2*

Аmplификацию проводили в объеме 30 мкл. В качестве матрицы использовали геномную ДНК лейкоцитов по 10 нг в реакцию. Реакционная смесь содержала 1х-буфер для Таq-полимеразы (65 мМ трис-НСl, 16 мМ (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 0,05% Tween-20, 2 мМ MgCl<sub>2</sub>, рН 8,8), 1 мМ dNTP, 1 е.а. Таq-полимеразы, праймеры до конечной концентрации 0,3 мМ (таблица 5).

ПЦР проводили в амплификаторе Mastercycler Gradient по следующему протоколу: денатурация при 95 °С в течение 3 мин, затем 40 циклов: 95°С – 30 сек, 60°С – 5 сек и 72°С – 30 сек. Размер целевого продукта амплификации определяли при помощи гель-электрофореза как описано в п. 2.2.3.1.

Для очистки ПЦР-продуктов был использован электрофорез в 6%-ом ПААГ (сшивка 30:1), в буфере ТВЕ, с последующей электроэлюцией. Осадок ДНК промывали от примесей

солей ацетоном, высушивали при комнатной температуре и растворяли в MilliQ. Количество выделенной ДНК измеряли спектрофотометрически на приборе GENESYS 10UV по оптической плотности A260, чистоту препарата оценивали по соотношению A260/A280.

Таблица 5 – Последовательности праймеров для ПЦР в режиме «реального времени»

Ген	Последовательность (5'-3')	
RAR $\beta$ 2 GenBank X56849.1 926–1116, 161 п.н., зависит от метилирования	прямой	AGG ATTGGGATGTCGAGAACGC
	обратный	CTCGACCAATCCAACCGAAACG
RAR $\beta$ 2 GenBank X56849.1 931–1116, 186 п.н., не зависит от метилирования	прямой	TTGTTTGAGGATTGGGATG
	обратный	TACCAT TTTCCAAACTTACTC
RAR $\beta$ 2 GenBank X56849.1, 924–1117, 194 п.н., дикий тип	прямой	ATGCGAGCTGTTTGAGGACT
	обратный	TTACCATTTTCCAGGCTTGC

Полученные ПЦР-продукты промоторной области гена RAR $\beta$ 2 длиной 194 п.н. были обработаны M. SssI метилазой. Затем метилированные ПЦР-продукты были конвертированы при помощи коммерческого набора Zymo Research.

Для построения калибровочной кривой ПЦР в режиме «реального времени», направленной на амплификацию независимых от метилирования форм промоторной области гена RAR $\beta$ 2 с праймеров RAR $\beta$ 2 независимых от метилирования (в качестве матрицы использовали метилированные конвертированные ПЦР-продукты длиной 194 п.н.), были получены ПЦР-продукты длиной 186 п.н. и очищены в 6% ПААГ как описано выше.

Для построения калибровочной кривой ПЦР в режиме «реального времени», направленной на амплификацию только метилированных форм промоторной области гена RAR $\beta$ 2 с праймеров RAR $\beta$ 2 специфичных к метилированию (в качестве матрицы использовали метилированные конвертированные ПЦР-продукты длиной 194 п.н.), были получены ПЦР-продукты длиной 161 п.н. и очищены в 6% ПААГ как описано выше.

#### 2.2.3.1.3. Получение метилированных ДНК и ПЦР-продуктов и оценка степени метилирования

Для получения положительного контроля для метил-специфичной ПЦР геномную ДНК обрабатывали CpG-метилазой M.Sss I. Реакционная смесь содержала NEB-буфер (50 mM NaCl, 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 0,16 mM SAM, 10 mM трис-HCl pH 7,9), 1,5 мкг геномной ДНК, 2 е.а. CpG-метилазы в конечном объеме 20 мкл. Полученную смесь инкубировали при 37°C в течение 1 ч. Метилирование ПЦР-продуктов длиной 194 п.н. проводили в тех же условиях (количество ПЦР-продукта на реакцию составило 1 мкг). Полученные препараты ДНК хранили при -20°C.

Степень метилирования геномной ДНК и ПЦР-продуктов оценивали как соотношение неметилированной ДНК к метилированной при помощи эндонуклеазы рестрикции Bsh1236I. Реакционная смесь содержала буфер (10 мМ трис-НСl, 10 мМ MgCl<sub>2</sub>, 100 мМ KCl, 0,1 мг/мл BSA, рН 8,5), 10 е.а. эндонуклеазы Bsh1236I и метилированную ДНК либо метилированный ПЦР-продукт длиной 194 п.н. Объем реакционной смеси составил 25 мкл. Контрольный образец содержал все те же компоненты за исключением фермента. Реакционную смесь инкубировали в течение 1 ч при 37°C, а затем инактивировали фермент нагреванием в течение 20 мин при 65°C. Степень расщепления метилированной ДНК оценивали как соотношение концентраций неметилированной ДНК к метилированной с помощью ПЦР в режиме «реального времени» с использованием программы для RARβ2 дикого типа.

#### 2.2.3.1.4. Бисульфитная модификация ДНК и условия проведения ПЦР в режиме «реального времени» с SYBR Green I

Бисульфитную модификацию неметилированной и метилированной геномной либо вДНК, а также метилированных и неметилированных ПЦР-продуктов проводили с помощью наборов Zymo Research в соответствии с протоколом, рекомендованным производителем. Раствор ДНК либо ПЦР-продукта хранили при -20°C. Концентрацию модифицированной ДНК либо ПЦР-продукта оценивали спектрофотометрически и при помощи количественной ПЦР. ПЦР проводили в объеме 30 мкл на приборе iCycler iQ5. Реакционная смесь содержала 2x буфер для Taq-полимеразы (65 мМ трис-НСl, 16 мМ (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 3,5 мМ MgCl<sub>2</sub>, 0,05% Tween-20, по 0,25 мМ каждого dNTP, 1xSYBR Green I, 10 мМ флуоресцеин, рН 8,8), олигонуклеотидные праймеры (таблица 5) в конечной концентрации 0,3 мкМ, 1 е.а. Taq-полимеразы и 5 мкл раствора ДНК-матрицы. Эффективность амплификации каждого ПЦР-продукта и геномной ДНК определяли по калибровочным кривым, построенным по серии разведений геномной неметилированной и метилированной ДНК. Измерение проводили в дублях. В качестве негативного контроля использовали воду.

Для определения количества неметилированной неконвертированной формы гена RARβ2 в образцах использовали программу RARβ2 дикого типа, для определения общего количества гена RARβ2 в образцах после конверсии (для области гена RARβ2 не специфичной к метилированию после бисульфитной конверсии) – программу RARβ2 независимого от метилирования, для определения количества метилированных форм гена RARβ2 (для области гена RARβ2 специфичной к метилированию после бисульфитной конверсии) – программу RARβ2 метилированного типа (таблица 6). Полученные данные анализировали при помощи ПО iQ5.

### 2.2.3.2. Биоинформатический анализ опухоли-ассоциированных белков в составе НПК крови больных РМЖ

Профилирование белков гистон-содержащих НПК, ассоциированных с развитием различных злокачественных заболеваний, проводили с использованием БД dbDEPC 3.0 [434]. Поиск прогностических опухолевых белков в составе НПК проводили с использованием БД Human Protein Atlas (<http://www.proteinatlas.org/>) [435], с учетом данных для молочной железы, почек, щитовидной железы, поджелудочной железы, печени, эндометрия, головы и шеи, яичников, желудка, шейки матки, рака легких и колоректального рака, меланомы и глиомы.

Таблица 6 – Условия проведения количественной SYBR Green I ПЦР

система		RAR $\beta$ 2 (GenBank X56849.1 924-1117)	RAR $\beta$ 2 (GenBank X56849.1 931-1116)	RAR $\beta$ 2(GenBank X56849.1 926-1116)
программа		дикий тип	независима от метилирования	специфична к метилированию
Цикл 1	Старт	95°C – 1 мин	95°C – 3 мин	95°C – 3 мин
Цикл 2,40x	Денатурация	95°C – 20 сек	95°C – 25 сек	95°C – 30 сек
	Отжиг праймеров	64°C – 10 сек	55°C – 5 сек	65°C – 5 сек
	Элонгация	72°C – 20 сек	72°C – 30 сек	72°C – 25 сек
	Снятие сигнала	84°C – 13 сек	88°C – 15 сек	84,5°C – 15 сек
Цикл 3	Шаг1	95°C – 1 мин	95°C – 1 мин	95°C – 1 мин
Цикл 4	Шаг1	55°C – 1 мин	65°C – 1 мин	65°C – 1 мин
Цикл 5	Кривая плавления, шаг 0,5°C			

### 2.2.4. Выделение и характеристика экзосом из клеточных культур, из плазмы и из крови

#### 2.2.4.1. Выделение экзосом и оценка лизиса ФЭК

Экзосомы выделяли из кондиционной среды клеток карциномы молочной железы SKBR3, а также из плазмы и цельной крови путем комбинации ультрафильтрации с последующим ультрацентрифугированием.

Для удаления бычьих везикул FBS центрифугировали при 100 000g в течение 1,5 ч при 4°C, супернатант отбирали и использовали для приготовления обедненной среды. За 2-3 суток до выделения клеточную среду в культуре заменяли на обедненную, содержащую DMEM, смесь антибиотиков и 10% FBS, не содержащую везикул.



Для получения экзосом из кондиционной среды клеток, среду центрифугировали в течение 20 мин при 1 200 g и 4°C, а затем при 17 000 g 4°C в течение 20 мин. Для удаления везикул более 100 нм, супернатант фильтровали через фильтр с диаметром пор 100 нм. Экзосомы плазмы осаждали ультрацентрифугированием при 100 000 g, в течение 90 мин, 4°C, осадок ресуспендировали в 10 мл PBS и дважды ультрацентрифугировали при тех же условиях. Экзосомы клеточных культур ресуспендировали в 200 мкл PBS, замораживали в жидком азоте и хранили при -80°C.

Для получения экзосом плазмы, полученные в п. 2.2.1.1 образцы плазмы центрифугировали при 17 000 g 4°C в течение 20 мин. Для удаления везикул более 100 нм, супернатант разводили в 5 раз PBS и фильтровали через фильтр с диаметром пор 100 нм. Экзосомы плазмы осаждали ультрацентрифугированием при 100 000 g, в течение 90 мин, 4°C, осадок ресуспендировали в 10 мл PBS и дважды ультрацентрифугировали при тех же условиях. Экзосомы плазмы ресуспендировали в 200 мкл PBS, замораживали в жидком азоте и хранили при -80°C.

Для получения экзосом крови кровь инкубировали в течение 5 мин при комнатной температуре с равным объемом буфера для элюции [438] при перемешивании на ротационной мешалке при 10 об/мин в течение 5 мин. Клетки осаждали центрифугированием в течение 15 мин при 1200 об/мин на центрифуге Eppendorf 5810R при 4°C. Супернатант отбирали в новую пробирку и повторно центрифугировали в течение 20 мин при 2400 об/мин. Полученные образцы центрифугировали при 17 000 g 4°C в течение 20 мин. Для удаления везикул более 100 нм, супернатант разводили в 2,5 раз PBS и фильтровали через фильтр с диаметром пор 100 нм. Экзосомы крови осаждали ультрацентрифугированием, промывали и хранили как экзосомы плазмы.

Для оценки доли разрушенных клеток после элюции с поверхности форменных элементов вДНК и экзосом был оценен уровень активности ЛДГ (LDH 1.1.1.27) с использованием коммерческого набора LDH kit в соответствии с рекомендациями производителя. Для построения калибровочной кривой были использованы лизированные первичные эндотелиоциты человека.

#### **2.2.4.2. Крио-электронная микроскопия**

Морфологию выделенных экзосом оценивали с помощью крио-электронной микроскопии. Исследование проводили на просвечивающем крио-электронном микроскопе Titan Krios 60-300 TEM/STEM, оснащённом высокочувствительным DED (Direct electron detector) детектором электронов Falcon II и корректором сферических аберраций при ускоряющем напряжении 300 кВ. Электронно-микроскопические медные сетки, покрытые

тонким слоем аморфного углерода, были обработаны в тлеющем разряде (30 сек, 25 мА) с использованием установки Pelco easi Glow для получения гидрофильной поверхности. Далее на сетки наносили 10 мкл экзосом, и с помощью установки Vitrobot Mark IV, проводили мгновенную заморозку образцов в жидком этане, охлажденном до температуры жидкого азота (-196°C). В результате образцы были зафиксированы в тонком слое аморфного льда, что позволило исследовать экзосомы в нативном состоянии. Для минимизации радиационных повреждений набор данных проводился с помощью программного обеспечения EPU в режиме малых доз. Изображения были получены с помощью Falcon II DED при увеличении 18000× и 37000× со значением расфокусировки в диапазоне [-2 мкм; -5 мкм]. Суммарная доза на изображение не превышала  $\sim 50\text{e}^- / \text{\AA}^2$ .

#### **2.2.4.3. Трансмиссионная электронная микроскопия**

Для негативного контрастирования образцы выделенных экзосом сорбировали на медные сетки с формваровой подложкой, стабилизированной углеродом, в течение 1 мин и 10 сек контрастировали 0,5 % раствором уранилацетата или 2% раствором фосфорно-вольфрамовой кислоты.

Для приготовления ультратонких срезов клеток крови после элюции с клеточной поверхности вДНК и экзосом, форменные элементы фиксировали 4% раствором параформальдегида, дофиксировали 1% раствором четырехоксида осмия, обезвоживали в растворах этилового спирта и ацетоне, заключали в смесь эпон-аралдит. Ультратонкие срезы готовили на ультратоме Leica EM UC7, контрастировали растворами уранилацетата и цитрата свинца.

Сетки изучали в просвечивающем электронном микроскопе JEM 1400 при ускоряющем напряжении 80 кВ. Изображения получали с помощью цифровой фотокамеры Veleta. Размеры структур измеряли на мониторе цифровой фотокамеры с помощью программы iTEM (Olympus, SIS, Germany).

#### **2.2.4.4. Трековый анализ**

Размер и концентрацию полученных экзосом оценивали при помощи анализатора частиц NanoSight LM10 (Malvern Instruments Ltd, Великобритания). В частности, образцы экзосом разводили в 100 раз PBS, фильтрованным через фильтры с диаметром пор 0,1 мкм. Каждый образец измеряли трижды при следующих настройках прибора: чувствительность камеры - 15 усл.ед., длительность записи - 30 с, пороговый уровень - 5 усл.ед. Не менее 200 треков анализировали на видео. Для анализа полученных данных использовали ПО NTA analytical software version 2.3 (NanoSight Ltd., Великобритания).

#### **2.2.4.5. Типирование экзосом**

Типирование экзосом на тетраспанины CD9, CD24, CD63, CD81 проводили методом проточной цитофлуориметрии с иммобилизованными антителами на латексных частицах. В частности, 10 мкл ( $6 \times 10^6$  частиц) 4% латексных частиц отмыли дважды по 100 мкл 0,1 М MES-буфером pH 5,5 при 3 000 g в течение 15 мин и ресуспендировали в 25 мкл MES-буфера. К 12,5 мкл частиц вносили по 3 мкг моноклональных антител против CD9, доводили объем до 50 мкл MES-буфером и инкубировали 14 ч при комнатной температуре на планшетном шейкере при 400 об/мин (дальнейшие инкубации на шейкере проводили при 400 об/мин). Покрытые антителами частицы отмывали трижды по 100 мкл PBS и ресуспендировали в 25 мкл PBS, содержащем 0,1% глицин. В 50 мкл экзосом (30 мкг белка) вносили 3 мкл латексных частиц, покрытых антителами и 100 мкл PBS и инкубировали на шейкере не менее 10 ч при 4°C. Затем в пробирки вносили 300 мкл 0,2 М глицина и инкубировали 30 мин при 4°C. Комплексы частиц с антителами и экзосомами отмывали дважды по 100 мкл PBS с 2% истощенной FBS, осаждали при 600 g в течение 10 мин при 4°C. В пробирки вносили иммуноглобулин G и инкубировали на шейкере 10 мин при комнатной температуре, затем отмывали дважды PBS с 2% истощенной от везикул FBS. Для выявления связавшихся с антителами на поверхности частиц экзосом в пробирки вносили 20 мкл флуоресцентно-меченных антител против CD63, CD81 и CD24, затем 80 мкл PBS с 2% истощенной FBS и инкубировали 50 мин при 4°C. Комплексы дважды отмывали PBS с 2% истощенной FBS. Цитофлуориметрия была выполнена на проточном цитофлуориметре FACS Canto II. В выделенной популяции экзосом анализировали медиану интенсивности флуоресценции (MFI) в сравнении с изотипическим контролем и отрицательными контролями.

#### **2.2.5. Исследование белкового состава экзосом плазмы и экзосом крови**

##### **2.2.5.1. Определение концентрации экзосомального белка**

Для оценки концентрации белка экзосом использовали коммерческий набор «NanoOrange Protein Quantitation kit» в соответствии с рекомендациями производителя. Предварительно экзосомы лизировали путем добавления к 7,5 мкл образца 2,5 мкл 4× лизирующего буфера (250 мМ трис-HCl, 8 % SDS, 0,2 М DTT, pH 6,8) и инкубировали на льду в течение 10 мин, затем нагревали в течение 10 мин при 95°C. Лизированные экзосомы центрифугировали в течение 5 мин на центрифуге Biofuge pico при 13000 об/мин. Далее все манипуляции проводили как описано в п. 2.2.2.1.4.

### **2.2.5.2. Оценка уровня 20S протеасом в составе экзосом**

Аликвоты экзосом (30 мкл, 7 мкг экзосомального белка) инкубировали в течение 90 мин на льду с 7 мкл лизис-буфера (125 мМ трис-HCl, 750 мМ NaCl, 0,5 % SDS, 5 % Triton X-100, pH 7,8) с добавлением 3 мкл протеазного коктейля (1,3 мМ апротинина, 0,33 мМ пепстатина А, 1 мкг/мл лейпептина). Образцы лизированных экзосом инкубировали при температуре 95°C в течение 7 мин и центрифугировали при 13 000 g в течение 5 мин. Супернатанты образцов наносили на 13% SDS-ПААГ и проводили электрофорез как описано в п. 2.2.2.1.4. После электрофореза белки переносили на PVDF-мембрану. Мембрану блокировали раствором 1× iBind. Связывание с первичным антителом к 20S- $\alpha$  и  $\beta$ -протеасомам в разведении 1:2000, промывку, связывание с конъюгатом IgA с пероксидазой хрена в разведении 1:5000 проводили с использованием автоматизированного устройства iBind Western Device. Далее мембрану инкубировали с раствором детекции Amersham ECL. Визуализация была выполнена в системе ChemiDoc Touch. Плотность полос оценивали с использованием ПО ImageLab. Результаты были стандартизированы с учетом уровня CD9 в экзосомах и выражены в у. е. от уровня 20S-протеасом в экзосомах условно ЗЖ.

### **2.2.5.3. Оценка уровня ADAM-10 на поверхности экзосом**

На латексных частицах иммобилизовали ADAM-10 как описано в п. 2.2.4.5. Аликвоты экзосом (около 30 мкг экзосомального белка) инкубировали с  $10^5$  анти-ADAM-10 латексными частицами в 150 мкл PBS при 4°C в течение ночи при осторожном перемешивании и блокировали в 0,2 М глицине в течение 30 мин. Комплексы частиц с экзосомами отмывали и инкубировали с иммуноглобулином G как описано в п. 2.2.4.5. Затем в пробирки вносили 20 мкл флуоресцентно-меченных антител против CD9 и CD24, затем 80 мкл PBS с 2% истощенной от везикул FBS и инкубировали 50 мин при 4°C. Комплексы дважды отмывали PBS с 2% истощенной FBS. Цитофлуориметрия была выполнена на проточном цитофлуориметре FACS Canto II. В выделенной популяции экзосом анализировали MFI в сравнении с изотипическим контролем и отрицательными контролями.

### **2.2.5.4. Двумерный (2D) электрофорез и анализ гелей**

Для гель-электрофоретического разделения белки экзосом осаждали смесью хлороформа с метанолом (1:4). Для этого к 100 мкл везикул добавляли 300 мкл деионизированной воды, 400 мкл метанола, 100 мкл хлороформа, тщательно перемешивали и центрифугировали при 14 000 g в течение 1 мин. 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, содержащем 8 М мочевины, 50 мМ 1,4-дителиотреитол, 4% (вес/объем) 3-[(3-холамидопропил)диметиламмоний]-1-пропаносульфат 0,1% (вес/объем) амфолитов 4–6 и 0,0002% (вес/объем) бромфенолового синего.

Для получения протеомных карт экзосом использовали метод 2D-электрофореза. Разделение белков в первом направлении 2D-электрофореза – в соответствии с их изоэлектрической точкой, проводили с использованием стрипов с иммобилизованным градиентом рН 4-7. На стрип наносили 150 мкг белка в 125 мкл буфера для 2D-электрофореза. Изоэлектрофокусирование проводили на приборе Protean IEF Cell при напряжении 250 В в течение 15 ч, затем в течение 2 ч при линейном подъеме напряжения до 4 000 В и потом до достижения 20 000 В.

После изоэлектрофокусирования каждый стрип последовательно по 10 мин инкубировали в буферных растворах 1 и 2, содержащих 0,375 М трис-НСl, 6 М мочевины, 2% SDS, 20% глицерина, рН 8,8 и, соответственно, 2% DTT или 2,5% йодоацетамида. Затем стрип помещали на верхний край ПААГ и фиксировали 1% расплавленной агарозой, содержащей 0,0002% бромфенолового синего.

Для разделения белков во втором направлении 2D-электрофореза – в соответствии с их молекулярной массой, использовали 13% вертикальные полиакриламидные гели размером 8×8×0,01 см. Разделение проводили в электрофоретической камере Mini-Protean 3 Cell при силе тока, равной 8 мА/гель, в течение 25 мин, а далее – при 50 мА/гель до тех пор, пока фронт бромфенолового синего не достигал нижней границы геля. В качестве стандартной смеси белков для определения масс и рI использовали набор маркеров для 2D-электрофореза «Markers for Two Dimensional Electrophoresis» (17 кДа – 89 кДа, рI-спектр 7,6–3,8). Визуализацию белковых пятен в гелях после завершения второго направления 2D-электрофореза осуществляли методом окрашивания нитратом серебра с тиосульфатом натрия.

Для анализа окрашенные серебром гели сканировали с разрешением 300 точек на дюйм при помощи калибровочного денситометра GS-800 и статистически анализировали с использованием ПО 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  $p < 0,05$ .

### **2.2.5.5. Идентификация белков экзосом методом MALDI-TOF масс-спектрометрии**

Для идентификации белков в составе экзосом плазмы и экзосом крови условно ЗЖ и больных РМЖ, белки разделяли при помощи 10-20% SDS-диск электрофореза и окрашивали при помощи Кумасси R-250. Фрагменты ПААГ, содержащие исследуемые белки, отмывали от Кумасси R-250 и SDS и подвергали трипсинолизу как описано п. 2.2.2.1.4. Пептидные фрагменты белков экстрагировали из геля, концентрировали и обессоливали на микроколонках C18 ZipTips, смесь пептидов элюировали с микроколонки на мишень приборной пластины насыщенным раствором матрикса как описано п. 2.2.2.1.4.

Масс-спектрометрический анализ с последующей идентификацией белков был проведён в Центре коллективного пользования «Масс-спектрометрические исследования» СО РАН О. С. Тутановым под руководством проф., д.х.н. Ю.П. Центаловича как описано п. 2.2.2.1.4.

### **2.2.5.6. Биоинформатический анализ экзосомальных белков**

Диаграмма Венна-Эйлера, иллюстрирующая общие белки в образцах экзосом плазмы и экзосом крови, была построена с использованием ПО FunRich версии 3.1.3 с использованием функции Vesiclepedia и текущих версий БД FunRich и Vesiclepedia [431]. Анализ функционального обогащения GO всех фракций экзосом выполняли с использованием ПО STRING ([www.string-db.org](http://www.string-db.org)) с базовыми настройками для анализа множественных белков. Уменьшение избыточности полученных данных проводилось с помощью ПО REVIGO (<http://revigo.irb.hr/>) с допустимым подобием менее 0,5. GO-профилирование экзосомальных белков, вовлеченных клеточную миграцию, иммунный ответ, ангиогенез и клеточную пролиферацию проводили с использованием терминов аннотации QuickGO как описано в п. 2.2.3.2.7.

### **2.2.6. Биоинформатический анализ опухоли-ассоциированных белков в составе экзосом плазмы и экзосом крови больных РМЖ**

Профилирование экзосомальных белков, по-разному экспрессируемых при развитии различных злокачественных заболеваний, проводили с использованием БД DEPC 3.0 [434]. Поиск прогностических опухолевых белков в протеоме экзосом проводили с использованием БД Human Protein Atlas (<http://www.proteinatlas.org/>), с учетом данных для молочной железы, почек, щитовидной железы, поджелудочной железы, печени, эндометрия, головы и шеи, яичников, желудка, шейки матки, рака легких и колоректального рака, меланомы и глиомы.

## 2.2.7. Исследование роли экзосом крови в развитии РМЖ

### 2.2.7.1. Оценка локализации и доли экзосомальной ДНК от содержания внДНК в плазме крови

Для оценки возможности транспорта внДНК в составе экзосом плазму крови получали от условно ЗЖ и больных РМЖ как описано п. 2.2.1.1. Из половины полученных образцов были выделены экзосомы как описано в п. 2.2.4.1 и охарактеризованы ТЭМ и трековым анализом как описано в п. 2.2.4.3 и п. 2.2.4.4, соответственно. Наличие экзосомальных тетраспанинов подтверждали с помощью иммуноокрашивания. В частности, к 10 мкл суспензии экзосом добавляли 10 мкл 0,5% BSA в PBS, вносили по 3 мкл 100 мкг/мл моноклональных антител мыши к человеческим рецепторам CD63 и CD9 и инкубировали в течение 18 ч на планшетном шейкере, затем сорбировали на сетки. Далее сетки промывали PBS и инкубировали 2 ч с конъюгатом белка А и наночастиц золота во влажной камере при комнатной температуре, затем промывали PBS в течение 2 мин и контрастировали 2% раствором фосфорно-вольфрамовой кислоты в течение 10 сек. Изображения с сеток получали как описано п. 2.2.4.3.

ДНК из 1 мл плазмы и из 100 мкл экзосом выделяли с помощью коммерческого набора и концентрировали переосаждением с ТЕА и гликогеном как описано в п. 2.2.1.1 до 15 мкл. Концентрацию выделенной ДНК оценивали с помощью ПЦР в режиме «реального времени» как описано в п. 2.2.1.3. Размер внДНК и ДНК из экзосом оценивали с помощью капиллярного электрофореза как описано в п. 2.2.1.5.

Для установления локализации ДНК в составе экзосом, 460 мкл везикул инкубировали 30 мин при 37°C с 8 мкл ДНКазы I (1 е.е./мл, без активности РНКазы) либо PBS и 52 мкл 10×буфера для ДНКазы. Затем фермент ингибировали добавлением EDTA и инкубацией при 65°C, 10 мин. После обработки ДНКазой I образцы промывали 12 мл PBS и ультрацентрифугировали при 100 000 g, 4°C, 90 мин. Супернатанты и экзосомы были использованы для выделения ДНК и последующей оценки размеров и концентрации ДНК.

Кроме того, 0,5 мкл выделенных экзосом или экзосом, обработанных ДНКазой I, сорбировали на нитроцеллюлозную мембрану D-3354 и высушивали в течение 20 мин при комнатной температуре. Неспецифическую сорбцию блокировали как описано в п. 2.2.2.3.1. Затем вносили раствор кроличьих поликлональных антител против гистонов H1, H2A, H2B и H3 (2,5 мкг/мл, по 100 мкл каждого) или мышинных моноклональных антител против CD9 (Abcam) в рабочем буфере (10 mM трис-HCl, pH 7,5, 0,15 M NaCl, 10% FBS, 0,05% Tween-20) и инкубировали на планшетном шейкере в течение 4 ч при 700 об/мин. Несвязавшиеся антитела отмывали рабочим буфером как описано в п. 2.2.2.3.1 и добавляли козы

антикроличьи антитела или кроличьи антимышьи антитела, конъюгированные с пероксидазой хрена, разведенные 1:5000 в том же буфере. Инкубацию с конъюгатом проводили в течение 4 ч, лунки промывали и визуализировали комплексы антиген-антитело как описано в п. 2.2.2.3.1. Белки экзосом и ДНК-связывающие в них мотивы идентифицировали как описано в п. 2.2.3.2.7. Анализ наличия ДНК-связывающих мотивов в составе белков осуществляли с помощью веб-платформы Interpro с использованием БД Interpro (<https://www.ebi.ac.uk/interpro/>), PROSITE, Pfam (<http://pfam.xfam.org/>), SMART (<http://smart.embl-heidelberg.de/>) и CDD (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/cdd.shtml>).

### **2.2.7.2. Формирование капилляро-подобных структур эндотелиоцитами**

Влияние экзосом на рост кровеносных сосудов *in vitro* оценивали на модели образования капилляро-подобных структур на Матригеле. Для этого предварительно депривированные в течение 18 ч клетки HUVEC 2–4 пассажа высаживали на 24-луночный планшет (35 000 клеток/лунку), покрытый Матригелем, обедненным ростовыми факторами. Затем в каждую лунку добавляли среду EBM-2 и препарат экзосом, до количества  $5 \times 10^8$  экзосом/лунку. Взятое количество экзосом соответствует количеству, секретированному из 1,92 млн клеток SKBR-3. Каждая экспериментальная точка была повторена трижды. В качестве отрицательного контроля использовали EBM-2-среду, не содержащую сыворотку, в качестве положительных контролей – EBM-2-среду, содержащую 10% FBS и среду EBM-2 без факторов роста с добавлением экзосом культуральной среды HER-2-положительной клеточной линии SKBR-3 РМЖ. Планшет помещали в CO<sub>2</sub>-инкубатор при 37°C на 18 ч, после чего оценивали формирование капилляро-подобных структур с помощью светового микроскопа Leica. Суммарную длину образованных капилляро-подобных структур в четырех выбранных полях зрения в каждой лунке оценивали посредством фотографирования лунок на увеличении 10× с последующей оценкой их длины с использованием ПО MetaMorph 5.0 software (Universal Imaging).

### **2.2.7.3. Оценка клеточной подвижности**

Для анализа двумерной миграции клетки высевали на 8-луночные планшеты при плотности 12 000 и 13 500 клеток/лунку для MCF10A и SKBR-3, соответственно. Для клеток MCF10A планшеты перед экспериментами покрывали 1 мг/мл бычьего фибронектина. Затем планшеты с SKBR-3 или с MCF10A инкубировали при 37°C в увлажненной атмосфере при 5% CO<sub>2</sub> в течение 24 ч или 48 ч, соответственно. Затем культуральную среду заменяли на DMEM в случае SKBR-3 или DMEM/F12 в случае MCF10A без сыворотки и EGF и инкубировали в течение 5 ч. Затем среду DMEM заменяли на среду F12 с 15 мМ HEPES, с сывороткой / EGF / экзосомами (из расчета  $10^8$  экзосом/лунку) или без них. Планшеты



помещали в инкубационную камеру при 37°C микроскопа Nikon Eclipse-Ti, оснащенного камерой ORCA-ER Hamamatsu, управляемой ПО NIS-Elements AR2.30.

Изображения получали с помощью объективов Plan-Neo FLUAR  $\times 10$  и  $\times 20$  каждые 5 мин в течение 15–20 ч. Чтобы оценить подвижность клеток, проанализировали количество подвижных клеток при каждом условии (мигрировавшая клетка определялась, если она перемещалась на расстояние, превышающее ее радиус), и скорость движущихся клеток, основываясь на отслеживании миграции клеток с использованием MTrackJplugging в ImageJ. Два-три поля зрения были записаны для каждого условия в трех независимых экспериментах.

#### **2.2.7.4. Анализ пролиферативной активности**

Для оценки интенсивности пролиферации клеток было рассчитано количество митозов на том же видео живых клеток MCF10A и SKBR3, которое было получено для клеточной подвижности.

#### **2.2.7.5. Иммунофлуоресцентное окрашивание межклеточных контактов**

Клетки высевали на 24-луночные культуральные чашки с покровными стеклами в условиях, описанных выше для экспериментов по миграции. После 5 ч удаляли сыворотку и EGF, среду меняли на DMEM с или без сыворотки / EGF / экзосом, и клетки дополнительно инкубировали при 37°C и 5% CO<sub>2</sub> в течение 24 ч. Для окрашивания E-кадгерина клетки фиксировали 1% PFA/PBS в течение 2 мин и помещали в холодный метанол на 15 мин. Для окрашивания  $\beta$ -катенином клетки фиксировали в 3,7% PFA в течение 15 минут и затем добавляли 0,2% Triton X-100 в течение 2 мин. Фиксированные клетки трижды промывали PBS по 15 мин и инкубировали в течение 40 мин с первичными антителами, а затем в течение 40 мин с вторичными антителами, конъюгированными с флуорохромом. В качестве первичных антител использовали анти-E-кадгерин и анти- $\beta$ -катениновые антитела. В качестве вторичных антител использовали протестированный специфичный для класса Alexa Fluor 594 конъюгированный козлий анти-мышиный IgG2a и анти-мышиный IgG Alexa 488. Все антитела были разведены в соответствии рекомендациями производителя. Ядра окрашивали DAPI. Клетки анализировали с помощью микроскопа Zeiss AxioPlan, оснащенного объективом Plan Neofluar  $\times 63$ . Изображения были получены с помощью цифровой камеры Olympus DP70 с ПО DP Controller.

#### **2.2.8. Методы статистической обработки данных**

Для анализа полученных в ходе работы данных применяли следующие методы статистической обработки: вычисление медианы с межквартильным размахом или среднего

значения и ошибки среднего, сравнение двух выборочных совокупностей с использованием непараметрического критерия Манна-Уитни, оценка степени корреляции с использованием коэффициента Спирмана. Данные среди нескольких групп сравнивали с помощью одностороннего дисперсионного анализа (ANOVA). Все данные обчитывались с помощью ПО, перечисленного в разделе 2.1.2. Различия считали статистически значимыми при значениях  $p \leq 0,05$ .

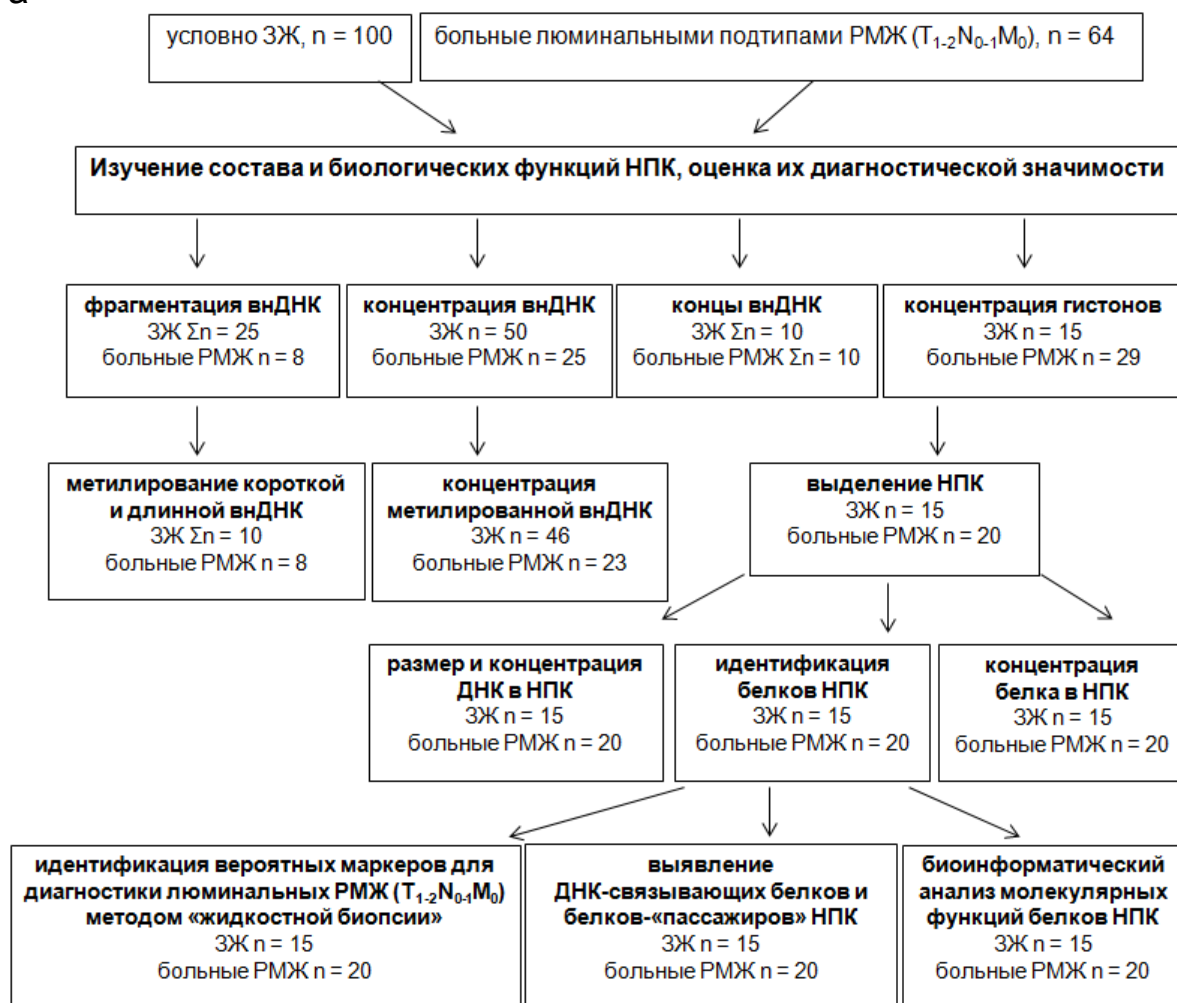
## ГЛАВЫ 3 – 5.

### **Циркулирующие дезоксирибонуклеопротеиновые комплексы и экзосомы в крови больных раком молочной железы: особенности состава, биологические функции и диагностический потенциал**

#### **(Результаты и обсуждение)**

Внеклеточные нуклеиновые кислоты циркулируют как в виде комплексов с биополимерами, так и в составе мембранных частиц/везикул, поэтому объектами исследования являлись дезоксирибонуклеопротеиновые комплексы и экзосомы крови условно ЗЖ и больных РМЖ. Дизайн исследования приведен на рисунке 10. Для исследования распределения, состава и биологических функций дезоксирибонуклеопротеиновых комплексов и экзосом, а также установления диагностической значимости их анализа были получены образцы венозной крови условно ЗЖ ( $n = 190$ ) и больных РМЖ ( $n = 194$ , таблица 3). Группа условно ЗЖ была сформирована на основе анкетирования, а также клинического обследования (см. п. 2.1.5). Группу первичных больных РМЖ ( $T_{1-2}N_{0-1}M_0$ ) составили пациентки Онкологического отделения № 2 (Отделение патологии молочной железы) Новосибирского областного клинического онкологического диспансера, их них 101 больная (78%) с люминальным РМЖ, 29 (22%) – с ТН-РМЖ. Поскольку в экспериментах были использованы только образцы, хранившиеся менее года, для каждого этапа исследований создавали новый банк образцов; информация о количестве условно ЗЖ и больных РМЖ, вовлеченных в отдельные эксперименты, отражена на рисунке 10 и в таблицах, приведенных в соответствующих разделах Глав 3 – 5. Кроме того, для некоторых экспериментов в связи с низкой концентрацией исследуемых объектов в крови требовалось объединение образцов. В частности, сравнительный анализ концентрации и аберрантного метилирования вДНК, циркулирующей в плазме и ассоциированной с ФЭК больных РМЖ по сравнению с условно ЗЖ проведен на индивидуальных образцах, а исследование природы концов ДНК – на пулированных образцах. Аналогично, анализ фрагментации вДНК и оценка индекса метилирования коротких и длинных фрагментов проведена на пулированных образцах условно ЗЖ и индивидуальных образцах больных РМЖ (рис. 10а). Выделение нативных НПК с последующей характеристикой нуклеиновой и белковой составляющих проводили из индивидуальных образцов крови условно ЗЖ и больных РМЖ (рис. 10а).

а



б

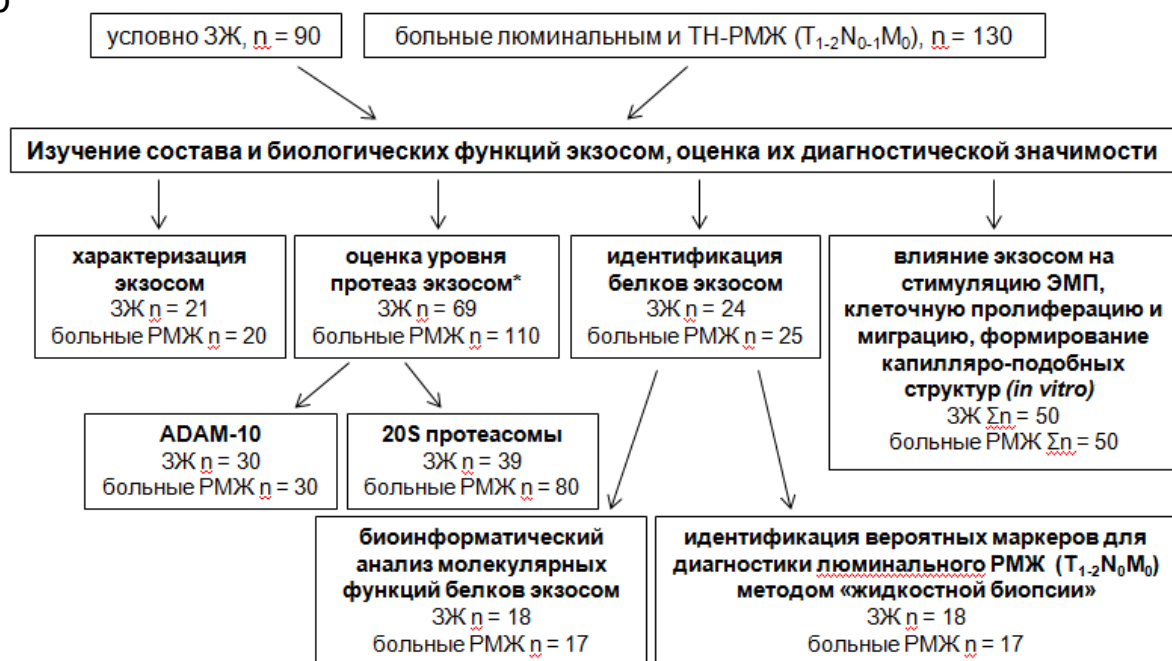


Рисунок 10 – Дизайн исследования НПК (а) и экзосом (б), циркулирующих в крови условно ЗЖ и больных РМЖ. Знаком  $\Sigma$  отмечены пулированные образцы, знаком \* отмечены образцы экзосом, в которых был оценен уровень экзосомальных протеаз, затем они были объединены и использованы в экспериментах *in vitro*.

Характеризация, оценка уровня экзосомальных протеаз и идентификация белков экзосом плазмы и экзосом крови проведена на индивидуальных образцах условно ЗЖ и больных РМЖ, исследование влияния экзосом на ЭМП, клеточную пролиферацию и миграцию, а также формирование капилляро-подобных структур – на пулированных образцах (рис. 10б).

## **ГЛАВА 3.**

### **Дезоксирибонуклеопротеиновые комплексы в крови условно здоровых женщин и больных РМЖ**

Строение, свойства и биологическая активность НПК, особенности их циркуляции и белкового состава в настоящее время недостаточно изучены, однако ряд исследований указывают на то, что с их помощью функционально активные ДНК могут транспортироваться в другие клетки, они необходимы для нормального функционирования многоклеточных организмов и могут быть связаны с развитием ряда патологических процессов. Действительно, при развитии онкологических заболеваний происходит не только увеличение концентрации вДНК в крови, но и вДНК имеет те же изменения, что и ДНК в клетках опухоли, а от гидролиза эндогенными нуклеазами эту ДНК защищают имеющие ДНК-связывающие мотивы белки, формируя НПК. Исследование распределения опухолеспецифических ДНК в составе коротких и длинных фрагментов вДНК в составе НПК, а также сравнительный анализ белков в составе НПК, циркулирующих в крови здоровых женщин и больных РМЖ, позволит расширить фундаментальные знания о механизмах, которые приводят к появлению и обеспечивают циркуляцию в крови данных комплексов, а также оценить их диагностическую значимость.

#### **3.1. Характеризация дезоксирибонуклеиновой составляющей циркулирующих в крови НПК**

Считается, что вДНК представлена короткими фрагментами преимущественно геномной ДНК, циркулирующими в виде двухцепочечных молекул, кратных нуклеосоме. Было показано, что концентрация и профиль фрагментации вДНК различаются в здоровом состоянии, при травмах, раке, аутоиммунных и инфекционных заболеваниях [95]. Гидролиз ДНК определяет не только фрагментацию, но и структуру концов ДНК. Поскольку активность нуклеаз различается в норме и при развитии онкологического заболевания, концентрация, размер и концы вДНК были проанализированы в крови условно ЗЖ и больных РМЖ.

##### **3.1.1. Концентрация и фрагментация вДНК в крови условно здоровых женщин и больных РМЖ**

Известно, что повышенная концентрация вДНК является признаком прогрессирования опухоли [13]. В текущем исследовании концентрация вДНК в плазме и элюатах с

поверхности ФЭЖ условно ЗЖ (n=50) и больных РМЖ (n=25, таблица 7) была определена с помощью ПЦР в режиме «реального времени» на LINE-1 элемент после выделения вДНК коммерческим набором «BPD-100», позволяющим эффективно выделять ДНК длиной от 50 п.н. до 20 т.п.н. Образцы выделенных вДНК были сконцентрированы до 30 мкл путём пересадения с ТЕА и гликогеном, поскольку данный метод является наиболее эффективным для пересадения малых количеств ДНК [440].

*Таблица 7 – Клинико-патологическая характеристика группы больных люминальным РМЖ, образцы крови которых использованы для оценки концентрации вДНК*

Клинико-патологические характеристики		Частота встречаемости
Стадия опухоли*	T1	8 (32%)
	T2	17 (68%)
Метастазы в регионарных лимфоузлах	N0	19 (76%)
	N1	6 (24%)
Удаленные метастазы	M0	25 (100%)
Степень злокачественности	II	25 (100%)
Гистологический тип	Инвазивная протоковая карцинома	25 (100%)

Повторы LINE1-элемента являются одними из наиболее распространенных в геноме человека (17% генома) и представлены  $5,2 \times 10^5$  копий [450]. LINE1-элемент относится к семейству автономных транспозонов – длинных перемещающихся ядерных элементов, расположенных в неактивном хроматине. Подавляющее большинство LINE-элементов является некодирующими последовательностями и плотно метилированы в нормальных соматических клетках. Наличие данных ретроэлементов необходимо для организации генома в активные или неактивные регионы, для подавления транскрипционного шума, а также регулирования транскрипционной активности [451]. Последовательности LINE1-элементов равномерно распределены по геному, что является большим преимуществом при использовании данного гена в качестве мишени для измерения общей концентрации ДНК в образце, поскольку вДНК представлена фрагментами разной длины и гетерогенна по своему составу.

Использованная TaqMan-ПЦР на LINE1-элемент позволяет с чувствительностью 5 пг геномной ДНК в образце, относительной погрешностью 10% и эффективностью амплификации не ниже 95% определять концентрацию ДНК в образце. Выявлено

статистически значимое увеличение концентрации вДНК в плазме больных РМЖ по сравнению с условно ЗЖ (медиана 23,5 по сравнению с 10,5 нг/мл крови,  $p = 0,0056$ , U-критерий Манна-Уитни) (рисунок 11а), что согласуется с литературными данными [13].

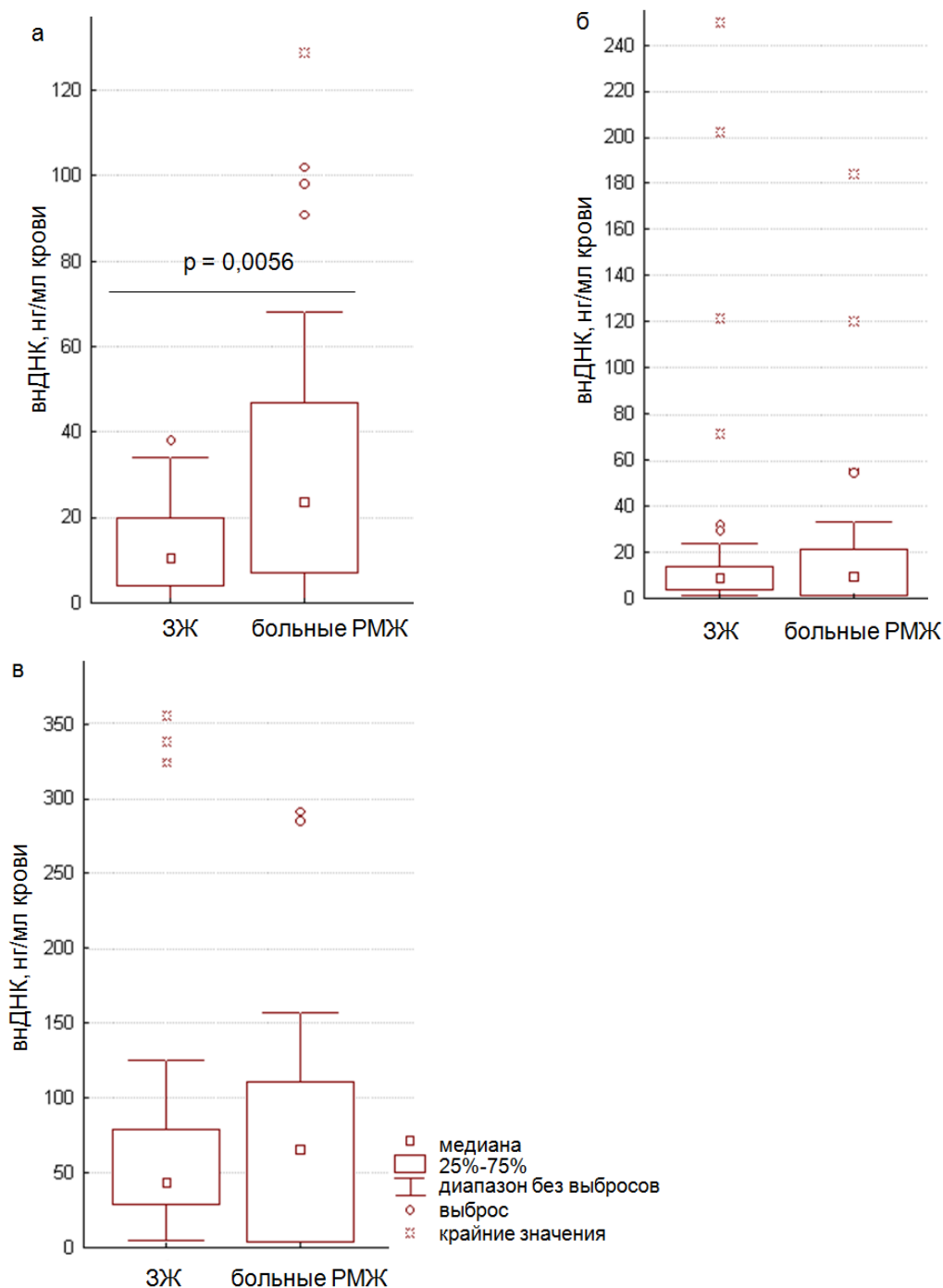


Рисунок 11 – Концентрация вДНК в плазме крови (а), PBS-EDTA элюате (б) и трипсиновом элюате (в) с поверхности ФЭК условно ЗЖ ( $n = 50$ ) и больных РМЖ ( $n = 25$ ).

В то же время не выявлено статистически значимых различий в концентрации вДНК в элюатах с поверхности ФЭК у условно ЗЖ и больных РМЖ: PBS-EDTA элюате медиана концентрации вДНК составила 8,5 и 10,3 нг/мл крови (рисунок 11б), в трипсиновом элюате – 6,6 и 43 нг/мл крови (рисунок 11в), соответственно. У всех онкологических больных



концентрация вДНК в плазме и на поверхности ФЭК не коррелировала со стадией заболевания.

Основным методом, при помощи которого разделяют и визуализируют нуклеиновые кислоты, является электрофорез в агарозном, ПАА или смешанном агарозно-ПАА гелях. Однако данный метод не позволяет получить полную информацию о представленности фрагментов в общем пуле циркулирующих ДНК, поскольку некоторые фрагменты могут быть представлены в недостаточном количестве для их детекции при помощи интеркалирующих красителей. Кроме того, размер пор геля также вносит ограничения в выявление коротких и длинных фрагментов ДНК.

В текущей работе для анализа фрагментации вДНК в плазме и ассоциированной с ФЭК ДНК был использован капиллярный электрофорез, преимуществом которого по сравнению с обычным электрофорезом является возможность анализировать минимальное количество образца (от 5 пг), с диапазоном разделения от 50 п.н. до 7 т.п.н., что, безусловно, делает его наиболее подходящим для изучения фрагментации циркулирующих нуклеиновых кислот, концентрация которых невысока [452]. Дизайн эксперимента приведен на рисунке 12.

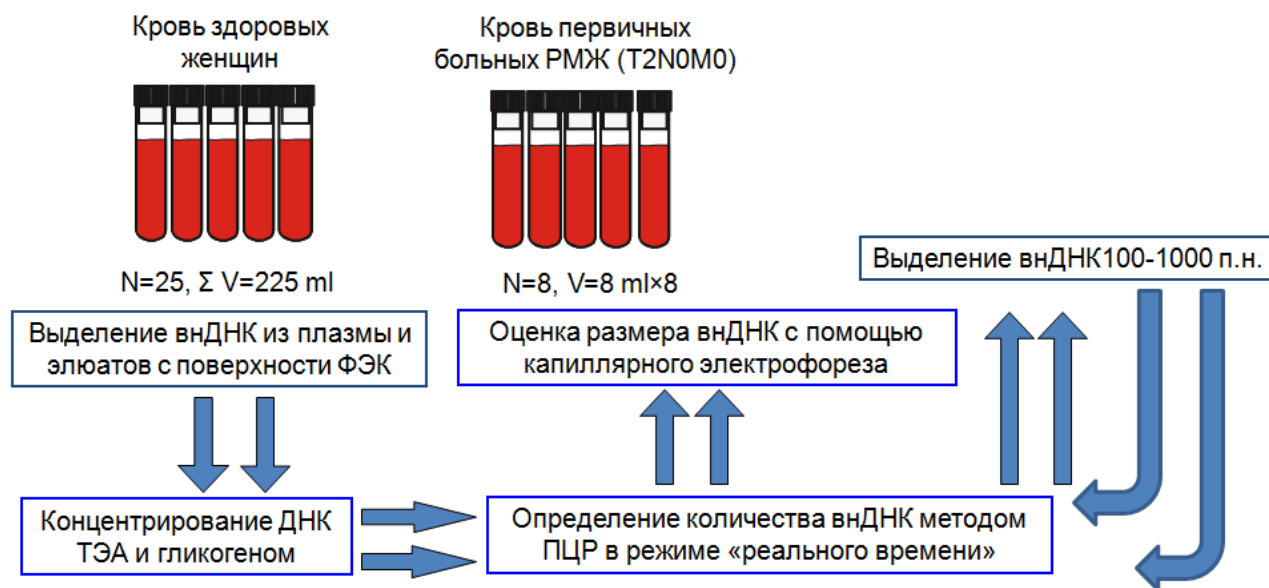


Рисунок 12 – Дизайн эксперимента по оценке профиля фрагментации вДНК крови.

Поскольку в плазме крови условно ЗЖ концентрация вДНК крайне низка, для исследования профиля фрагментации ДНК в крови индивидуальные образцы крови контрольных доноров ( $n = 25$ ) были объединены. Было показано, что в плазме крови условно ЗЖ преобладают фрагменты вДНК размером  $\sim 180$  п.н., а фрагменты ДНК размером 8 022 и 13 810 п.н. представлены в меньшей степени, при этом ассоциированная с ФЭК ДНК

представлена преимущественно длинными фрагментами (от 3765 до 14490 п.н. в PBS-EDTA элюате; от 1522 до 14135 п.н. в трипсиновом элюате) (рисунок 13 а-в).

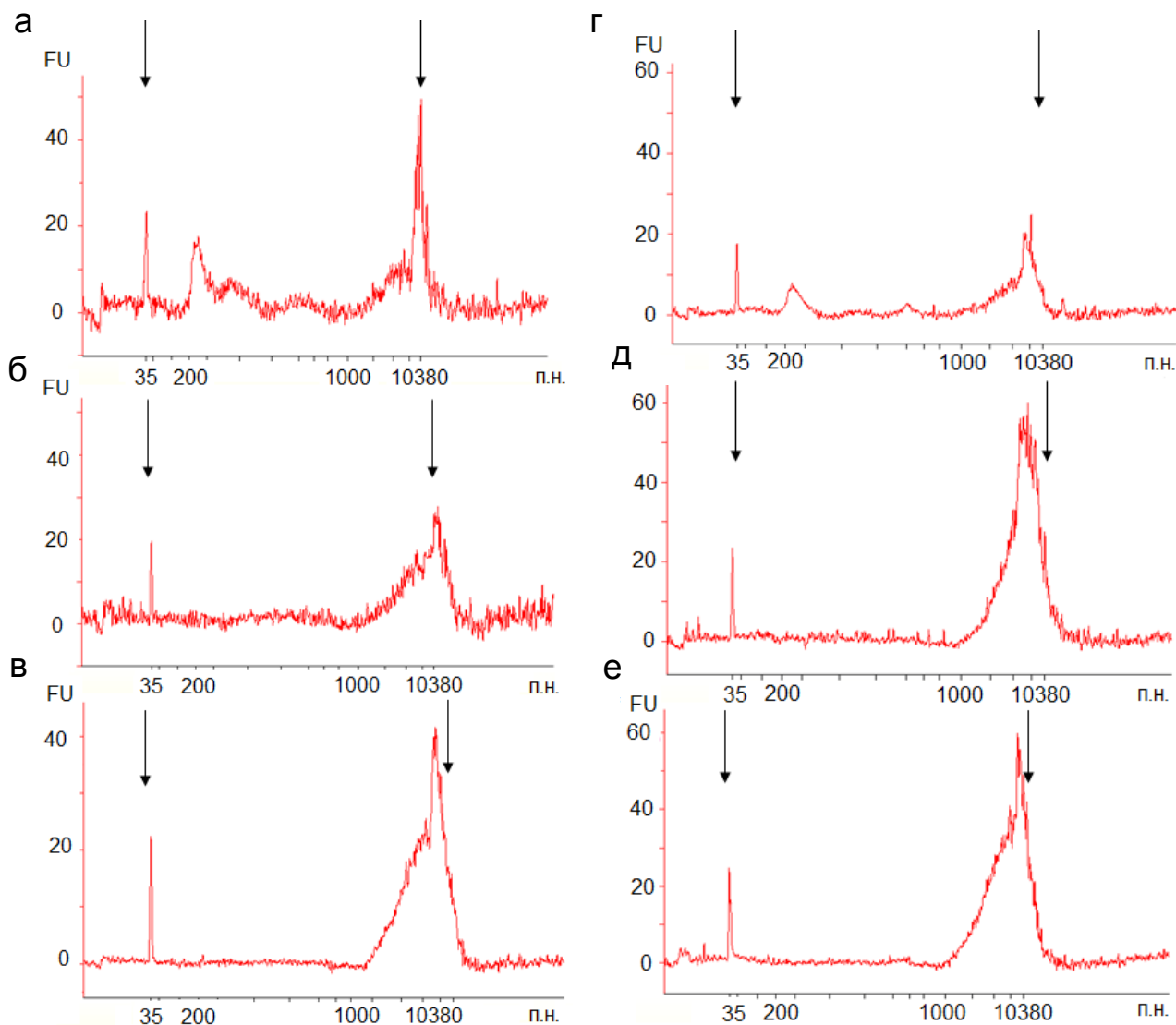


Рисунок 13 – Электрофореграмма вДНК из интегральных образцов плазмы крови (а), PBS-EDTA элюата (б) и трипсинового элюата (в) с поверхности ФЭК условно ЗЖ ( $n = 25$ ). Типичная электрофореграмма вДНК индивидуальных образцов плазмы крови (г), PBS-EDTA элюата (д) и трипсинового элюата (е) с поверхности ФЭК больных РМЖ (приведены распределение ДНК по длине в образцах от одного из 8 пациентов). Стрелками указаны положения маркеров длиной 35 п.н. и 10.380 п.н.

Профиль фрагментации вДНК в крови больных РМЖ исследован в индивидуальных образцах ( $n = 8$ , таблица 8). Было показано, что во всех образцах плазмы крови больных РМЖ преобладали длинные фрагменты ДНК, а фрагменты  $\sim 171$  и  $\sim 180$  п.н. были представлены в гораздо меньшей степени (рисунок 13 г). Короткие фрагменты ДНК являлись минорным компонентом в составе ассоциированной с ФЭК ДНК крови как у условно ЗЖ, так и у больных РМЖ (рисунки 13 д,е).

Таблица 8 – Клинико-патологическая характеристика группы больных люминальным А подтипом РМЖ, образцы крови которых использованы для оценки фрагментации вДНК

Клинико-патологические характеристики		Частота встречаемости
Стадия опухоли	T2	8 (100%)
Метастазы в регионарных лимфоузлах	N0	8 (100%)
Удаленные метастазы	M0	8 (100%)
Степень злокачественности	II	8 (100%)
Гистологический тип	Инвазивная протоковая карцинома	8 (100%)

Поскольку с помощью капиллярного электрофореза не удалось оценить долю индивидуальных фрагментов в общем пуле анализируемой ДНК, короткие фрагменты вДНК (от 100 до 1000 п.н.) были выделены из различных фракций крови с помощью электроэлюции из ПААГ с последующей оценкой доли коротких фрагментов в составе вДНК с использованием количественной ПЦР на LINE1-элемент.

Для оценки эффективности выделения нуклеиновых кислот из геля в качестве контроля были использованы маркер длины ДНК M16 от 100 п.н. до 1000 п.н. (в количестве 3 мкг) и ПЦР-продукт гена RARβ2 длиной 194 п.н. (в количестве 1 нг и 40 пг). Концентрацию выделенного маркера M16 оценивали спектрофотометрически, а ПЦР-продукт – при помощи количественной ПЦР на независимый от метилирования и конвертирования участок гена RARβ2. Эффективность выделения маркера ДНК длиной от 100 п.н. до 1000 п.н. составила 90%, ПЦР-продукта – 91% и 80% для 1 нг и 40 пг, соответственно.

Было обнаружено, что доля коротких фрагментов в плазме крови условно ЗЖ составляет ~20% вДНК, а у больных РМЖ ~2%. В составе ассоциированной с ФЭК ДНК короткие дезоксирибонуклеиновые фрагменты практически отсутствуют как в норме, так и при развитии онкологического заболевания (0,1 – 0,9%) (Таблица 9).

Таблица 9 – Распределение коротких (100-1000 п.н.) и длинных фрагментов (более 1 т.п.н.) в составе вДНК крови условно ЗЖ и больных РМЖ, (%)

ДНК фрагменты	Условно ЗЖ			Больные РМЖ		
	Плазма	PBS-EDTA элюат	Трипсиновый элюат	Плазма	PBS-EDTA элюат	Трипсиновый элюат
100-1000 п.н.	18,7	0,9	0,1	2,6±1,4	0,3±0,1	0,2±0,1
> 1000 п.н.	81,3	99,1	99,9	97,5±1,4	99,7±0,1	99,8±0,1

Полученные результаты о фрагментации внДНК в плазме крови условно ЗЖ согласуются с литературными данными [38, 64, 453], а характерная апоптотическая лестница позволяет предположить, что короткие фрагменты ДНК в кровотоке появляются в результате естественной гибели клеток во время их регенерации; хотя нуклеосомы захватываются макрофагами и соседними клетками, часть нуклеосом всё же высвобождается в циркуляцию.

Источниками появления длинных фрагментов ДНК (выше 2 т.п.н.) в плазме крови может быть как активная секреция живыми клетками, так и некротические процессы. Однако поскольку в норме некротические клетки в основном не обнаруживаются, этот тип клеточной гибели не может обеспечить значительную часть внДНК в плазме, хотя он часто наблюдается при развитии опухолей, вероятно, в результате недостаточной васкуляризации [50].

Наряду с фрагментированными ДНК в формирование пула внДНК крови также вносят значимый вклад нуклеиновые кислоты, взаимодействующие с клетками крови и эндотелием сосудов. Наличие преимущественно длинных фрагментов ДНК в составе ассоциированной с ФЭК ДНК крови условно ЗЖ и больных РМЖ может объясняться устойчивостью нуклеиновых кислот, связанных с поверхностью клеток, к действию нуклеаз.

### **3.1.2. Концы циркулирующей в крови внДНК**

На источник происхождения внДНК в циркуляции кроме профиля фрагментации может пролить свет информация о концах двухцепочечных дезоксирибонуклеиновых фрагментов. Исследование характера гидролиза клеточной ДНК в зависимости от типа клеточной смерти показало, что в составе апоптотической ДНК наблюдаются разрывы с тупыми концами, а также с 5'- и 3'-выступающими концами, а в результате некротической гибели клетки обнаруживаются только фрагменты ДНК с 5'-выступающими концами [454, 455].

Дизайн эксперимента по исследованию концов внДНК крови приведен на рисунке 14.

Объединенные образцы как внДНК плазмы, так и ассоциированной с ФЭК ДНК крови условно ЗЖ ( $n = 10$ ) демонстрируют гетерогенность на концах – были обнаружены молекулы с 5'-выступающими, 3'-выступающими и тупыми концами (рисунок 15а).

Объединенные образцы внДНК плазмы первичных больных люминальным А подтипом РМЖ ( $T_2N_0M_0$ ,  $n = 10$ , таблица 10) содержат преимущественно выступающие на 3 нуклеотида 3'-концы и выступающие на 2 нуклеотида 5'-концы, а ассоциированная с ФЭК ДНК – только выступающие на 2 нуклеотида 5'-концы (рисунок 15б).

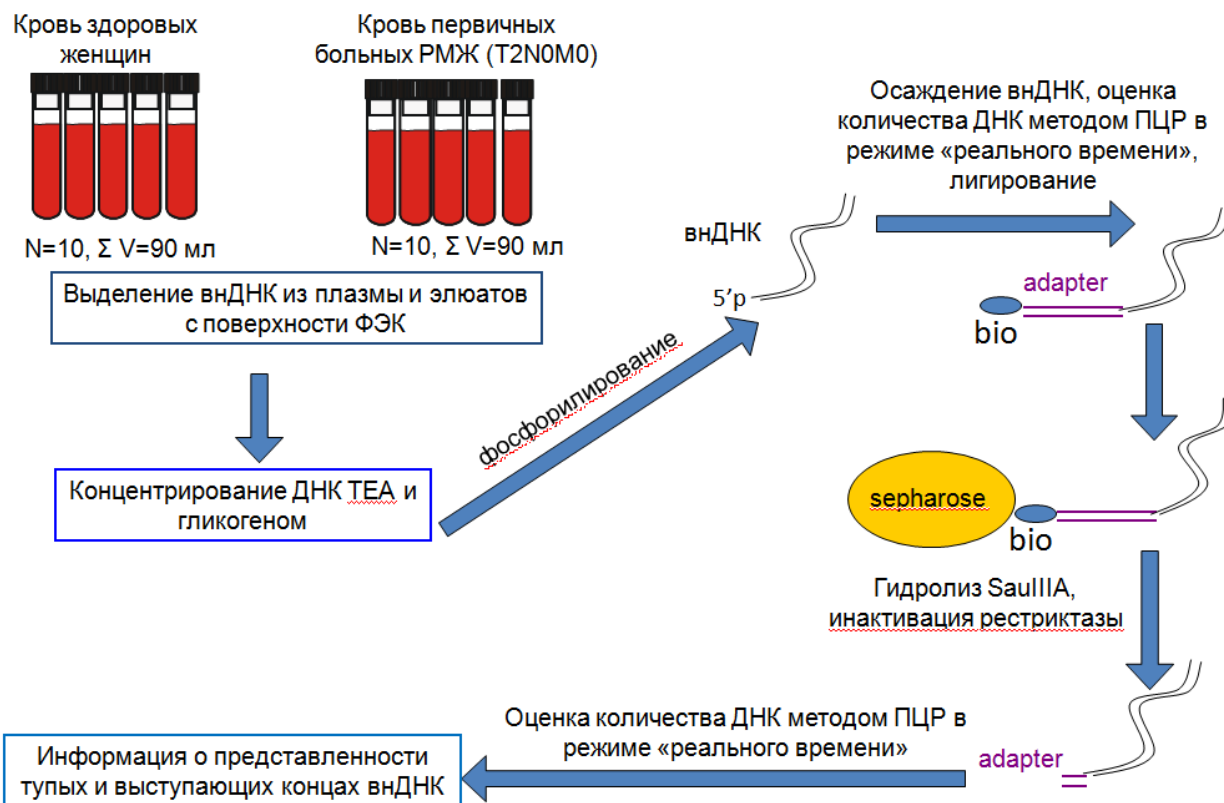


Рисунок 14 – Дизайн эксперимента по исследованию концов вДНК крови.

Известно, что фрагменты ДНК с тупыми 5'-фосфорилированными концами обнаружены в апоптотических, но не в некротических клетках. Кроме того, гиперпредставленность 5'-выступающих концов по сравнению с тупыми и 3'-выступающими концами типична для раннего некроза [454]. Следует отметить, что двухцепочечные олигонуклеотиды, имеющие различные вариации выступающих концов ( $\pm 3$  н) не покрывают все варианты молекул ДНК, циркулирующих в крови.

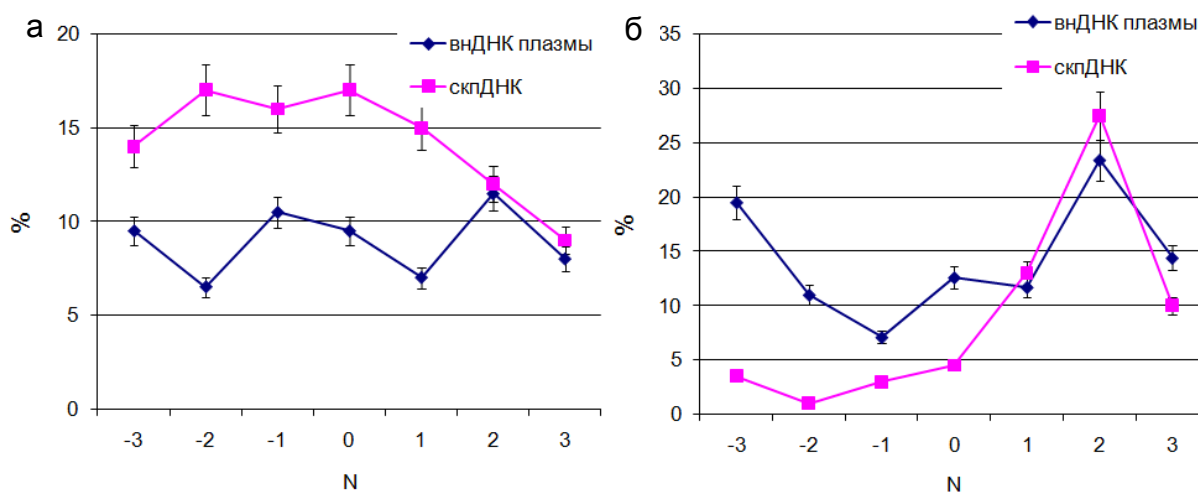


Рисунок 15 – Представленность выступающих и тупых концов в составе вДНК крови условно ЗЖ (n = 10) (а) и больных РМЖ (n = 10) (б).

Таблица 10 – Клинико-патологическая характеристика группы больных люминальным А подтипом РМЖ, образцы крови которых использованы для оценки природы концов вДНК

Клинико-патологическая характеристика		Частота встречаемости
Стадия опухоли	T2	10 (100%)
Метастазы в регионарных лимфоузлах	N0	10 (100%)
Удаленные метастазы	M0	10 (100%)
Степень злокачественности	II	10 (100%)
Гистологический тип	Инвазивная протоковая карцинома	10 (100%)

Полученные в работе данные о представленности концов и профилю фрагментации вДНК плазмы и ассоциированной с ФЭК ДНК указывают, что в норме не менее 20% вДНК плазмы имеют апоптотическое происхождение. Присутствие длинных фрагментов вДНК с повышенной представленностью 5'-выступающих концов в крови первичных больных РМЖ (T<sub>2</sub>N<sub>0</sub>M<sub>0</sub>) свидетельствуют о том, что при раке не менее 1/3 вДНК высвобождается в кровь из некротических клеток.

### 3.1.3. Распределение aberrантно-метирированной ДНК в составе короткой и длинной вДНК при РМЖ

Поскольку ранее было показано, что метилированная ДНК более стабильна, чем неметирированная [456] и легко связывается с клетками [59, 457], на следующем этапе была проведена оценка aberrантно метилированной вДНК в плазме и элюатах с поверхности ФЭК. В качестве мишени была выбрана промоторная область гена *RARβ2*, который метилируется с высокой частотой [458]. Известно, что *RARβ2* – ген, кодирующий ядерный рецептор ретиноидной кислоты, играет критическую роль во время эмбрионального развития, гомеостаза, роста и дифференцировки клеток. Было показано, что *RARβ2* метилирован в 10,4% раковой ткани по сравнению с 0% в соседней нормальной ткани молочной железы [459]. По другим данным, процент aberrантного метилирования промотора *RARβ2* в опухолевой ткани выше – 46% по сравнению с 4% в нормальной ткани молочной железы [460]. Несмотря на то, что увеличение метилирования *RARβ2* было ниже в образцах вДНК плазмы по сравнению с опухолевыми тканями [461, 462], этот эпигенетический онкомаркер считается перспективным для использования в диагностических панелях, разрабатываемых для «жидкостной биопсии». Более того, в наших

ранних исследованиях мы наблюдали повышение его выявляемости в ассоциированной с ФЭК ДНК [59, 463].

Короткие фрагменты (100-1000 п.н.) вДНК и исходная вДНК из плазмы, PBS-EDTA и трипсинового элюатов крови условно ЗЖ ( $n = 10$ ) и больных РМЖ (таблица 8) были модифицированы бисульфитом. Для оценки количества метилированных и неметилированных фрагментов последовательности *RARβ2* в качестве калибровки использовали ПЦР-продукты гена *RARβ2* длиной 186 п.н. и 161 п.н., соответственно. Используемая в работе ПЦР-система, специфичная к метилированию, обладает аналитической чувствительностью 50 копий/образец, точность, характеризуемая относительной погрешностью, составляет 90%, эффективность амплификации не ниже 75%. Независимая от метилирования ПЦР-система обладает чувствительностью 50 копий/образец, относительной погрешностью 10% и эффективностью амплификации не ниже 80%. Поскольку в образцах было различное соотношение плазмы и ФЭК, концентрация вДНК приведена в пг/мл крови.

Было показано, что как в норме, так и при патологии метилированные последовательности промоторной области гена *RARβ2* выявляются только в составе длинных фрагментов вДНК, при этом индекс метилирования в крови условно ЗЖ не превысил 10%, а у больных РМЖ достигал 61% (таблица 11).

Полученные результаты доказывают, что наиболее ценным источником опухолеспецифической ДНК для «жидкостной биопсии» являются длинные фрагменты вДНК, ассоциированные с поверхностью ФЭК. Во-первых, анализ такой ДНК снижает влияние естественной фрагментации ДНК на данные ПЦР [464]. Во-вторых, ассоциированная с поверхностью ФЭК ДНК обогащена метилированной ДНК, что подтверждается индексом метилирования *RARβ2*.

На следующем этапе была проведена оценка концентрации aberrантно метилированного *RARβ2* в образцах вДНК плазмы и ассоциированной с поверхностью ФЭК ДНК из крови условно ЗЖ ( $n = 46$ ) и первичных больных РМЖ ( $n = 23$ , таблица 7). Медиана концентрации aberrантно метилированного гена *RARβ2* в плазме больных РМЖ составила около 72 пг/мл крови (ДНК была обнаружена в 52% (12/23) образцов с диапазоном 0–442 пг/мл) (рисунок 16а). В плазме условно ЗЖ метилированный *RARβ2* был обнаружен в 37% (17/46) образцов в диапазоне 0–261 пг/мл (рисунок 16а). Не выявлено статистически значимых различий между концентрациями метилированной ДНК в PBS-EDTA элюатах у условно ЗЖ и больных РМЖ (рисунок 16б), при этом только 35% и 26% образцов содержали метилированный *RARβ2*.

Таблица 11 – Индекс метилирования\* в составе вДНК, выделенных из индивидуальных образцов крови условно ЗЖ и больных РМЖ, среднее±SD\*\*

Фракция крови	ДНК	Условно ЗЖ (n=10)	Больные РМЖ (n=8)	<i>p</i>
Плазма	Суммарная ДНК	10±3	33±11	<0,05
	100-1000 п.н.	0	0	
PBS-EDTA элюат	Суммарная ДНК	9±4	15±6	
	100-1000 п.н.	0	0	
Трипсиновый элюат	Суммарная ДНК	7±4	61±12	<0,05
	100-1000 п.н.	0	0	

\*Индекс метилирования рассчитывался как отношение метилированной формы гена *RARβ2* к неметилированной, умноженный на 100%.

\*\* Концентрация вДНК ниже чувствительности метода обозначена как 0.

Достоверное увеличение концентрации метилированной ДНК в трипсиновых элюатах было обнаружено у онкологических больных по сравнению с условно ЗЖ (медиана 381 против 151 пг/мл крови, U-критерий Манна-Уитни) (рисунок 16в). В частности, aberrantly метилированный ген *RARβ2* был обнаружен в 96% (22/23) у больных РМЖ в диапазоне концентрации 0–1484 пг/мл и в 57% (26/43) у условно ЗЖ в диапазоне 0–470 пг/мл. Выявленные различия между онкологическими больными и контролем совпадают с опубликованными данными для рака легкого [463].

Сравнительный анализ концентрации aberrantly метилированного гена *RARβ2* во вДНК плазмы и ассоциированной с ФЭК ДНК у больных РМЖ выявил достоверно повышенную концентрацию опухоли-ассоциированной ДНК в трипсиновом элюате по сравнению с плазмой и PBS-EDTA элюатом (381 против 72 пг/мл,  $p = 0,000001$  и 381 против 0 пг/мл,  $p = 0,00001$ , соответственно). Эти данные совпадают с данными по индексу метилирования гена *RARβ2* в крови больных РМЖ (таблица 11).

Не выявлено связи между значениями концентрации aberrantly метилированного гена *RARβ2* в ДНК плазмы и ассоциированной с ФЭК ДНК со стадиями опухоли или метастазами в регионарные лимфатические узлы. Тем не менее, была обнаружена достоверная корреляция между повышенной концентрацией метилированной ДНК в плазме и возрастом условно ЗЖ (коэффициент Спирмана  $R = 0,45$ ,  $p = 0,001$ ) (рисунок 17). Таким образом, формирование сопоставимой по возрасту группы сравнения крайне важно при оценке диагностической значимости метилированных маркеров в составе вДНК.



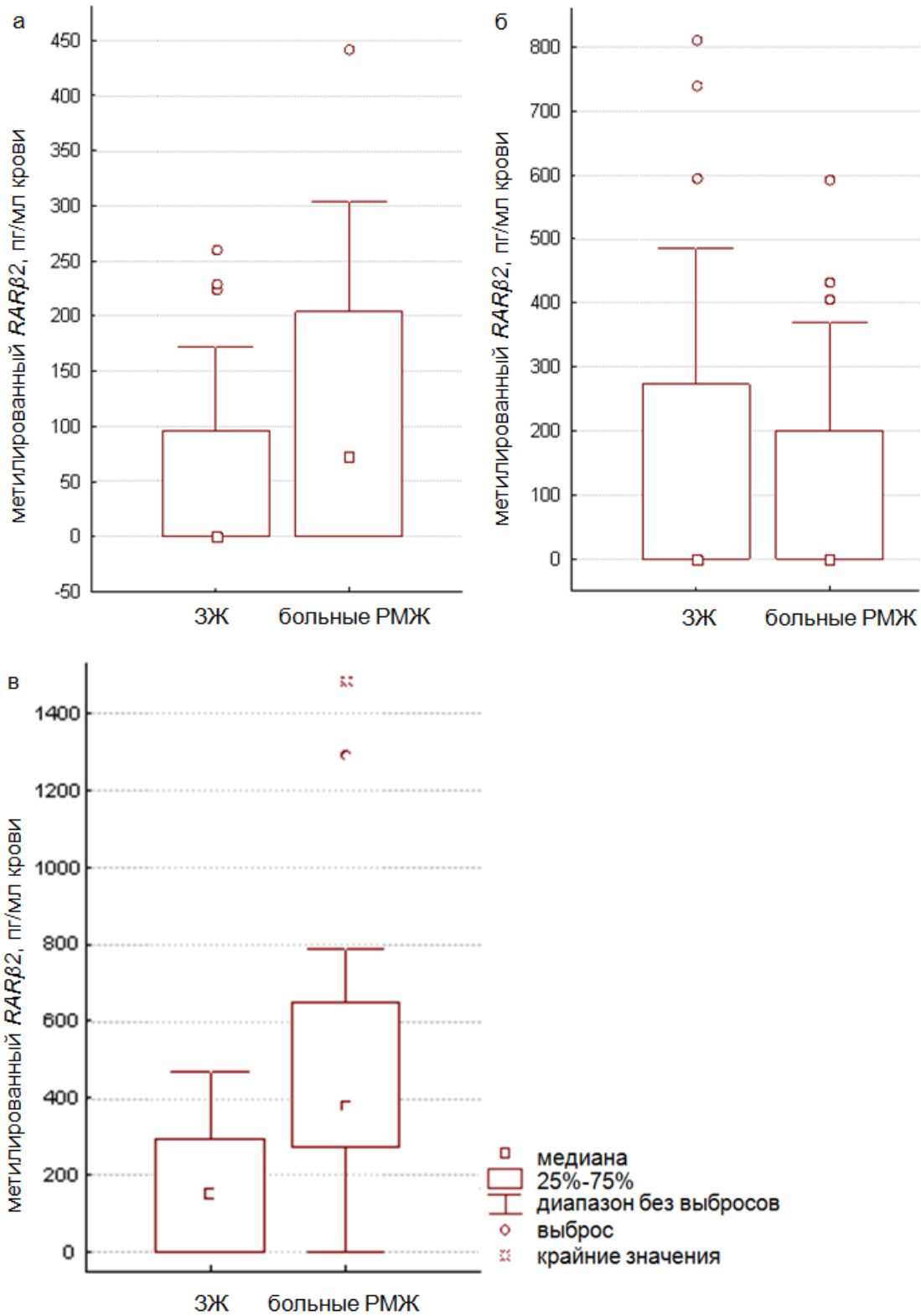


Рисунок 16 – Концентрация aberrantly метилированного *RARβ2* в крови условно ЗЖ ( $n = 46$ ) и больных РМЖ ( $n = 23$ ) плазма (а); PBS-EDTA элюат (б); трипсиновый элюат (в).

Таким образом, несмотря на некоторые неудобства выделения ассоциированной с ФЭК ДНК, эта фракция вДНК демонстрирует очевидные преимущества в качестве источника опухолеспецифичной метилированной ДНК.

Следует отметить, что опухолевая ДНК обычно представляет собой незначительную часть циркулирующей ДНК и обнаруживается в низких концентрациях, что требует высокой специфичности ПЦР [13, 465]. Для увеличения количества анализируемой опухолевой ДНК требуется либо увеличение объема венозной крови (что крайне проблематично для больных с далеко зашедшими стадиями, сопровождающимися анемией, при этом не происходит увеличения соотношения метилированных и неметилированных форм), либо использование вДНК, обогащенной опухолевой ДНК, такой как ассоциированная с ФЭК ДНК. Концентрация вДНК и их размер/фрагментация определяются не только неравномерной фрагментацией генома при гибели клеток, но и нуклеазами и протеазами, гидролизующими вДНК в составе НПК [464].

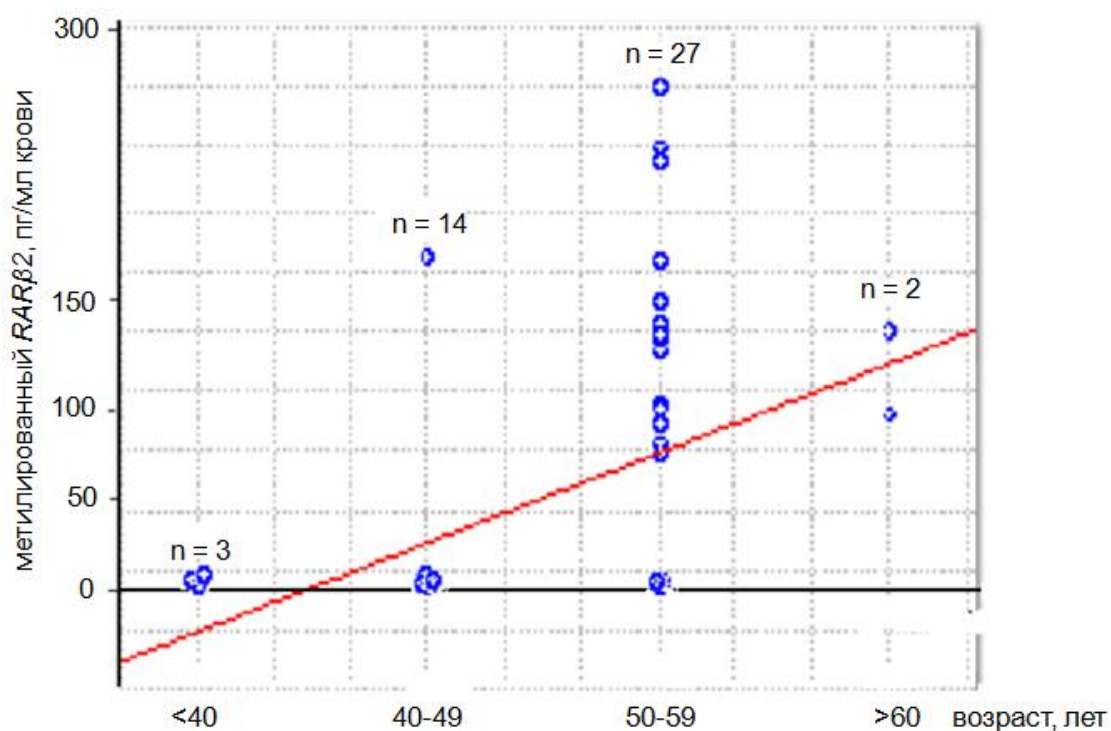


Рисунок 17 – Зависимость концентрации aberrантно метилированного гена *RARβ2* в плазме крови от возраста условно ЗЖ (n = 46).

Эти особенности вДНК накладывают различные ограничения как на методы выделения, так и на последующий анализ [466]. По одним данным вДНК онкологических больных имеет высокую фрагментацию, по другим в равной степени представлены короткие и длинные фрагменты [467]. Таким образом, в литературе нет единого мнения об индексе целостности вДНК, что крайне важно для разработки систем ПЦР для «жидкостной биопсии». В текущем исследовании было подтверждено наличие длинной ДНК на поверхности ФЭК. Более того, ДНК трипсинового элюата из крови больных РМЖ имеет повышенный индекс метилирования по сравнению с вДНК плазмы. Более ранние исследования показали, что чувствительность обнаружения метилированного гена

повышается при одновременном анализе вДНК плазмы и ДНК, ассоциированной с ФЭК больных раком желудка и легких [463, 468]. Эти различия могут быть связаны как с разными нозологиями, так и с разными конструкциями используемых ПЦР-систем. Однако авторы также показали, что одного анализа метилирования вДНК недостаточно для успешного обнаружения злокачественного новообразования. Причинами снижения эффективности ПЦР могут быть режим метилирования, когда не все CpG-динуклеотиды в промоторной области метилируются одновременно [461], а также аллель-специфическое метилирование [469, 470]. В то же время некоторые новые подходы, такие как использование NGS-секвенирования, нацеленного на конкретный локус, позволяют преодолеть такие ограничения [469, 470]. Несомненно, для повышения эффективности диагностической системы необходим дальнейший поиск онкомаркеров. Кроме того, эти молекулы могут быть использованы в мультимаркерном подходе, используемом в настоящее время для повышения чувствительности и специфичности тестов неинвазивной «жидкостной биопсии».

Следует отметить, что низкий уровень aberrантно метилированной ДНК во вДНК является серьезным ограничением для всех методов, направленных на анализ опухолевой ДНК, циркулирующей в крови. В связи с этим требуется разработка принципиально новых подходов к обогащению опухолевой ДНК из общего пула циркулирующей в крови ДНК.

### **3.2. Сравнительный анализ дезоксирибонуклеопротеиновых комплексов**

Поскольку белковый состав НПК крови может определять не только время жизни вДНК в циркуляции, но и её биологические функции, были разработаны два принципиально разных подхода для выделения нативных НПК крови, идентифицированы в их составе белки и с помощью биоинформатического анализа установлены ДНК-связывающие мотивы, а также молекулярные функции и биологические процессы, в которые вовлечены как ДНК-связывающие белки, так и белки-«пассажиры» НПК.

#### **3.2.1. НПК, выделенные сорбцией на мелкодисперсном стекле и аффинной хроматографией**

За основу метода выделения нативных НПК из плазмы крови был взят метод выделения вДНК, основанный на связывании ДНК с поверхностью мелкодисперсного стекла и позволяющий с эффективностью не менее 90% выделять ДНК размером свыше 100 п.н. [439]. Схема метода выделения НПК и идентификации белков в их составе представлена на рисунке 18.



Рисунок 18 – Схема метода выделения нативных НПК крови сорбцией на мелкодисперсном стекле с последующей идентификацией белков в их составе.

Для подбора оптимального связывания НПК за нуклеиновую компоненту с мелкодисперсным стеклом без разрушения НПК, были сформированы комплексы, содержащие ДНК и ДНК-связывающий белок лактоферрин – моносубъединичный гликопротеин с молекулярным весом ~80 кДа. Известно, что лактоферрин имеет два центра связывания с нуклеиновыми кислотами, отличающихся по аффинности; суммарная  $K_d$  составляет  $\sim 5 \times 10^{-7} \text{ М}$  [82]. Влияние буфера для сорбции и способа отмывки стекла на эффективность выделения НПК оценивали по белку и ДНК (6 выделений в дублях).

Электрофоретический анализ белков в составе элюированных НПК и белков, связанных с мелкодисперсным стеклом, с последующим их переносом на нитроцеллюлозную мембрану и окрашиванием коллоидным серебром показал, что в присутствии 10 мМ трис-ацетат (рН 5,0), 2 мМ  $\text{CaCl}_2$ , 0,5% Tween-20 комплексы ДНК с лактоферином связываются с поверхностью стекла, в то время как без ДНК лактоферрин практически не связывается с поверхностью стекла (рисунок 19а).

Связанные с поверхностью стекла НПК могут быть элюированы, однако они частично необратимо связываются с поверхностью стекла (рисунок 19а). Эффективность выделения радиоактивно-меченной ДНК в составе НПК при условии использования 50% емкости сорбента составляет не менее  $48 \pm 7\%$  (среднее  $\pm$  ошибка среднего) (рисунок 19б).

Таким образом, метод выделения НПК из биологических жидкостей, основанный на использовании мелкодисперсного стекла, может быть использован для исследования их состава и изучения транспорта в НПК.

Для подтверждения того, что выделяемые сорбцией на мелкодисперсном стекле НПК содержат ДНК, нуклеиновые кислоты из полученных препаратов НПК выделяли коммерческим набором для выделения ДНК «BPD-100» и концентрировали как описано в п. 2.2.1.1. С помощью капиллярного электрофореза было показано, что в составе циркулирующих в крови НПК преобладает двухцепочечная ДНК размером более 4 т.п.н., причем на поверхности ФЭК ее размер выше, чем в плазме (рисунок 20).

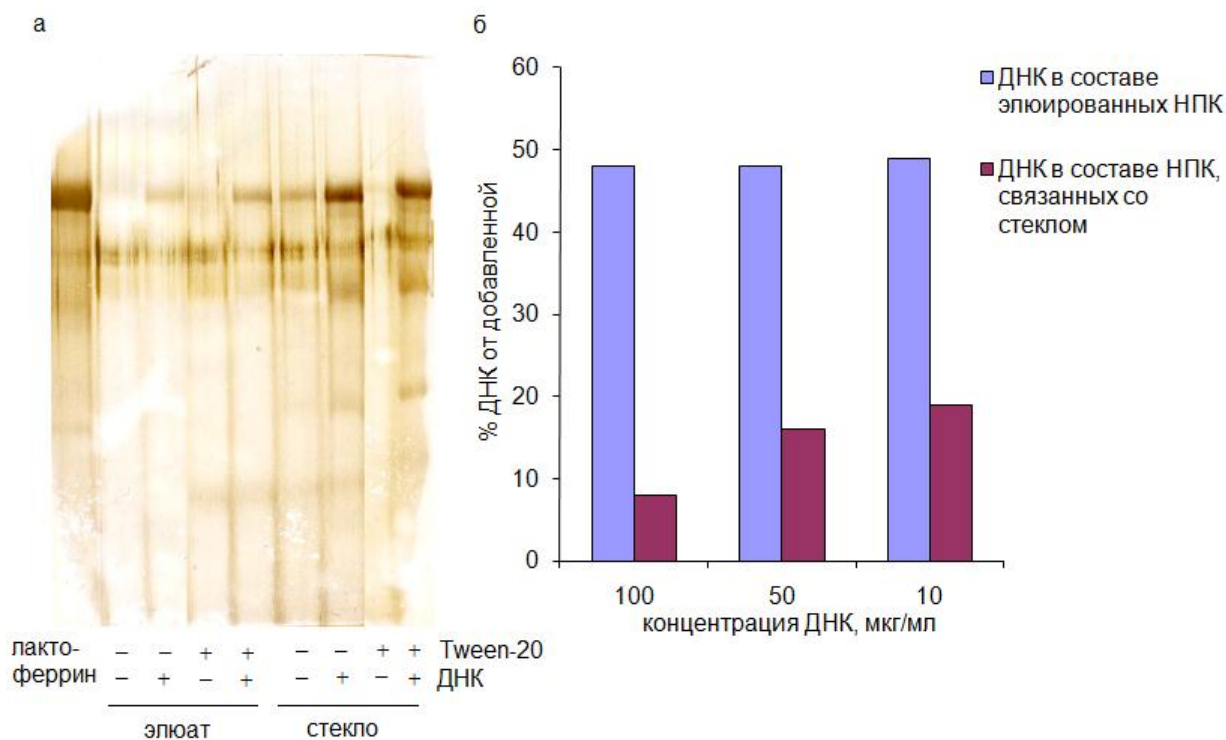


Рисунок 19 – Выделение ДНК-лактоферриновых комплексов с использованием мелкодисперсного стекла. (а) Анализ белков НПК, выделенных сорбцией на мелкодисперсном стекле из буфера, содержащего 10 мМ трис-ацетат (рН 5,0), 2 мМ CaCl<sub>2</sub>, Tween-20. Белки элюированных и связанных со стеклом НПК разделяли с помощью SDS-диск электрофореза в 10-20% ПААГ, затем переносили на нитроцеллюлозную мембрану и окрашивали коллоидным серебром. (б) Зависимость эффективности элюции ДНК в составе НПК от концентрации ДНК. Эффективность выделения <sup>32</sup>P-меченной высокомолекулярной ДНК, %. Данные трех независимых экспериментов представлены как среднее значение.

Наличие длинной вДНК на поверхности ФЭК может объясняться либо специфичным механизмом секреции ДНК, либо более эффективной защитой нуклеиновой кислоты от воздействия нуклеаз за счет многоточечного связывания с клетками. Помимо этого, связывание вДНК с ФЭК может обеспечиваться не только за нуклеиновую компоненту, но и за счёт взаимодействия белковых или липидных компонентов, находящихся в комплексах с ДНК и защищающих её от действия нуклеаз [471].

Для сравнения спектра молекулярного веса белков из состава НПК, циркулирующих в плазме и связанных с поверхностью ФЭК условно ЗЖ и первичных больных РМЖ белки, выделенные вышеописанным методом, были проанализированы при помощи 10-20% SDS-диск электрофореза (рисунок 21). Показано, что молекулярная масса белков в составе НПК составляет от 12 до 200 кДа, с преобладающими мажорными компонентами 40-70 кДа, при этом набор белков в составе НПК циркулирующих в крови условно ЗЖ и больных РМЖ отличаются (рисунок 21). Полученные результаты могут указывать на различные механизмы формирования циркулирующих в крови НПК в норме и при развитии злокачественных заболеваний. Таким образом, на концентрацию вДНК в крови онкологических больных (в

том числе и больных РМЖ) влияют не только интегральная нуклеазная и протеазная активность крови, но и состав белков, вовлеченных в формирование НПК: при развитии патологии изменение репертуара белков в составе НПК крови может не только обеспечивать более эффективную защиту от гидролаз крови, но и снижать скорость выведения НПК (а значит и опухолевой вДНК) из циркуляции, затрудняя клубочковую фильтрацию [472].

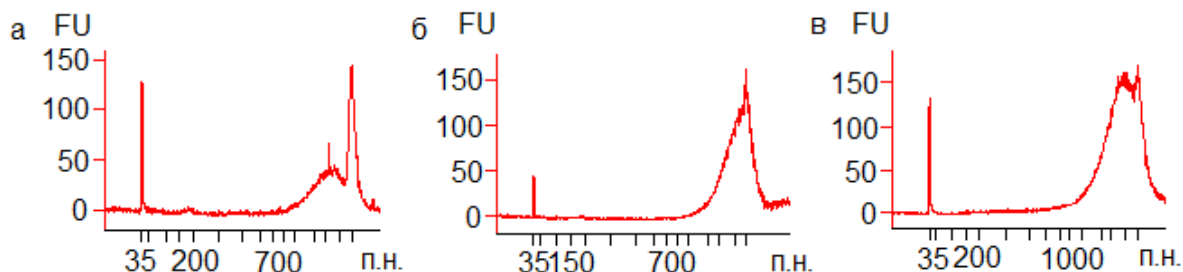


Рисунок 20 – Электрофореграмма пулированной ДНК, входящей в состав НПК крови ( $n = 15$ ). Распределение по размеру в диапазоне от 35 п.н. до 10380 п.н. оценено при помощи High Sensitivity DNA Kit на приборе «Agilent 2100 Bioanalyzer»: (А) ДНК из пулированного препарата НПК плазмы; (Б) ДНК из пулированного препарата НПК PBS-EDTA элюата с поверхности ФЭК; (В) ДНК из пулированного препарата НПК трипсинового элюата с поверхности ФЭК.

В пилотном эксперименте была подтверждена возможность идентификации белков в составе нативных НПК, связанных с поверхностью ФЭК условно ЗЖ, выделенных с помощью сорбции на мелкодисперсном стекле. Идентифицированные с высокой достоверностью методом MALDI-TOF с помощью баз данных NCBI и Swiss-Prot белки в составе НПК представлены в таблице 12.

Из состава идентифицированных белков ранее уже было показано, что альбумин является главным олигонуклеотид-связывающим поверхностным белком [97]. В ряде работ показано высокоаффинное взаимодействие нуклеиновых кислот с ЧСА. Так, для 16-звенных фосфодиэфирных олигонуклеотидов определена константа диссоциации комплекса олигонуклеотид-ЧСА, которая составила  $2 \times 10^{-5}$  М. Двухцепочечная ДНК конкурентно ингибировала связывание олигонуклеотида с ЧСА, причем более эффективно, чем добавленные в качестве конкурентов олигонуклеотиды. Это позволило авторам предположить, что двухцепочечная ДНК лучше связывается с ЧСА, чем одноцепочечные олигонуклеотиды [77, 473]. По-видимому, ЧСА, не являясь мембранным белком, взаимодействует с клеточной поверхностью через экспонированные на ней рецепторы к альбумину [114, 474]. Кроме того, ЧСА способен улучшать доставку олигонуклеотидов в клетки и, в частности, в ядра [475]. В связи с этим представляется возможным использовать ЧСА в качестве доставляющего агента. Действительно, был предложен метод доставки в клетки олигонуклеотидов в составе наночастиц альбумина [476-478].

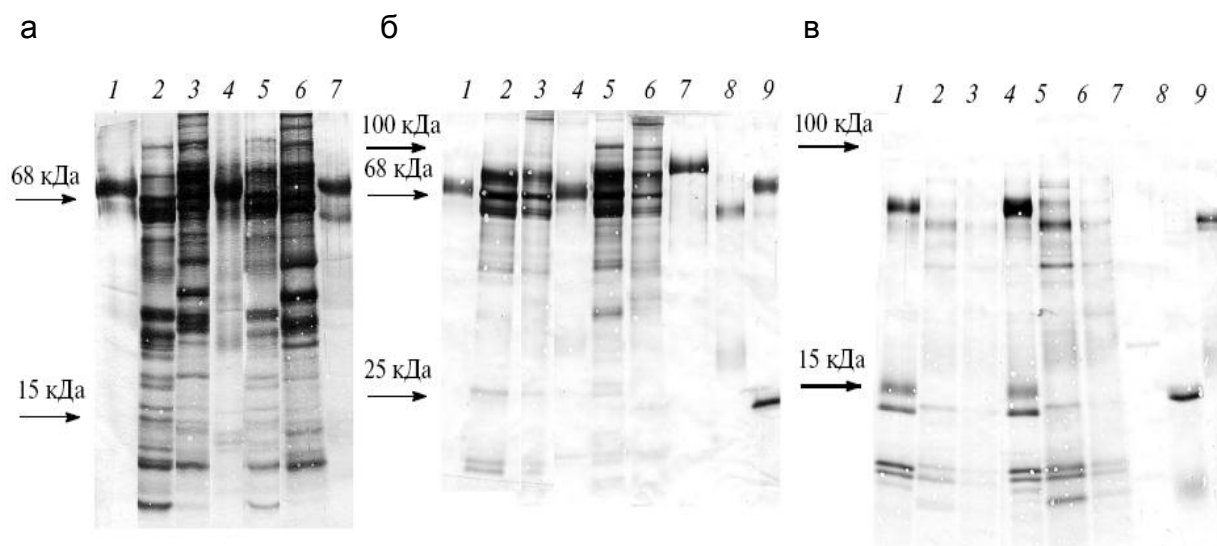


Рисунок 21 – Анализ белков НПК, выделенных из плазмы крови и элюатов с поверхности ФЭК условно ЗЖ и больной РМЖ. Белки разделяли с помощью 10–20%-ного SDS-диск-электрофореза, затем переносили на нитроцеллюлозную мембрану и окрашивали коллоидным серебром.

(а) Плазма: 1 – белки плазмы ЗЖ (разведение 1 : 500); 2 – белки элюированных со стекла НПК плазмы ЗЖ; 3 – белки НПК плазмы ЗЖ, связанные со стеклом; 4 – белки плазмы больной РМЖ (разведение 1 : 500); 5 – белки элюированных со стекла НПК плазмы больной РМЖ; 6 – белки НПК плазмы больной РМЖ, связанные со стеклом; 7 – BSA.

(б) PBS-EDTA элюат: 1 – белки PBS-EDTA элюата ЗЖ (разведение 1 : 50); 2 – белки элюированных со стекла НПК PBS-EDTA элюата ЗЖ; 3 – белки НПК PBS-EDTA элюата ЗЖ, связанные со стеклом; 4 – белки PBS-EDTA элюата больной РМЖ (разведение 1 : 50); 5 – белки элюированных со стекла НПК PBS-EDTA элюата больной РМЖ; 6 – белки НПК PBS-EDTA элюата больной РМЖ, связанные со стеклом; 7 – лактоферрин; 8 – суммарные иммуноглобулины класса G человека; 9 – BSA и миоглобин.

(в) Трипсиновый элюат: 1 – белки трипсинового элюата ЗЖ (разведение 1 : 10); 2 – белки элюированных со стекла НПК трипсинового элюата ЗЖ; 3 – белки НПК трипсинового элюата ЗЖ, связанные со стеклом; 4 – белки трипсинового элюата больной РМЖ (разведение 1 : 10); 5 – белки элюированных со стекла НПК трипсинового элюата больной РМЖ; 6 – белки НПК трипсинового элюата больной РМЖ, связанные со стеклом; 7 – трипсин; 8 – ингибитор трипсина; 9 – суммарные иммуноглобулины класса G человека.

Поиск потенциальных сайтов связывания нуклеиновых кислот в структуре альбумина проводился при помощи программы PDBSiteScan (<http://www.mgs.bionet.nsc.ru/cgi-bin/mgs/fastprot/pdbsitescan.pl?stage=0>) [479]. ЧСА состоит из трех гомологичных доменов (I–III), каждый из которых разделен на два субдомена (А и В). Субдомены А и В имеют соответственно 6 и 4  $\alpha$ -спирали, соединенные подвижными петлями [480]. Анализ сывороточного альбумина выявил в субдомene IIIВ потенциальный сайт связывания этого белка с РНК и ДНК (позиции, 570-584). Найденный сайт имел структурное сходство с реальными РНК- (ID 1E80DAE) и ДНК- (ID 1H88DBD) связывающими сайтами из базы PDBSite. На рисунке 22 иллюстрируется взаимодействие альбумина с ДНК. Из рисунка видно, что взаимодействие с ДНК происходит по большой бороздке.

Таблица 12 – Мажорные белки в составе НПК, связанных с ФЭЖ условно ЗЖ

№	Название белка	score	Мол вес, кДа
1	Histidine rich glycoprotein	90	59,541
2	Haptoglobin	74	45,177
3	Complement C3	72	187,030
4	Serum Albumin	72	69,321
5	Complement C3	70	188,948
6	Complement C3	70	187,030
7	Hemoglobin	70	16,130
8	Apolipoprotein	60	30,759
9	Fibrinogen	57	51,479

Выявленный потенциальный сайт связывания с НК в субдомене IIIВ, не противоречит данным других исследователей. Действительно, большинство исследованных лигандов связывается с ЧСА в сайтах I или II, однако для ряда соединений высокоаффинные сайты связывания обнаружены в других частях молекулы альбумина [481]. Так, например, в физиологических условиях альбумин обычно переносит две молекулы жирных кислот, однако он способен связывать, по крайней мере, 5 таких молекул (2 в субдомене IIIА, и по одной в субдоменах IV, ПА и IIIВ). Причем сайт с наибольшей аффинностью расположен в субдомене IIIВ27.

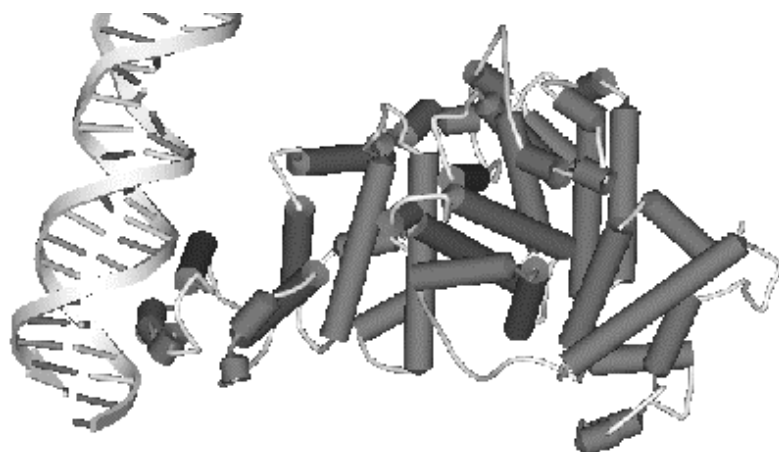


Рисунок 22 – Потенциальный комплекс сывороточного альбумина (PDB ID 1E7E) с ДНК. Координаты атомов ДНК взяты из ДНК-белкового комплекса (PDB ID 1H88). Белок представлен в цилиндрической модели, ДНК как arrows ladder.

Полученные данные показали, что предложенный метод выделения циркулирующих в крови НПК при помощи мелкодисперсного стекла, связывающего нуклеиновые кислоты, входящие в состав таких комплексов, может быть использован для идентификации белков НПК, изучения транспорта вНК в кровотоке и поиска новых протеомных маркеров заболеваний характеризующихся повышенным содержанием циркулирующих нуклеиновых кислот в крови. В тоже время недостатком разработанного метода является выделение



только половины нативных НПК, а половина остается связанной с поверхностью мелкодисперсного стекла. В связи с этим был разработан принципиально другой подход к выделению нативных НПК – путем выделения за белковую составляющую – гистоны.

Известно, что в крови ЗЖ и больных РМЖ концентрация вДНК в сыворотке крови коррелирует с концентрацией нуклеосом ( $R = 0,327$ ,  $p = 0,001$ ) [90]. Возрастание концентрации нуклеосом в плазме или сыворотке крови наблюдается при различных формах онкологических заболеваний, травмах и сепсисе, причем у больных этих групп наблюдается также и повышение концентрации вДНК [155]. Также в литературе описано связывание вДНК в составе нуклеосом с клеточной поверхностью через гистоны [116, 482, 483]. Более того, показано, что нуклеосомы способны пересекать клеточную мембрану [484, 485], а некоторые белки (в частности, ЧСА), формируя комплексы с вДНК, способны опосредовать её интернализацию через эндоцитоз [485].

Таким образом, альтернативным подходом к выделению нативных НПК стало выделение циркулирующих в крови гистон-содержащих НПК при помощи аффинной хроматографии на сорбенте с иммобилизованными антителами против гистонов, с последующей идентификацией белков в их составе при помощи масс-спектрометрии.

На первом этапе с помощью высокочувствительных коммерческих наборов ELISA Kit for Histone H2B и ELISA Kit for Histone H4 (тип сэндвич) была определена концентрация гистонов в крови условно ЗЖ ( $n = 15$ ) и больных РМЖ ( $n = 29$ , таблица 13).

*Таблица 13 – Клинико-патологическая характеристика группы больных люминальным РМЖ, образцы крови которых использованы для оценки концентрации гистонов*

Клинико-патологическая характеристика		No (%)
Стадия	T1	21 (72%)
	T2	8 (28%)
Метастазы в регионарных лимфоузлах	N0	24 (83%)
	N1	5 (17%)
Удаленные метастазы	M0	29 (100%)
Степень злокачественности	II	26 (90%)
	III	3 (10%)
Гистотип	Инфильтрующая протоковая карцинома	29 (100%)

Набор ELISA Kit for Histone H2B обладал чувствительностью 0,124 нг/мл в диапазоне определения 0,312-20 нг/мл, набор ELISA Kit for Histone H4 обладал чувствительностью 0,056 нг/мл в диапазоне определения 0,156-10 нг/мл, оба набора характеризовались коэффициентами вариации менее 10%. Данные концентрации гистона H2a в плазме крови условно ЗЖ и больных РМЖ приведены на рисунке 23. Гистон H2a был выявлен в 60%

образцов плазмы крови условно ЗЖ, медиана концентрации гистона Н2а составила 149,2 пг/мл; у больных РМЖ гистон Н2а был выявлен в 80% образцов, медиана концентрации гистона Н2а составила 498 пг/мл. С помощью непараметрического критерия Манна-Уитни было показано, что концентрация гистона Н2а в плазме крови онкологических больных выше, чем у условно ЗЖ ( $p = 0,039$ ). Поскольку гистон Н2а является частью циркулирующих в крови НПК и известно, что концентрация вДНК в крови онкологических больных повышается, теоретически предсказанное повышение концентрации гистона Н2а как компонента НПК подтверждено с помощью сэндвич ИФА.

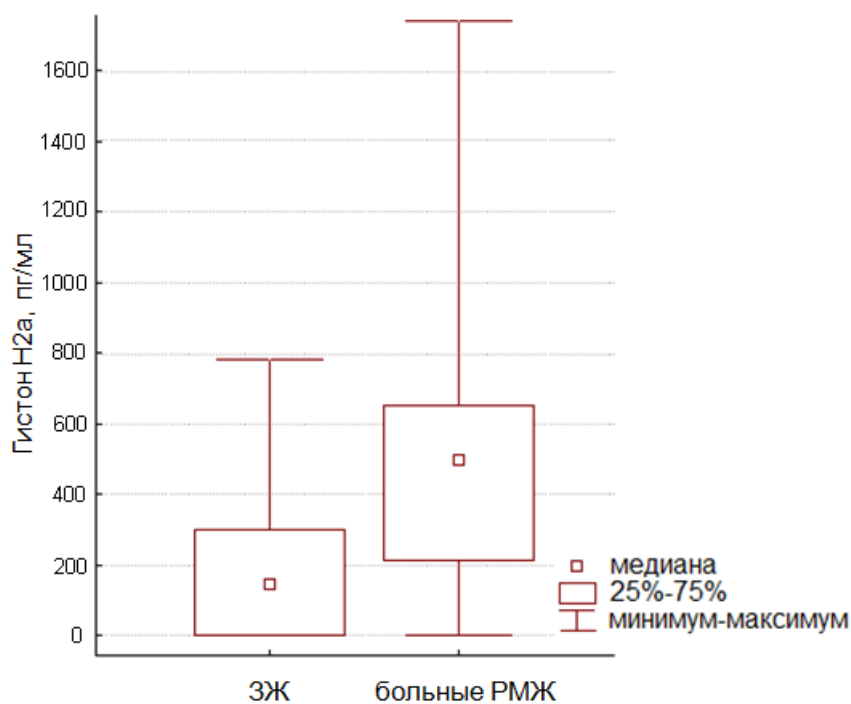


Рисунок 23 – Концентрация гистона Н2а в плазме крови условно ЗЖ и больных люминальным РМЖ.

Показано, что концентрация гистона Н4 в образцах плазмы крови условно ЗЖ и больных РМЖ был ниже чувствительности метода (данные не приведены). Полученные результаты могут косвенно свидетельствовать, что гистон Н4 в составе НПК недоступен для связывания антителами.

Схема выделения нативных НПК аффинной хроматографией на сорбенте с иммобилизованными антителами против гистонов человека представлена на рисунке 24.

Суммарный препарат гистонов человека был получен методом кислотной экстракции и охарактеризован при помощи пятенного ИФА. При помощи коммерчески доступных моноклональных антител показано, что полученный препарат гистонов содержит гистоны Н1, Н2а, Н2в и Н3 (рисунок 25).

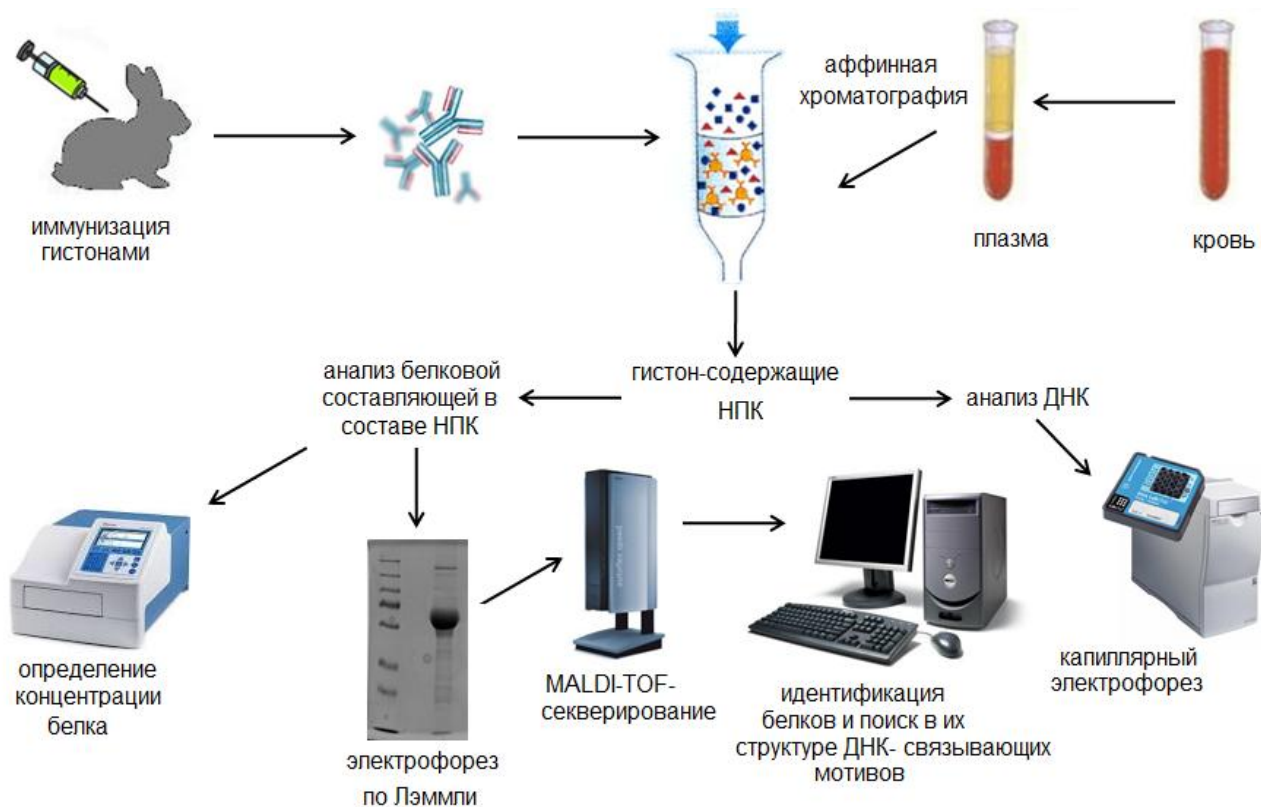


Рисунок 24 – Выделение нативных гистон-содержащих НПК крови с последующей идентификацией белков в их составе. Принципиальная схема эксперимента.

С помощью электрофореза по Лэммли с последующим переносом и окрашиванием нитроцеллюлозной мембраны коллоидным серебром показано, что суммарный препарат гистонов человека содержит преимущественно белки с молекулярной массой от 11 до 23 кДа, соответствующие по подвижности линкерному и коровым гистонам (рисунок 26).

Полученный препарат гистонов был использован для наработки поликлональных антител против гистонов и синтеза аффинного сорбента для последующего выделения антигистоновых антител. Титр антител против гистонов в кроличьей антисыворотке и в аффинно-очищенном препарате антител (0,7 мг/мл) составил  $10^{-4}$  (рисунок 25).

Для выделения циркулирующих в крови НПК, содержащих в своём составе гистоны, аффинно-очищенные кроличьи антитела против гистонов человека были иммобилизованы на активированную бромцианом сефарозу CL-4B. С помощью аффинной хроматографии из плазмы условно ЗЖ (n=15; 30–65 лет) и первичных больных люминальным РМЖ (n=20; T<sub>1</sub>-<sub>2</sub>N<sub>0</sub>M<sub>0</sub>; 46–60 лет, таблица 13) были получены препараты гистон-содержащих НПК.

Для подтверждения наличия ДНК в составе НПК, ее выделяли из НПК и из плазмы крови при помощи коммерческого набора «BPD-100». При помощи капиллярного электрофореза показано, что в плазме крови условно ЗЖ преобладает ДНК длиной 170-180 п.н., в крови больных РМЖ - ДНК длиной 170-180 п.н. и длиной более 6 т.п.н. представлены либо в равной мере, либо преобладает длинная ДНК (более 6 т.п. н.) (рисунок 26).

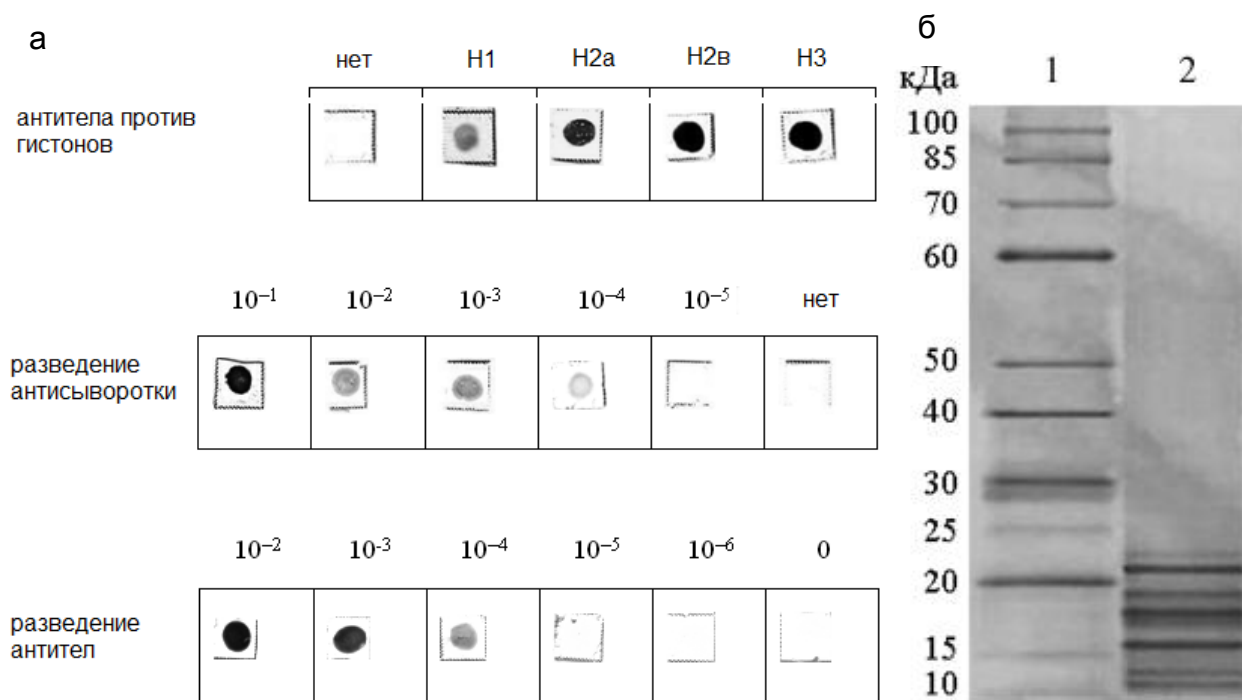


Рисунок 25 – Характеризация гистонов и анти-гистоновых антител. (а) Пятенный ИФА. На нитроцеллюлозу сорбировали 0,5 мкл суммарного препарата гистонов (0,5 мг/мл), инкубировали с коммерческими антителами против гистонов, кроличьей антисывороткой либо аффинно-очищенными антителами (титровали начиная от концентрации 0,7 мг/мл) и затем инкубировали с конъюгатом козьих антикроличьих антител, конъюгированных с пероксидазой хрена. Образующиеся комплексы антиген-антитело визуализировали с помощью 4-хлор-1-нафтола. (б) Анализ гистонов методом электрофореза по Лэммли в градиентном 10–20% ПААГ. Нитроцеллюлозная мембрана окрашена коллоидным серебром. 1 – белковый маркер молекулярной массы PageRulerSM-0661; 2 – гистоны.

Полученные результаты согласуются как с литературными данными, так и с результатами о фрагментации вДНК в крови (раздел 3.1.1.1). В частности, при помощи электрофореза было показано, что в состав вДНК плазмы входят как короткие (длиной 180 п.н.), так и длинные фрагменты, причем при развитии онкологического заболевания доля длинных ДНК-фрагментов в циркуляции повышается [38, 42, 43, 50, 86, 153, 154] и т.д. Представленность фрагментов вДНК в составе НПК крови условно ЗЖ сопоставима с представленностью вДНК плазмы, у больных РМЖ в составе гистон-содержащих нативных НПК выявлена преимущественно короткая ДНК (171-181 п.н.), что может указывать на снижение роли гистонов в упаковке длинной вДНК, циркулирующей в крови онкологических больных (рисунок 26).

В образцах плазмы и в составе НПК крови больных РМЖ было обнаружено значительное увеличение концентрации вДНК по сравнению с условно ЗЖ (в плазме медиана 46 по сравнению с 4 нг/мл крови,  $p = 0,0026$ , U-критерий Манна-Уитни, рисунок

27а; в НПК медиана 9,9 по сравнению с 1,04 нг/мл крови,  $p = 0,0041$ , U-критерий Манна-Уитни, рисунок 27б).

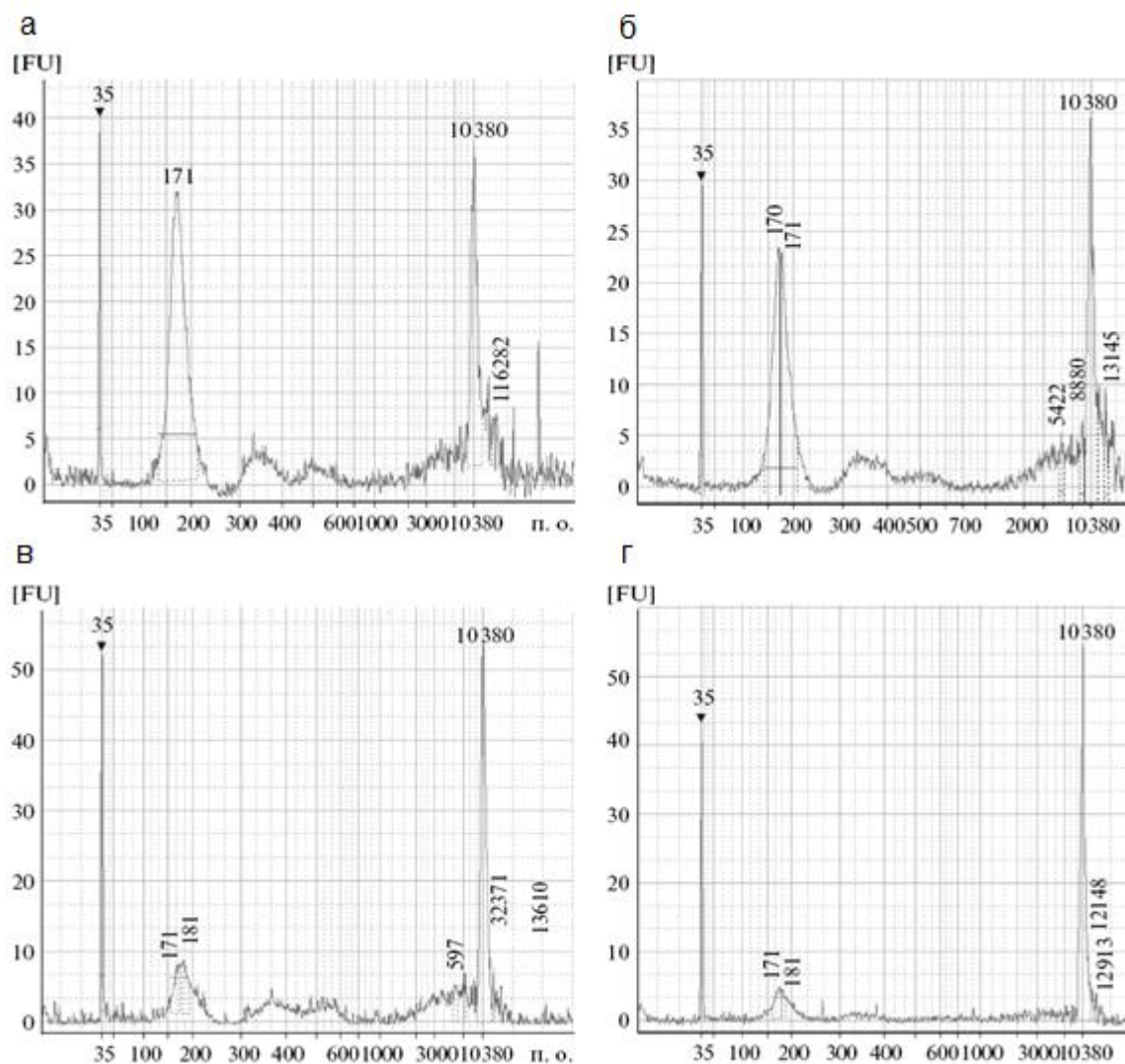


Рисунок 26 – Распределение по размеру вДНК, выделенной из плазмы крови (а) и гистон-содержащих НПК крови (б) условно ЗЖ; вДНК плазмы (в) и ДНК в составе НПК крови больных РМЖ (г). Стрелками указаны положения маркеров длиной 35 и 10380 п.н.

Доля ДНК в составе гистон-содержащих НПК от общей вДНК в плазме крови в норме и при РМЖ достоверно не отличалась (медиана составила 26% и 30%, соответственно,  $p = 0,655$ , U-критерий Манна-Уитни) (рисунок 28а).

Концентрация белка в препаратах нативных НПК из плазмы крови ЗЖ и больных РМЖ была определена с помощью набора «NanoOrange Protein Quantitation kit» по протоколу, рекомендованному производителем. Для построения калибровочной кривой использовали фирменный раствор BSA. Было показано, что доля белка в составе гистон-содержащих НПК от общего содержания белка в плазме крови в норме и при РМЖ также достоверно не отличается (медиана составила 3% и 3,05%, соответственно,  $p = 0,521$ , U-критерий Манна-Уитни) (рисунок 28б).

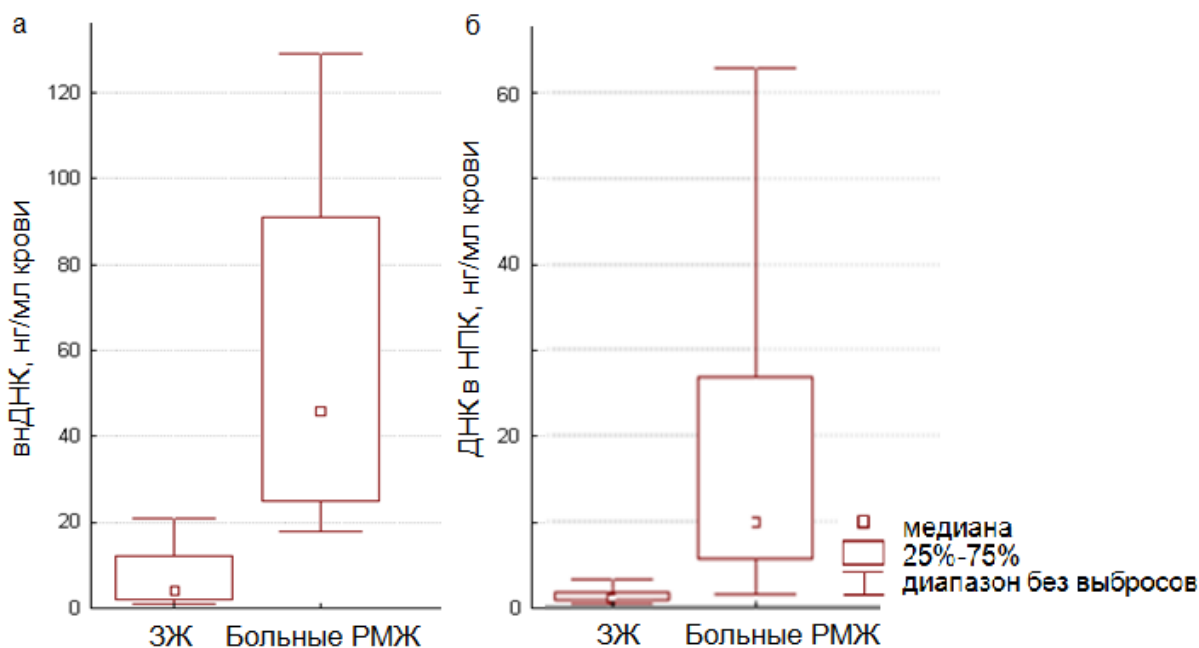


Рисунок 27 – Концентрация вДНК плазмы (а) и ДНК НПК крови (б) условно ЗЖ (n = 15) и больных РМЖ (n = 20). Указаны медианные концентрации вДНК в диапазоне 25–75% и столбцы диапазона, не выходящие за пределы диапазона.

Сравнительный электрофоретический анализ мажорных белков, входящих в состав гистон-содержащих НПК из плазмы крови условно ЗЖ и больных РМЖ не выявил различий в белковом спектре; по подвижности белки соответствуют ЧСА, лактоферрину, гистонам, иммуноглобулинам, а также белкам с молекулярными массами от 11 до 170 кДа (рисунок 29).

Для оценки возможной неспецифической сорбции НПК на аффинном сорбенте был синтезирован сорбент с иммобилизованными суммарными антителами кролика на основе активированной бромцианом сефарозы. С помощью аффинной хроматографии из плазмы крови условно ЗЖ были получены препараты белков, неспецифично взаимодействующих с антителами кролика. Показано, что количество выделенного белка с использованием суммарных антител кролика значительно меньше, нежели выделенного с помощью антител против гистонов человека. Препарат белков плазмы крови, неспецифично взаимодействующих с антителами кролика, содержит мажорные белки с молекулярными массами около 70, 55 и 25 кДа, что теоретически соответствует ЧСА (67 кДа), тяжёлым (~ 53 кДа) и лёгким (~ 23 кДа) цепям иммуноглобулинов, соответственно (рисунок 29).

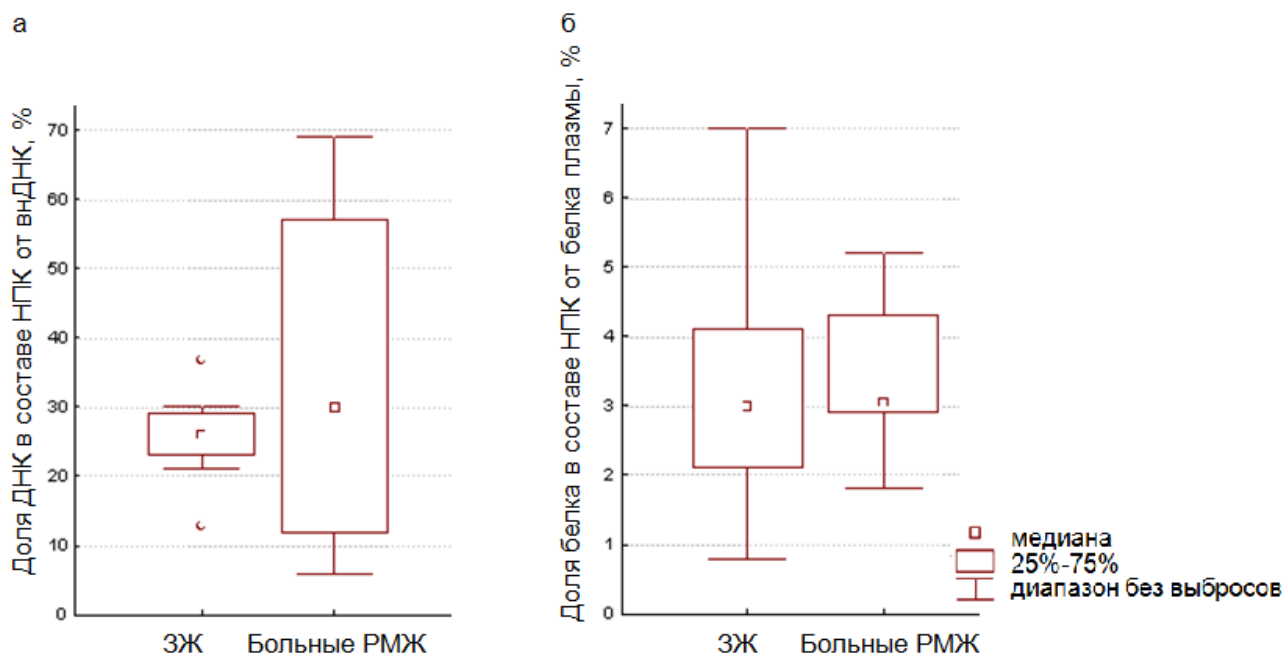


Рисунок 28 – Характеризация НПК, циркулирующих в плазме крови условно ЗЖ ( $n = 15$ ) и больных РМЖ ( $n = 20$ ) по нуклеиновой и белковой составляющим: доля ДНК в составе НПК от концентрации вДНК в плазме крови (а); доля белка в составе НПК от общего белка плазмы крови (б).

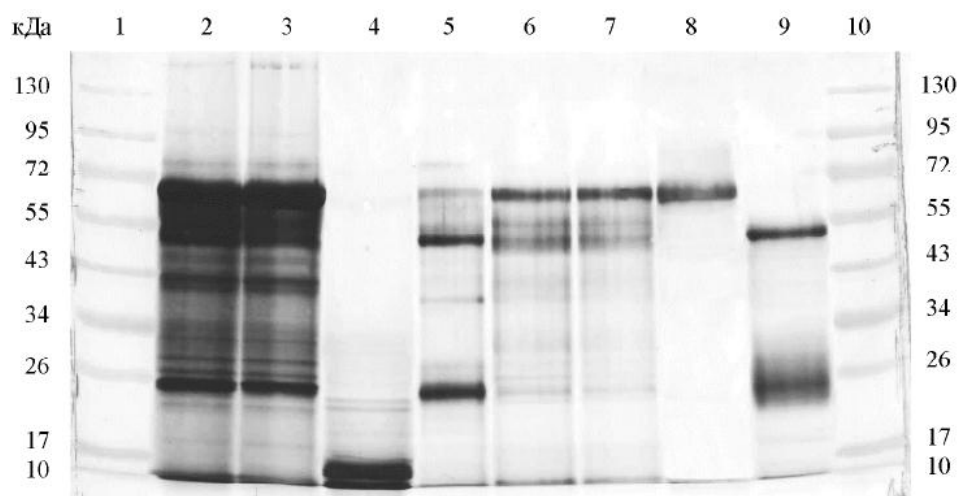


Рисунок 29 – Анализ гистон-содержащих НПК из плазмы крови методом электрофореза по Лэммли в градиентном 10–20% ПААГ. Нитроцеллюлозная мембрана окрашена коллоидным серебром. 1, 10 – белковый маркер молекулярной массы PageRulerSM-0671; 2 – гистон-содержащие НПК плазмы крови условно ЗЖ; 3 – гистон-содержащие НПК плазмы крови больной РМЖ; 4 – суммарный препарат гистонов; 5 – белки плазмы условно ЗЖ, неспецифически связывающиеся с IgG кролика; 6 – плазма крови условно ЗЖ (разведение 1:500); 7 – плазма крови условно ЗЖ (разведение 1:700); 8 – ЧСА; 9 – IgG.

Таким образом, выделение нативных гистон-содержащих НПК, циркулирующих в крови, с помощью аффинной хроматографии может быть использовано для получения информации о белках в составе НПК в норме и при патологических состояниях.

### 3.2.2. Сравнительный протеомный анализ циркулирующих НПК в крови условно здоровых женщин и больных РМЖ

Белки в составе циркулирующих в крови НПК идентифицировали методом MALDI-TOF масс-спектрометрии после разделения в ПААГ и трипсинолиза белков в индивидуальных фрагментах геля. Каждый образец НПК наносили на гель в пяти повторах; заданный score 56 и наличие не менее трех пептидов из последовательности белка (рисунок 30) позволили с высокой достоверностью ( $p < 0,05$ ) идентифицировать 177 и 169 белков в НПК крови условно ЗЖ ( $n = 15$ ) и больных люминальным РМЖ ( $n = 20$ , табл. 13), соответственно (Приложения 1А, 2Б). Поскольку известно, что ЧСА способен образовывать комплексы не только с ДНК [97, 473], но и неспецифически связываться с иммуноглобулинами за счет высокого содержания в плазме крови [486], идентифицированный в составе НПК альбумин был исключен из дальнейшего анализа. Также в таблицы не включены значительно представленные в гистон-содержащих НПК гистоны (H1t; H1.0; H2А типы: 1А, 1С, 2С, H2А.Ј; H2В типы: 1В, 1L, 1N, 3В, WT; Core histone macroH2А.1).

Доля универсальных белков НПК (встречались как в норме, так и при онкологическом заболевании) составила 12% (38 белков, Приложения 1А, 1Б), из них 12 наиболее представленных белков (Homeobox protein Hox-C5, Probable G-protein coupled receptor 22, Putative G antigen family D member 1, Transcription factor jun-D, Translocating chain-associated membrane protein 1-like 1, Myosin regulatory light chain 12A, EF-hand calcium-binding domain-containing protein 9, Splicing factor U2AF 35 kDa subunit, Insulin-degrading enzyme, Spermatogenesis-associated protein 3, cAMP-responsive element modulator, Beta-1,3-glucosyltransferase) встречались в 76% случаев (Приложение 1В).

Сравнение идентифицированных 308 белков в составе НПК с белками экзосом, аннотированных в БД ExoCarta выявило совпадение четырех белков – MIL1 (UniProt ID Q9BXK5), COPS9 (UniProt ID Q9BX79), HAND1 (UniProt ID O96004) и TCP1 (UniProt ID Q99832), что косвенно подтверждает отсутствие примесных белков, не входящих в состав НПК.

Известно, что в деградацию циркулирующей в крови вДНК наряду с ДНКазой I вовлечен фактор Н [487-489]. Выявленный в составе НПК универсальный белок CFHR2 (Complement factor H-related protein 1) способен связываться с субстратом, блокируя сайты связывания фактора Н [490], увеличивая таким образом длительность циркуляции вДНК в составе НПК. Кроме того, в составе НПК крови условно ЗЖ идентифицированы белки H2АЈ и HАТ1, выполняющие дисопсонизационные функции, повышая время циркуляции вДНК и снижая скорость её поглощения клетками печени [491].



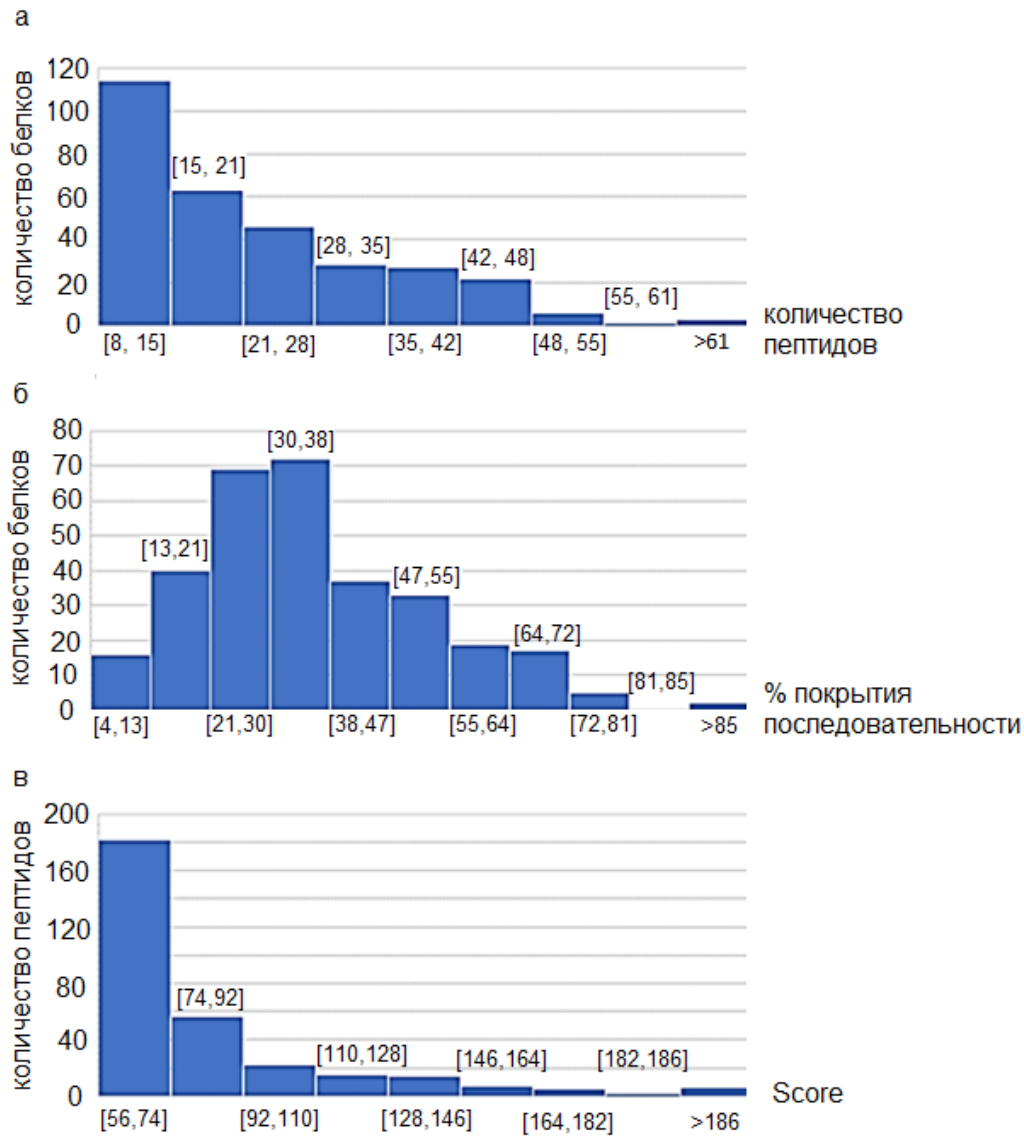


Рисунок - 30. Аналитические характеристики взятых в анализ белков НПК: количество идентифицированных пептидов в белках (а), процент покрытия сиквенса в идентифицированных белках (б), Score в идентифицированных пептидах (в).

Для характеристики белков, идентифицированных в циркулирующих НПК крови, был проведен биоинформационный анализ с помощью БД InterPro и InterProScan версий 5.15-58 и 5.15-54 [492, 493], что позволило идентифицировать категории IPR и GO для белков НПК крови ЗЖ (Приложение 1Г) и больных РМЖ (Приложение 1Д) (изоформы не приведены). Для избежания потери информации и полного учета полученных данных при биоинформационном анализе были учтены все белки (даже если белок встречался только в одном образце). Полученные списки терминов GO для 36 клеточных компонентов (Cellular Components, классификация по части клетки или внеклеточного пространства, где осуществляется функция продукта гена), 125 молекулярных функций (Molecular Functions, классификация по специфической функции продукта гена (белка или РНК) на молекулярном уровне) и 106 биологических процессов (Biological Processes, классификация по

комплексному процессу, обычно необходимому для жизнедеятельности организмов и происходящему благодаря осуществлению последовательности молекулярных реакций) приведены в Приложениях 1Е-З. Для 46 белков термины GO не были определены по всем трем категориям (клеточные компоненты, молекулярные функции, биологический процесс). Такие белки приведены в Приложении 1И.

Анализ белков в составе НПК плазмы крови условно ЗЖ и больных РМЖ в категории Генной онтологии «Клеточные компоненты» позволил установить, что среди универсальных категорий мембранные белки составляют почти половину всех идентифицированных белков (термины: интегральный компонент мембраны (GO:0016021), интегральный компонент плазматической мембраны (GO:0005887), мембрана (GO:0016020), постсинаптическая мембрана (GO:0045211)). Полученные результаты могут косвенно указывать на возможность связывания циркулирующих вДНК в клеточной поверхности, что, вероятно является необходимым условием для проникновения в клетку и влияния на ее биологические процессы. Доля внеклеточных белков в составе НПК составляет менее 5%, что также косвенно указывает, что в циркуляцию попадают уже сформированные НПК (рисунок 31а).

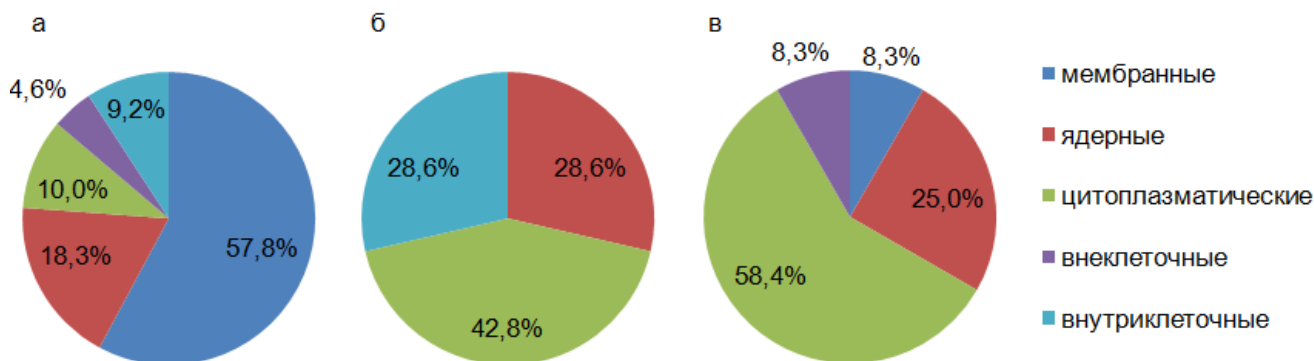


Рисунок 31 – GO-анализ белков НПК по клеточным компонентам: универсальные белки (а), уникальные белки условно ЗЖ (б), уникальные белки больных РМЖ (в).

Уникальные белки в составе НПК крови условно ЗЖ также были разнесены по категориям, объединенным по следующим локализациям: цитоплазматические, внутриклеточные и ядерные белки (рисунок 31б). Большинство уникальных белков НПК крови больных РМЖ были представлены в категориях, объединенных по локализациям цитоплазматические и ядерные белки (рисунок 31в).

Таким образом, уникальные белки НПК условно ЗЖ отличаются от уникальных белков НПК больных РМЖ наличием внутриклеточных белков и отсутствием мембранных и внеклеточных белков.

Анализ белков в составе НПК плазмы крови условно ЗЖ и больных РМЖ в категории Генной онтологии «Молекулярные функции» позволил установить, что среди универсальных категорий наиболее представлены нуклеиновые кислоты/нуклеотид-связывающие белки

(термины: связывание нуклеотидов (GO:0000166), связывание нуклеиновых кислот (GO:0003676), связывание ДНК (GO:0003677), связывание РНК (GO:0003723), сиквенс-специфическое связывание с ДНК (GO:0043565)), а также белки, связывающие белки (связывание белков (GO:0005515)) и ионы металлов (термины: связывание ионов железа (GO:0005506), связывание ионов кальция (GO:0005509), связывание ионов цинка (GO:0008270), связывание ионов металлов (GO:0046872)) (рисунок 32а). Полученные результаты косвенно подтверждают, что часть ДНК-связывающих белков имеет мотив «цинковые пальцы». Кроме того, часть белков в составе НПК, обладающая белок-связывающей и не обладающая ДНК-связывающей способностью, по-видимому, является «пассажирами» в циркулирующих в крови комплексах.

Среди уникальных белков НПК крови условно ЗЖ и у больных РМЖ наиболее представлены каталитически-активные белки, а также белки, связывающие нуклеиновые кислоты и регулирующие активность рецепторов (рисунки 32 б, в). Кроме того, с развитием патологии в НПК возрастает доля белков-участников ионных каналов и белков, связывающих белки (рисунок 32в).

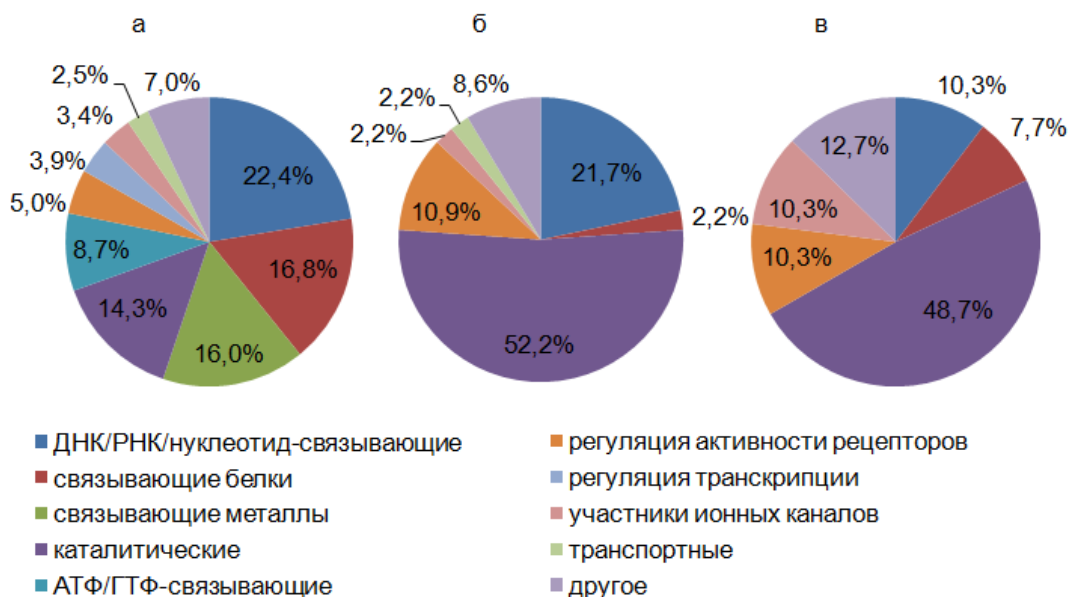


Рисунок 32 – GO-анализ белков НПК по молекулярным функциям: универсальные белки (а), уникальные белки условно ЗЖ (б), уникальные белки больных РМЖ (в).

Анализ белков в составе НПК плазмы крови условно ЗЖ и больных РМЖ в категории Генной онтологии «Биологический процесс» позволил установить, что среди универсальных категорий наиболее представлены белки, вовлеченные в передачу сигналов (термины: сигнальная трансдукция (GO:0007165), сигнальная трансдукция, опосредованная малыми ГТФазами (GO:0007264), внутриклеточная сигнальная трансдукция (GO:0035556), передача сигналов рецептора, сопряженного с G-белком (GO:0007186), рецептор, активирующий

аденилатциклазу, связанный с G-белком (GO:0007189)), транспорт (термины: транспорт (GO:0006810), транспорт ионов (GO:0006811), анионов (GO:0006820), хлоридов (GO:0006821), липидов (GO:0006869), белков (GO:0015031), а также внутриклеточный (GO:0006886) и трансмембранный (GO:0055085) транспорт) и регуляцию транскрипции (термин GO:0006355), а также осуществляющие каталитические реакции (рисунок 33а).

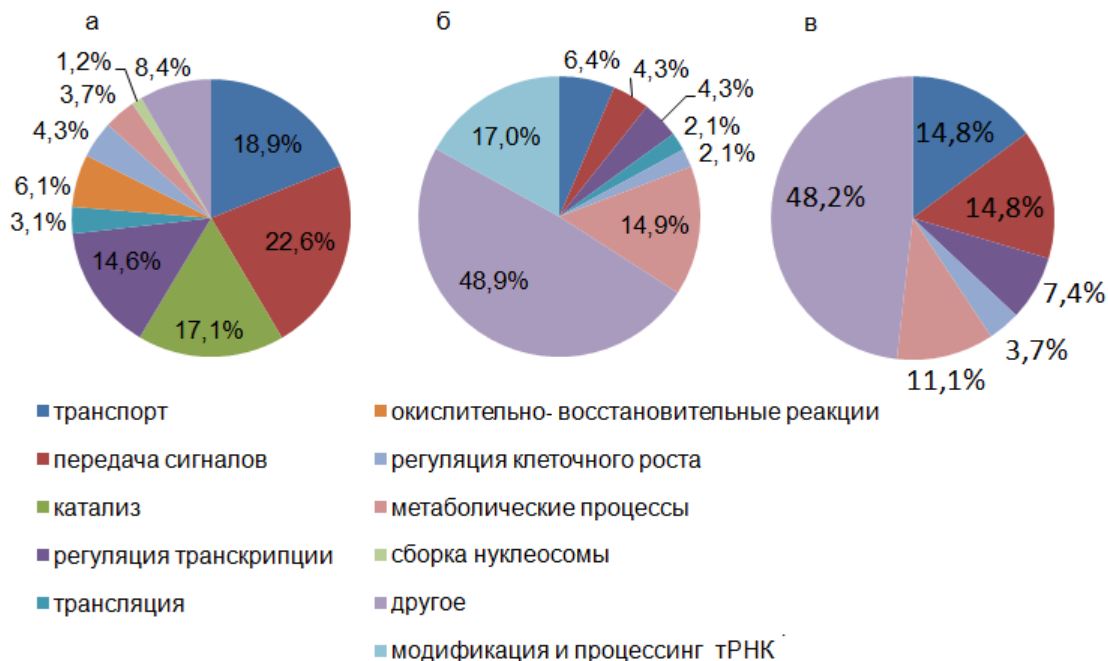


Рисунок 33 – GO-анализ белков НПК по биологическим процессам: универсальные белки (а), уникальные белки условно ЗЖ (б), уникальные белки больных РМЖ (в).

У онкологических больных по сравнению с условно ЗЖ наиболее представлены в составе НПК белки, участвующие в транспорте и передаче сигналов, а также отсутствуют белки, вовлеченные в модификацию и процессинг РНК (рисунки 33б, в), что может косвенно объяснять причину повышения концентрации вДНК в крови при развитии новообразований [494].

Для выявления белков, связывающих ДНК и нуклеотиды, в составе НПК, идентифицированные белки анализировали с использованием QuickGO по GO “связывание нуклеиновых кислот” (nucleic acid binding, GO:0003676) и “связывание нуклеотидов” (nucleotide binding, GO:0000166). Установлено, что со связыванием нуклеиновых кислот и нуклеотидов (НК-связывающие) ассоциированы 113 белков (37%), из них 15 являются универсальными (39% от всех универсальных белков НПК). В составе уникальных белков НПК крови условно ЗЖ доля НК-связывающих белков составила 40%, в составе уникальных белков НПК крови больных РМЖ – 33% (рисунок 34).

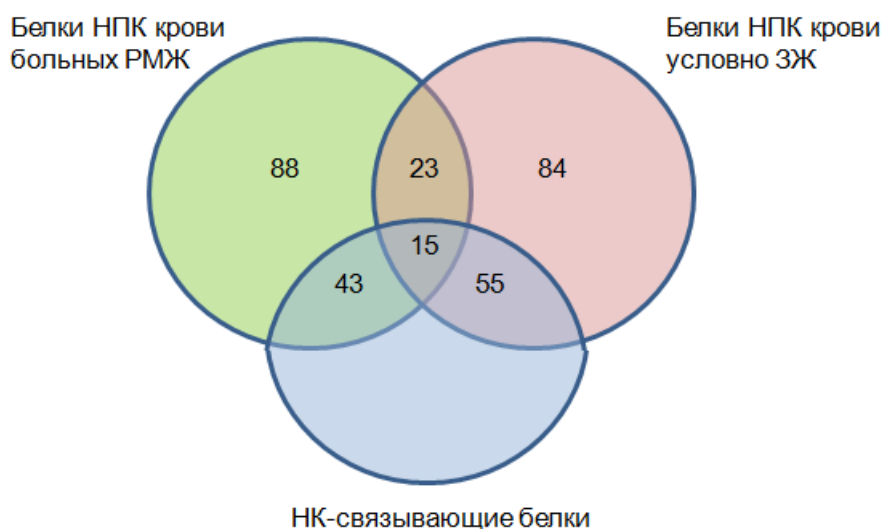


Рисунок 34 – Идентифицированные НК-связывающие белки в составе НПК крови условно ЗЖ и больных РМЖ (диаграмма Венна-Эйлера). Визуализация данных, полученных с помощью QuickGO.

Для идентификации ДНК-связывающих доменов в выявленных НК-связывающих белках в составе НПК крови, полученные протеомы исследовали с помощью веб-платформы Interpro и БД Interpro (<https://www.ebi.ac.uk/interpro/>), PROSITE, Pfam (<http://pfam.xfam.org/>), SMART (<http://smart.embl-heidelberg.de/>) и CDD (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/cdd.shtml>) (таблица 11). В результате биоинформатического анализа было выявлено 38 типов ДНК-связывающих мотивов, наиболее представленными среди которых являются цинковые пальцы (C2H2, CCCH, PHD, C4, CXXC и RING типов), домены Гомеобокса, KRAB, петля-поворот-петля и лейциновые застёжки.

Garcia M. с соавторами на основании исследования, посвящённого связыванию транскрипционных факторов с нуклеосомами, предложили характеризовать ДНК-связывающие белки по прочности связывания с нуклеосомами [495]. К “прочно” связывающим нуклеосомы белкам авторы относят белки с наличием доменов следующих типов: bHLH, НТН, гомеодомены и цинковые пальцы. Среди идентифицированных в текущей работе 30 (27%, из них 4 универсальных белка, 11 и 15 белков в НПК крови условно ЗЖ и больных РМЖ, соответственно) из 113 ДНК-связывающих белков обладают высоким сродством к связыванию нуклеосом и могут претендовать на роль основных структурных элементов циркулирующих НПК. Кроме того, выявленный в составе НПК крови условно ЗЖ НМGB4 содержит домен НМGB (High Mobility Group Box domain), осуществляющий связывание ДНК и белок-белковые взаимодействия. Показано, что в составе НМGB1 данный домен участвует в связывании вДНК, белков TLR2 и RAGE, опосредующих интернализацию вДНК [496-499].

Таблица 14 – НК-связывающие мотивы в составе белков НПК крови ЗЖ и больных РМЖ

НК-связывающий мотив	Белки НПК (Gene Name)		
	Универсальные	Уникальные для условно ЗЖ	Уникальные для больных РМЖ
Zinc finger C2H2-type	UBP22	KLF10 SLC2A4RG ZNF479	EGR4 GAS2L3 PLAGL2 RNF222 ZNF461 ZNF75A ZNF75CP ZNF75D
RNA recognition motif	U2AF1	ESRP1 MTHFSD SNRNP35 SREK1 SRSF5 ZRSR2P1	ENOX2 MYEF2 REXO5
Homeobox domain	HOXC5	HOXA13 HOXB4 HOXC8	CDX2 HOXB9 POU5F1B UNCX
Zinc finger, CCCH-type	U2AF1	MKRN2 TRMT1 ZRSR2P1	
Basic-leucine zipper (bZIP)	CREM JUND		CHST7 JUN MAFB
Jun-like transcription factor	JUND		JUN
Krüppel-associated box (KRAB)	ZNF479		POGK ZNF461 ZNF75A ZNF75CP ZNF75D
Basic helix-loop-helix (bHLH) domain		MSGN1 NEUROD4	HAND1 NEUROD1
Zinc finger, PHD-type		AIRE FBXL19	PHF1 SP110
HSR domain		AIRE	SP110
Nucleic acid-binding, OB- fold		MCM3	NABP2
SAND domain		AIRE	SP110

Histone H2a/H2b/H3		H2AJ	
(Armadillo-type fold) MIF4G-like domain superfamily		EIF5	
Anticodon-binding domain		TARSL2	
DNA/RNA-binding repeats in PUR-alpha/beta/gamma		PURA	
F-box domain		FBXL19	
G-patch domain		GPATCH4	
High mobility group box domain		HMGB4	
Interferon regulatory factor DNA-binding domain		IRF2	
MCM domain		MCM3	
Neuronal helix-loop-helix transcription factor		NEUROD4	
PIN domain		FCF1	
TATA box-binding protein- associated factor RNA polymerase I subunit A-like		TAF1A	
TGS domain		TARSL2	
Transcription initiation factor TFIID subunit 12 domain		TAF12	
Translation initiation factor IF2/IF5, zinc-binding		EIF5	
Zinc finger, CXXC-type		FBXL19	
Zinc finger, RING-type		MKRN2	
Nascent polypeptide- associated complex NAC domain			NACA
Brinker DNA-binding domain			POGK
Bromodomain			SP110
POU domain			POU5F1B
HSPH1, nucleotide-binding domain			HSPH1
HTH CenpB-type DNA- binding domain			POGK
THAP-type zinc finger			THAP7
(Armadillo-type fold) Uncharacterised domain NUC173			RRP12
Zinc finger C4-type			LMCD1

В настоящий момент белок HMGB4 сравнительно мало описан и изучен, однако его структурные сходства могут указывать на то, что и он, подобно HMGB1, способен не только связывать вДНК [500], но и регулировать её интернализацию, передачу межклеточных сигналов и иммуностимулирующие свойства.

Сравнительный анализ функционального обогащения, проведенный с помощью FunRich показал, что среди ДНК-связывающих белков НПК, циркулирующих в крови условно ЗЖ и больных РМЖ преобладали ядерные (61 и 69%, соответственно) и цитоплазматические белки (по 45 и 48%, соответственно) (рисунок 35).

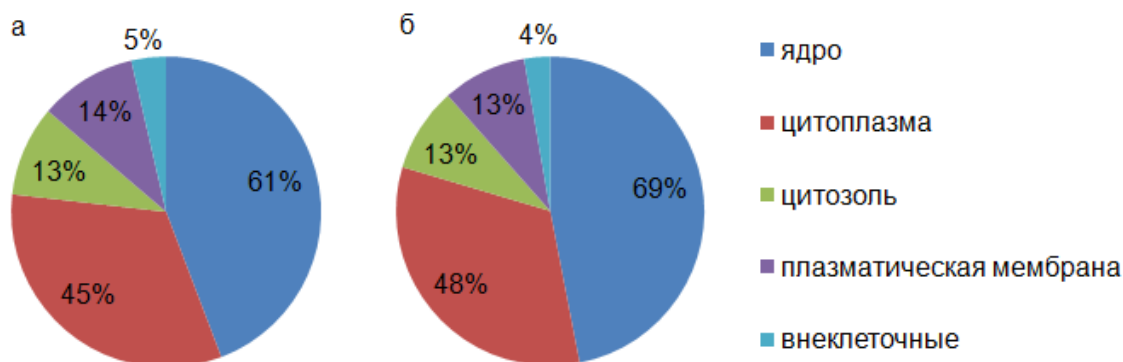


Рисунок 35 – Сравнительный анализ функционального обогащения ДНК-связывающих белков НПК крови условно ЗЖ (а) и больных РМЖ (б) по клеточным компонентам.

В то же время, в крови больных РМЖ в составе НПК повышена представленность ДНК-связывающих белков, вовлеченных в процессы регуляции метаболизма нуклеотидов, нуклеозидов и нуклеиновых кислот (43% при раке и 34% в норме) и снижена представленность ДНК-связывающих белков, вовлеченных в процессы межклеточной коммуникации и передачи сигналов (по 17% в норме и 25% и 27%, соответственно при РМЖ) (рисунок 36).

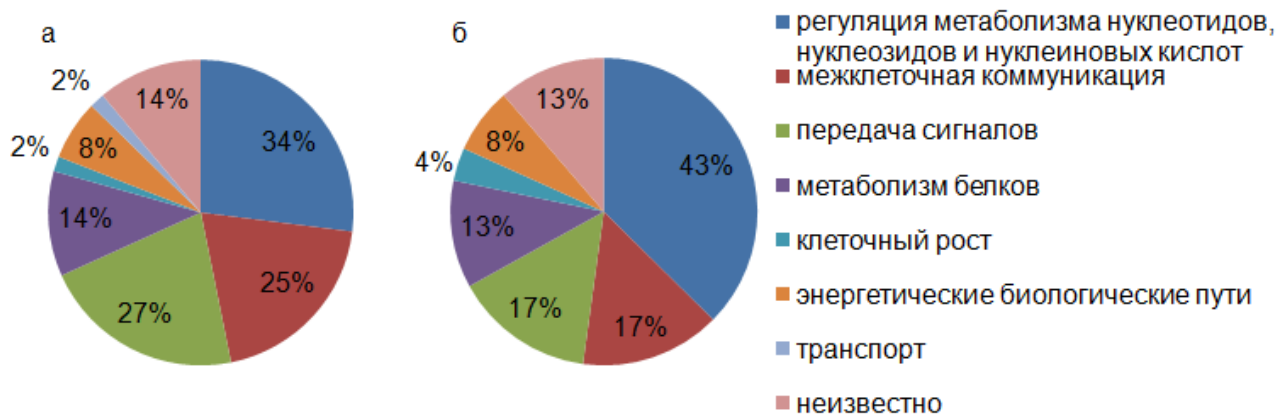


Рисунок 36 – Сравнительный анализ функционального обогащения ДНК-связывающих белков НПК крови условно ЗЖ (а) и больных РМЖ (б) по биологическим процессам.



Помимо ДНК-связывающих белков в состав НПК входят белки, не осуществляющие непосредственное связывание ДНК (белки-«пассажиры»). Анализ белков-«пассажиры» не менее важен как для понимания процессов формирования и строения НПК, так и их функций и особенностей циркуляции. Сравнительный анализ функционального обогащения, проведенный с помощью FunRich показал, что среди белков-«пассажиры» в составе НПК, циркулирующих в крови условно ЗЖ и больных РМЖ преобладали белки цитоплазмы (по 35%), плазматической мембраны и ядра (27% и 28%, 25% и 26%, соответственно) (рисунок 37).

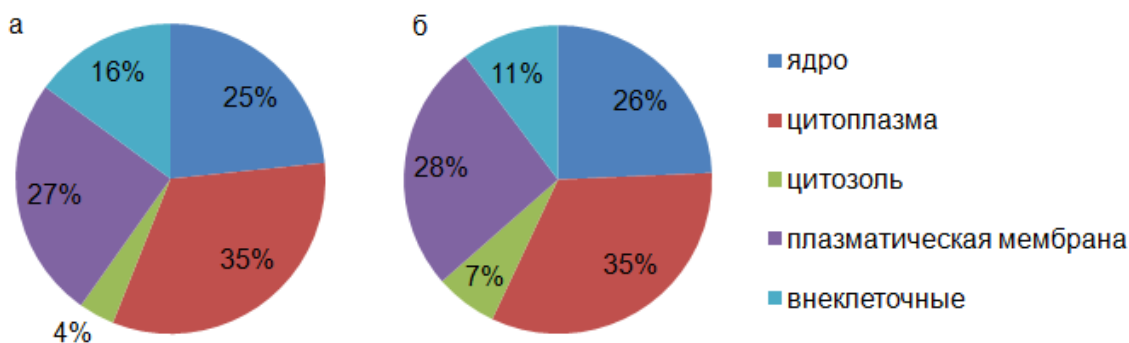


Рисунок 37 – Сравнительный анализ функционального обогащения белков-«пассажиры» НПК крови условно ЗЖ (а) и больных РМЖ (б) по клеточным компонентам.

Среди белков-«пассажиры» НПК крови в норме и при РМЖ сопоставимо представлены белки, регулирующие межклеточную коммуникацию (20% и 22%, соответственно) и передачу сигналов (23% и 24%, соответственно) (рисунок 38); представленность белков-«пассажиры» у условно ЗЖ, опосредующих энергетические пути была в три раза выше, чем у онкологических больных (16% и 5%, соответственно), а белков, вовлеченных в процессы транспорта – ниже (7% и 12%, соответственно).

Таким образом, в состав НПК входят как ДНК-связывающие белки, преимущественно ядерного и цитоплазматического происхождения, так и белки-«пассажиры», имеющие цитоплазматическое и ядерное происхождение, а также плазматической мембраны. Установлено, что в процессы регуляции метаболизма нуклеотидов, нуклеозидов и нуклеиновых кислот вовлечены преимущественно ДНК-связывающие белки, а в процессы межклеточной коммуникации и передачи сигнала – белки-«пассажиры»; также обращает внимание повышение доли белков-«пассажиры» в составе НПК крови больных РМЖ, вовлеченных в неизвестные биологические процессы. По-видимому, белки-«пассажиры» связываются с комплексами через ДНК-связывающие белки и играют значимую роль в транспорте и защите вДНК от действия нуклеаз, узнавании комплекса иммунной системой, интернализации и клиренсе НПК.



Рисунок 38 – Сравнительный анализ функционального обогащения белков-«пассажилов» НПК крови условно ЗЖ (а) и больных РМЖ (б) по биологическим процессам.

Дальнейшее детальное изучение белкового состава циркулирующих НПК крови позволит как использовать данные о циркулирующих ДНК-связывающих белках и мотивах в их составе в рамках диагностических методов для обогащения опухолевой вДНК, так и улучшить мультимаркерные подходы за счёт использования панелей маркеров данной ДНК и циркулирующих в комплексах с ней белков.

### 3.2.3. Опухоль-ассоциированные белки в составе НПК крови больных РМЖ

Для выявления белков, ассоциированных с развитием злокачественных новообразований, уникальные белки НПК крови больных РМЖ были проанализированы с использованием БД dbDEPC. Было показано, что 44 (34 %) белка НПК дифференциально экспрессируются при ряде злокачественных новообразований, из них 14 белков (11%) – при РМЖ (рисунок 39). Однако анализ встречаемости гиперэкспрессированных при РМЖ в тканях белков в составе индивидуальных образцов НПК крови больных РМЖ выявил их крайне низкую диагностическую значимость – каждый маркер встречался только в 13% (2/15 случаев).

В настоящий момент неизвестно, осуществляется ли специфическая сборка НПК при высвобождении вДНК в виде комплексов с нуклеосомами и являются ли они, подобно экзосомам, молекулярным отпечатком секретирующей клетки, включая в свой состав в качестве белков-“пассажилов” гиперэкспрессированные белки.

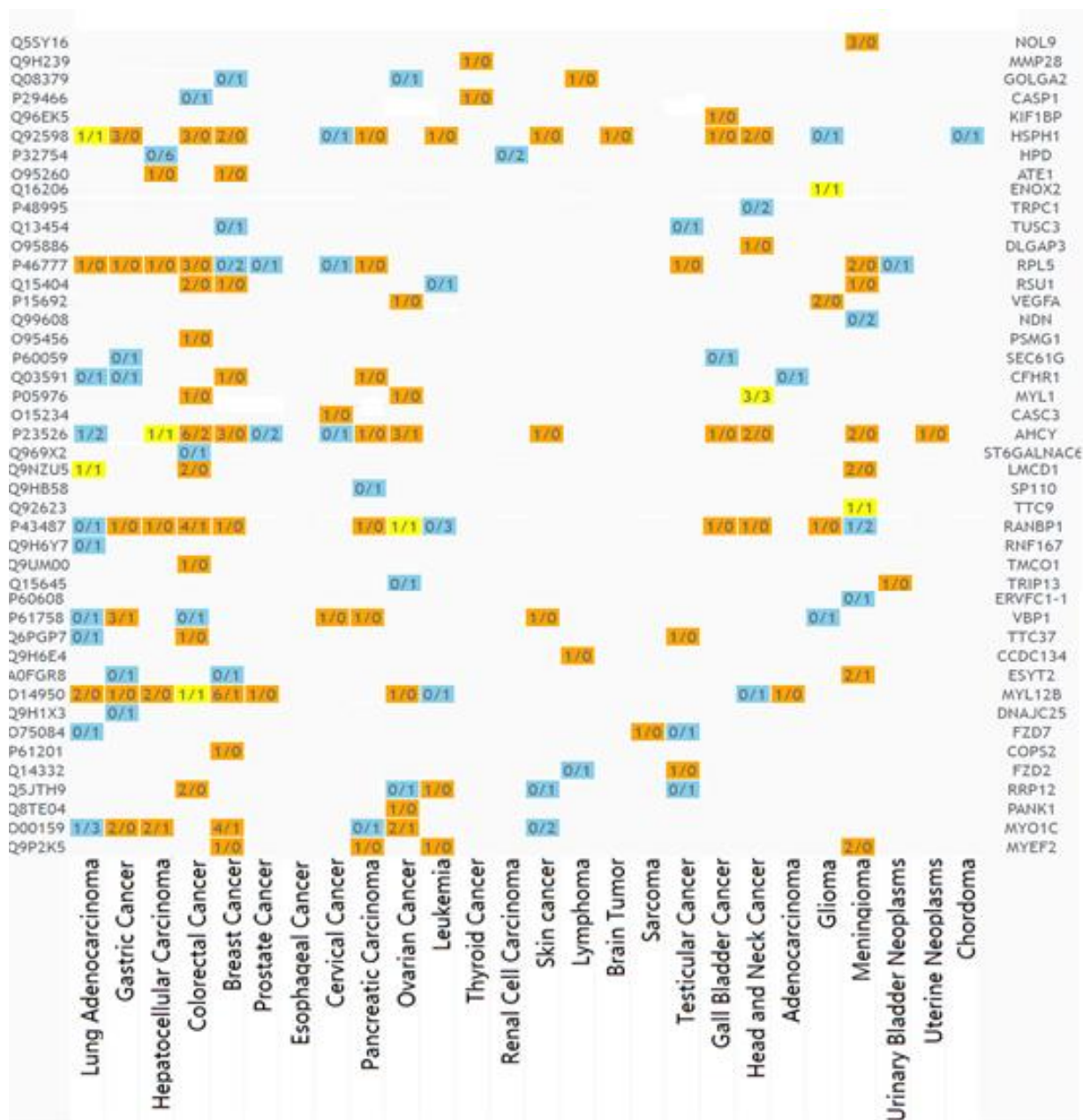


Рисунок 39 – Тепловая карта уникальных белков НПК крови больных РМЖ, ассоциированных с различными типами злокачественных новообразований. Цветом выделены белки, для которых число исследований, идентифицировавших белок, как гиперэкспрессированный > (оранжевый) = (жёлтый) < (голубой) числа исследований, идентифицировавших белок, как гипоекспрессированный.

Комбинация белков SPG7, ADRB1, SMCO4, PHF1, PSMG1 в составе НПК позволяет дифференцировать первичных больных РМЖ ( $T_{1-2}N_0M_0$ ) от условно ЗЖ с чувствительностью 100% и специфичностью 80% (AUC 0,900, 95% доверительный интервал 0,751 до 0,975, рисунок 40), а уменьшение диагностической панели на протеомный маркер SMCO4 приводит к снижению чувствительности до 89% при сохранении специфичности 80%.

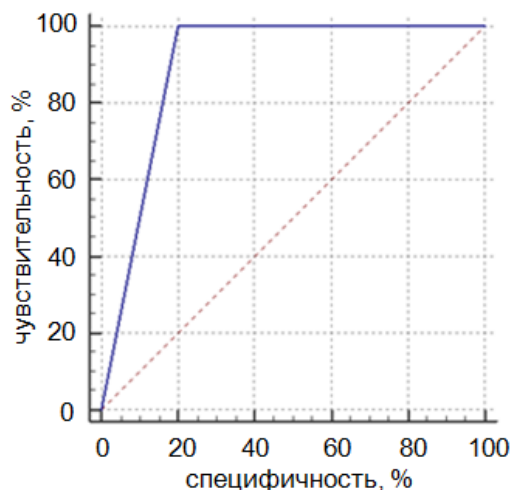


Рисунок 40 – ROC-кривая для определения белков SPG7, ADRB1, SMCO4, PHF1, PSMG1 в НПК плазмы крови. Синяя линия – аппроксимированная кривая ROC.

В таблице 15 приведена информация по выявленным потенциальным опухолевым маркерам РМЖ в составе НПК. Поскольку из пяти потенциально диагностически значимых белков только один является ДНК-связывающим белком (PHF1), вероятно, что именно белки-“пассажиры” обуславливают формирование и структуру НПК, их транспорт и последующую передачу сигналов клеткам-реципиентам.

На следующем этапе диагностически значимые белки НПК (PHF1, SPG7, ADRB1, SMCO4, PSMG1) были проанализированы с использованием данных, доступных в Human Protein Atlas (HPA) ([www.proteinatlas.org/](http://www.proteinatlas.org/)). Было показано, что белок PHF1 гиперэкспрессирован, а белки SMCO4 и PSMG1 имеют средний уровень экспрессии в клетках карциномы молочной железы, при этом все они обладают низкой тканеспецифичностью. Информация об уровне экспрессии белков ADRB1 и SPG7 в тканях молочной железы, их диагностической и прогностической значимости в базе данных HPA отсутствует.

В дальнейшем выявленные уникальные для опухоли-специфических белков ДНК-связывающие мотивы (Nascent polypeptide-associated complex NAC domain, Brinker DNA-binding domain, Bromodomain, POU domain, HSPH1 nucleotide-binding domain, НТН CenpB-type DNA-binding domain, THAP-type zinc finger, (Armadillo-type fold) Uncharacterised domain NUC173 и Zinc finger C4-type) могут быть использованы для обогащения вДНК опухолевого происхождения, что может повысить эффективность диагностики онкологических заболеваний методом «жидкостной биопсии».

Выявленные перспективные протеомные маркеры РМЖ (SPG7, ADRB1, SMCO4, PHF1, PSMG1) НПК необходимо в дальнейшем верифицировать на обширных группах пациентов.

Таблица 15 – Потенциальные протеомные маркеры РМЖ в составе циркулирующих в крови НПК

Роль в НПК	Название белка	Название гена	Описание белка
ДНК-связывающие белки	PHD finger protein 1	PHF1	Цинк-связывающий белок является компонентом комплекса метилтрансфераз, специфичного для Lys-27 гистона H3 (H3K27); участвует в репрессии транскрипции гомеостатических генов. Белок также рекрутируется для двухцепочечных разрывов, а снижение его уровня приводит к чувствительности к рентгеновским лучам и усилению гомологичной рекомбинации.
Белки-«пассажиры»	Beta-1 adrenergic receptor	ADRB1	Интегральный мембранный белок, опосредующий индуцированную катехоламинами активацию аденилатциклазы посредством действия G-белков. Этот рецептор связывает адреналин и норадреналин примерно с одинаковым сродством. Опосредует активацию Ras посредством G(s)- $\alpha$ - и цАМФ-опосредованной передачи сигналов. Также присутствует в ранней эндосоме.
	Proteasome assembly chaperone 1	PSMG1	Цитоплазматический/ядерный белок-шаперон, способствующий сборке 20S протеасомы как части гетеродимера с PSMG2. Гетеродимер PSMG1-PSMG2 связывается с субъединицами протеасом PSMA5 и PSMA7, способствует сборке $\alpha$ -субъединиц протеасомы в гетерогептамерное $\alpha$ -кольцо и предотвращает димеризацию $\alpha$ -кольца.
	Single-pass membrane and coiled-coil domain-containing protein 4	SMCO4	Трансмембранный белок, 17- $\beta$ -эстрадиол снижает, а цисплатин увеличивает экспрессию мРНК SMCO4.
	Paraplegin	SPG7	Трансмембранная АТФ-зависимая цинковая металлопротеаза, вовлечена в фолдинг белков и протеолиз.

В комбинации с анализом последовательностей опухолевой вДНК данные опухолеассоциированные белки НПК могут служить потенциальными мишенями для разработки мультимаркерных подходов для ранней неинвазивной диагностики злокачественных новообразований.

## ГЛАВА 4.

### Сравнительный анализ экзосом плазмы и экзосом крови условно здоровых женщин и больных РМЖ

За последние 10 лет наблюдается феноменальный рост числа публикаций в области исследования состава, функций и клинического использования экзосом: согласно БД Pubmed (<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/>) в 2013 г этой теме была посвящена 661 статья, а в 2022 – уже 5134. Поскольку экзосомы транспортируются с током крови по всему организму и частично отражают состав родительских клеток, эти везикулы можно использовать как для доставки терапевтических препаратов, так и для выявления соответствующих биомаркеров. В тоже время пока отсутствует информация о составе и биологических функциях недавно обнаруженных экзосом, ассоциированных с ФЭК. Сравнительный анализ состава и биологической активности экзосом плазмы и экзосом крови онкологических больных позволит не только расширить фундаментальные знания о распределении экзосом между плазмой и ФЭК, но и заложит базу для создания новых вариантов диагностики злокачественных заболеваний, позволит создать фундаментальные предпосылки для возможной оптимизации противоопухолевой терапии.

#### 4.1. Характеризация экзосом из плазмы и экзосом крови

Пул циркулирующих в крови онкологических больных экзосом состоит из экзосом, секретруемых лейкоцитами, эритроцитами, тромбоцитами и эндотелиоцитами, а также клетками тканей, такими как фибробласты, эпителиальные клетки и опухолевые клетки [501, 502]. Поскольку циркулирующие в крови экзосомы несут на своей поверхности специфические рецепторы для адресной доставки биологически-активных молекул к клеткам-мишеням, можно предположить, что эти везикулы также способны взаимодействовать с плазматическими мембранами ФЭК, при этом часть экзосом не подвергается немедленному слиянию с мембраной и может какое-то время оставаться на поверхности клетки в виде ассоциированных с клетками везикул.

Для подтверждения данной гипотезы экзосомы были выделены из PBS-EDTA элюата и трипсинового элюата с поверхности ФЭК условно ЗЖ (n = 21) и больных РМЖ (таблица 16).

В образцах с подтвержденным отсутствием гемолиза (концентрация гемоглобина при 414 нм была ниже 0,175 усл. ед./мл во всех образцах) проводили оценку целостности плазматических мембран путем измерения активности ЛДГ в плазме и клеточных элюатах и

ТЭМ ультратонких срезов. Было показано, что доля разрушенных клеток не превышает 0,0014% (таблица 17), а также отсутствуют следы повреждений плазматической мембраны. Ядро и все мембранные органеллы (митохондрии, аппарат Гольджи, ЭПР, эндосомы и лизосомы) также имели неповрежденную структуру (рисунок 41).

Таблица 16 – Характеристика группы больных РМЖ, образцы крови которых использованы для хакартеризации экзосом плазмы и экзосом крови

Клинико-патологические характеристики		Частота встречаемости
Стадия	T1-T2	20 (100%)
Метастазы в регионарных лимфоузлах	N0	14 (70%)
	N1	6 (30%)
Удаленные метастазы	M0	20 (100%)
Люминальный РМЖ		15 (75%)
Трижды-негативный РМЖ		5 (25%)
Степень злокачественности	II	16 (80%)
	III	2 (10%)
	неизвестно	2 (10%)
Гистологический подтип	Инвазивная протоковая карцинома	20 (100%)

Таким образом, двустадийная элюция экзосом с поверхности ФЭК не приводит к лизису плазматических мембран и использованный подход может быть использован для получения везикул, ассоциированных с ФЭК.

Таблица 17 – Доля разрушенных клеток в результате элюции экзосом с поверхности ФЭК, оцененное измерением активности ЛДГ

Образцы	Доля разрушенных клеток, %	
	Среднее значение	Диапазон значений
Условно ЗЖ (n = 10)	$2,4 \times 10^{-4}$	$8,4 \times 10^{-5} - 4,0 \times 10^{-4}$
Больные люминальным РМЖ (n = 9)	$1,13 \times 10^{-3}$	$8,6 \times 10^{-4} - 1,4 \times 10^{-3}$

В дальнейшей работе для выяснения роли экзосом, ассоциированных с ФЭК, в развитии опухолевых новообразований и оценки их диагностического потенциала проводили характеристику и сравнительный анализ экзосом плазмы и экзосом крови (образцы включали экзосомы из плазмы, из PBS-EDTA элюата и из трипсинового элюата) условно ЗЖ (n = 21) и больных РМЖ (таблица 16).

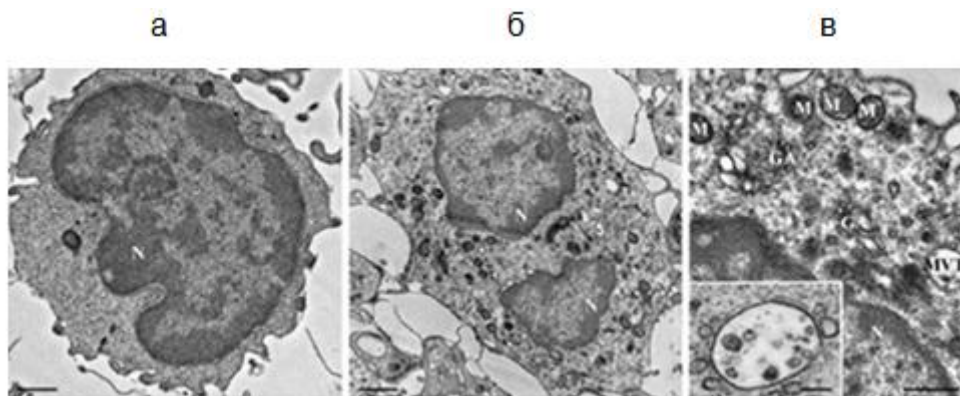


Рисунок 41 – ТЭМ ультратонких срезов клеток крови после элюции экзосом с поверхности ФЭК. Ультратонкие срезы контрастировали уранилацетатом и цитратом свинца: лимфоцит (а), нейтрофил (б), часть нейтрофила (в), на врезке – МВТ, N – ядро, М – митохондрия, GA – аппарат Гольджи. Масштаб: а–в – 1 мкм, на врезке – 200 нм. ТЭМ проведена к.б.н. Григорьевой А.Е. (группа микроскопических исследований ИХБФМ СО РАН).

Для подтверждения экзосомальной природы выделенных везикул из плазмы и везикул из крови была проведена трансмиссионная и крио-электронная микроскопия, размер и концентрацию микровезикул оценивали трековым анализом, наличие поверхностных тетраспанинов подтверждали проточной цитометрией.

С помощью ТЭМ было показано, что 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 [503, 504]. В полученных нами препаратах основная часть везикул как из плазмы, так и везикул из крови условно ЗЖ и больных РМЖ имела размеры 40-100 нм и морфологические характеристики экзосом (чашеобразная форма с двойной мембраной) (рисунок 42). Содержание везикул с поврежденной мембраной во всех препаратах не превышало 10%, доля микровезикул (размером менее 30 нм) составила не более 15%.

Морфология экзосом из плазмы и экзосом из крови условно ЗЖ и больных РМЖ также была исследована с помощью крио-электронной микроскопии. При оценке распределения везикул различного строения и размеров были проанализированы 100 и 116 изображений везикул из плазмы и из крови условно ЗЖ (рисунок 43 а,б); 121 и 117 изображений везикул из плазмы и из крови больных РМЖ, соответственно (рисунок 43 в,г).

Более 90% внеклеточных везикул были идентифицированы как экзосомо-подобные везикулы благодаря наличию липидного бислоя/мембраны. Большинство везикул были одиночными и имели округлую или слегка вытянутую форму. Одинарные (рисунок 43 а–е), двойные (рисунок 43 а–г, ж, з), с двойной мембраной (рисунок 43 л–м), и многослойные экзосомо-подобные везикулы (рисунок 43 а–г, и, к) были обнаружены во всех образцах



выделенных везикул из пулированной плазмы и из пулированной крови условно ЗЖ и больных РМЖ. Следует отметить, что одинарные везикулы были преимущественно представлены в плазме условно ЗЖ, а в препаратах из крови ЗЖ их содержание уменьшалось (с 91% до 37%), при этом увеличивалась доля двойных везикул (с 3 до 20%) и двухмембранных везикул (с 0 до 22%) (таблица 18). Морфология выделенных везикул из плазмы и из крови больных РМЖ были сопоставимы с преобладанием одиночных везикул (81 и 70%, соответственно; таблица 18).

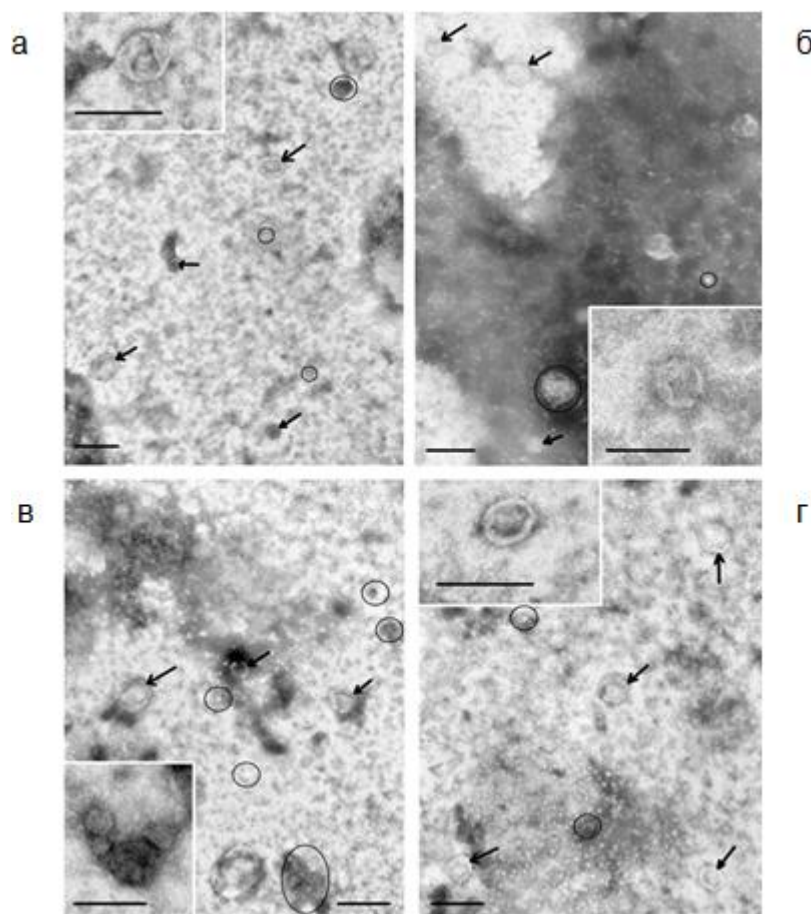


Рисунок 42 – ТЭМ, негативное контрастирование фосфорновольфрамовой кислотой. Препараты экзосом, выделенные из плазмы крови условно ЗЖ (а), плазмы крови больных РМЖ (б), экзосом крови условно ЗЖ (в), экзосом крови больных РМЖ (г). Овалом выделены «не-везикулы», стрелками обозначены экзосомы, на врезках – экзосомы. Длина масштабной линии соответствует 100 нм. ТЭМ проведена к.б.н. Григорьевой А.Е. (группа микроскопических исследований ИХБФМ СО РАН, Новосибирск, Россия).

Подобные типы внеклеточных везикул ранее были описаны в эякуляте и спинномозговой жидкости [506, 507]. В текущей работе впервые продемонстрировано, что в плазме условно ЗЖ и плазме и крови больных РМЖ преобладают одиночные экзосомы, а в крови условно ЗЖ их доля снижена почти в 2,5 раза. Поскольку экзосомы крови содержат две фракции (экзосомы плазмы и экзосомы, ассоциированные с поверхностью ФЭК), выявленное явление свидетельствует о преобладании на поверхности ФЭК экзосом

различной морфологии. Это позволяет предположить, что существуют субпопуляции экзосом с различными специфическими функциями, а ФЭК выступают в качестве их переносчиков. Более того, по-видимому, при злокачественном новообразовании происходит перераспределение этих субпопуляций.

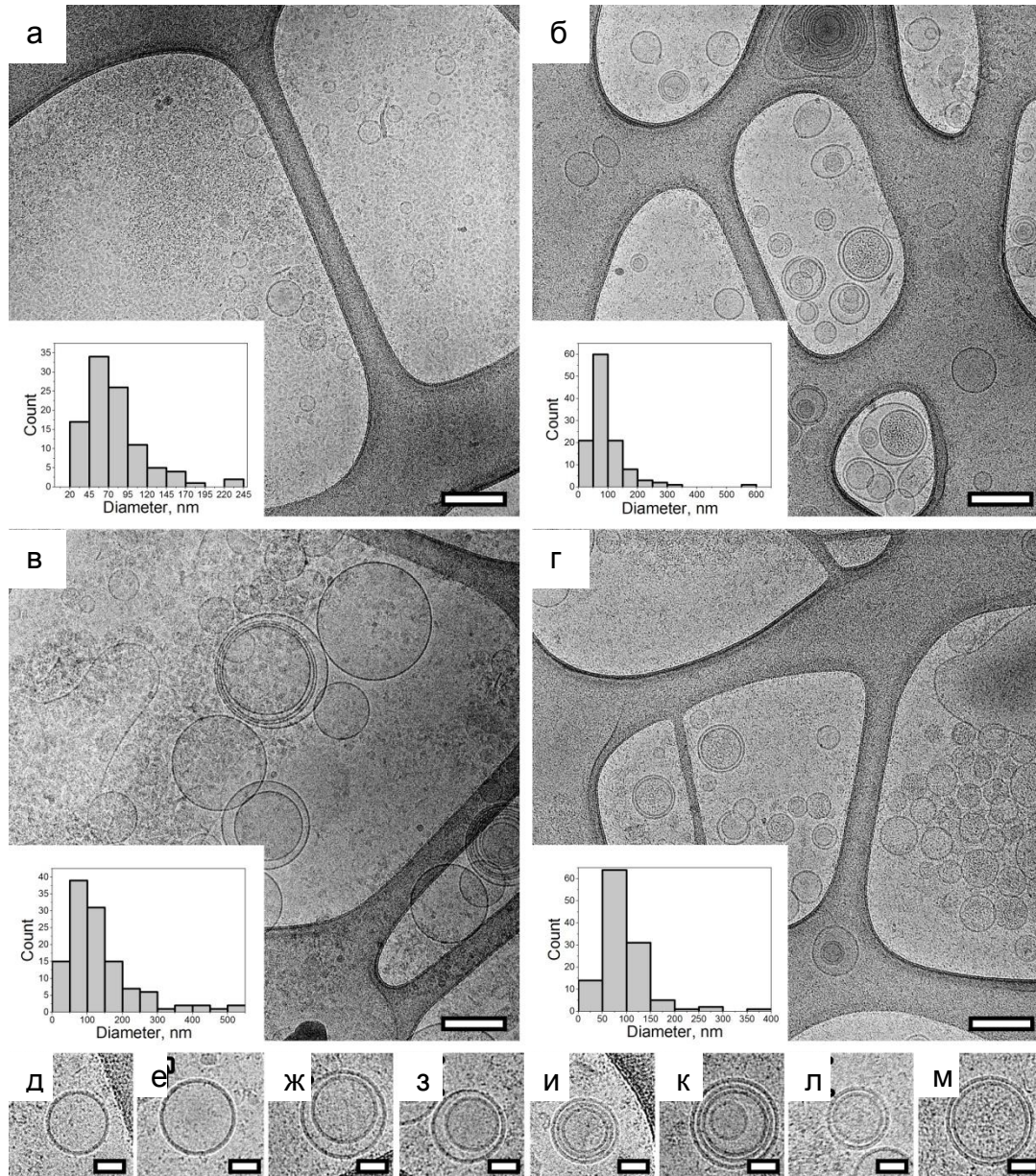


Рисунок 43 – Представленность экзосом с различной морфологией. Крио-ЭМ-изображения экзосом, выделенных из объединенных образцов плазмы условно ЗЖ (а), крови условно ЗЖ (б), плазмы больных РМЖ (в), крови больных РМЖ (г), одинарных везикул (д, е), двойных везикул (ж, з), многослойных везикул (и, к), двухмембранных везикул (и-м), везикул с электронно-плотным содержимым (ж, м). Масштабные линейки составляют 500 нм для микрофотографий (а-г) и 100 нм для микрофотографий (д-м). Кримоэлектронная микроскопия проведена к.х.н. Р. Камышлинским в Ресурсном центре зондовой и электронной микроскопии НИЦ «Курчатовский институт» (Москва, Россия).

Таблица 18 – Доля одно-, двух-, двухмембранных, многослойных и везикул с электронно-плотным содержимым в образцах везикул объединенных образцов плазмы и крови условно ЗЖ и больных люминальным РМЖ

Источник экзосом		% везикул				
		одинарные	двойные	с двойной мембраной	многослойные	с электронно-плотным содержимым
Условно ЗЖ	Плазма	91	3	0	2	4
	Кровь	37	20	22	8	13
Больные РМЖ	Плазма	81	8	3	3	5
	Кровь	70	10	9	5	6

Согласно данным крио-электронной микроскопии, экзосомо-подобные везикулы из плазмы больных РМЖ были достоверно крупнее по сравнению везикулами из плазмы условно ЗЖ ( $135 \pm 9$  и  $78 \pm 4$  нм, соответственно,  $p < 0,0001$ ); однако экзосомо-подобные везикулы в крови имели сопоставимые размеры ( $91 \pm 5$  и  $92 \pm 5$  нм, соответственно). Таким образом, полученные данные косвенно свидетельствуют о том, что в крови условно ЗЖ ассоциированные с поверхностью ФЭК экзосомо-подобные везикулы крупнее, чем в плазме ( $p = 0,0322$ ), а в крови больных РМЖ - наоборот ( $p = 0,0007$ ) (рисунок 43).

При помощи трекового анализа было показано, что как в норме, так и при РМЖ около половины экзосом крови ассоциированы с поверхностью ФЭК (медианы экзосом в плазме от общего содержания экзосом в крови составили 43% и 55%, соответственно) (рисунок 44, таблица 19).

Таблица 19 – Концентрация и распределение по размерам экзосом из плазмы и экзосом из крови условно ЗЖ и больных РМЖ. Данные по трековому анализу частиц

Источник экзосом		Медиана концентрации экзосом (везикул/мл крови) $\times 10^9$	Медиана размера везикул, нм
Условно ЗЖ	Плазма	7,9	116
	Кровь	18,4	115
Больные люминальным РМЖ	Плазма	31,9	106
	Кровь	57,4	108

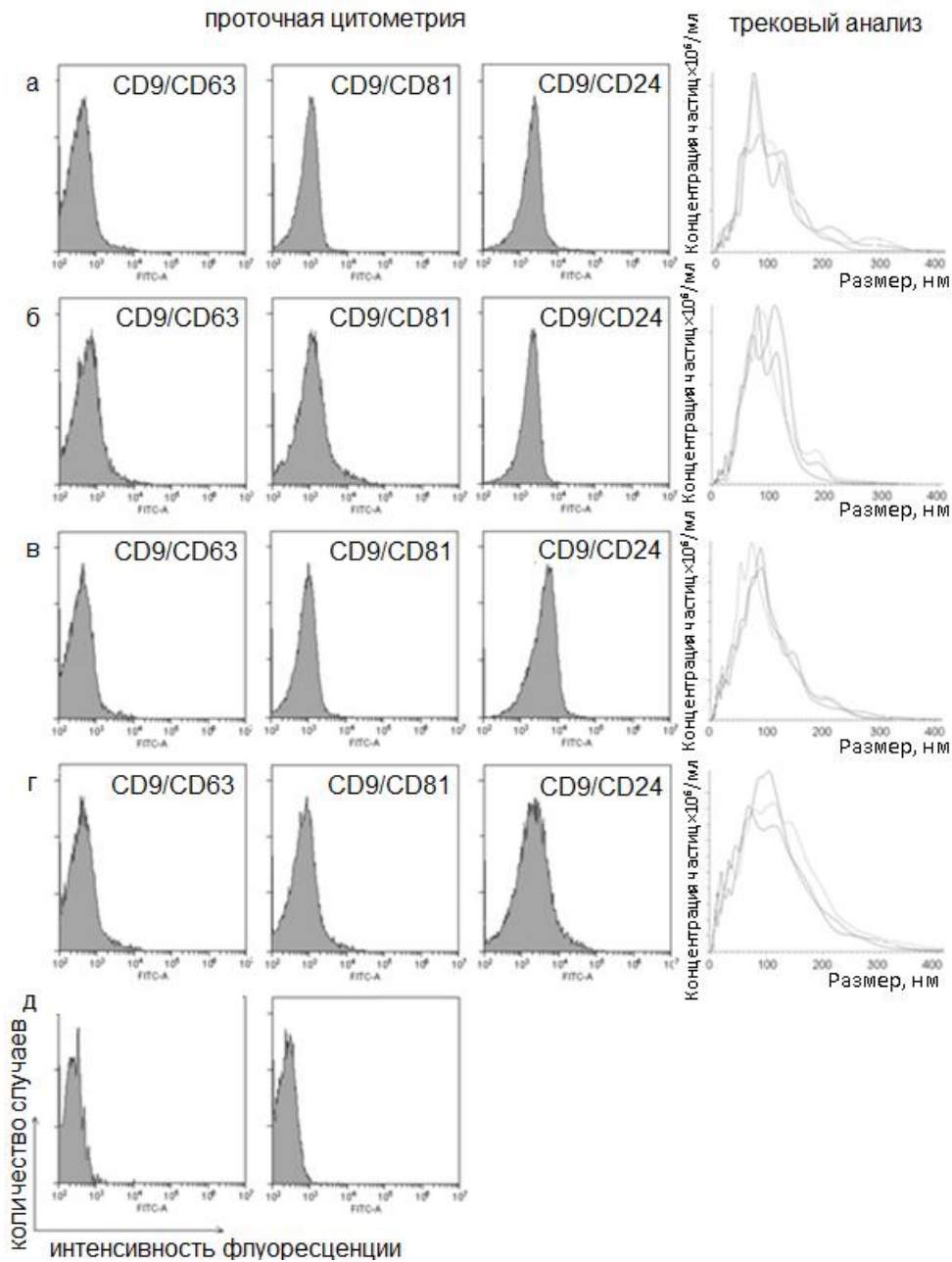


Рисунок 44 – Характеризация экзосом с помощью трекового анализа и проточной цитометрии. Для проточной цитометрии показаны средние значения MFI. Плазма условно ЗЖ (а), кровь условно ЗЖ (б), плазма больных люминальным РМЖ (в), кровь больных люминальным РМЖ (г), изотипический контроль и отрицательный контроль (покрытые анти-CD9 антителами латексные частицы, окрашены антителами против CD81-FITC) (д).

Показано, что при люминальном РМЖ концентрация экзосом достоверно повышается как в плазме, так и в крови больных по сравнению с условно ЗЖ ( $p < 0,05$ ). Необходимо отметить, что трековый анализ позволяет получить данные гидродинамического радиуса и концентрации индивидуальных наночастиц независимо от их природы и структуры; однако данный метод не позволяет отличить индивидуальные везикулы от белковых/белково-липидных агрегатов и агрегатов везикул.

Выделенные из крови экзосомо-подобные везикулы были охарактеризованы проточной цитометрией на наличие экзосомальных маркеров (рисунок 44). По убыванию MFI как в плазме, так и в крови условно ЗЖ и больных люминальным РМЖ были идентифицированы следующие субпопуляции везикул: CD9/CD24 > CD9/CD81 > CD9/CD63, т.е. субпопуляция CD9/CD24-позитивных экзосомо-подобных везикул преобладала как в плазме, так и в крови и в норме, и при РМЖ (таблица 20).

Таблица 20 – Экспрессия CD24, CD63 и CD81 на поверхности CD9-положительных экзосом крови условно ЗЖ и больных люминальным РМЖ (MFI ± SEM)

Источник экзосом		CD 24	CD 63	CD 81
Условно ЗЖ	Плазма	1080±130	540±97	740±81
	Кровь	865±129	570±74	770±85
Больные РМЖ	Плазма	1200±132	480±57	710±92
	Кровь	1350±189	515±77	745±89

\*- различия были значимыми по сравнению с условно ЗЖ ( $p < 0,05$ ).

Таким образом, наиболее часто как в норме, так и при патологии в крови выявляются экзосомы, экспрессирующие рецепторы CD9 и CD24, которые, по-видимому, были секретированы эндотелиоцитами и ФЭК. Рецептор CD63 удаётся обнаружить на поверхности наименьшего количества экзосом, причём эти экзосомы экспонируют одновременно и другие рецепторы (CD9, CD24). При развитии РМЖ не выявлено достоверных различий по MFI между популяциями CD9/CD24-позитивных, CD9/CD63-позитивных и CD9/CD81-позитивных везикул плазмы и везикул крови. Подобного типирования субпопуляций экзосом при развитии злокачественных заболеваний ранее не проводили, однако известно, что повышенное содержание CD151 в составе экзосом плазмы коррелирует со стадией заболевания и метастазами в лимфоузлы у пациентов с инвазивным протоковым РМЖ [507, 508], а CD82 – с плохим прогнозом у пациентов с раком яичников и молочной железы [509].

В совокупности полученные данные показывают, что внеклеточные везикулы, выделенные из плазмы и из крови, обладают всеми свойствами экзосом (морфология, размер, наличие поверхностных тетраспанинов). Увеличение концентрации и изменение морфологии ассоциированных с ФЭК экзосом уже при T<sub>1-2</sub>N<sub>0-1</sub>M<sub>0</sub> косвенно указывает на значимость везикул данного типа в развитии люминального и ТН-РМЖ.

## **4.2. Тетраспанин-ассоциированные и тетраспанин-неассоциированные протеазы в составе экзосом крови условно здоровых женщин и больных РМЖ**

Известно, экзосомы осуществляют межклеточную коммуникацию путем переноса от клеток-доноров к клеткам-реципиентам таких биологически активных молекул, как белки и различные типы РНК. Широко представленные в экзосомах мажорные тетраспанины (CD9, CD63, CD81) вовлечены не только во взаимодействие везикул с клетками, но и взаимодействуют с различными белками, формируя функциональные тетраспаниновые комплексы. Эти комплексы включают в себя различные белки, в том числе протеазы. Среди тетраспанин-ассоциированных экзосомальных протеаз большое внимание привлекают ADAM-протеазы, уровень которых коррелирует с локальной инвазией и миграцией клеток [510]. В частности, ADAM-10 осуществляет эктодоменный шеддинг различных субстратов, в том числе рецепторов факторов роста, рецепторов адгезии и кадгеринов, что в результате индуцирует подвижность клеток и увеличивает метастатический потенциал опухолевых клеток [511-513].

Также существенный вклад в опухолевую прогрессию вносят неассоциированные с тетраспанинами протеазы, в частности 20S протеасомы. Протеасомы, обладающие трипсиноподобной, химотрипсиноподобной и каспазоподобной активностью, имеют большое значение для внутриклеточной деградации белков, что обуславливает их важную роль в возникновении и развитии злокачественных новообразований [514]. Показано, что протеасомы участвуют в регуляции пролиферации, апоптоза, миграции клеток, транскрипции генов и иммунного ответа, разрушая или активируя белки – компоненты сигнальных путей, факторы транскрипции и другие функционально значимые молекулы [515, 516]. Недавно ADAM-10 и 20S протеасомы были обнаружены в составе экзосом мезенхимальных стволовых клеток [517], эндотелиальных клеток [518] и клеток рака яичников [519]. Однако уровень этих ферментов в экзосомах крови в норме и при онкологии до сих пор остается неясным.

Поскольку на поверхности экзосом плазмы и экзосом крови наиболее представлены CD9 и CD24, уровень тетраспанин-ассоциированной металлопротеиназы ADAM-10 был оценен в CD9- и CD24-позитивных экзосомах условно ЗЖ ( $n = 30$ ) и больных РМЖ ( $n = 30$ , таблица 21). Было обнаружено, что уровень поверхностной формы ADAM-10 достоверно возрастает в субпопуляции CD9-положительных экзосом, выделенных как из плазмы, так и из крови больных люминальным РМЖ по сравнению с нормой (в 1,8 и 1,3 раза, соответственно, ( $p < 0,05$ )) (таблица 22). Более того, уровень ADAM-10 был достоверно выше в составе CD9-позитивных экзосом плазмы по сравнению с экзосомами из крови больных

люминальным РМЖ ( $p < 0,05$ ). Отсутствие достоверных изменений уровня шеддазы в составе CD24-позитивных экзосом плазмы и экзосом крови в норме и при РМЖ может объясняться тем, что включение зрелой формы ADAM-10 в экзосомы и ее протеолитическая активность регулируются тетраспанинами CD9, CD81, CD82 [520].

Таблица 21 – Клинико-патологическая характеристика больных РМЖ, образцы крови которых использованы для оценки уровня ADAM-10 в составе экзосом

Клинико-патологическая характеристика		№ (%)
Люминальный подтип		25 (83)
Трижды-негативный подтип		5 (17)
Стадия	T1	15 (50)
	T2	15 (50)
Метастазы в регионарных лимфоузлах	N0	24 (80)
	N1	6 (20)
Удаленные метастазы	M0	30 (100)
Степень злокачественности	II	28 (93)
	III	2 (7)
Общее количество пациенток		30 (100%)

Полученные данные позволяют предположить, что при развитии РМЖ увеличение уровня ADAM-10 на поверхности экзосом снижает возможность их связывания с ФЭК, что в свою очередь позволяет экзосомам выполнять роль посредников в обеспечении межклеточной коммуникации посредством горизонтального переноса РНК и белков [521], влияя на развитие как первичного новообразования, так и отдаленных метастазов. Более того, повышенный уровень ADAM-10 на поверхности экзосом больных РМЖ может в значительной степени определять опухолевый рост и диссеминацию, модифицируя локальное микроокружение и делая доступными заключенные в матрикс ростовые факторы, с одной стороны и, растворяя компоненты внеклеточного матрикса и повышая миграционную и инвазивную активность опухолевых клеток, с другой [241, 517].

Ранее было показано, что экзосомальные интегрины  $\alpha\beta4$  и  $\alpha\beta1$  ассоциированы с метастазами в легкие, тогда как экзосомальный интегрин  $\alpha\beta5$  - с метастазами в печень. Воздействие на интегрины  $\alpha\beta4$  и  $\alpha\beta5$  снижало поглощение экзосом, а также метастазирование в легкие и печень, соответственно [522]. Поскольку ADAM-протеазы экзосом взаимодействуют с интегринными, можно предположить, что ассоциация ADAM-интегринов подтверждает органотропный характер метастазов, а выявленные различия в представленности ADAM-10 на поверхности экзосом крови у больных с люминальным и трижды-негативным РМЖ – усиливает косвенные доказательства этой гипотезы.

Таблица 22 – Оценка представленности ADAM-10 на поверхности CD 9+ и CD 24+ экзосом в крови условно ЗЖ и больных РМЖ (MFI ± SEM)

Источник экзосом		CD9+	CD24+
Условно ЗЖ	Плазма	844±99	884±124
	Кровь	804±79	920±91
Больные люминальным РМЖ	Плазма	<b>1531±162*</b>	926±94
	Кровь	<b>1026±100*</b>	1103±99
Больные ТН-РМЖ	Плазма	962±88	908±109
	Кровь	862±69	969±106

\*статистически значимые отклонения по сравнению с нормой.

Сравнительный анализ уровня 20S протеасом выявил статистически значимое увеличение тетраспанин-неассоциированной протеазы в экзосомах плазмы и экзосомах крови больных РМЖ (n = 80, таблица 23) по сравнению с условно ЗЖ (n = 39) (в 1,6 и 2,8 раза, соответственно,  $p < 0,05$ , (таблица 24, рисунок 45а).

Таблица 23 – Клинико-патологическая характеристика больных РМЖ, образцы крови которых использованы для оценки уровня 20S протеасом в составе экзосом

Клинико-патологическая характеристика		Люминальный РМЖ, n = 61	ТН-РМЖ, n = 19	Всего пациентов, n = 80
Стадия опухоли	T1	19 (31%)	7 (27%)	26 (33%)
	T2	42 (69%)	12 (63%)	54 (67%)
Регионарные метастазы	N0	30 (49%)	13(68%)	43 (54%)
	N1	31 (51%)	6 (32%)	37(46%)
Удаленные метастазы	M0	61 (100%)	19 (100%)	80 (100%)
Степень злокачественности	II	61 (100%)	19 (100%)	80 (100%)

Более того, уровень 20S протеасом в экзосомах крови онкологических больных ассоциирован с молекулярным подтипом РМЖ. В частности, уровень экзосомальной 20S протеасомы был значительно выше при ТН-подтипе, чем при менее агрессивных люминальных подтипах (таблица 25, рисунок 45б).

Известно, что убиквитин-протеасомная система является важным механизмом подавления эстрогенового рецептора [523] и позволяет его быстро удалять для поддержания надлежащего уровня данного белка в ответ на гормональную стимуляцию. Полученные нами результаты позволяют предположить, что именно содержимое экзосом, а не количество



везикул играет основную роль в развитии резистентности к противоопухолевой терапии [524].

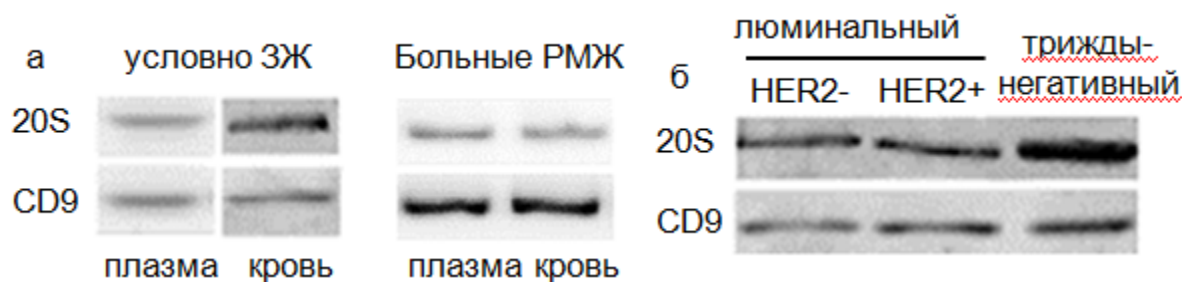


Рисунок 45 – Уровень 20S протеасом в экзосомах плазмы и экзосомах крови условно ЗЖ и больных РМЖ. Вестерн-блоттинг с использованием антител против  $\alpha$  и  $\beta$ -субъединиц протеасомы 20S. CD9 использован в качестве внутреннего контроля. Экзосомы плазмы и экзосомы крови условно ЗЖ и больных РМЖ(а); экзосомы больных люминальным РМЖ и с ТН-РМЖ (б).

При оценке химотрипсинподобной и каспазаподобной протеасомной активности было показано, что экзосомы не обладают ферментативной активностью (данные не представлены). Вероятно, выявленное повышенное содержание 20S протеасомы в экзосомах крови онкологических больных, не проявляющей ферментативной активности, способствует доставке интактных биологически активных белков (транскрипционных факторов, ферментов и т. д.) от трансформированных клеток к клеткам-мишеням. Доставляемые экзосомой комплексы протеасома-ингибитор могут диссоциировать, а ферментативно активная протеасома может участвовать в регуляции множества клеточных процессов посредством элиминации определенных белков и/или образования пептидов [525].

Таблица 24 – Уровень 20S протеасомы ( $\alpha+\beta$ ) в составе экзосом плазмы и экзосом крови условно ЗЖ и больных РМЖ, отн. ед.

Источник экзосом		Медиана и диапазон [25;75%], отн. ед.
Условно ЗЖ	Плазма	1,00 [0,90; 1,12]
	Кровь	1,15 [0,95; 1,22]
Больные РМЖ	Плазма	1,59 [1,22; 1,61]*
	Кровь	2,28 [1,95; 2,61]*

\* значимые различия между условно ЗЖ и онкологическими больными,  $p < 0,05$ .

Таким образом, субпопуляционный состав экзосом и их протеазный груз различаются в крови условно ЗЖ и онкологических больных. Выявленное перераспределение тетраспанин-ассоциированных и тетраспанин-неассоциированных протеаз в субпопуляциях экзосом при

разных подтипах РМЖ свидетельствует о различных механизмах сортировки биологически активных молекул в везикулы, большинство из которых до конца не изучены.

*Таблица 25 – Уровень 20S протеасомы ( $\alpha+\beta$ ) в составе экзосом плазмы условно ЗЖ и больных РМЖ с различными подтипами, отн. ед.*

Источник экзосом		Медиана и диапазон [25;75%], отн. ед.
Условно ЗЖ		1,00 [0,90; 1,12]
Больные РМЖ	Люминальный РМЖ	1,57 [1,22; 1,73]*
	ТН-РМЖ	1,94 [1,58; 2,67]****

\* статистически значимые различия между условно ЗЖ и онкологическими больными,  $p < 0,05$ . \*\* статистически значимые различия между люминальным РМЖ и ТН-РМЖ,  $p < 0,05$ .

Тем не менее, полученные результаты о содержании ADAM-10 и 20S протеасомы в экзосомах плазмы и в экзосомах крови указывают на значимую роль везикул, ассоциированных с ФЭК, в развитии рака. Дальнейшее понимание роли различных субпопуляций экзосом в микроокружении опухоли и метастазировании рака позволит разработать опухоли-специфические терапевтические агенты, что приведет к снижению инвалидизации и увеличению длительности жизни женщин трудоспособного возраста.

### **4.3. Протеомный портрет экзосом плазмы и экзосом крови условно здоровых женщин и больных РМЖ**

Несмотря на то, что экзосомы отражают молекулярный состав секретирующих их клеток, направленный транспорт биологически-активных молекул в эти везикулы позволяет им оставаться уникальными структурами. Поскольку механизм сортировки различных типов РНК и белков в экзосомы пока не достаточно изучен, для выявления уникальных для опухолевых везикул белков был проведен сравнительный анализ протеома экзосом плазмы и экзосом крови условно ЗЖ и больных РМЖ.

На первом этапе были получены 2D-протеомные карты (по три 2D-электрофореграммы/образец) экзосом плазмы и экзосом крови условно ЗЖ ( $n = 6$ ) и больных РМЖ ( $n = 8$ , таблица 26) (рисунок 46). Было установлено, что в составе экзосом присутствуют белки с молекулярной массой от 10 до 250 кДа. Наиболее значимые различия между протеомными картами экзосом крови условно ЗЖ 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 (рисунок 46).

*Таблица 26 – Клинико-патологическая характеристика больных РМЖ, образцы крови которых использованы для выявления уникальных для РМЖ белков экзосом методом 2D-электрофореза*

Клинико-патологическая характеристика		№ (%)
Люминальный подтип		6 (75%)
Трижды-негативный подтип		2 (25%)
Стадия	T1	4 (50%)
	T2	4 (50%)
Метастазы в регионарных лимфоузлах	N0	8 (100%)
Удаленные метастазы	M0	8 (100%)
Степень злокачественности	II	8 (100%)
Инвазивная протоковая карцинома		8 (100%)
Общее количество онкологических больных		8 (100%)

Поскольку в литературе отсутствуют протеомные атласы экзосомальных белков, не представлялось возможным идентифицировать белки, уровень экспрессии которых значительно изменяется при развитии РМЖ. В связи с этим, на следующем этапе работы для идентификации белков в составе экзосом крови была использована масс-спектрометрия.

С помощью MALDI-TOF масс-спектрометрии с высокой достоверностью ( $p < 0,05$ ) в образцах экзосом крови условно ЗЖ ( $n = 18$ ) и больных РМЖ ( $n = 17$ , таблица 27) идентифицированы 111 и 146 белков, соответственно (Приложения 1К-Н). Доля универсальных белков (обнаруживались во всех образцах) составила 15% (34 белка, Приложение 1О), а доля белков, уникальных для экзосом крови условно ЗЖ и больных РМЖ, – 27% и 49%, соответственно (рисунок 47).

Анализ идентифицированных белков в составе экзосом плазмы и экзосом крови условно ЗЖ и больных РМЖ проводили с использованием ПО Funrich v3.1.3 и БД Vesiclepedia и БД ExoCarta. Показано, что 105 (80%) идентифицированных нами белков экзосом плазмы уже обнаруживали в составе внеклеточных везикул, и они аннотированы в БД Vesiclepedia. Аналогично, в результате анализа представленности идентифицированных в настоящей работе белков экзосом плазмы в БД ExoCarta показано, что 71 (54%) белок экзосом плазмы выявлен ранее в протеомных исследованиях экзосом (рисунок 48).

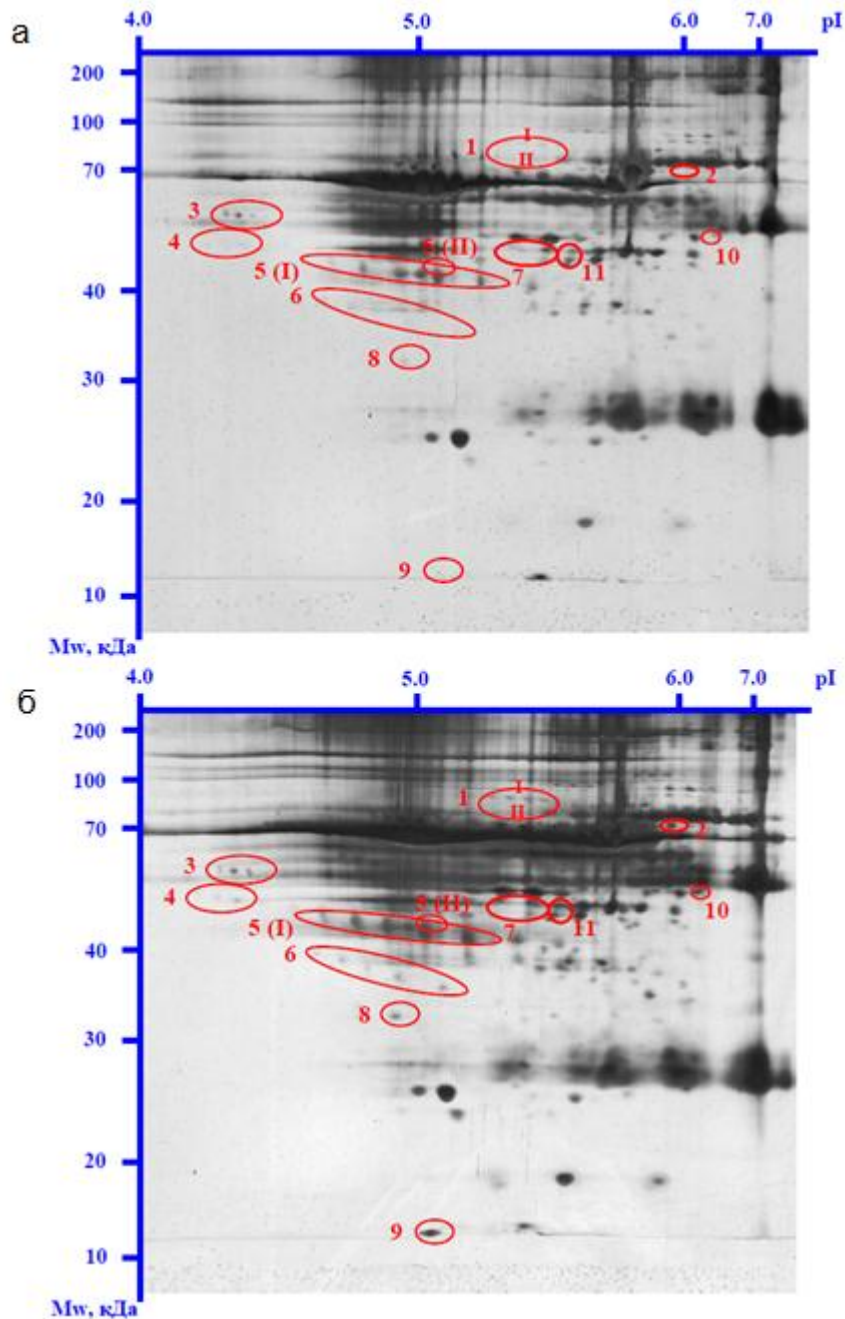


Рисунок 46 – Типичные протеомные карты экзосом крови условно ЗЖ (а) и больных люминальным РМЖ (б). Двумерная электрофореграмма окрашена серебром. По оси абсцисс – изоэлектрическое фокусирование, по оси ординат – SDS-ПААГ-электрофорез. Молекулярные массы белков в кДа приведены слева. В окружности заключены белки, по относительному объему и наличию которых наблюдались отличия между исследуемыми группами.

Анализ белков экзосом крови показал, что 163 (73%) из идентифицированных белков уже обнаруживали в составе внеклеточных везикул и они аннотированы в БД Vesiclepedia – 80 белков из образцов крови условно ЗЖ и 114 белков из образцов крови больных РМЖ (рисунок 49а). Таким образом, 60 (27%) экзосомальных белков были впервые идентифицированы в составе внеклеточных везикул. Анализ представленности белков по БД

Exocarta показал, что из 223 идентифицированных экзосомальных белков 100 (45%) уже аннотированы в базе, из них 59 и 72 белка входят в состав экзосом крови условно ЗЖ и больных РМЖ, соответственно (рисунок 49б). Таким образом, 123 (55%) идентифицированных в экзосомальных белка ранее не были аннотированы в БД Exocarta. Полученные данные демонстрируют, что белки экзосом крови более полно отражают протеомный портрет циркулирующих в кровотоке везикул.

Таблица 27 – Клинико-патологическая характеристика больных РМЖ, образцы крови которых использованы для идентификации белков экзосом

Клинико-патологическая характеристика		№ (%)
Люминальный подтип		17 (100%)
Стадия	T1	15 (88%)
	T2	2 (12%)
Метастазы в регионарных лимфоузлах	N0	17 (100%)
Удаленные метастазы	M0	17 (100%)
Степень злокачественности	II	17 (100%)
Общее количество пациенток		17 (100%)

Анализ 34 универсальных белков (встречаются как в экзосомах крови ЗЖ, так и в экзосомах больных РМЖ) показал, что все эти белки ранее были идентифицированы в составе экзосом биологических жидкостей, клеточных линий и в экзосомах, секретлируемых опухолевыми клетками ряда злокачественных новообразований, и индексированы в БД ExoCarta (Приложение 10). Выявлены белок-белковые взаимодействия между APOB, APOA1 и APOA4, FGA, TF, HPX, FGG, HP, C3, ALB, ANSG, FGB, TTR, HPR и CLU.

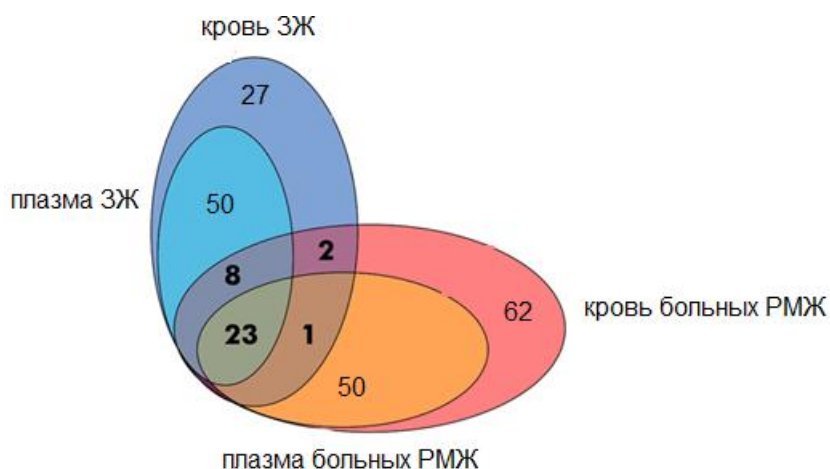


Рисунок 47 – Диаграмма Венна-Эйлера идентифицированных белков в экзосомах крови условно ЗЖ и больных РМЖ.

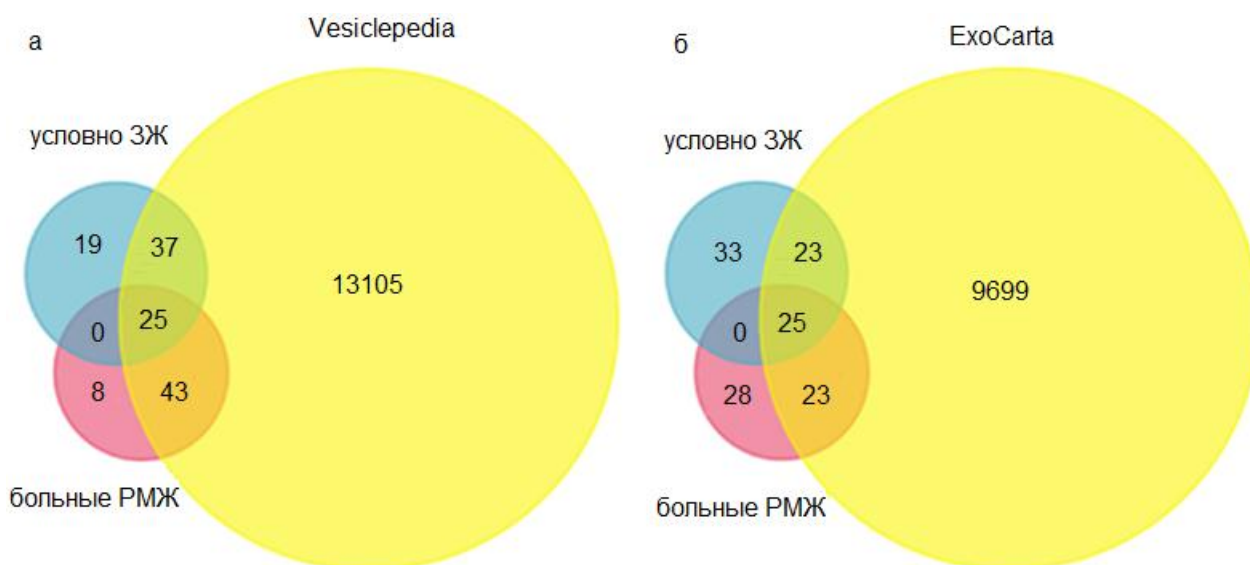


Рисунок 48 – Представленность идентифицированных белков экзосом плазмы условно ЗЖ и больных РМЖ в БД Vesiclepedia (а) и БД Exocarta (б).

Анализ функционального обогащения по наиболее представленным генным онтологиям белков экзосом проводили с помощью ПО FunRich (рисунок 50). Было показано, что в составе экзосом плазмы и экзосом крови как в норме, так и при РМЖ белки представлены сопоставимо: преобладают ядерные, цитоплазматические и экзосомальные белки, при этом у онкологических больных по сравнению с условно ЗЖ незначительно возрастает доля цитоплазматических белков (59% и 55% в экзосомах плазмы и 55% и 47% в экзосомах крови, соответственно) (рисунок 50а). Полученные данные по представленности белков экзосом плазмы согласуются с ранее опубликованными [526-528].

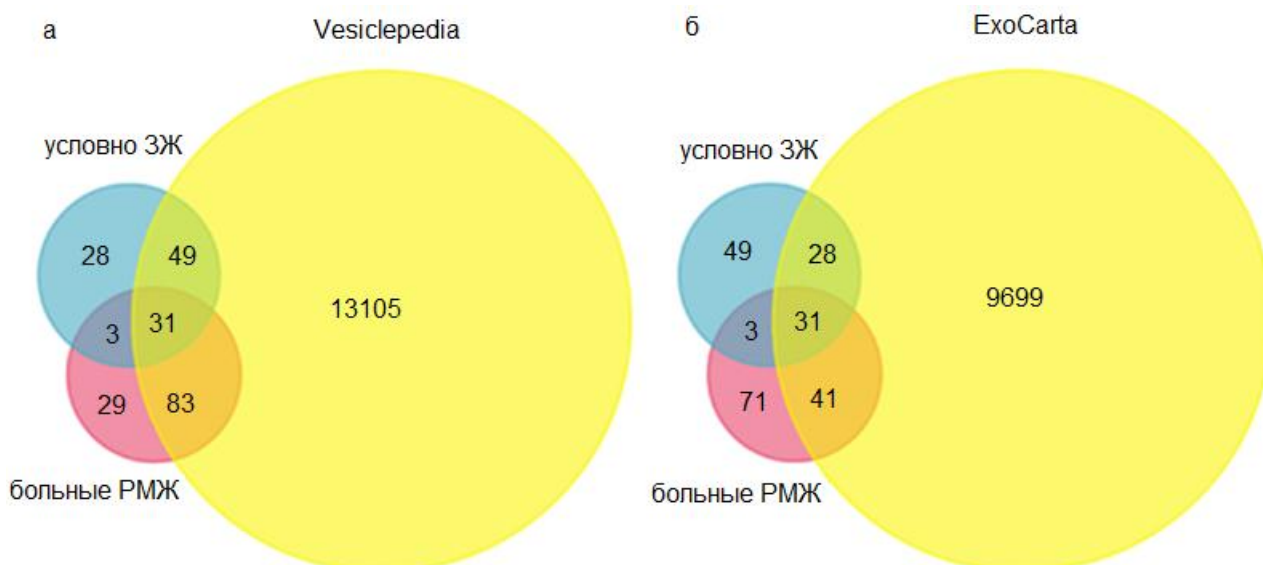


Рисунок 49 – Представленность идентифицированных белков экзосом крови условно ЗЖ и больных РМЖ в БД Vesiclepedia (а) и БД Exocarta (б).

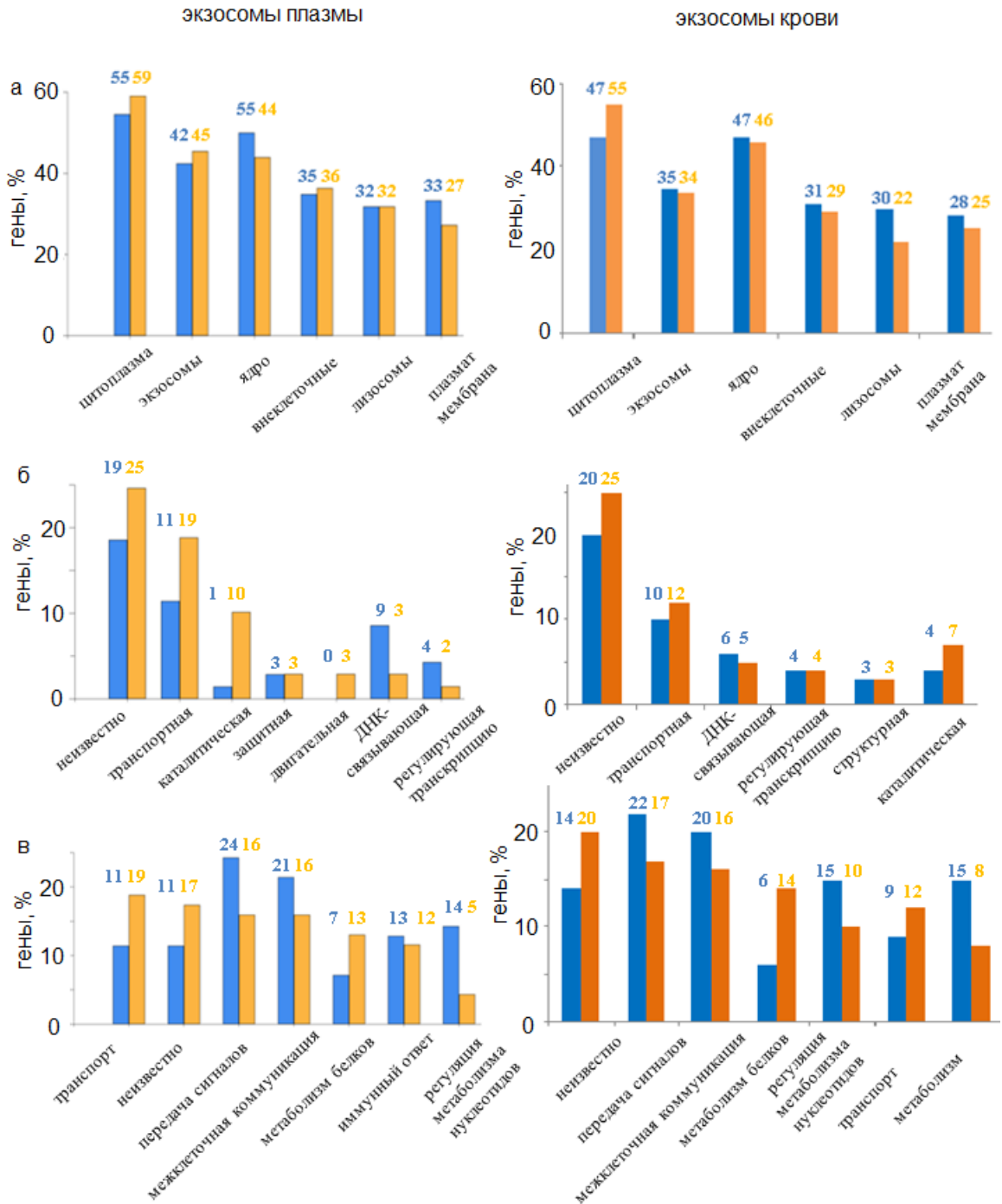


Рисунок 50 – GO-анализ белков экзосом плазмы и экзосом крови условно ЗЖ (голубой цвет) и больных РМЖ (оранжевый цвет) по клеточным компонентам (а), молекулярным функциям (б) и биологическим процессам (в).

При сравнении белков экзосом плазмы и экзосом крови в норме и при РМЖ по молекулярным функциям наиболее значимые различия установлены для экзосом плазмы. В частности, в составе экзосом плазмы онкологических больных по сравнению с условно ЗЖ возрастает доля транспортных (с 11% до 19%) и вовлеченных в катализ (с 1% до 10%) белков, при этом снижается доля ДНК-связывающих (с 9% до 3%) белков и белков, регулирующих транскрипцию (с 4% до 2%) (рисунок 50б). Функции для значительной части

экзосомальных белков не ясны: доля таких белков в экзосомах плазмы и экзосомах крови составляет у условно ЗЖ 19% и 25%, у больных РМЖ – по 20% и 25%, соответственно.

Большинство экзосомальных белков в плазме и в крови условно ЗЖ и больных РМЖ вовлечены в межклеточную коммуникацию (21% и 20% в норме и по 16% при онкологии, соответственно), передачу сигналов (24% и 22% в норме и 16% и 17% при онкологии, соответственно). Следует также отметить, что в экзосомах крови больных РМЖ чаще обнаруживаются белки, вовлеченные в белковый метаболизм и транспорт (рисунок 50в). Полученные по экзосомам плазмы результаты подтверждают ранее опубликованные работы [527, 528].

Выявленное в работе распределение идентифицированных белков экзосом плазмы и экзосом крови по клеточным локализациям, биологическим процессам и молекулярным функциям коррелирует с представленными в литературе для экзосом культуры клеток [529, 530]. Поскольку большинство GO представлено в экзосомальных белках как в норме, так и при РМЖ, можно предположить, что эти белки необходимы для формирования, секреции и интернализации везикул. В то же время, поскольку доля ряда функций и процессов изменяется при сравнении белков экзосом крови условно ЗЖ и больных РМЖ (транспортные и каталитические функции, процессы передачи сигнала, метаболизма белков, межклеточной коммуникации), можно предположить изменение сортинга белков при развитии патологии.

Результат сравнения функциональной роли белков экзосом плазмы и экзосом крови условно ЗЖ и больных РМЖ посредством анализа биологических путей, аннотированных в БД Reactome ([www.reactome.org](http://www.reactome.org)) и NCI-Nature Pathway Interaction Database ([www.ndexbio.org](http://www.ndexbio.org)) с помощью ПО FunRich приведен на рисунке 51. Для белков экзосом плазмы наиболее представленными были Integrin family cell surface interactions (Reactome: R-HSA-216083), опосредующий клеточную адгезию к внеклеточному матриксу, Hemostasis (Reactome: R-HSA-109582), включающий стадии адгезии и агрегации и E-cadherin signaling events (NCI PID: aef0d8c2-6191-11e5-8ac5-06603eb7f303 и a5f1af61-6191-11e5-8ac5-06603eb7f303), играющий центральную роль в формировании адгезивных контактов клеток (рисунок 51а).

Наиболее представленными биологическими путями среди белков экзосом крови являлись TRAIL (TNF-related apoptosis-inducing ligand) (Reactome: R-HSA-75158), индуцирующий апоптоз посредством активации каспазы 8; Integrin family cell surface interactions и Hemostasis (рисунок 51б).

Таким образом, идентифицированные белки экзосом крови вовлечены в различные процессы, в частности: (а) контакт между поверхностными молекулами экзосом и клетками; б) эндоцитоз и экзоцитоз экзосом; в) слияние экзосомы с клеточной мембраной. Возможно,



продукция экзосом позволяет опухолевым клеткам оказывать различные эффекты в соответствии с возможными акцепторными мишенями. Например, экзосомы могут усиливать злокачественные свойства соседних опухолевых клеток и/или активировать незлокачественные соседние клетки посредством переноса многофункциональных белков, играющих ключевую роль в канцерогенезе.

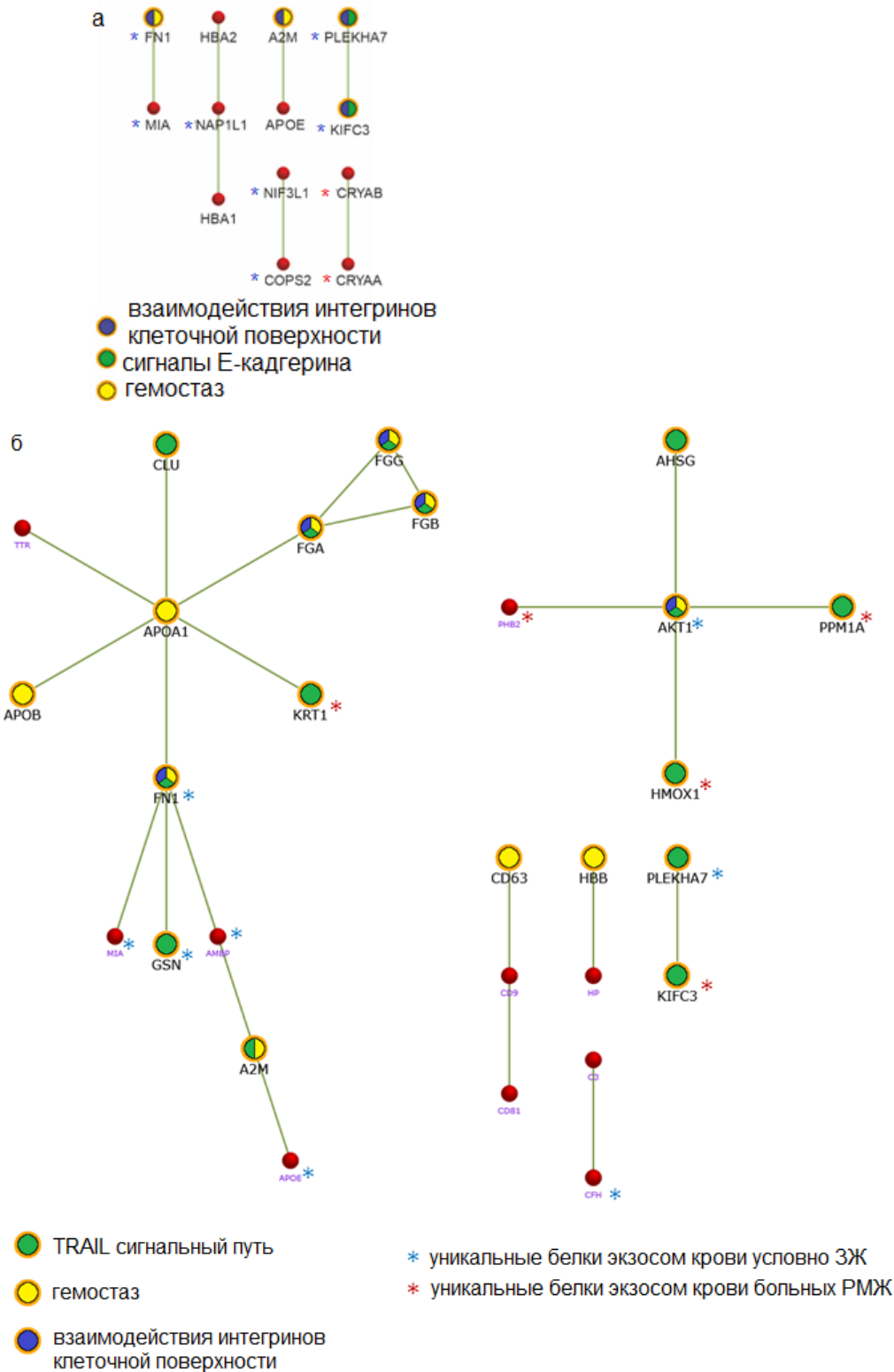


Рисунок 51 – Анализ биологических путей, в которых участвуют белки экзосом плазмы (а) и белки экзосом крови (б).

Для подтверждения гипотезы о том, что экзосомы крови по сравнению с экзосомами плазмы больных РМЖ обогащены белками-участниками процессов, потенциально приводящих к росту и распространению опухоли, на следующем этапе был проведен анализ литературы и аннотаций QuickGO и выделены в составе экзосом белки, принимающие активное участие в ЭМП, клеточной пролиферации, миграции и инвазии, ангиогенезе и регуляции иммунного ответа (таблицы 28 и 29).

Таблица 28 – Уникальные белки экзосом плазмы условно ЗЖ и больных РМЖ, связанные с ключевыми этапами прогрессии опухоли

Белок	ЭМП	Клеточная пролиферация	Инвазия	Клеточная миграция	Стимуляция ангиогенеза	Иммунный ответ
ACSM3						
APOB						
APOE						
BARD1						
BMP7						
CAPN2						
CFH						
CHD5						
CKMT2						
COPS2						
CORO6						
CRYAB						
DNM1L						
EXOC8						
FN1						
FXYD5						
GTSE1						
HAND1						
HBB						
HIF1AN						
IGF2R						
IGHA1						
IGHG1						
IGKC						
IGKV3-20						
KIF20B						
KIF3B						
KIFC3						
MIA						
MTHFD1						
NANOS3						
NAPIL1						
PIBF1						
PIK3CD						
PLEKHA7						
RAB22A						
RAB24						
RASGRP4						
RASSF2						
RFC3						
TNFSF14						
TTR						
VPS13A						
ZAP70						

Норма

РМЖ

Универсальные (встречаются у ЗЖ и больных РМЖ)

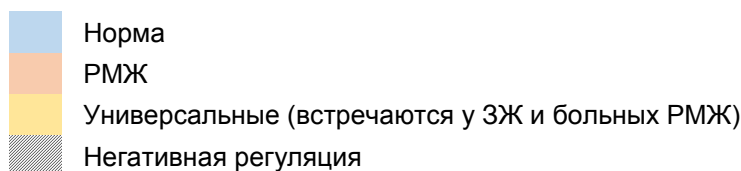
Негативная регуляция

Показано, что в регуляцию ЭМП вовлечено 7 (9%) белков в составе экзосом плазмы и 41 (37%) – в составе экзосом крови условно ЗЖ. В крови больных РМЖ белки экзосом крови менее вовлечены в регуляцию ЭМП: 9 (12%) и 31 (21%), соответственно, при этом доля

белков, ответственных за негативную регуляцию ЭМП, была в два раза выше в составе экзосом условно ЗЖ по сравнению с онкологическими больными (6% против 3%).

Таблица 29 – Уникальные белки экзосом крови условно ЗЖ и больных РМЖ, связанные с ключевыми этапами прогрессии опухоли

Белок	ЭМП	Клеточная пролиферация	Инвазия	Клеточная миграция	Стимуляция ангиогенеза	Иммунный ответ
A1BG						
A2M						
ACSM3						
ADAM10						
AHSG						
AIFM1						
AIM2						
AKT1						
AMBP						
APOA1						
APOA4						
APOB						
APOE						
APPBP2						
ATR						
BANF1						
BARD1						
BMP1						
BMP7						
C3						
CAPN2						
CDC73						
CCDC85A						
CD24						
CD63						
CD81						
CD9						
CFH						
CHD5						
CKAP2L						
CKMT2						
CLK3						
CLU						
COPS2						
CORO6						
CPS1						
CRYAB						
DKC1						
DNM1L						
ELL2						
EXOC8						
FGA						
FGB						
FGF10						
FGG						
FN1						
FXD5						
GCLC						
GDF2						
GRSE1						
GSN						
GTSE1						
HAND1						
HBB						
HIG1AN						
HMOX1						
HP						
IGF2R						
IGHA1						
IGHG1						
IGHG2						
IGHM						
IGHV3-74						
IGKC						
IGKV3-20						
IgL7						
IL16						
ITIH4						
KDM6B						
KIF20B						
KIF3B						
KIFC3						
KRT1						
KRT6A						
KRT6B						
LMNA						
LRG						
MBD4						
MFAP5						
MIA						
MTHFD1						
NANOS3						
NAP1L1						
P0DOX6						
PCNT						
PDZD2						
PGF						
PHB2						
PIBF1						
PIK3CD						
PIP4K2B						
PLEKHA7						
PPM1A						
PSKH1						
RAB22A						
RAB24						
RANBP3						
RAP1B						
RASGRP4						
RASSF2						
RFC3						
SERPINA1						
SERPINB7						
SOC3						
ST3GAL1						
TNFSF14						
TPD52L2						
TTR						
UBA52						
VAV3						
VPS13A						
ZAP70						



В регуляцию клеточной пролиферации вовлечены 19 (17%) белков экзосом крови условно ЗЖ, из них только 5 (6%) белков экзосом плазмы, у больных РМЖ – 6 (4%) и 1 (0,7%) экзосомальных белков, соответственно. Как и в случае ЭМП, доля белков, ответственных за негативную регуляцию клеточной пролиферации, была в два раза выше в составе экзосом условно ЗЖ по сравнению с онкологическими больными (6% против 3%) (таблицы 28 и 29).

В регуляцию клеточной инвазии в составе экзосом плазмы условно ЗЖ и больных РМЖ вовлечено сопоставимое количество белков: 16 (14%) и 14 (10%), а в экзосомах крови – 51 (46%) и 33 (23%) белков в норме и при онкологии, соответственно. Следует подчеркнуть, что в составе экзосом крови больных РМЖ доля белков-ингибиторов данного процесса была в три раза ниже, чем в экзосомах крови условно ЗЖ (5% против 1,4%) (таблицы 28 и 29).

В регуляцию клеточной подвижности вовлечены 25 (23%) белков экзосом крови условно ЗЖ, из них 9 (8%) – в составе экзосом плазмы, у больных РМЖ – 21 (14%) и 9 (6%), соответственно, при этом при онкологии в составе экзосом отсутствовали белки, ингибирующие клеточную подвижность (таблицы 28 и 29).

В стимуляцию ангиогенеза вовлечено значительно меньше экзосомальных белков – 10 (9%) у условно ЗЖ и 5 (3%) у больных РМЖ, а ингибирующие ангиогенез белки выявлены всего по одному в каждом случае (GDF2 и BMP7, соответственно) (таблицы 28 и 29).

В регуляцию иммунного ответа вовлечено одинаковое количество белков: в норме 30 (27%) экзосомальных белков, из них 7 (6%) в составе экзосом плазмы; при онкологии – 30 (21%) и 8 (5%) белков, соответственно. При этом с негативной регуляцией данного процесса связано по 3 белка в составе экзосом крови в норме и при РМЖ (таблицы 28 и 29).

Таким образом, половина идентифицированных экзосомальных белков участвует в ЭМП, клеточной пролиферации, инвазии, клеточной миграции, развитии сосудистой системы и иммунном ответе. Более того, протеомные профили экзосом из крови условно ЗЖ обогащены белками, ингибирующими ЭМП, клеточную пролиферацию, миграцию и инвазию. Таким образом, анализ протеомного состава экзосом крови значительно дополняет информацию об их биогенезе и функциональной роли в канцерогенезе.

#### **4.4. Опухолевые маркеры в составе экзосом плазмы и экзосом крови больных РМЖ**

В литературе широко представлены данные по поиску протеомных опухолевых маркеров в составе экзосом плазмы [531, 532], обсуждаются достоинства использования белков экзосом плазмы по сравнению с белками плазмы [425], при этом отсутствуют данные

о протеоме экзосом, ассоциированных с клеточной поверхностью [28]. 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 [200, 533-535]. Использование 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.

Используя БД dbDEPC 3.0 [434] обнаружено, что в экзосомах плазмы крови больных РМЖ 49 (66%) идентифицированных белков дифференциально экспрессируются при различных злокачественных новообразованиях, из которых 38 (51%) - при РМЖ (рисунок 52).

Следует отметить, что в экзосомах крови больных РМЖ выявлено 86 (59%) и 51 (35%) таких белков, соответственно (рисунок 53). Таким образом, в экзосомах плазмы дифференциально экспрессированные при РМЖ белки выявлялись чаще, чем в экзосомах крови (51% против 35%), что можно объяснить интенсивным изучением состава экзосом плазмы и недавно обнаруженным феноменом экзосом, ассоциированных с ФЭЖ.

Гипер- и гипоекспрессированные белки, ассоциированные с развитием РМЖ, были сопоставимо представлены в составе экзосом крови (39% и 43% гипер- и гипоекспрессированных белков, соответственно), однако гипоекспрессированные белки преобладают в экзосомах плазмы (47% по сравнению с 29% гиперэкспрессированных белков) (рисунки 52, 53).

Наборы прогностических белков благоприятного/неблагоприятного прогноза для всех типов рака, доступных в БД Human Protein Atlas [435, 536], были использованы для поиска соответствий среди белков экзосом, уникальных для крови больных РМЖ. Всего в крови больных РМЖ идентифицировано 64 прогностических белка, характерных для различных типов рака, из них 29 - в экзосомах плазмы. Использование данных по прогностическим белкам РМЖ, аннотированных в БД Human Protein Atlas позволило выделить 3 белка-маркера благоприятного (SERPINA1, KRT6B, SOCS3) и 1 неблагоприятного (IGF2R) прогноза. Ранее эти белки были признаны прогностическими маркерами [537, 538], и их экспрессия в ткани молочной железы статистически значимо ( $p < 0,001$ ) связана с более высокой и низкой общей выживаемостью, соответственно.

Представитель семейства серпинов SERPINA1 является ингибитором сериновых протеаз, а именно эластазы, трипсина, химотрипсина и активатора плазминогена; участвует в

инвазии [539] и иммунном ответе, обнаруживается в везикулах и является также прогностическим маркером колоректального рака (благоприятный прогноз).

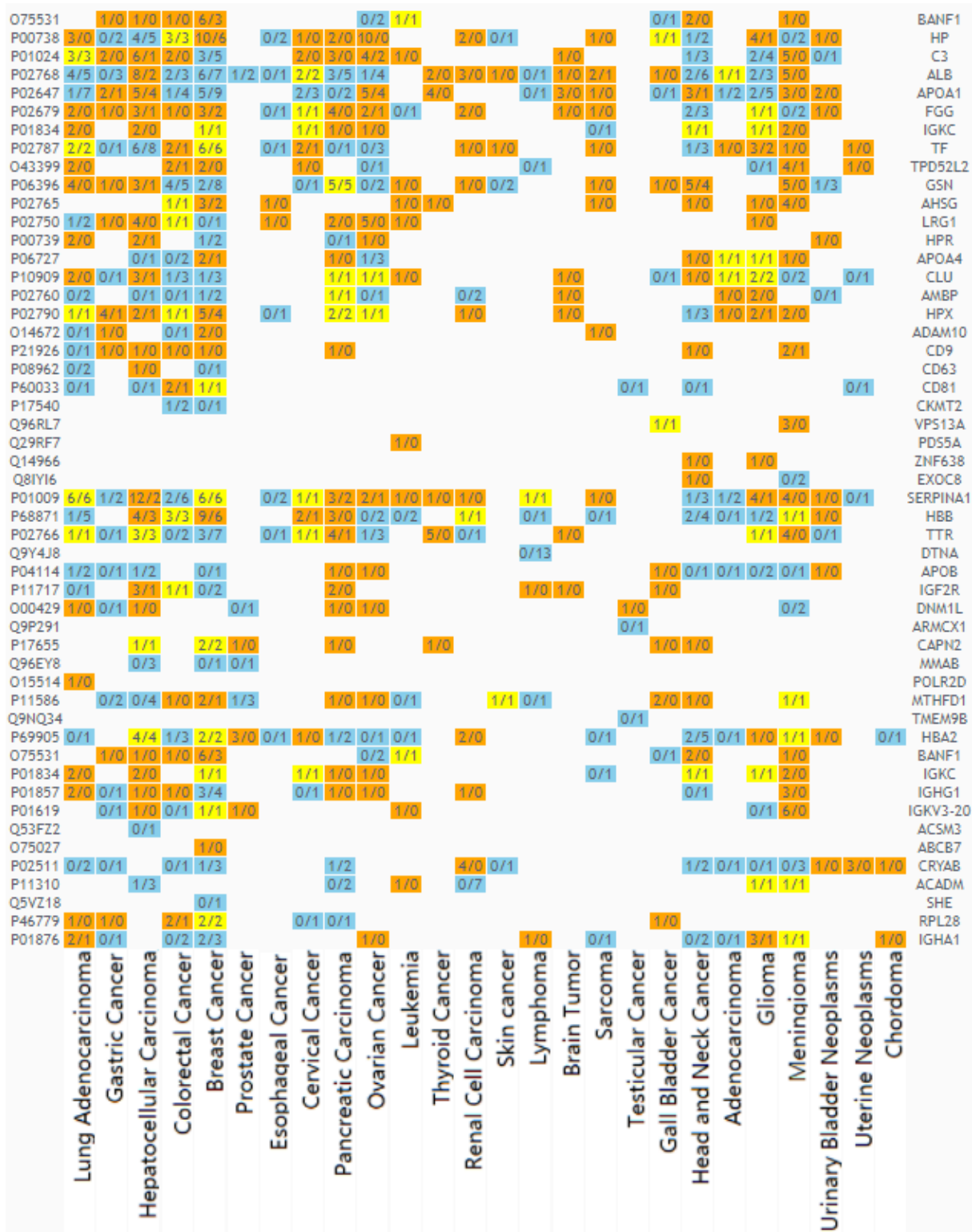


Рисунок 52 – Тепловая карта белков экзосом плазмы больных РМЖ, ассоциированных с различными типами злокачественных новообразований. Цветом выделены белки, для которых число исследований, идентифицировавших белок, как гиперэкспрессированный > (оранжевый) = (жёлтый) < (голубой) числа исследований, идентифицировавших белок, как гипоекспрессированный.

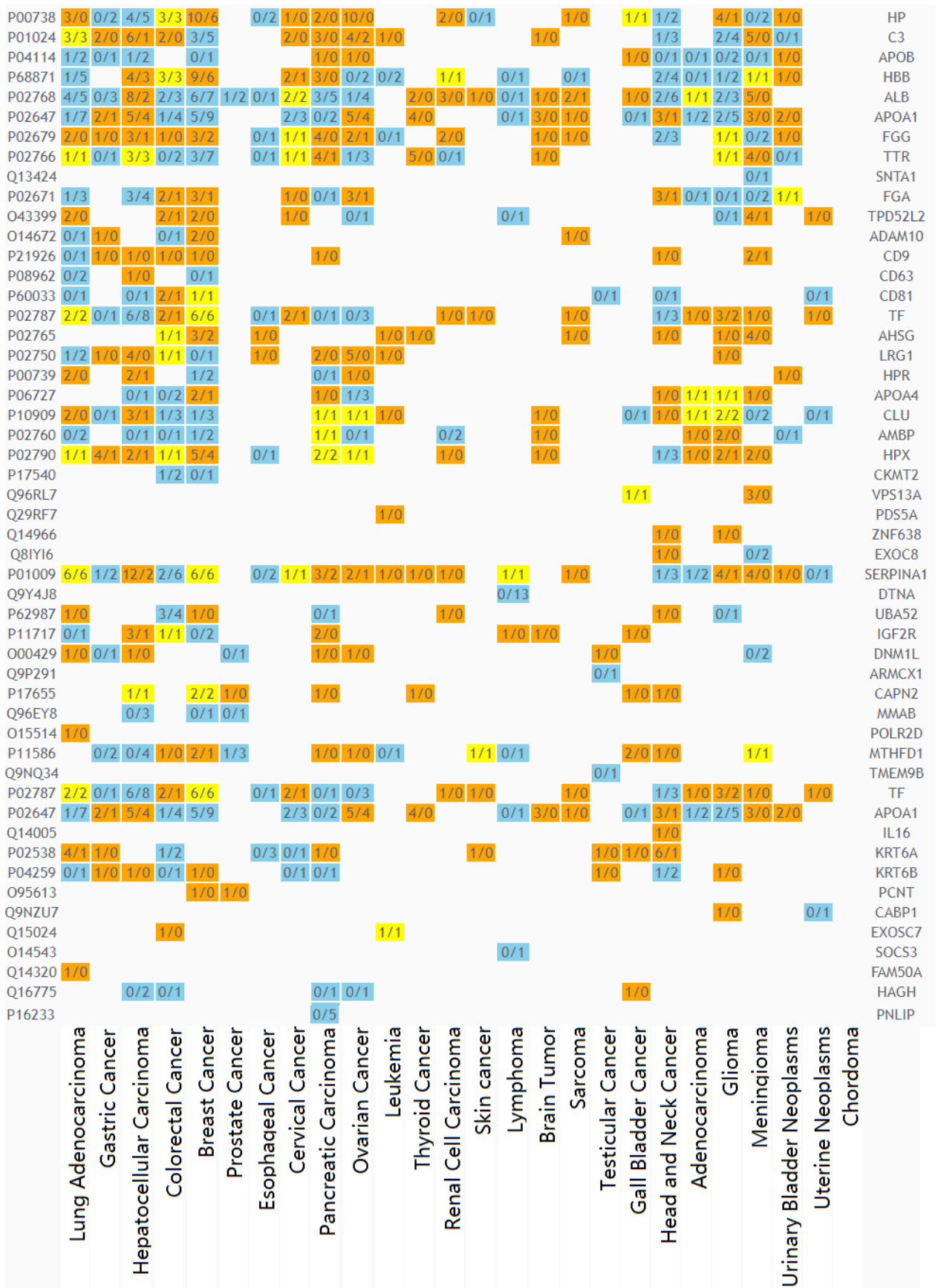


Рисунок 53 – Тепловая карта белков экзосом крови больных РМЖ, ассоциированных с различными типами злокачественных новообразований. Цветом выделены белки, для которых число исследований, идентифицировавших белок, как гиперэкспрессированный > (оранжевый) = (жёлтый) < (голубой) числа исследований, идентифицировавших белок, как гипоекспрессированный.

Кератин 6В (KRT6B) представляет собой белок цитоскелета, участвующий в инвазии [540] и имеющий также прогностическое значение при уротелиальном раке (неблагоприятный).

Белок супрессор передачи цитокинового сигнала 3 (SOCS3) локализуется в цитозоле и плазматической мембране, участвует в ЭМП [541], инвазии [542] и развитии сосудистой сети и имеет прогностическое значение также для рака почки (неблагоприятное).

Рецептор инсулиноподобного фактора роста 2 (IGF2R) представляет собой белок, который транспортирует фосфорилированные лизосомальные ферменты от комплекса Гольджи и клеточной поверхности к лизосомам. Он расположен в аппарате Гольджи и везикулах и действует как положительный регулятор коактивации Т-клеток, что, как показано, способствует иммунному ответу и инвазии [543]. Этот белок также является прогностическим маркером рака шейки матки (неблагоприятный).

Показано, что комбинация белков SERPINA1, KRT6B и SOCS3 в составе экзосом крови позволяет дифференцировать больных РМЖ от условно ЗЖ с чувствительностью 65% и специфичностью 100%, тогда как использование экзосом плазмы позволяет дифференцировать норму и онкологию лишь с чувствительностью 29% и специфичностью 100%. Расширение панели до пяти маркеров (APPBP2, KRT1, KRT6B, SERPINA1, SOCS3) в составе экзосом крови повышает чувствительность диагностической системы до 71% при 100% специфичности (AUC = 0,853, 95% доверительный интервал 0,692-0,949, рисунок 54).

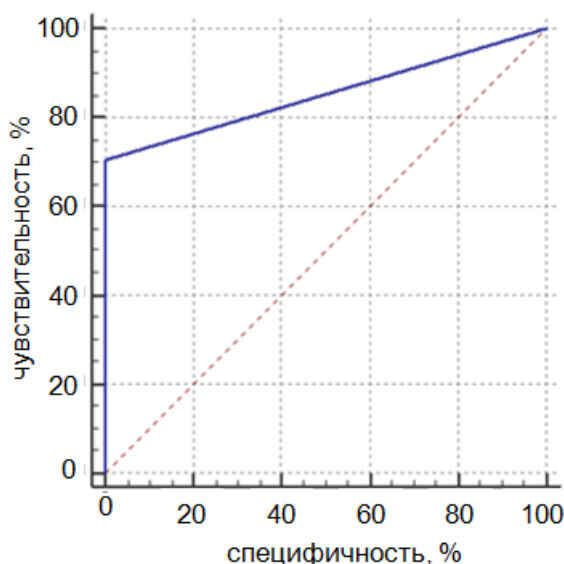


Рисунок 54 – ROC-кривая для определения белков APPBP2, KRT1, KRT6B, SERPINA1, SOCS3 в экзосомах крови. Синяя линия – аппроксимированная кривая ROC.

Кератин 1 (KRT1) регулирует активность киназ, таких как PKC и SRC, посредством связывания с интегрином  $\beta$ -1 (ITB1) и рецептором активированной киназы протеина С 1



(RACK1). В комплексе с C1QBP является высокоаффинным рецептором кининогена-1/НМВК. KRT1 гиперэкспрессирован при раке мочевого пузыря, шейки матки и опухолях головы и шеи. Недавно было показано, что KRT1 ассоциирован с агрессивным течением РМЖ [544].

APPBP2 (Amyloid beta precursor protein binding protein 2) играет роль во внутриклеточном транспорте белка: может участвовать в перемещении APP по микротрубочкам к поверхности клетки. Данный белок является неблагоприятным маркером прогноза рака печени. Показано, что ген этого белка гиперэкспрессирован при РМЖ [545], а соматические мутации в его составе – перспективные маркеры остеосаркомы [546].

Таким образом, данное исследование демонстрирует, что протеомный анализ экзосом крови больных РМЖ выявляет большее количество онкомаркеров по сравнению с анализом экзосом плазмы. Однако для облегчения клинического использования таких панелей биомаркеров необходимо разработать простой и надежный метод выделения экзосом крови. 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.

## ГЛАВА 5.

### Роль экзосом крови в развитии солидных опухолей

Значение экзосом в управлении различными физиологическими и патологическими состояниями уже не вызывает сомнений. Экзосомы могут передавать сигналы для индукции ЭМП и пролиферации, миграции и инвазии клеток, процессов ангиогенеза и метастазирования [526, 547-550], а также возможно переносят опухолевую ДНК к клеткам-реципиентам [551]. Следует отметить, что большинство исследований выполнено с использованием экзосом из культуры клеток, однако в крови имеется сложная смесь циркулирующих везикул различного происхождения, включающая большое количество экзосом гемопоэтического и эндотелиального происхождения, а также опухолевых экзосом [501, 502]. На сегодняшний день большинство работ, касающихся участия экзосом биологических жидкостей в канцерогенезе, сосредоточены на исследовании экзосом плазмы. Однако экзосомальный транспорт обеспечивается не только жидкой фракцией крови, но и фракцией экзосом, ассоциированной с ФЭК. Выявленные в текущей работе различия в морфологии и в белковом составе экзосом плазмы и экзосом крови (содержат экзосомы плазмы и экзосомы, ассоциированные с поверхностью ФЭК) указывает на то, что эти субпопуляции экзосом действительно различны, а ФЭК выступают в роли их переносчиков.

Не только эффекты экзосом опухолевого происхождения на нормальные клетки, но также и эффекты экзосом, секретлируемых клетками нормальной ткани на раковые клетки, имеют важное значение для патогенеза заболевания. Например, экзосомы плазмы различного происхождения воздействуют на циркулирующие опухолевые клетки, а экзосомы, секретлируемые стромальными клетками, воздействуют на опухолевые клетки. Действительно, было показано, что экзосомы из плазмы здоровых доноров обладают способностью стимулировать метастазирующие свойства клеток РМЖ [547]. Для подтверждения гипотезы о различной функциональной роли экзосом плазмы и экзосом, ассоциированных с ФЭК в стимуляции роста опухоли было исследовано влияние экзосом плазмы и экзосом крови условно ЗЖ и больных РМЖ на ключевые этапы опухолевой прогрессии: ЭМП, пролиферацию опухолевых клеток, миграцию клеток и стимуляцию ангиогенеза, а также оценена возможность транспорта ДНК в составе экзосом.

#### 5.1. Транспорт ДНК в составе экзосом

Известно, что внДНК устойчива к действию внеклеточных нуклеаз за счет образования макромолекулярных комплексов с белками (в том числе гистонами) [64] и другими

биомолекулами, а также связывания этих комплексов с поверхностью клеток крови [9]. Примечательно, что некоторые патологические состояния, включая рак и аутоиммунные заболевания, которые характеризуются повышенными концентрациями внДНК [13, 552], а также повышенными уровнями экзосом в плазме или сыворотке [553]. Несмотря на свой небольшой размер, экзосомы имеют большую площадь поверхности, а их мембрана в значительной степени отражает мембрану родительских клеток; таким образом, по аналогии с ДНК, связанной с клеточной поверхностью, они способны транспортировать ДНК, по крайней мере, на своей поверхности. Принимая во внимание содержание экзосом в крови (около  $10^7$ – $10^8$  везикул/мл), была выдвинута гипотеза о значимой роли этого типа везикул в транспорте ДНК, защите ДНК от нуклеаз плазмы и адресной доставке внДНК в клетки-реципиенты.

Концентрацию внДНК в плазме условно ЗЖ ( $n = 7$ ) и больных люминальным РМЖ ( $n = 7$ , таблица 30) оценивали с помощью ПЦР в режиме «реального времени». Было выявлено статистически значимое увеличение концентрации внДНК в плазме у онкологических больных по сравнению с условно ЗЖ (медиана 46 по сравнению с 4 нг/мл,  $p = 0,0026$ , U-критерий Манна-Уитни) (рисунок 55а). Медиана концентрации ДНК в экзосомах плазмы больных РМЖ составила около 2 пг/мл крови (ДНК выявлялась в 71% (5/7) образцов в диапазоне 0–7 пг/мл), а в экзосомах плазмы условно ЗЖ – около 1 пг/мл крови (ДНК выявлялась в 57% (4/7) образцов в диапазоне 0–29 пг/мл) (рисунок 55б), что согласуется с литературными данными [201].

*Таблица 30 – Клинико-патологическая характеристика больных люминальным РМЖ, образцы крови которых использованы для исследования транспорта внДНК в составе экзосом*

Клинико-патологическая характеристика		No (%)
Стадия опухоли	T1	4 (57%)
	T2	3 (43%)
Регионарные и удаленные метастазы	N0	7 (100%)
	M0	7 (100%)
Инфильтративная протоковая карцинома		7 (100%)
Количество больных		7 (100%)

Таким образом, одна экзосома содержит  $1,4 \times 10^{-8}$  пг ДНК в плазме условно ЗЖ, а в плазме больных РМЖ –  $1,1 \times 10^{-8}$  пг ДНК, т.е. незначительная часть внДНК прикреплена к наружной мембране экзосомы в составе везикулярной короны – доля экзосомальной ДНК не превышает 0,025% в плазме условно ЗЖ и 0,004% в плазме больных РМЖ. Принимая во внимание, что внутренний объем одной экзосомы составляет примерно от  $4 \times 10^{-24}$  до  $1,5 \times 10^{-24}$

<sup>21</sup> м<sup>3</sup>, а объем одной средней молекулы белка массой 50 кДа или молекулы РНК размером 100 н. составляет примерно  $6 \times 10^{-26}$  м<sup>3</sup> [201], теоретический расчет позволяет предположить, что каждая экзосома может вместить примерно 50 000 молекул белков или малых РНК. Поскольку в плазме крови больных РМЖ преобладают длинные фрагменты ДНК, по видимому, экзосома может содержать не более 700 молекул ДНК. Однако, поскольку было показано, что экзосомы преимущественно содержат малые РНК и белки, фактическое количество молекул ДНК в экзосоме еще меньше. Действительно, в ходе экспериментов было получено значительно меньшее количество ДНК. В частности, если молекулярная масса ДНК размером 5 т.п.н. составляет  $3,45 \times 10^6$ , а количество экзосомальной ДНК равно  $1,1 \times 10^{-8}$  пг, то каждая экзосома должна содержать  $1,9 \times 10^{-3}$  молекул ДНК.

Обработка экзосом плазмы ДНКазой I с последующим пятненным ИФА показала, что гистоны H2a, H2b и H3 не являются частью экзосомальной мембраны, а являются частью макромолекулярного комплекса вДНК-белок, связанного с поверхностью экзосомы либо посредством взаимодействия с ДНК-связывающими белками, либо с гистон-связывающими белками (рисунок 56). Отсутствие гистона H1 в экзосомальной короне можно объяснить его заменой на амилоид Р для повышения растворимости олигонуклеосом в плазме [7].

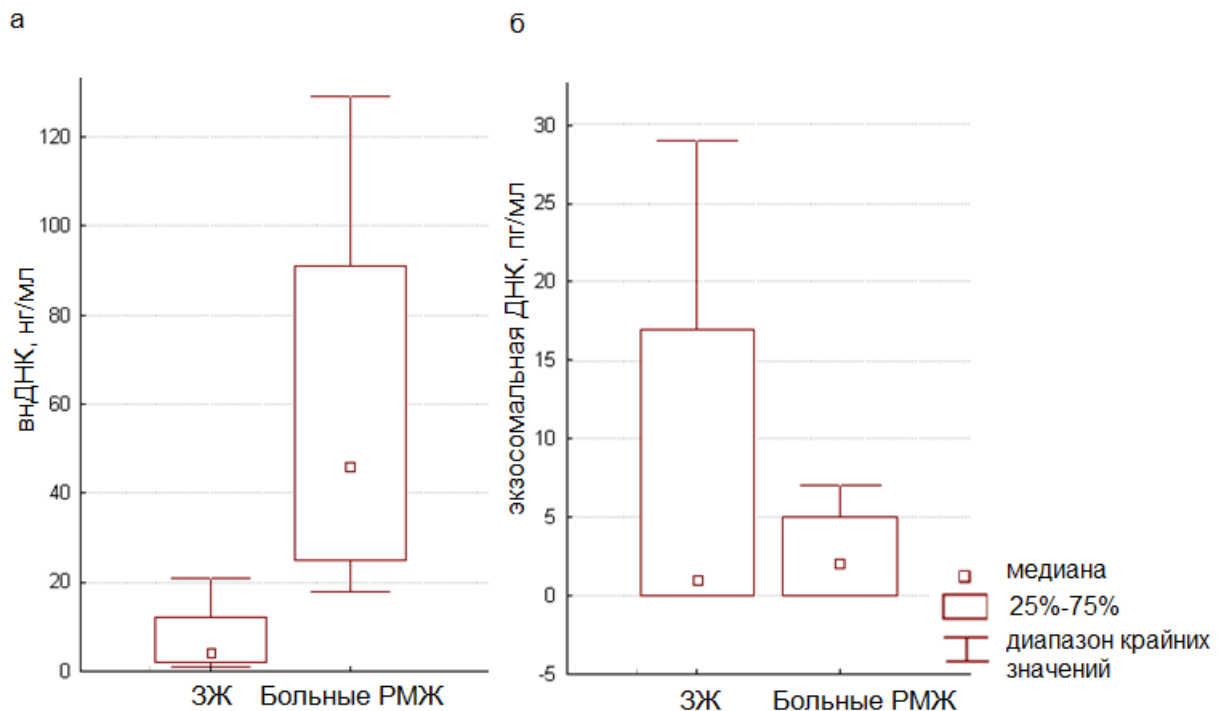


Рисунок 55 – Концентрация ДНК в плазме (а) и в составе экзосом (б) плазмы крови условно ЗЖ (n = 7) и больных РМЖ (n = 7).

С использованием подходов биоинформатики после идентификации с помощью MALDI-TOF масс-спектрометрии были идентифицированы 16 экзосомальных ДНК-связывающих белков (рисунок 57).

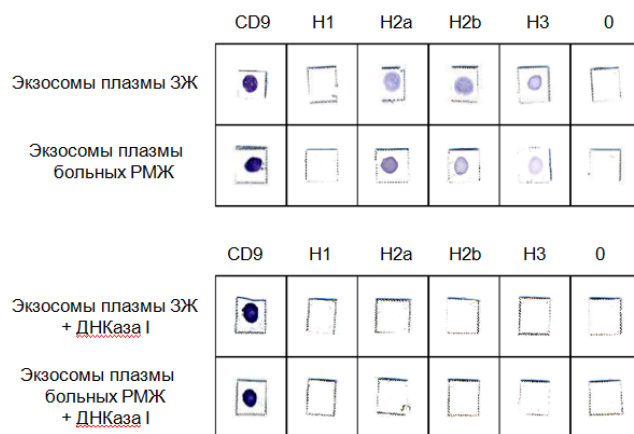


Рисунок 56 – Пятенный ИФА. Экзосомы из плазмы условно ЗЖ и больных РМЖ сорбировали на нитроцеллюлозную мембрану и инкубировали с антигистоновыми или анти-CD9 антителами, а затем инкубировали с конъюгатом козьих антикроличьих антител или кроличьих антимышиных антител, конъюгированных с пероксидазой хрена. Комплексы антиген-антитело визуализировали 4-хлор-1-нафтолом.

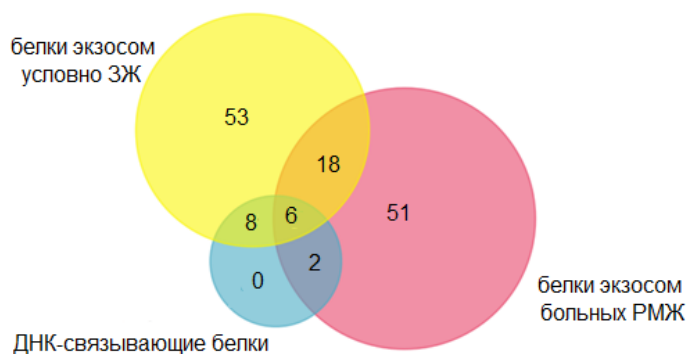


Рисунок 57 – Диаграмма Венна-Эйлера ДНК-связывающих белков в экзосомах плазмы крови условно ЗЖ и больных РМЖ, составленная с использованием ПО QuickGO и FunRich.

Согласно недавно опубликованному исследованию связывания транскрипционных факторов с нуклеосомами на основе соотношения  $K_d$  для неспецифического связывания ДНК и  $K_d$  для неспецифического связывания нуклеосом, а также трехмерной структуры их ДНК-связывающих доменов ДНК-связывающие белки можно условно разделить на «сильно» и «слабо» связывающие нуклеосомы [495]. ДНК-связывающие белки, «сильно» связывающие нуклеосомы, характеризовались наличием следующих типов доменов: bHLH, НТН, гомеодомены и цинковые пальцы. Таким образом, среди 13 ДНК-связывающих экзосомальных белков, за исключением гистонов, семь (54%) обладают высокой аффинностью к связыванию с нуклеосомами (один универсальный белок; один и пять белков в экзосомах плазмы больных РМЖ и экзосомах плазмы условно ЗЖ, соответственно) и могут являться основными структурными элементами НПК на наружной мембране экзосом.

В ДНК-связывающих экзосомальных белках были идентифицированы ДНК-связывающие домены (таблица 31).

Таблица 31 – ДНК-связывающие домены в экзосомальных белках

Uniprot ID	Ген	Название белка	ДНК-связывающий домен	Источник экзосом	Score
O95831	AIFM1	Apoptosis-inducing factor 1, mitochondrial	FAD/NAD(P)-binding domain	Условно ЗЖ	59
O14862	AIM2	Interferon-inducible protein AIM2	N/A	Условно ЗЖ	57
Q8TDI0	CHD5	Chromodomain-helicase-DNA-binding protein 5	CHD subfamily II, SANT-like domain; CHD, C-terminal 2; Zinc finger, PHD-type; Zinc finger, PHD-finger	Условно ЗЖ	47
O96004	HAND1	Heart- and neural crest derivatives-expressed protein 1	basic helix-loop-helix (bHLH) domain	Условно ЗЖ	61
P01871	IGHM	Ig mu chain C region	Immunoglobulin-like domain	Условно ЗЖ	75
P40938	RFC3	Replication factor C subunit 3	N/A	Условно ЗЖ	64
Q9Y2P0	ZNF835	Zinc finger protein 835	Zinc finger C2H2-type	Условно ЗЖ	110
O43309	ZSCAN12	Zinc finger and SCAN domain-containing protein 12	Zinc finger C2H2-type	Условно ЗЖ	57
P02768	ALB	Serum albumin	N/A	Условно ЗЖ, большие РМЖ	62
O75531	BANF1	Barrier-to-autointegration factor	2 non-specific dsDNA-binding sites	Условно ЗЖ, большие РМЖ	60
Q15776	ZKSCAN8	Zinc finger protein with KRAB and SCAN domains 8	Zinc finger C2H2-type	Условно ЗЖ, большие РМЖ	55
Q9Y2W7	KCNIP3	Calsenilin	EF-hand domain	большие РМЖ	58
Q14966	ZNF638	Zinc finger protein 638	Matrin/U1-C, C2H2-type zinc finger; RNA recognition motif domain	большие РМЖ	65

Анализ клеточной локализации экзосомальных белков с помощью QuickGO показал, что четыре белка — AIFM1 («мембрана», GO:0016020), IGHM («мембрана», GO:0016020; «интегральный компонент мембраны», GO:0016021; «плазматическая мембрана», GO:0005886), CHD5 («мембрана», GO:0016020) и KCNIP3 («мембрана», GO:0016020; «плазматическая мембрана», GO:0005886; «комплекс потенциал-зависимых калиевых каналов», GO:0008076) – кандидаты на связывание ДНК на внешней мембране экзосом; корона экзосом может включать пять ДНК-связывающих белков: H2a, H2b, H3 (по результатам пятенного ИФА), IGHM и ALB.

Следует отметить, что белки AIFM1, IGHM и CHD5 обнаруживаются только в экзосомах плазмы условно ЗЖ, а белок KCNIP3 - только в экзосомах плазмы больных РМЖ; H2a, H2b, H3 и ALB выявляются во всех образцах экзосом (таблица 31).

Помимо связывания внДНК с ДНК-связывающими белками мембраны экзосом, внДНК может присоединяться к экзосомам за счет связывания гистонов в НПК с гистон-связывающими белками экзосомальной короны. Однако только два гистон-связывающих белка – CHD5 и KDM6B – были обнаружены в экзосомах плазмы условно ЗЖ. Полученные данные свидетельствуют о том, что внДНК преимущественно связывается с наружной мембраной экзосом за счет ассоциации с ДНК-связывающими белками.

Необходимо отметить, что хотя термины онтологии ДНК-связывающих генов еще не присвоены некоторым белкам, литературные данные свидетельствуют о том, что в экзосомальных протеомах есть другие ДНК-связывающие белки. Например, ранее уже было показано, что с внДНК связывается фибриноген [80]. Учитывая, этот белок локализуется в короне везикул, образуя комплексы с интегринами, вполне вероятно образование макромолекулярных комплексов ДНК-фибриноген-интегрин-экзосома [554]. В дополнение к ДНК-связывающим внеклеточным белкам и мембранным белкам в экзосомах плазмы условно ЗЖ и больных РМЖ были идентифицированы 13 и 8 ДНК-связывающих белков ядерного и цитоплазматического происхождения, соответственно. Было показано, что эти экзосомальные ДНК-связывающие белки выполняют множество молекулярных функций и участвуют различных биологических процессах [555–558].

Таким образом, экзосомы переносят ДНК-связывающие белки преимущественно в виде внутреннего содержимого от клеток-доноров к клеткам-реципиентам, вызывая изменения в поведении последних. Биологическое значение выявленных небольших количеств внДНК на поверхности экзосом до сих пор остается загадкой.

## 5.2. Влияние экзосом на формирование капилляро-подобных структур

Клинические исследования динамики опухолевой прогрессии больных РМЖ подтвердили, что одним из важнейших факторов, определяющих патогенез данного заболевания, является способность опухоли индуцировать ангиогенез. Ангиогенез контролируется множеством ростовых факторов и сигнальных молекул, экспрессия которых особенно повышена в трансформированных клетках [559]. Известно, что ангиогенные факторы могут переноситься экзосомами [560, 561]; более того, в ответ на клеточную гипоксию, которая характерна для опухолевой ткани, изменяется содержимое экзосом, и такие опухолевые экзосомы стимулируют неоангиогенез [562].

Сравнительная оценка ангиогенной активности экзосом плазмы и экзосом крови условно ЗЖ (объединенные образцы от 50 доноров) и больных люминальным РМЖ (объединенные образцы от 50 пациентов, таблица 23) была проведена с помощью методики образования капилляро-подобных структур клетками HUVEC на Матригеле, обедненном ростовыми факторами. Данный метод является «золотым стандартом» изучения ангиогенных свойств *in vitro* [563]. Анализ образования капилляро-подобных структур показал, что более обширная сеть на Матригеле была сформирована в присутствии экзосом из плазмы и крови больных РМЖ по сравнению с отрицательным контролем ( $p = 0,0027$  и  $p = 0,0030$ , соответственно); более того, экзосомы из плазмы больных РМЖ обладали более выраженным эффектом по сравнению с экзосомами крови больных РМЖ и экзосомами из плазмы условно ЗЖ ( $p = 0,0206$  и  $p = 0,0439$ , соответственно) (рисунок 58).

Кроме того, инкубация HUVEC с экзосомами крови условно ЗЖ снижала способность к образованию капилляро-подобных структур по сравнению с отрицательным контролем, экзосомами из плазмы условно ЗЖ и экзосомами крови больных РМЖ ( $p = 0,0024$ ,  $p = 0,0173$  и  $p = 0,0006$ , соответственно) (рисунок 58).

Таким образом, ангиогенный потенциал экзосом плазмы и экзосом крови больных РМЖ, является сопоставимым. Пересчет на вклад экзосом, ассоциированных с ФЭК, показал, что ангиогенная активность этой фракции достоверно не отличается от активности экзосом плазмы, что указывает на сопоставимость фракций экзосом по биологической активности. При этом экзосомы, полученные из плазмы условно ЗЖ, обладают меньшей ангиогенез-стимулирующей активностью по сравнению с экзосомами плазмы больных люминальным РМЖ ( $T_{1-2}N_{0-1}M_0$ ).

В литературе множество указаний на ангиогенез-стимулирующую активность экзосом, секретируемых опухолевыми клетками, в том числе экзосом, полученных из плазмы крови онкологических больных [564-566]. Данные о сопоставимой активности экзосом,



ассоциированных с ФЭК, с экзосомами плазмы при РМЖ дополняют представление о природе ангиогенеза в опухолевой ткани при РМЖ.

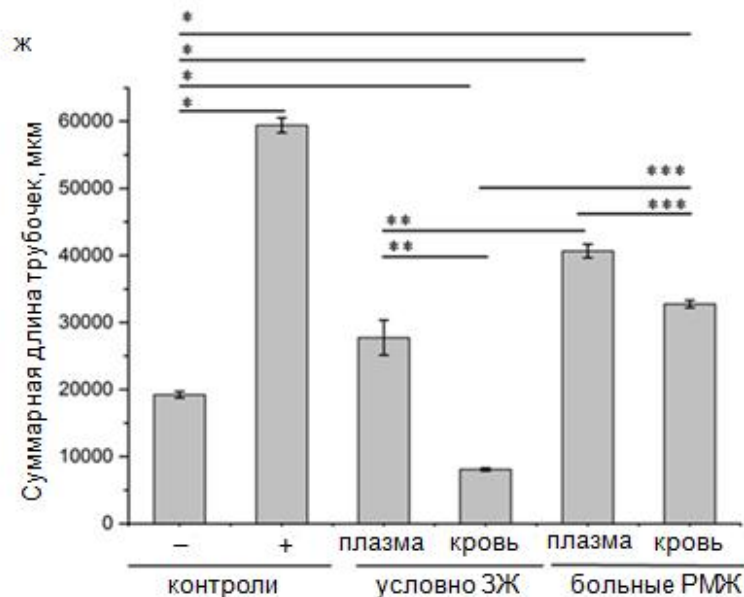
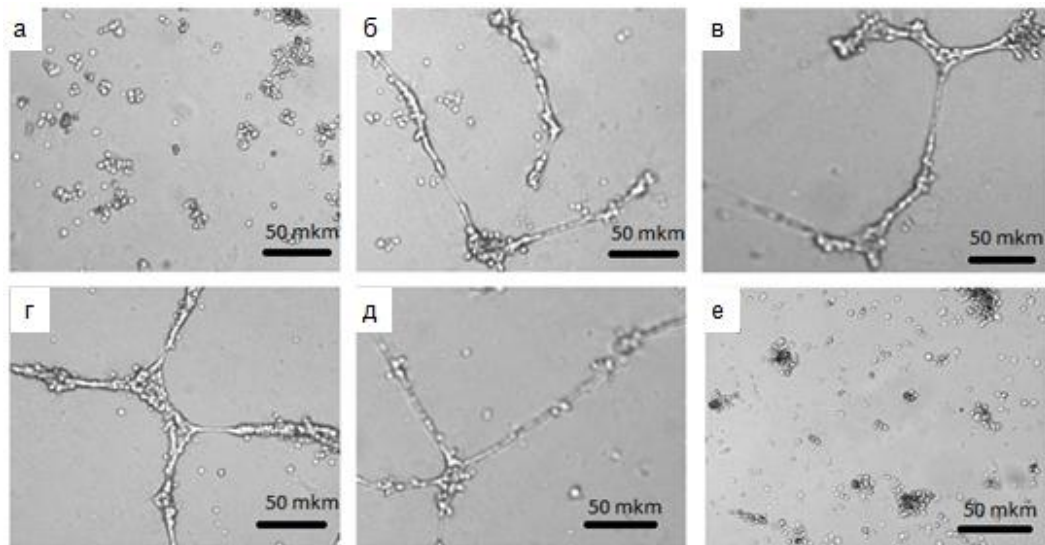


Рисунок 58 – Эффект экзосом из плазмы и крови на формирование капилляро-подобных структур клетками HUVEC. Фотографии, демонстрирующие формирование капилляро-подобных структур клетками HUVEC, обработанные PBS (негативный контроль) (а), экзосомами из плазмы (б) и из крови (в) больных РМЖ, 10% FBS (положительный контроль) (г), экзосомами из плазмы (д) и из крови (е) условно ЗЖ. Шкала соответствует 250 µm. Количественный анализ формирования капилляро-подобных структур (ж). Значения общей длины капилляро-подобных структур (среднее±SEM, \* $p < 0,05$  по сравнению с отрицательным контролем, \*\* $p < 0,05$  по сравнению с экзосомами из плазмы условно ЗЖ, \*\*\* $p < 0,05$  по сравнению с экзосомами крови больных РМЖ).

Сравнительно малая суммарная длина образованных капилляро-подобных структур после добавления к HUVEC экзосом крови условно ЗЖ (меньше в 2,5 раза по сравнению с отрицательным контролем и в 4 раза по сравнению эффектом от экзосом плазмы условно ЗЖ) указывает на ингибирующую активность экзосом, ассоциированных с ФЭК. Поскольку

в препарате экзосом не менее 60% представлены экзосомами, ассоциированными с ФЭК, добавление экзосом крови условно ЗЖ в пять раз снижает скорость формирования капилляро-подобных структур по сравнению с эффектом, наблюдаемым от добавления экзосом плазмы условно ЗЖ. В тоже время экзосомы крови больных РМЖ не дают аналогичного эффекта, что вероятно способствует более активному росту и ветвлению сосудистого русла внутри опухолевой ткани.

### **5.3. Стимуляция экзосомами крови клеточной подвижности**

Влияние экзосом из плазмы и из крови условно ЗЖ (объединенные образцы от 50 доноров) и больных люминальным РМЖ (объединенные образцы от 50 пациентов, таблица 23) на миграцию клеток было протестировано в MCF10A (линия псевдо-нормальных эпителиоцитов молочной железы) и клетках карциномы молочной железы SKBR-3.

Эпителиальные клетки MCF10A на поверхности стекла были расположены отдельно или объединены в островки различных размеров и были почти неподвижны в условиях отсутствия сыворотки и EFG (отрицательный контроль) (рисунок 59а).

Добавление сыворотки лошади и / или EGF к этим клеткам (положительный контроль) значительно стимулировало их подвижность (рисунок 59а). В частности, статистически значимо возросло количество мигрирующих клеток (рисунок 59б) и миграционный путь (рисунок 59в) ( $p = 0,0062$  и  $p < 0,0001$ , соответственно) как для отдельных клеток MCF10A, так и для островков. Добавление экзосом крови условно ЗЖ или экзосом из плазмы и экзосом крови больных РМЖ приводило к значительному увеличению числа подвижных клеток по сравнению с отрицательным контролем ( $p = 0,0369$ ,  $p = 0,0253$  и  $p = 0,0253$ , соответственно) (рисунок 59а,б). Точно так же наблюдалось движение нескольких клеточных островков друг к другу. Тем не менее, было обнаружено, что общая длина пути клеток MCF10A уменьшается после добавления экзосом из крови условно ЗЖ по сравнению с добавлением экзосом из плазмы ( $p = 0,0219$ ) (рисунок 59в).

Линия SKBR3 была в основном представлена отдельными клетками или клетками, объединенными в небольшие группы. В присутствии 10% FBS без экзосом (положительный контроль) наблюдалось много подвижных клеток (рисунок 60а). Удаление FBS (отрицательный контроль) привело к статистически значимому ослаблению клеточной миграции ( $p = 0,00001$ ), что позволяет предположить, что FBS оказывает наибольшее влияние на подвижность клеток SKBR3 (рисунок 60б).

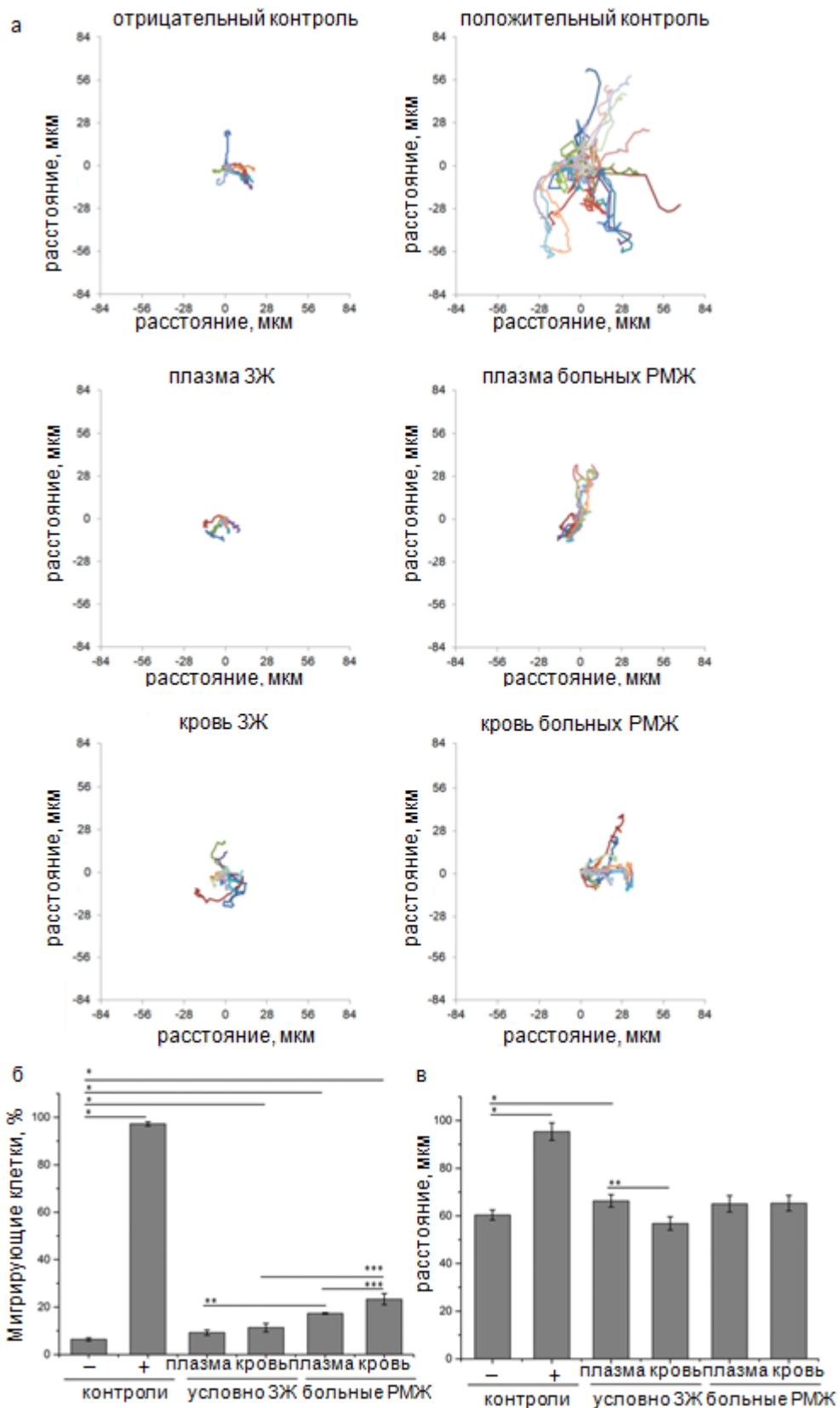


Рисунок 59 – Влияние экзосом из плазмы и экзосом крови на миграцию клеток MCF10A. Результаты трех независимых экспериментов представлены как среднее  $\pm$  SEM, \* $p < 0,05$  по сравнению с отрицательным контролем, \*\* $p < 0,05$  по сравнению с экзосомами из плазмы условно ЗЖ, \*\*\* $p < 0,05$  по сравнению с экзосомами из крови больных РМЖ. Траектории отдельных клеток MCF10A в присутствии или в отсутствие экзосом (а), доля подвижных клеток (б), миграционный путь в течение 15 часов (в).

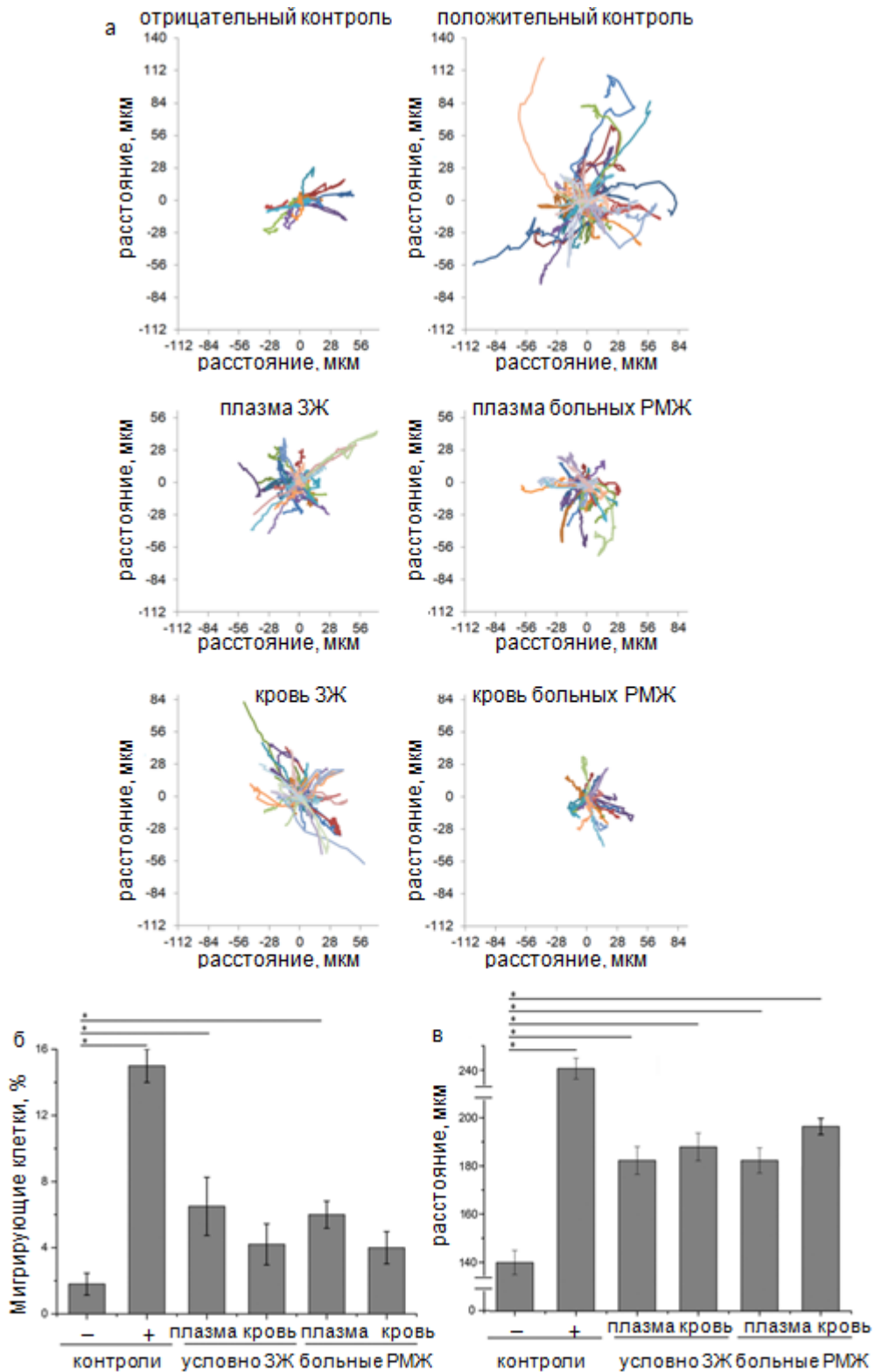


Рисунок 60 – Влияние экзосом из плазмы и экзосом крови на миграцию клеток SKBR3. Результаты трех независимых экспериментов представлены как среднее  $\pm$  SEM, \* $p < 0,05$  по сравнению с отрицательным контролем, \*\* $p < 0,05$  по сравнению с экзосомами из плазмы условно ЗЖ, \*\*\* $p < 0,05$  по сравнению с экзосомами из крови больных РМЖ. Траектории отдельных клеток SKBR3 в присутствии или в отсутствие экзосом (а), доля подвижных клеток (б), миграционный путь в течение 15 часов (в).

Добавление экзосом из плазмы условно ЗЖ и больных РМЖ к клеткам увеличивало количество подвижных опухолевых клеток в 3,6 и 3,3 раза ( $p = 0,0373$  и  $p = 0,0106$ , соответственно), эффекты добавления экзосом крови условно ЗЖ и больных РМЖ были менее выраженными (рисунок 60а,б).

Следует отметить, что подвижные клетки SKBR3 наблюдались даже в плотной культуре и внутри групп, которые активно двигались даже без дополнительных обработок. На миграцию подвижных клеток существенное влияние оказывало добавление FBS или экзосом по сравнению с отрицательным контролем ( $p < 0,0001$  при добавлении FBS и экзосом больных РМЖ;  $p = 0,0002$  для экзосом плазмы условно ЗЖ;  $p = 0,0010$  для экзосом крови ЗЖ) (рисунок 60в).

#### 5.4. Влияние экзосом крови на интенсивность клеточной пролиферации

В случае неопухолевых клеток MCF10A, где пролиферация была высокочувствительна к присутствию сыворотки и/или факторов роста ( $p = 0,0055$ ), добавление экзосом крови как условно ЗЖ (объединенные образцы от 50 доноров), так и больных люминальным РМЖ (объединенные образцы от 50 пациентов, таблица 23) привело к статистически значимому увеличению числа митотических событий ( $p = 0,0163$  и  $p = 0,0162$ , соответственно) (таблица 32).

Таблица 32 – Митотическая активность\*

Клеточная линия	Образцы	Среднее $\pm$ SEM	$p$
MCF10A	Отрицательный контроль	3,65 $\pm$ 0,25	0,0055
	Положительный контроль	20,75 $\pm$ 1,25	
	Экзосомы плазмы условно ЗЖ	4,40 $\pm$ 0,80	0,0163
	Экзосомы крови условно ЗЖ	7,30 $\pm$ 0,40	
	Экзосомы плазмы больных РМЖ	4,25 $\pm$ 0,55	0,0162
	Экзосомы крови больных РМЖ	7,65 $\pm$ 0,45	
SKBR3	Отрицательный контроль	31,40 $\pm$ 6,21	
	Положительный контроль	24,10 $\pm$ 5,87	
	Экзосомы плазмы условно ЗЖ	30,30 $\pm$ 2,20	
	Экзосомы крови условно ЗЖ	22,60 $\pm$ 6,53	
	Экзосомы плазмы больных РМЖ	27,20 $\pm$ 5,17	
	Экзосомы крови больных РМЖ	24,50 $\pm$ 3,23	

\*процент событий митоза в течение 15 часов наблюдения.

В случае раковых клеток SKBR3, которые эффективно пролиферируют без сыворотки, добавление экзосом из любых источников не влияло на пролиферацию (таблица 32).

### **5.5. Морфология адгезионных соединений клеток после обработки экзосомами**

Для оценки влияния экзосом крови на способность клеток образовывать адгезионные соединения (AJ), с помощью иммунофлуоресцентного окрашивания в клетках MCF10A и SKBR3 была проанализирована экспрессия ключевых белков межклеточных контактов – E-кадгерина и  $\beta$ -катенина.

Было показано, что эпителиальные клетки MCF10A образуют небольшие островки на поверхности стекла в отсутствие лошадиной сыворотки и EGF (отрицательный контроль) и демонстрируют хорошо выраженные адгезионные соединения на основе E-кадгерина и  $\beta$ -катенина, которые были организованы в виде адгезионных поясов вдоль границ между клетками (рисунок 61a).

Добавление лошадиной сыворотки и EGF (положительный контроль) приводило к значительному изменению морфологии адгезионных соединений. Окрашивание E-кадгерина на границах между клетками становилось более диффузным, а края клеток перекрывались. В местах наложения образующихся клеток специфические спайки были организованы в виде облака мелких точек (рисунок 61a). Подобные типы межклеточных адгезий были показаны ранее во время трансэпителиальной миграции трансформированных эпителиальных клеток крысы [567].

Добавление экзосом плазмы или суммарных экзосом крови условно ЗЖ (объединенные образцы от 50 доноров) или больных люминальным РМЖ (объединенные образцы от 50 пациентов, таблица 23) к клеткам приводило к значительному разрушению адгезионных соединений на основе E-кадгерина. Оставались видимыми только остаточные адгезионные структуры, и они были представлены случайно распределенными точками или небольшими радиальными структурами (рисунок 61a).  $\beta$ -катенин-позитивные адгезионные соединения также значительно реорганизовались. В клетках, обработанных экзосомами, адгезионные структуры на основе  $\beta$ -катенина были лучше выражены, чем на основе E-кадгерина, и представляли собой нерегулярные радиальные структуры в областях перекрытия соседних клеток. Нарушение адгезионных структур было связано с появлением небольших зазоров между клетками (рисунок 61a).

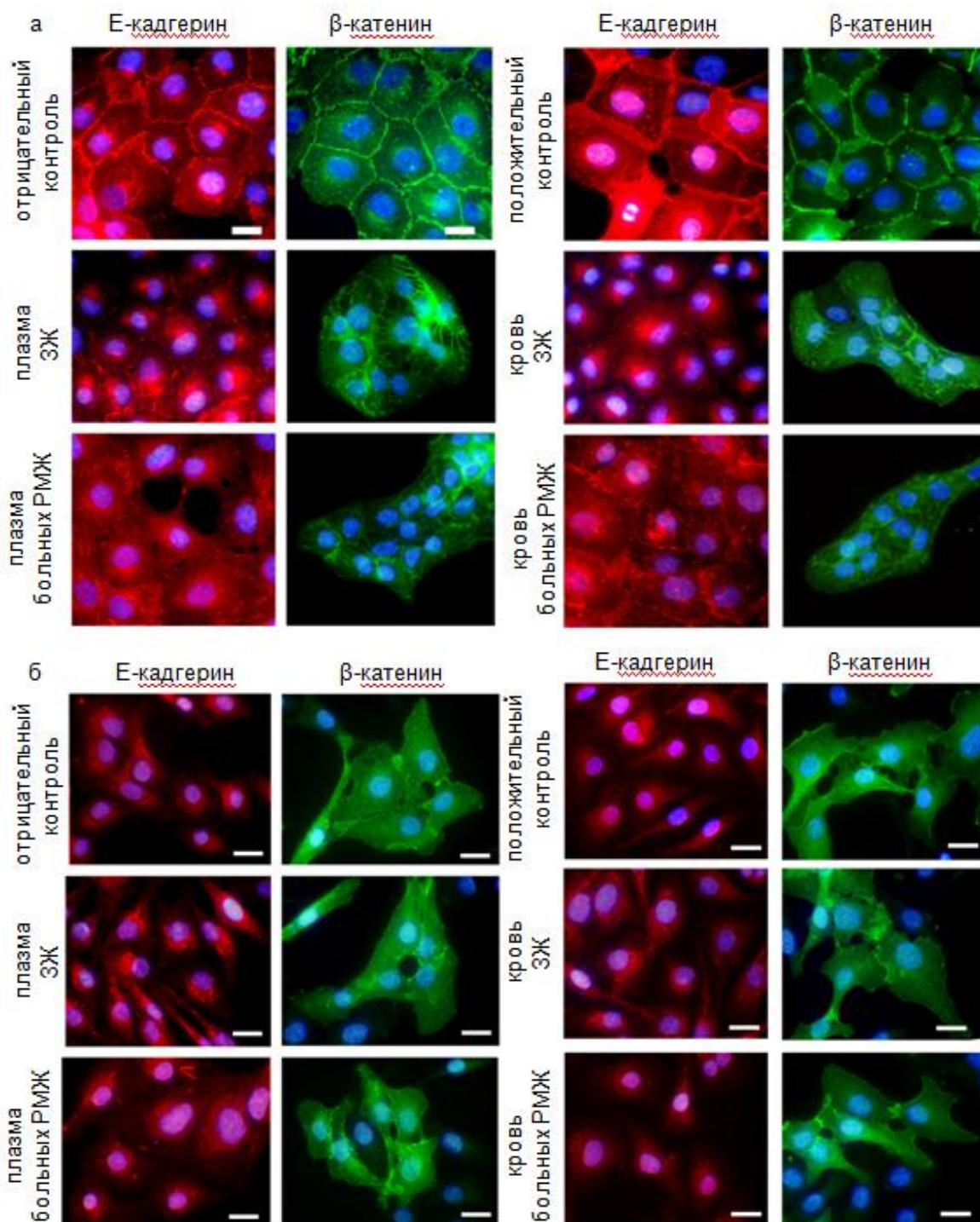


Рисунок 61 – Влияние экзосом на морфологию межклеточной адгезии клеток путем иммунофлуоресцентного окрашивания E-кадгерина (красный цвет) и  $\beta$ -катенина (зеленый цвет). Ядра клеток окрашены DAPI. Условия эксперимента описаны рядом с картинками. Бар составляет 20 мкм. Клетки MCF10A (а), клетки SKBR-3 (б).

Аналогичное исследование было проведено на раковых клетках SKBR3. Было обнаружено, что эти клетки не образуют адгезионных соединений на основе E-кадгерина как при наличии, так и в отсутствие экзосом (рисунок 61б), даже когда они контактируют в группах или островках. В связи с этим, для выявления клеточных адгезий в контактирующих клетках было использовано окрашивание на  $\beta$ -катенин.

В отрицательном контроле эти спайки представлены короткими касательными линиями, радиальными спайками или каплеобразными спайками на перекрывающихся краях клеток. Клетки SKBR3 не образовывали выраженных межклеточных адгезий: между клетками было несколько небольших промежутков (рисунок 61б). Добавление FBS к клеткам SKBR3 приводило к увеличению клеточного разделения, и даже контактирование клеток не способствовало адгезии на основе  $\beta$ -катенина. Добавление экзосом условно ЗЖ и больных РМЖ к клеткам SKBR3 существенно не изменило количество и морфологию клеточных адгезий на основе  $\beta$ -катенина.

Таким образом, мы не выявлено влияния экзосом крови на морфологию межклеточных спаек высокоподвижных раковых клеток SKBR3, не образующих адгезионные соединения на основе E-кадгерина. Однако экзосомы крови как условно ЗЖ, так и больных РМЖ изменяют межклеточную адгезию эпителиальных клеток MCF10A и, таким образом, стимулируют первые этапы ЭМП.

Таким образом, анализ *in vitro* показал, что экзосомы плазмы больных люминальным РМЖ (T<sub>1-2</sub>N<sub>0-1</sub>M<sub>0</sub>) стимулируют морфологическое изменение межклеточных адгезий, характерное для более ранних стадий ЭМП MCF10A, и усиливают формирование капилляро-подобных структур лучше, чем экзосомы из других источников. Более того, было обнаружено, что экзосомы плазмы больных РМЖ значительно увеличивают количество подвижных псевдонормальных и опухолевых клеток. Наблюдаемые биологические эффекты экзосом плазмы онкологических больных могут быть связаны с пониженным содержанием по сравнению с экзосомами крови условно ЗЖ белков, ингибирующих ЭМП, клеточную пролиферацию, миграцию и инвазию.

Кроме того, впервые установлено, что экзосомы крови больных РМЖ стимулируют ЭМП клеток MCF10A и образование капилляро-подобных структур. Более того, обработка неопухолевых клеток MCF10A экзосомами крови онкологических больных значительно увеличивает количество подвижных и пролиферирующих клеток. Аналогичная обработка экзосомами клеток SKBR3 увеличивает общую длину пути этих клеток. Таким образом, экзосомы плазмы и экзосомы крови больных РМЖ вызывают сходные (но не идентичные) биологические эффекты и характеризуются различным белковым составом. Поскольку экзосомы плазмы составляют лишь часть экзосом крови, правильнее оценивать содержание белков, связанных с критическими для развития РМЖ процессами, в экзосомах крови. Учитывая их потенциальную роль в онкогенезе, такие экзосомы крови могут служить перспективными мишенями для терапии, например, для предотвращения неоангиогенеза и миграции раковых клеток.



Экзосомы крови условно ЗЖ наоборот подавляют образование капилляро-подобных структур и уменьшают длину пути псевдонормальных клеток молочной железы по сравнению с экзосомами плазмы условно ЗЖ, при этом значительно увеличивают количество подвижных клеток MCF10A и количество событий митоза. Неожиданным открытием стало то, что все экзосомы крови (из плазмы и из крови) условно ЗЖ стимулируют ЭМП клеток MCF10A и увеличивают общую длину пути клеток SKBR3. Способность циркулирующих в плазме экзосом потенцировать злокачественные свойства опухоли была показана и в других работах [568-570]. Аналогичные результаты были получены для экзосом здоровых доноров, а также для клеток РМЖ MDA-MB-231 и MCF-7 [547]; экзосомы плазмы стимулировали адгезивные свойства, двумерную случайную миграцию и инвазию клеток РМЖ *in vitro*, а также их метастатическую диссеминацию *in vivo* дозозависимым образом. Таким образом, экзосомы крови условно ЗЖ ведут себя как двуликий Янус: они снижают агрессивное поведение нормальных клеток и обладают способностью стимулировать метастазирующие свойства клеток РМЖ. Поскольку большинство экзосом в крови онкологических больных имеют неопухолевое происхождение, вполне вероятно, что экзосомы из нормальных клеток, не привлекая к ним внимания, играют существенную роль в диссеминации опухоли.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Настоящая работа представляет собой первое комплексное исследование циркулирующих в крови здоровых доноров и онкологических больных дезоксирибонуклеопротеиновых комплексов (НПК) и экзосом (экзосом плазмы и экзосом, ассоциированных с поверхностью форменных элементов крови, далее – экзосом крови). Применение в данной работе современных подходов к изучению нуклеиновых кислот и белков, включающих молекулярно-биологические, химические и физические методы исследований, а также биоинформатические подходы к обработке данных, дало возможность впервые описать состав циркулирующих в крови НПК и экзосом и наметить перспективные протеомные маркеры для диагностики рака молочной железы (РМЖ) методом «жидкостной биопсии». Более того, предсказанные биоинформатическими подходами эффекты экзосом крови условно здоровых женщин (ЗЖ) и больных РМЖ были подтверждены в экспериментах *in vitro*. Полученные в работе данные о строении концов, фрагментации и индексе метилирования ДНК плазмы и ДНК, ассоциированной с форменными элементами крови, существенно расширяют знания о циркулирующей внеклеточной ДНК (внДНК) при онкологии, а также могут быть полезны для разработки диагностических ПЦР-систем для «жидкостной биопсии». Основные выводы этой работы, посвященной особенностям циркуляции и оценке диагностической значимости внеклеточных НПК и экзосом крови больных РМЖ, рассмотрены ниже.

Первый блок работы посвящен анализу изменений в строении концов, фрагментации и индексе метилирования внДНК плазмы и внДНК, ассоциированной с форменными элементами крови у больных РМЖ. Было показано, что в крови ЗЖ концы внДНК гетерогенны – обнаружены молекулы с 5'-выступающими, 3'-выступающими и тупыми концами; у больных РМЖ внДНК плазмы содержит преимущественно выступающие 3'- и 5'-концы, а ДНК, ассоциированная с форменными элементами – только 5'-концы. Кроме того, в плазме крови ЗЖ в составе внДНК доля коротких фрагментов (100-1000 п.н.) составляет ~ 20%, а у больных РМЖ ~ 2%. В составе ДНК, ассоциированной с форменными элементами, как в норме, так и при РМЖ преобладают фрагменты более 1000 п.н. (более 99%). Полученные в работе данные о представленности концов и профилю фрагментации внДНК плазмы и внДНК, ассоциированной с ФЭК, указывают, что в норме не менее 20% ДНК плазмы имеют апоптотическое происхождение. Присутствие длинных фрагментов внДНК с повышенной представленностью 5'-выступающих концов в крови больных РМЖ свидетельствуют о том, что при раке не менее трети ДНК высвобождается в кровь из некротических клеток.

Поскольку ранее было показано, что метилированная ДНК более стабильна, чем неметилированная [456] и легко связывается с клетками [59, 457], была проведена оценка aberrантно метилированной внДНК в плазме и элюатах с поверхности форменных элементов. В качестве мишени была выбрана промоторная область гена *RARβ2*, который метилируется с высокой частотой [458, 460, 463]. Aberrантно метилированные последовательности промоторной области гена *RARβ2* были выявлены только во фрагментах внДНК размером более 1000 п.н., при этом наибольший индекс метилирования выявлен во внДНК, ассоциированной с форменными элементами крови больных РМЖ (61%). Сравнительный анализ концентрации aberrантно метилированного *RARβ2* в образцах внДНК плазмы и внДНК, ассоциированной с поверхностью форменных элементов крови ЗЖ и больных РМЖ, выявил статистически значимые отличия (медиана 72 против 381 пг/мл,  $p < 0,01$ , соответственно). Таким образом, внДНК, ассоциированная с форменными элементами крови больных РМЖ является перспективным источником aberrантно-метилированных маркеров, на основе которой могут быть созданы тест-системы для выявления РМЖ.

Поскольку белковый состав НПК крови может определять не только время жизни внДНК в циркуляции, но и её биологические функции, одной из задач, решенных в данной работе, было определение протеома НПК в норме и при РМЖ. Для решения этой задачи были разработаны два принципиально разных подхода для выделения нативных НПК крови.

За основу первого метода выделения нативных НПК из плазмы крови был взят метод выделения внДНК, основанный на связывании ДНК с поверхностью мелкодисперсного стекла и позволяющий с эффективностью не менее 90% выделять ДНК размером свыше 100 п.н. [439]. С использованием модельных НПК ( $^{32}\text{P}$ -меченая ДНК+ДНК-связывающий белок лактоферрин [82]) были оптимизированы условия выделения НПК из плазмы крови и показано, что данный метод может быть использован для идентификации белков НПК, изучения транспорта внДНК в кровотоке и поиска новых протеомных маркеров заболеваний, характеризующихся повышенным содержанием циркулирующих нуклеиновых кислот. В тоже время недостатком разработанного метода является выделение примерно половины нативных НПК, а вторая половина остается необратимо связанной с поверхностью мелкодисперсного стекла. В связи с этим был разработан принципиально иной подход к выделению нативных НПК, заключающийся в выделении НПК за белковую составляющую – гистоны.

Нативные гистон-содержащие НПК были выделены из плазмы крови при помощи аффинной хроматографии на сорбенте с иммобилизованными поликлональными антителами против гистонов. Доля ДНК и доля белка в составе выделенных НПК достоверно не

отличались от содержания вДНК и общего содержания белка в плазме крови в норме и при РМЖ, что свидетельствует о применимости разработанного подхода для получения информации о белках в составе НПК в норме и при патологических состояниях. Анализ протеома НПК комбинацией методов масс-спектрометрии и биоинформатики позволил впервые описать состав гистон-содержащих НПК. В частности, в составе НПК крови ЗЖ и больных РМЖ идентифицированы 177 и 169 белков, соответственно, из них 38 белков были универсальными. Сравнительный анализ выявил при РМЖ увеличение доли транспортных белков, белков ионных каналов и белков, участвующих в передаче сигналов. С помощью биоинформатического анализа в белках НПК выявлены 38 типов ДНК-связывающих мотивов, что позволило условно разделить белки НПК на связывающие нуклеиновые кислоты и белки-«пассажиры», на долю которых приходится 63% всех белков. При РМЖ в составе ДНК-связывающих белков возрастает доля белков, регулирующих метаболизм нуклеиновых кислот и снижается доля белков, вовлеченных в процессы межклеточной коммуникации и передачи сигнала, а в составе белков-«пассажиров» – возрастает доля транспортных белков и снижается доля белков энергетических биологических путей.

В дальнейшем 9 выявленных уникальных для опухоли-специфических белков ДНК-связывающих мотивов могут быть использованы для обогащения вДНК опухолевого происхождения, что может повысить эффективность диагностики онкологических заболеваний методом «жидкостной биопсии». Комбинация пяти белков (SPG7, ADRB1, SMCO4, RHF1, PSMG1) в составе НПК позволяет дифференцировать больных РМЖ от ЗЖ с чувствительностью 100% и специфичностью 80%. В комбинации с анализом последовательностей опухолевой вДНК выявленные опухоли-ассоциированные белки НПК могут служить потенциальными мишенями для разработки мультимаркерных подходов для ранней неинвазивной диагностики злокачественных новообразований.

Отдельный блок работы был посвящен исследованию феномена экзосом крови онкологических больных. Известно, что при циркуляции в крови экзосомы контактируют с форменными элементами, причем часть из них не подвергается немедленному слиянию/интернализации с плазматической мембраной, а какое-то время может оставаться на поверхности клетки в виде ассоциированных с клетками везикул [27, 28]. Доля экзосом, циркулирующих в плазме, от всех экзосом крови, а также состав, биологическая роль и диагностическая ценность экзосом крови до начала этой работы были не известны.

С помощью трансмиссионной и крио-электронной микроскопии была описана морфология везикул и проведен сравнительный анализ экзосом плазмы и экзосом крови ЗЖ и больных РМЖ. Впервые было обнаружено, что у ЗЖ в плазме преимущественно представлены одинарные везикулы (91%), а в крови – одинарные (37%), двойные (20%) и

двухмембранные везикулы (22%). Морфология выделенных везикул из плазмы и из крови больных РМЖ была сопоставима (преобладали одиночные везикулы – 81% и 70%, соответственно). При помощи трекового анализа было выявлено, что как в норме, так и при РМЖ около половины экзосом крови ассоциированы с поверхностью форменных элементов крови (медианы экзосом в плазме от общего содержания экзосом крови составили 43% и 55%, соответственно), при этом при онкологии концентрация экзосом достоверно повышается как в плазме, так и в крови по сравнению нормой ( $p < 0,05$ ). С помощью проточной цитометрии в плазме и в крови как в норме, и при РМЖ были идентифицированы различные субпопуляции везикул, из них CD9+/CD24+экзосомо-подобные везикулы являются наиболее представленной субпопуляцией. Таким образом, у больных РМЖ по сравнению со ЗЖ возрастает концентрация и изменяется морфология как экзосом плазмы, так и экзосом крови.

Известно, что экзосомы осуществляют межклеточную коммуникацию путем переноса биологически активных молекул от клеток-доноров к клеткам-реципиентам. Мажорные тетраспанины экзосом вовлечены не только во взаимодействие везикул с клетками, но и взаимодействуют с различными белками, формируя функциональные тетраспаниновые комплексы. Среди тетраспанин-ассоциированных экзосомальных протеаз большое внимание привлекают ADAM-10, которые осуществляет эктодоменный шеддинг различных субстратов, в том числе рецепторов факторов роста, рецепторов адгезии и кадгеринов, что в результате индуцирует подвижность клеток и увеличивает метастатический потенциал опухолевых клеток [511-513]. Неассоциированные с тетраспанинами протеазы экзосом – 20S протеасомы – участвуют в регуляции пролиферации, апоптоза, миграции клеток, транскрипции генов и иммунного ответа, разрушая или активируя белки – компоненты сигнальных путей, факторы транскрипции и другие функционально значимые молекулы [515, 516]. В данной работе впервые выявлены различия в уровнях ферментов экзосом крови у больных РМЖ по сравнению со ЗЖ: повышение 20S протеасом и ADAM-10 в CD9+субпопуляции свидетельствуют о вовлечении в канцерогенез как тетраспанин-ассоциированных, так и тетраспанин-неассоциированных протеаз в составе экзосом, ассоциированных с форменными элементами крови, наряду с экзосомами плазмы.

Поскольку механизм сортировки РНК и белков в экзосомы пока не достаточно изучен, с помощью масс-спектрометрии в образцах экзосом крови условно ЗЖ и больных РМЖ идентифицированы 111 и 146 белков, соответственно, из них 34 белка были универсальными. С помощью биоинформатического анализа показано, что как в норме, так и при РМЖ в составе экзосом преобладают ядерные, цитоплазматические и экзосомальные белки. При РМЖ в составе экзосом возрастает доля транспортных и каталитических белков,

при этом снижается доля белков, участвующих в межклеточной коммуникации и передаче сигнала, ДНК-связывающих белков и белков, регулирующих метаболизм нуклеотидов. Полученные по экзосомам плазмы результаты подтверждают ранее опубликованные данные [526-528], тогда как данные по протеомному портрету экзосом крови получены в работе впервые.

Для подтверждения гипотезы о том, что экзосомы крови по сравнению с экзосомами плазмы больных РМЖ обогащены белками-участниками процессов, потенциально приводящих к росту и распространению опухоли, в составе экзосом была оценена доля белков, принимающих активное участие в эпителиально-мезенхимальном переходе (ЭМП), клеточной пролиферации, миграции и инвазии, ангиогенезе и регуляции иммунного ответа. Установлено, что при РМЖ экзосомы крови по сравнению с экзосомами плазмы обогащены белками, стимулирующими ЭМП, клеточную пролиферацию, миграцию и инвазию, при этом протеом экзосом крови ЗЖ обогащен белками, ингибирующими эти процессы.

Таким образом, полученная в работе информация об изменении концентрации и морфологии, а также белкового состава экзосом крови больных РМЖ расширяет фундаментальные знания об участии экзосом в канцерогенезе. Кроме того, белки экзосом крови можно рассматривать как источник потенциальных маркеров для выявления РМЖ методом «жидкостной биопсии»: комбинация пяти белков в составе экзосом крови (APPBP2, KRT1, KRT6B, SERPINA1, SOCS3) позволяет дифференцировать группы больных РМЖ от ЗЖ с чувствительностью 71% и специфичностью 100%.

Не только эффекты экзосом опухолевого происхождения на нормальные клетки, но и эффекты экзосом, секретлируемых клетками нормальной ткани на раковые клетки, имеют важное значение для патогенеза заболевания [547]. Для подтверждения гипотезы о различной функциональной роли экзосом плазмы и экзосом, ассоциированных с форменными элементами крови в стимуляции роста опухоли было исследовано влияние экзосом плазмы и экзосом крови ЗЖ и больных РМЖ на ключевые этапы опухолевой прогрессии *in vitro*, а также оценена возможность транспорта ДНК в составе экзосом.

Установлено, что экзосомы не являются основными транспортерами ДНК – доля ДНК в короне экзосом не превышает 0,03% от содержания вДНК в плазме крови. С помощью масс-спектрометрии и биоинформатического анализа идентифицированы 16 экзосомных ДНК-связывающих белков, из них 4 белка на внешней мембране и 5 белков в короне экзосом. Кроме того, ДНК может присоединяться к экзосомам за счет связывания гистонов в НПК с гистон-связывающими белками экзосомальной короны (выявлены 2 гистон-связывающих белка). Полученные данные свидетельствуют о том, что вДНК

преимущественно связывается с внешней поверхностью экзосом за счет ассоциации с ДНК-связывающими белками.

В экспериментах *in vitro* установлено, что все экзосомы больных РМЖ стимулируют формирование капилляро-подобных структур, что указывает на сопоставимую биологическую активность экзосом плазмы и экзосом крови. При этом добавление к эндотелиоцитам экзосом крови ЗЖ в пять раз снижает скорость формирования капилляро-подобных структур по сравнению с добавлением экзосом плазмы этих же доноров.

Влияние экзосом плазмы и экзосом крови ЗЖ и больных РМЖ на формирование межклеточных контактов, клеточную миграцию и пролиферацию протестировано на линии псевдо-нормальных эпителиоцитов молочной железы (MCF10A) и клетках карциномы молочной железы (SKBR-3). Экзосомы крови ЗЖ по сравнению с экзосомами плазмы этих же доноров уменьшают длину пути и при этом увеличивают количество подвижных клеток MCF10A и количество событий митоза. При этом все экзосомы ЗЖ стимулируют ЭМП клеток MCF10A и увеличивают общую длину пути клеток SKBR3. Способность экзосом плазмы потенцировать злокачественные свойства опухоли ранее была показана и в других работах [547, 568-570], данные о биологических эффектах экзосом крови получены в работе впервые.

Установлено, что экзосомы плазмы и экзосомы крови больных РМЖ вызывают сходные (но не идентичные) биологические эффекты, что может быть связано с их различным белковым составом: экзосомы плазмы больше стимулируют морфологическое изменение межклеточных адгезий, характерное для более ранних стадий ЭМП MCF10A, а также значительно увеличивают количество подвижных псевдонормальных и опухолевых клеток, экзосомы крови – увеличивают количество как подвижных, так и пролиферирующих клеток MCF10A, а также общую длину пути клеток SKBR3. Поскольку экзосомы плазмы составляют лишь часть экзосом крови, правильнее оценивать содержание белков, связанных с критическими для развития РМЖ процессами, в экзосомах крови. Учитывая потенциальную роль экзосом крови в онкогенезе, они могут служить перспективными мишенями для терапии, например, для предотвращения миграции раковых клеток.

Подводя итог, можно заключить, что система экзосомальной межклеточной коммуникации выполняет регуляторную и интегрирующую роль в физиологии организма, представляя существенную значимость, как в фундаментальном, так и в практическом отношении для разных областей, в том числе и для онкологии. Полученные данные о белках, участвующих в транспорте вДНК в составе НПК, и белках в составе экзосом, отвечающих за транспорт опухоли-ассоциированных нуклеиновых кислот в кровотоке имеют принципиальное значение для понимания молекулярных механизмов процессов,

обеспечивающих передачу генетической информации и сигналов между клетками. Полученная информация может быть использована для создания новых методов диагностики онкологических заболеваний и создания фундаментальных предпосылок для возможной оптимизации противораковой терапии.



## ВЫВОДЫ

Данная работа представляет собой первое комплексное исследование циркулирующих в крови здоровых доноров и онкологических больных дезоксирибонуклеопротеиновых комплексов и суммарных экзосом (экзосом плазмы и экзосом, ассоциированных с поверхностью формных элементов крови, далее – экзосом крови), в результате которого впервые описан состав циркулирующих в крови дезоксирибонуклеопротеиновых комплексов и экзосом, намечены перспективные протеомные маркеры для «жидкостной биопсии» рака молочной железы и установлены эффекты, оказываемые экзосомами крови на пролиферацию и миграцию опухолевых клеток, стимуляцию формирования капилляро-подобных структур.

1. Анализ внеклеточной ДНК, выделенной из крови условно здоровых женщин и больных РМЖ, позволил выявить ряд существенных различий:

- в крови условно здоровых женщин концы внеклеточной ДНК гетерогенны – обнаружены молекулы с 5'-выступающими, 3'-выступающими и тупыми концами; у больных РМЖ внеклеточная ДНК плазмы содержит преимущественно выступающие 3'-концы и 5'-концы, а ДНК, ассоциированная с форменными элементами – только 5'-концы;

- в плазме крови условно здоровых женщин в составе внеклеточной ДНК доля коротких фрагментов (100-1000 п.н.) составляет ~ 20%, у больных РМЖ ~ 2%. В составе ДНК, ассоциированной с форменными элементами, как в норме, так и при РМЖ преобладают фрагменты более 1000 п.н. (более 99%);

- аберрантно метилированные последовательности промоторной области гена *RARβ2* выявлены только во фрагментах внеклеточной ДНК размером более 1000 п.н., наибольший индекс метилирования выявлен в ДНК, ассоциированной с форменными элементами крови больных РМЖ (61%). У больных РМЖ концентрация данного маркера выше в ассоциированной с форменными элементами ДНК по сравнению с ДНК плазмы (медиана 381 против 72 пг/мл,  $p < 0,01$ , соответственно).

2. Детальный анализ дезоксирибонуклеопротеиновых комплексов (НПК), циркулирующих в крови условно здоровых женщин и больных РМЖ, проведенный с использованием MALDI-TOF масс-спектрометрии и биоинформатических подходов, выявил следующие существенные различия их белкового состава:

- в составе НПК крови условно здоровых женщин и больных РМЖ идентифицированы 177 и 169 белков, соответственно, из них 38 белков – универсальные. При наличии злокачественного новообразования в составе циркулирующих в крови НПК возрастает доля транспортных белков, белков ионных каналов и белков, участвующих в передаче сигналов;

- белки, обнаруженные в составе НПК, условно можно разделить на белки, связывающие нуклеиновые кислоты, и белки-«пассажиры». На долю белков, связывающих нуклеиновые кислоты, приходится 37% всех белков НПК, в них выявлено 38 типов ДНК-связывающих мотивов. При РМЖ в составе ДНК-связывающих белков возрастает доля белков, регулирующих метаболизм нуклеиновых кислот и снижается доля белков, вовлеченных в процессы межклеточной коммуникации и передачи сигналов, а в составе белков-«пассажиров» – возрастает доля транспортных белков и снижается доля белков энергетических биологических путей.

3. Сравнительный анализ экзосом плазмы и экзосом крови выявил значительные отличия в морфологии и в уровне ферментов у условно здоровых женщин и у больных РМЖ:

- у больных РМЖ увеличивается концентрация как экзосом плазмы, так и экзосом крови, а также изменяется соотношение везикул различной морфологии;

- у больных РМЖ повышается уровень тетраспанин-ассоциированной шеддазы ADAM-10 на поверхности CD-9-положительных экзосом и тетраспанин-неассоциированной 20S протеасомы в составе экзосом плазмы и экзосом крови;

4. Детальный анализ экзосом крови условно здоровых женщин и больных РМЖ, проведенный с использованием MALDI-TOF масс-спектрометрии и биоинформатических подходов, выявил следующие существенные различия их белкового состава:

- в составе экзосом крови условно здоровых женщин и больных РМЖ идентифицированы 111 и 146 белков соответственно, из них 34 белка – универсальные. При наличии РМЖ в составе экзосом плазмы и экзосом крови возрастает доля транспортных и каталитических белков, а также вовлеченных в метаболизм белков, при этом снижается доля белков, участвующих в межклеточной коммуникации и передаче сигнала, ДНК-связывающих белков и белков, регулирующих метаболизм нуклеотидов;

- экзосомы крови по сравнению с экзосомами плазмы больных РМЖ обогащены белками, стимулирующими ЭМП, миграцию и инвазию, при этом протеом экзосом крови условно здоровых женщин обогащен белками, ингибирующими эти процессы.

5. Показано, что экзосомы не являются основными транспортерами ДНК – доля ДНК в экзосомах не превышает 0,03% от содержания внеклеточной ДНК в плазме крови. Впервые установлено, что экзосомы крови больных РМЖ *in vitro* стимулируют формирование капилляро-подобных структур, индуцируют ЭМП и увеличивают количество подвижных и пролиферирующих псевдо-нормальных клеток молочной железы MCF10A, а также общую длину пути раковых клеток SKBR3. Выявлено разнонаправленное влияние

экзосом крови условно здоровых женщин: они подавляют формирование капилляро-подобных структур и уменьшают длину пути клеток MCF10A по сравнению с экзосомами плазмы, при этом стимулируют ЭМП, увеличивают количество подвижных и пролиферирующих MCF10A, а также длину пути клеток SKBR3.

б. Белки в составе НПК и экзосом крови могут быть использованы для выявления РМЖ методом «жидкостной биопсии», позволяя дифференцировать группы первичных больных РМЖ ( $T_{1-2}N_{0-1}M_0$ ) от условно здоровых женщин:

- комбинация пяти белков в составе экзосом крови (APPBP2, KRT1, KRT6B, SERPINA1, SOCS3) – с чувствительностью 71% и специфичностью 100% (AUC 0,853);

- комбинация пяти белков в составе НПК (SPG7, ADRB1, SMCO4, PHF1, PSMG1) – с чувствительностью 100% и специфичностью 80% (AUC 0,900).

## ПРИМЕНЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ И НАУЧНЫХ ВЫВОДОВ

1. Результаты исследования, вошедшие в диссертацию, могут быть использованы при разработке тест-систем для диагностики онкологических заболеваний методом «жидкостной биопсии», в том числе РМЖ:

- использование ДНК, ассоциированной с форменными элементами крови, для которой характерны длина более 1000 п.н. и более высокий индекс метилирования, позволит улучшить аналитические характеристики ПЦР-систем, основанных на анализе специфичных к метилированию промоторных областей генов-супрессоров опухоли;

- использование выявленных уникальных для онкологических больных ДНК-связывающих мотивов белков позволит создать методы обогащения/выделения вДНК опухолевого происхождения.

2. При выполнении диссертационной работы выявлено, что экзосомы плазмы составляют менее половины экзосом крови. У больных РМЖ экзосомы крови по сравнению с экзосомами плазмы обогащены белками, стимулирующими эпителиально-мезенхимальный переход, миграцию и инвазию клеток. Для повышения эффективности выявления опухоле-ассоциированных белков разработан способ получения экзосом крови (патент РФ №2556825 от 18 июня 2015 г. «Способ получения экзосом из крови»).

3. Обнаруженные при выполнении диссертационной работы панели протеомных маркеров в составе дезоксирибонуклеопротеиновых комплексов и экзосом крови могут быть использованы в качестве дополнительного критерия дифференцирования условно здоровых женщин и больных РМЖ (патент РФ №2571507 от 24 ноября 2015 г. «Способ диагностики и мониторинга онкологических заболеваний с использованием экзосом крови»).

**СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ**

1. Stejskal P., Goodarzi H., Srovnal J., Hajdúch M., van 't Veer L.J., Magbanua M.J.M. Circulating tumor nucleic acids: biology, release mechanisms, and clinical relevance // *Mol. Cancer*. – 2023 – V.22(1) – P.15. doi: 10.1186/s12943-022-01710-w.
2. Blood Sample Monitoring of Patients With EGFR Mutated Lung Cancer//US National Library of Medicine. Available online: <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT02284633> (accessed on 25 May 2021).
3. Monitoring Plasma Tumor DNA in Early—Stage Breast Cancer//US National Library of Medicine. 2016. Available online: <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT02743910> (accessed on 25 May 2021).
4. Naik S.H., Schumacher T.N., Perie L. Cellular barcoding: A technical appraisal // *Exp. Hematol.* – 2014 – V.42. – P.598–608.
5. Kuroi K., Tanaka C., Toi M. Clinical significance of plasma nucleosome levels in cancer patients // *Int. J. Oncol.* – 2001. – V.19(1). – P.143-148. doi: 10.3892/ijco.19.1.143.
6. Holdenrieder S., Stieber P. Clinical use of circulating nucleosomes // *Crit. Rev. Clin. Lab. Sci.* – 2009. – V.46. – P.1–24.
7. Butler P., Tennent G., Pepys M. Pentraxin-chromatin interactions: Serum amyloid P component specifically displaces H1-type histones and solubilizes native long chromatin // *J. Exp. Med.* – 1990. – V.172. – P.13–18.
8. Егорова В., Блинов М. ДНК-связывающие белки сыворотки крови при гемобластозах // *Вопр. мед. хим.* – 1993. – Т.39(3). – С.36-38.
9. Kononova I.V., Mamaeva S.N., Alekseev V.A., Nikolaeva N.A., Afanasyeva L.N., Nikiforov P.V., Vasilyeva N.A., Vasiliev I.V., Maximov G.V. Simultaneous detection of the HPV L1 gene and the human  $\beta$ -globin gene in the blood components of cervical cancer patients living in Yakutia // *Int. J. Biomed.* – 2022. – V.12(1). – P.109-114. doi:10.21103/Article12(1)\_OA10.
10. Liang N., Jiao Z., Zhang C., Wu Y., Wang T., Li S., Wang Y., Song T., Chen J-Q., Liang H., Chen Q. Mature red blood cells contain long DNA fragments and could acquire DNA from lung cancer tissue // *Adv. Sci (Weinh)*. – 2023. – V.e2206361. doi: 10.1002/advs.202206361.
11. Rykova E.Y., Morozkin E.S., Ponomaryova A.A., Loseva E.M., Zaporozhchenko I.A., Cherdyntseva N.V., Vlassov V.V., Laktionov P.P. Cell-free and cell-bound circulating nucleic acid complexes: mechanisms of generation, concentration and content // *Expert Opin. Biol. Ther.* – 2012. – V.12(1). – P.S141-153. doi: 10.1517/14712598.2012.673577.

12. Mouliere F., Thierry A.R. The importance of examining the proportion of circulating DNA originating from tumor, microenvironment and normal cells in colorectal cancer patients // *Exp. Opin. Biol. Ther.* – 2012. – V.12. – P.209–215.
13. Bryzgunova O.E., Konoshenko M.Y., Laktionov P.P. Concentration of cell-free DNA in different tumor types // *Expert Rev. Mol. Diagn.* – 2021. – V.21(1). – P.63-75. doi: 10.1080/14737159.2020.1860021.
14. Tierno D., Grassi G., Zanconati F., Bortul M., Scaggiante B. An overview of circulating cell-free nucleic acids in diagnosis and prognosis of triple-negative breast cancer // *Int. J. Mol. Sci.* – 2023. – V.24(2). – P.1799. doi: 10.3390/ijms24021799.
15. Tsoneva D.K., Ivanov M.N., Conev N.V., Manev N., Stoyanov D.S., Vinciguerra M. Circulating histones to detect and monitor the progression of cancer // *Int. J. Mol. Sci.* – 2023. – V.24(2). – P.942. doi: 10.3390/ijms24020942.
16. Kok V.C., Yu C.-C. Cancer-derived exosomes: their role in cancer biology and biomarker development // *Int. J. Nanomedicine.* – 2020. – V.15. – P.8019–8036. doi: 10.2147/IJN.S272378.
17. Huang S., Dong M., Chen Q. Tumor-derived exosomes and their role in breast cancer metastasis // *Int. J. Mol. Sci.* – 2022. – V.23(22). – P.13993. doi: 10.3390/ijms232213993.
18. Lin B., Jiang J., Jia J., Zhou X. Recent advances in exosomal miRNA biosensing for liquid biopsy // *Molecules.* – 2022. – V.27(21). – P.7145. doi: 10.3390/molecules27217145.
19. Whiteside T.L. The role of tumor-derived exosomes in epithelial mesenchymal transition (EMT) // *Transl. Cancer Res.* – 2017. – V.6(1). – P.90–92.
20. Liang X., Zhang L., Wang S., Han Q., Zhao R.C. Exosomes secreted by mesenchymal stem cells promote endothelial cell angiogenesis by transferring miR-125a // *J. Cell. Sci.* – 2016. – V.129(11). – P.2182–2189. doi: 10.1242/jcs.170373.
21. Harada T., Yamamoto H., Kishida S., Kishida M., Awada C., Takao T., Kikuchi A. Wnt5b-associated exosomes promote cancer cell migration and proliferation // *Cancer Sci.* – 2017. – V.108(1). – P.42-52. doi: 10.1111/cas.13109.
22. He M., Qin H., Poon T.C.W., Sze S.C., Ding X., Co N.N., Ngai S.M., Chan T.F., Wong N. Hepatocellular carcinoma-derived exosomes promote motility of immortalized hepatocyte through transfer of oncogenic proteins and RNAs // *Carcinogenesis.* – 2015. – V.36(9). – P.1008–1018.
23. Rak J. Extracellular vesicles — biomarkers and effectors of the cellular interactome in cancer // *Front. Pharmacol.* – 2013. – V.4. – P.21. doi: 10.3389/fphar.2013.00021.

24. Filipazzi P., Burdek M., Villa A., Rivoltini L., Huber V. Recent advances on the role of tumor exosomes in immunosuppression and disease progression // *Semin. Cancer Biol.* – 2012. – V.22(4). – P.342-349.
25. Kok V.C., Yu C.-C. Cancer-derived exosomes: their role in cancer biology and biomarker development // *Int. J. Nanomed.* – 2020. – V.15. – P.8019–8036.
26. Yanshina D.D., Kossinova O.A., Gopanenko A.V., Krasheninina O.A., Malygin A.A., Venyaminova A.G., Karpova G.G. Structural features of the interaction of the 3'-untranslated region of mRNA containing exosomal RNA-specific motifs with YB-1, a potential mediator of mRNA sorting // *Biochimie.* – 2018. – V.144. – P.134-143. doi: 10.1016/j.biochi.2017.11.007.
27. 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. – V.6(9). – P.e24234. doi: 10.1371/journal.pone.0024234.
28. Mamaeva S.N., Kononova I.V., Ruzhansky M., Nikiforov P.V., Nikolaeva N.A., Pavlov A.N., Fedorova N.F., Huang J., Semenova M.N., Barashkova D.V., Frolova L.S., Maximov G.V. Using scanning electron microscopy and atomic force microscopy to study the formation of nanoparticles on red blood cell surface in cervical cancer patients // *Int. J. Biomedicine.* – 2020. – V.10(1). – P.70-75.
29. Sung H., Ferlay J., Siegel R.L., Laversanne M., Soerjomataram I., Jemal A., Bray F. Global cancer statistics 2020: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries // *CA Cancer J. Clin.* – 2021. – V.71(3). – P.209-249. doi: 10.3322/caac.21660.
30. Nagy B. Cell-free nucleic acids // *Int. J. Mol. Sci.* – 2019. – V.20(22). – P.5645. doi: 10.3390/ijms20225645.
31. Beck J., Urnovitz H.B., Riggert J., Clerici M., Schütz E. Profile of the circulating DNA in apparently healthy individuals // *Clin. Chem.* – 2009. – V.55(4). – P.730-738. doi: 10.1373/clinchem.2008.113597.
32. van der Vaart M., Pretorius P.J. Characterization of circulating DNA in healthy human plasma // *Clin. Chim. Acta.* – 2008. – V.395(1-2). – P.186. doi: 10.1016/j.cca.2008.05.006.
33. Ngan R.K.C., Yip T.T.C., Cheng W.W., Chan J.K.C., Cho W.C.S., Ma V.W.S., Wan K.K., Au J.S.K, Law C.K. Clinical role of circulating epstein-Barr virus DNA as a tumor marker in lymphoepithelioma-like carcinoma of the lung // *Ann. N. Y. Acad. Sci.* – 2004. – V.1022. – P.263-270.

34. Федченко В.И., Гурьев С.О., Семенова Н.В. Неинвазивная пренатальная ПЦР диагностика пола // Биомед. Химия. – 2005. – Т.51. – С.527-535.
35. Hacker H.J., Zhang W., Tokus M., Bock T., Schroder C.H. Patterns of circulating hepatitis B virus serum nucleic acids during lamivudine therapy // Ann. N. Y. Acad. Sci. – 2004. – V.1022. – P.271-281.
36. Лихтенштейн А.В., Потапова Г.И. Генетические дефекты как маркеры опухолевого роста // Молекулярная биология. – 2003. – Т.37(2). – С.181–193.
37. Nagata S. Apoptotic DNA fragmentation // Exp. Cell. Res. – 2000. – V.256(1). – P.12–28.
38. Jahr S., Hentze H., Englisch S., Hardt D., Fackelmayer F.O., Hesch R.D., Knippers R. DNA fragments in the blood plasma of cancer patients: quantitations and evidence for their origin from apoptotic and necrotic cells // Cancer Res. – 2001. – V.61(4). – P.1659–1665.
39. Pisetsky D.S. The origin and properties of extracellular DNA: from PAMP to DAMP // Clin. Immunol. – 2012. – V.144(1). – P.32–40.
40. Samejima K., Earnshaw W.C. Trashing the genome: the role of nucleases during apoptosis // Nat. Rev. Mol. Cell. Biol. – 2005. – V.6(9). – P.677–688.
41. Bell D.A., Morrison B., Van den Bygaart P. Immunogenic DNA-related factors. Nucleosomes spontaneously released from normal murine lymphoid cells stimulate proliferation and immunoglobulin synthesis of normal mouse lymphocytes // J. Clin. Invest. – 1990. – V.85(5). – P.1487–1496.
42. Suzuki N., Kamataki A., Yamaki J., Homma Y. Characterization of circulating DNA in healthy human plasma // Clin. Chim. Acta. – 2008. – V.387(1–2). – P.55–58.
43. Deligezer U., Yaman F., Erten N., Dalay N. Frequent copresence of methylated DNA and fragmented nucleosomal DNA in plasma of lymphoma patients // Clin. Chim. Acta. – 2003. – V.335(1–2). – P. 89–94.
44. Radic M., Marion T.N. Neutrophil extracellular chromatin traps connect innate immune response to autoimmunity // Semin. Immunopathol. – 2013. – V.35(4). – P.465–480.
45. Tong Y.K., Lo Y.M. Diagnostic developments involving cell-free (circulating) nucleic acids // Clin. Chim. Acta. – 2006. – V.363(1–2). – P.187–196.
46. Heitzer E., Auer M., Hoffmann E.M., Pichler M., Gasch C., Ulz P., Lax S., Waldispuehl-Geigl J., Mauermann O., Mohan S., Pristauz G., Lackner C., Höfler G., Eisner F., Petru E., Sill H., Samonigg H., Pantel K., Riethdorf S., Bauernhofer T., Geigl J.B., Speicher M.R. Establishment of tumor-specific copy number alterations from plasma DNA of patients with cancer // Int. J. Cancer – 2013. – V.133(2). – P.346–356.
47. Kuroi K., Tanaka C., Toi M. Plasma nucleosome levels in node-negative breast cancer patients // Breast Cancer. – 1999. – V.6(4). – P.361–364.



48. Ellinger J., Bastian P.J., Ellinger N., Kahl P., Perabo F.G., Buttner R., Muller S.C., von Ruecker A. Apoptotic DNA fragments in serum of patients with muscle invasive bladder cancer: A prognostic entity // *Cancer Lett.* – 2008. – V.264. – P.274–280.
49. Morozkin E.S., Loseva E.M., Morozov I.V., Kurilshikov A.M., Bondar A.A., Rykova E.Y., Rubtsov N.B., Vlassov V.V., Laktionov P.P. A comparative study of cell-free apoptotic and genomic DNA using FISH and massive parallel sequencing // *Expert Opin. Biol. Ther.* – 2012. – V.12(1). – P.S11-17. doi: 10.1517/14712598.2012.670631.
50. Lichtenstein A.V., Melkovyan H.S., Tomei L.D., Umansky S.R. Circulating nucleic acids and apoptosis // *Ann. N. Y. Acad. Sci.* – 2001. – V.945. – P.239–249.
51. Thierry A.R., El Messaoudi S., Gahan P.B., Anker P., Stroun M. Origins, structures, and functions of circulating DNA in oncology // *Cancer Metastasis Rev.* – 2016. – V.35(3). – P.347-376. doi: 10.1007/s10555-016-9629-x.
52. Cheng C., Omura-Minamisawa M., Kang Y., Hara T., Koike I., Inoue T. Quantification of circulating cell-free DNA in the plasma of cancer patients during radiation therapy // *Cancer Sci.* – 2009. – V.100(2). – P.303–309.
53. Tsai N.W., Lin T.K., Chen S.D., Chang W.N., Wang H.C., Yang T.M., Lin Y.J., Jan C.R., Huang C.R., Liou C.W., Lu C.H. The value of serial plasma nuclear and mitochondrial DNA levels in patients with acute ischemic stroke // *Clin. Chim. Acta.* – 2011. – V.412(5–6). – P.476–479.
54. Swarup V., Rajeswari M.R. Circulating (cell-free) nucleic acids – a promising, non-invasive tool for early detection of several human diseases // *FEBS Lett.* – 2007. – V.581. – P.795–799.
55. Kobayashi S.D., Braughton K.R., Whitney A.R., Voyich J.M., Schwan T.G., Musser J.M., DeLeo F.R. Bacterial pathogens modulate an apoptosis differentiation program in human neutrophils // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* – 2003. – V.100. – P.10948–10953.
56. Gupta A.K., Hasler P., Holzgreve W., Gebhardt S., Hahn S. Induction of neutrophil extracellular DNA lattices by placental microparticles and IL-8 and their presence in preeclampsia // *Hum. Immunol.* – 2005. – V.66(11). – P.1146–1154. doi: 10.1016/j.humimm.2005.11.003
57. Demers M., Krause D.S., Schatzberg D., Martinod K., Voorhees J.R., Fuchs T.A., Scadden D.T., Wagner D.D. Cancers predispose neutrophils to release extracellular DNA traps that contribute to cancer-associated thrombosis // *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* – 2012. – V.109(32). – P.13076–13081. doi: 10.1073/pnas.1200419109.
58. Erpenbeck L., Schön M.P. Neutrophil extracellular traps: protagonists of cancer progression? // *Oncogene.* – 2017. – V.36(18). – P.2483-2490. doi: 10.1038/onc.2016.406.

59. Skvortsova T.E., Rykova E.Y., Tamkovich S.N., Bryzgunova O.E., Starikov A.V., Kuznetsova N.P., Vlassov V.V., Laktionov P.P. Cell-free and cell-bound circulating DNA in breast tumors: DNA quantification and analysis of tumor-related gene methylation // *Br. J. Cancer* – 2006. – V.94. – P.1492-1495.
60. Morozkin E.S., Laktionov P.P., Rykova E.Y., Vlassov V.V. Extracellular nucleic acids in cultures of long-term cultivated eucaryotic cells // *Ann. N. Y. Acad. Sci.* – 2004. – V.1022. – P.244-249.
61. Anker P., Stroun M., Maurice P.A. Spontaneous release of DNA by human blood lymphocytes as shown in an in vitro system // *Cancer Res.* – 1975. – V.35(9). – P.2375–2382.
62. Морозкин Е.С., Сильников В.Н., Рыкова Е.Ю., Власов В.В., Лактионов П.П. Внеклеточная ДНК в культуре первичных и трансформированных клеток, инфицированных и не инфицированных микоплазмой // *Бюлл. эксперим. биол. мед.* – 2009. – Т.147(1). – С.67–70.
63. Von Köckritz-Blickwede M., Goldmann O., Thulin P., Heinemann K., Norrby-Teglund A., Rohde M., Medina E. Phagocytosis-independent antimicrobial activity of mast cells by means of extracellular trap formation // *Blood* – 2008. – V.111(6). – P.3070–3080.
64. Holdenrieder S., Kolligs F.T., Braess J., Manukyan D., Stieber P. Nature and dynamics of nucleosome release from neoplastic and non-neoplastic cells // *Anticancer Res.* – 2012. – V.32(5). – P.2179–2183.
65. Gahan P.B., Anker P., Stroun M. Metabolic DNA as the origin of spontaneously released DNA? // *Ann. N. Y. Acad. Sci.* – 2008. – V.1137. – P.7-17.
66. Aucamp J., Bronkhorst A.J., Peters D.L., Van Dyk H.C., Van der Westhuizen F.H., Pretorius P.J. Kinetic analysis, size profiling, and bioenergetic association of DNA released by selected cell lines in vitro // *Cell. Mol. Life Sci.* – 2017. – V.74(14). – P.2689-2707.
67. Morozkin E.S., Babochkina T.I., Vlassov V.V., Laktionov P.P. The effect of protein transport inhibitors on the production of extracellular DNA // *Ann. N. Y. Acad. Sci.* – 2008. – V.1137. – P.31–35.
68. Karres I., Kremer J.P., Dietl I., Steckholzer U., Jochum M., Ertel W. Chloroquine inhibits proinflammatory cytokine release into humanwhole blood // *Am. J. Physiol.* – 1998. – V.274(4). – P.1058–1064.
69. Nickel W. The mystery of nonclassical protein secretion: a current view on cargo proteins and potential export routes // *Eur. J. Biochem.* – 2003. – V.270(10). – P.2109–2119.
70. Shaw J.-P., Kent K., Bird J., Fishback J., Froehler B. Modified deoxyoligonucleotides stable to exonuclease degradation in serum // *Nucleic Acids Res.* – 1991. – V.19. – P.747-750.

71. Halicka H.D., Bedner E., Darzynkiewicz Z. Segregation of RNA and separate packaging of DNA and RNA in apoptotic bodies during apoptosis // *Exp. Cell Res.* – 2000. – V.260. – P.248-256.
72. Abe T., Nakashima C., Sato A., Harada Y., Sueoka E., Kimura S., Kawaguchi A., Sueoka-Aragane N. Origin of circulating free DNA in patients with lung cancer // *PLoS ONE* –2020. – V.15(7). – P.e0235611.
73. Ng E.K., Tsui N.B., Lam N.Y., Chiu R.W., Yu S.C., Wong S.C., Lo E.S., Rainer P.J., Johnson T.H., Lo Y.M. Presence of filterable and nonfilterable mRNA in the plasma of cancer patients and healthy individuals // *Clin. Chem.* – 2002. – V.48(8). – P.1212–1217.
74. Gerasimova Y.V., Alekseyeva I.V., Bogdanova T.G., Erchenko I.A., Kudryashova N.V., Chelobanov B.P., Laktionov P.P., Alekseyev P.V., Godovikova T.S. Affinity separation of polyribonucleotide-binding human blood proteins // *Bioorg. Med. Chem. Lett.* – 2006. – V.16. – P.5526-5529.
75. Tanner J.E. Nucleosomes activate NF—kappaB in endothelial cells for induction of the proangiogenic cytokine IL-8 // *Int. J. Cancer* – 2004. – V.1(12). – P.155–160.
76. Паутова Л.В., Рыкова Е.Ю., Лактионов П.П., Власов В.В. Исследование взаимодействия полиреактивных антител с нуклеиновыми кислотами с помощью алкилирующих производных олигонуклеотидов // *Молекуляр. биология* – 1996. – Т.30. – С.941-950.
77. Лактионов П.П., Брыксин А.В., Рыкова Е.Ю., Власов В.В. Исследование олигонуклеотид-белковых взаимодействий в крови *in vivo* // *Бюлл. Эксперим. Биол. Мед.* – 1999. –V.127. – P.654-657.
78. Van Schravendijk M.R., Dwek R.A. Interaction of C1q with DNA // *Mol. Immunol.* – 1982. – V.19. – P.1179-1187.
79. Paidassi H., Tacnet-Delorme P., Arlaud G.J., Frachet P. How phagocytes track down and respond to apoptotic cells // *Crit. Rev. Immunol.* – 2009. – V.29(2). – P.111-130. doi: 10.1615/critrevimmunol.v29.i2.20.
80. Hoch S.O. DNA-binding domains of fibronectin probed using Western blots // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* – 1982. – V.106. – P.1353-1358.
81. Sabatier L., Chen D., Fagotto-Kaufmann C., Hubmacher D., McKee M.D., Annis D.S., Mosher D.F., Reinhardt D.P. Fibrillin assembly requires fibronectin // *Mol. Biol. Cell.* – 2009. – V.20(3). – P.846–858.
82. Лактионов П.П., Рыкова Е., Крепкий Д.В., Брыксин А.В., Власов В.В. Взаимодействие олигонуклеотидов с белками барьерных жидкостей // *Биохимия* – 1997. – Т.62. – С.613-618.

83. Zou S., Magura C.E., Hurley W.L. Heparin-binding properties of lactoferrin and lysozyme // *Comp. Biochem. Physiol. B.* – 1992. – V.103. – P.889-895.
84. Sumenkova D.V., Polyakov L.M., Panin L.E. Plasma lipoproteins as a transport form of extracellular DNA // *Bull. Exp. Biol. Med.* – 2013. – V.154(5). – P.622-623.
85. Van Berkel P.H., Geerts M.E., Van Veen H.A., Mericskay M., de Boer H.A., Nuijens J.H. N-terminal stretch Arg2, Arg3, Arg4 and Arg5 of human lactoferrin is essential for binding to heparin, bacterial lipopolysaccharide, human lysozyme and DNA // *Biochem. J.* – 1997. – V.328. – P.145-151.
86. Wu T.L., Zhang D., Chia J.H., Tsao K.H., Sun C.F., Wu J.T. Cell-free DNA: measurement in various carcinomas and establishment of normal reference range // *Clin. Chim. Acta.* – 2002. – V.321. – P.77-87.
87. Peters D.L., Pretorius P.J. Origin, translocation and destination of extracellular occurring DNA-a new paradigm in genetic behavior // *Clin. Chim. Acta* – 2011. – V.412(11-12). – P.806-811. doi: 10.1016/j.cca.2011.01.026.
88. De Meyer S.F., Suidan G.L., Fuchs T.A., Monestier M., Wagner D.D. Extracellular chromatin is an important mediator of ischemic stroke in mice // *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* – 2012. – V.32(8). – P.1884-1891.
89. Holdenrieder S., Stieber P., Bodenmüller H., Busch M., Fertig G., Fürst H., Schalhorn A., Schmeller N., Untch M., Seidel D. Nucleosomes in serum of patients with benign and malignant diseases // *Int. J. Cancer.* – 2001. – V.95(2). – P.114–120.
90. Roth C., Pantel K., Müller V., Rack B., Kasimir-Bauer S., Janni W., Schwarzenbach H. Apoptosis-related deregulation of proteolytic activities and high serum levels of circulating nucleosomes and DNA in blood correlate with breast cancer progression // *BMC Cancer* – 2011. – V.11. – P.4.
91. Ranna D., Andrys C., Krejsek J., Hamakova K., Kremlacek J., Fiala Z., Borsky P., Borska L. Elevated levels of circulating biomarkers of cell death (nucleosomes) in the patients with plaque psoriasis treated with the Goeckerman regimen // *Bratisl. Lek. Listy.* – 2014. – V.115(4). – P.229–232.
92. Fuchs T.A., Bhandari A., Wagner D.D. Histones induce rapid and profound thrombocytopenia in mice // *Blood* – 2011. – V.118(13). – P.3708–3714.
93. Gasparro F.P., Dall'Amico R., O'Malley M., Heald P.W., Edelson R.L. Cell membrane DNA: a new target for psoralen photoadduct formation // *Photochem. Photobiol.* – 1990. – V.52(2). – P.315–321.

94. Беляев Н.Д., Будкер В.Г., Горохова О.Е., Соколов А.В. Mg<sup>2+</sup>-зависимое взаимодействие ДНК с эукариотическими клетками // Молекуляр. Биология – 1988. – Т.22. – С.1667-1672.
95. Брызгунова О.Е., Лактионов П.П. Формирование пула циркулирующих ДНК крови: источники, особенности строения и циркуляции // Биомедицинская химия – 2015. – Т.61(4). – С.409-426.
96. Rieber M., Bacalao J. An "external" RNA removable from mammalian cells by mild proteolysis // Proc. Natl. Acad. Sci. USA – 1974. – V.71. – P.4960–4964.
97. Челобанов Б.П., Лактионов П.П., Власов В.В. Белки, участвующие в связывании и поглощении клетками нуклеиновых кислот // Биохимия – 2006. – Т.71. – С.725-741.
98. Yakubov L.A., Deeva E.A., Zarytova V.F., Ivanova E.M., Ryte A.S. Mechanism of oligonucleotide uptake by cells: involvement of specific receptors? // Proc. Natl. Acad. Sci. USA – 1989. – V.86. – P.6454–6458.
99. Cherepanova A.V., Bushuev A.V., Duzhak T.G., Zaporozhchenko I.A., Vlassov V.V. Ku protein as the main cellular target of cell-surface-bound circulating DNA // Expert Opin. Biol. Ther. – 2012. – V.12. – P.S35–S41.
100. Yao G.Q., Corrias S., Cheng Y.C. Identification of two oligodeoxyribonucleotide binding proteins on plasma membranes of human cell lines // Biochem. Pharmacol. – 1996. – V.51(4). – P.431–436.
101. Bennett R.M., Kotzin B.L., Merritt M.J. DNA receptor dysfunction in systemic lupus erythematosus and kindred disorders. Induction by anti-DNA antibodies, antihistone antibodies, and antireceptor antibodies // J. Exp. Med. – 1987. – V.166(4). – P.850–863.
102. Bennett R.M., Gabor G.T., Merritt M.M. DNA binding to human leukocytes. Evidence for a receptor-mediated association, internalization, and degradation of DNA // J. Clin. Invest. – 1985. – V.76(6). – P.2182–2190.
103. Bennett R.M., Hefeneider S.H., Bakke A., Merritt M., Smith C.A., Mourich D., Heinrich M.C. The production and characterization of murine monoclonal antibodies to a DNA receptor on human leukocyte // J. Immunol. – 1988. – V.140(9). – P.2937–2942.
104. Rykova E., Laktionov P., Vlasov V. Activation of spleen lymphocytes by plasmid DNA // Nucleosides Nucleotides – 1999. – V.18(6–7). – P.1693–1695.
105. Siess D.C., Vedder C.T., Merckens L.S., Tanaka T., Freed A.C. A human gene coding for a membrane-associated nucleic acid-binding protein // J. Biol. Chem. – 2000. – V.275. – P.33655–33662.
106. Dorsch C.A. Binding of single-strand DNA to human platelets // Thromb. Res. – 1981. – V.24. – P.119-129.

107. Huss R. A 42 kD erythrocyte surface membrane protein with binding capacity to polynucleotides shows functional lack in systemic lupus erythematosus // *Immunobiology* – 1988. – V.178. – P.141-142.
108. Chelobanov B.P., Laktionov P.P., Kharkova M.V., Rykova E.Y., Vlassov V.V. Isolation of nucleic acid binding proteins: an approach for isolation of cell surface, nucleic acid binding proteins // *Ann. N. Y. Acad. Sci.* – 2004. – V.1022. – P.239–243.
109. Cherepanova A.V., Bushuev A.V., Kharkova M.V., Vlassov V.V., Laktionov P.P. DNA inhibits dsRNA-induced secretion of pro-inflammatory cytokines by gingival fibroblasts // *Immunobiology* – 2013. – V.218(2). – P.272–280.
110. Benimetskaya L., Loike J.D., Khaled Z., Loike G., Silverstein S.C. Mac-1 (CD11b/CD18) is an oligodeoxynucleotide-binding protein // *Nat. Med.* – 1997. – V.3. P.414–420.
111. Laktionov P.P., Dazard J.E., Vives E., Rykova E.Y., Piette J., Vlassov V.V., Lebleu B. Characterisation of membrane oligonucleotide-binding proteins and oligonucleotide uptake in keratinocytes // *Nucleic Acids Res.* – 1999. – V.27. – P.2315-2324.
112. Rochard E., Legrand D., Mazurier J., Montreuil J., Spik G. The N-terminal domain I of human lactotransferrin binds specifically to phytohemagglutinin-stimulated peripheral blood human lymphocyte receptors // *FEBS Lett.* – 1989. – V.255(1). – P.201–204.
113. Eda S., Kikugawa K., Beppu M. Characterization of lactoferrin-binding proteins of human macrophage membrane: multiple species of lactoferrin-binding proteins with polylactosamine-binding ability // *Biol. Pharm. Bull.* – 1997. – V.20(2). – P.127–133.
114. Tirupathi C., Finnegan A., Malik A.B. Isolation and characterization of a cell surface albumin-binding protein from vascular endothelial cells // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* – 1996. – V.93. – P.250–254.
115. Jacob L., Viard J.P., Allenet B., Anin M.F., Slama F.B., Vandekerckhove J., Primo J., Markovits J., Jacob F., Bach J.F., le Peco J.B., Louvard D. A monoclonal anti-double-stranded DNA autoantibody binds to a 94 kDa cell surfaceprotein on various cell types via nucleosomes or a DNA-histone complex // *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* – 1989. – V.86(12). – P.4669–4673.
116. Koutouzov S., Cabrespines A., Amoura Z., Chabre H., Lotton C., Bach J.F. Binding of nucleosomes to a cell surface receptor: redistribution and endocytosis in the presence of lupus antibodies // *Eur. J. Immunol.* – 1996. – V.26(2). – P.472–486.
117. Hefeneider S.H., Cornell K.A., Brown L.E., Bakke A.C., McCoy S.L., Bennett R.M. Nucleosomes and DNA bind to specific cell-surface molecules on murine cells and induce cytokine production // *Clin. Immunol. Immunopathol.* – 1992. – V.63(3). – P.245–251.

118. Gahan P.B., Anker P., Stroun M. The virtosome – a novel cytosolic informative entity and intercellular messenger // *Cell. Biochem. Funct.* – 2010. – V.28(7). – P.529–538.
119. De Oliveira M., Boutet V., Fattal E., Boquet D., Grognet J.M., Couvreur P., Deverre J.R. Improvement of in vivo stability of phosphodiester oligonucleotide using anionic liposomes in mice // *Life Sci.* – 2000. – V.67(13). – P.1625–1637.
120. Брызгунова О.Е., Мак В.В., Власов В.В., Лактионов П.П. Исследование стабильности и циркуляции метилированных ДНК потенциальных онкомаркеров in vivo и in vitro // *Молекулярная медицина* – 2010. – Т.5. – С.42–47.
121. Lo Y.M., Zhang J., Leung T.N., Lau T.K., Chang A.M., Hjelm N.M. Rapid clearance of fetal DNA from maternal plasma // *Am. J. Hum. Genet.* – 1999. – V.64(1). – P.218–224.
122. Han D.S.C., Ni M., Chan R.W.Y., Chan V.W.H., Lui K.O., Chiu R.W.K., Lo D. The biology of cell-free DNA fragmentation and the roles of DNASE1, DNASE1L3, and DFFB // *Am. J. Hum. Genet.* – 2020. – V.106(2). – P.202-214. doi: 10.1016/j.ajhg.2020.01.008.
123. Sierakowska H., Shugar D. Mammalian nucleolytic enzymes // *Prog. Nucleic. Acid. Res. Mol. Biol.* – 1977. – V.20. – P.59-130. doi: 10.1016/s0079-6603(08)60470-5.
124. Shiokawa D., Tanuma S. Characterization of human DNase I family endonucleases and activation of DNase gamma during apoptosis // *Biochemistry* – 2001. – V.40(1). – P.143-152. doi: 10.1021/bi001041a.
125. Prince W.S., Baker D.L., Dodge A.H., Ahmed A.E., Chestnut R.W., Sinicropi D.V. Pharmacodynamics of recombinant human DNase I in serum // *Clin. Exp. Immunol.* – 1998. – V.113(2). – P.289-296. doi: 10.1046/j.1365-2249.1998.00647.x.
126. Miyauchi K., Ogawa M., Shibata T., Matsuda K., Mori T., Ito K., Minamiura N., Yamamoto T. Development of a radioimmunoassay for human deoxyribonuclease I // *Clin. Chim. Acta* – 1986. – V.154. – P.115-123. doi: 10.1016/0009-8981(86)90003-3.
127. Nadano D., Yasuda T., Kishi K. Measurement of deoxyribonuclease I activity in human tissues and body fluids by a single radial enzyme-diffusion method // *Clin. Chem.* – 1993. – V.39(3). – P.448-452.
128. Dewez B., Lans M., Allaey V., Karaoglou A., Taper H., Roberfroid M. Serum alkaline deoxyribonuclease activity, a sensitive marker for the therapeutic monitoring of cancer patients: methodological aspects // *Eur. J. Clin. Chem. Clin. Biochem.* – 1993. – V.31(11). – P.793-797.
129. Pan C.Q., Sinicropi D.V., Lazarus R.A. Engineered properties and assays for human DNase I mutants // *Methods Mol. Biol.* – 2001. – V.160. – P.309-321.

130. Gibson U.E.M., Chen A.B., Baker D., Sinicropi D.V. An antibody capture bioassay (ACB) for DNase in human serum samples // *J. Immunol. Methods* – 1992. – V.155(2). – P.249-256. doi: 10.1016/0022-1759(92)90292-2.
131. Pan C.Q., Dodge T.H., Baker D.L., Prince W.S., Sinicropi D.V., Lazarus R.A. Improved potency of hyperactive and actin-resistant human DNase I variants for treatment of cystic fibrosis and systemic lupus erythematosus // *J. Biol. Chem.* – 1998. – V.273(29). – P.18374-18381. doi: 10.1074/jbc.273.29.18374.
132. Shak S., Capon D.J., Hellmiss R., Marsters S.A., Baker C.L. Recombinant human DNase I reduces the viscosity of cystic fibrosis sputum // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* – 1990. – V.87(23). – P.9188-9192. doi: 10.1073/pnas.87.23.9188.
133. Peitsch M.C., Polzar B., Stephan H., Crompton T., MacDonald H.R., Mannherz H.G., Tschopp J. Characterization of the endogenous deoxyribonuclease involved in nuclear DNA degradation during apoptosis (programmed cell death) // *EMBO J.* – 1993. – V.12(1). – P.371-377. doi: 10.1002/j.1460-2075.1993.tb05666.x.
134. Harosh I., Binninger D.M., Harris P.V., Mezzina M., Boyd J.B. Mechanism of action of deoxyribonuclease II from human lymphoblasts // *Eur. J. Biochem.* – 1991. – V.202(2). – P.479-484. doi: 10.1111/j.1432-1033.1991.tb16397.x.
135. Эндакова Э.А., Новгородцева Т.Е. Исследование активности кислых нуклеаз // *Лаб. Дело* – 1991. – Т.8. – P.16-19.
136. Ito K., Yamamoto T., Minamura N. Human urine DNase I: immunological identity with human pancreatic DNase I and enzymic and proteochemical properties of the enzyme // *J. Biochem. (Tokyo)* – 1984. – V.95(5). – P.1399-1406.
137. Eder P.S., DeVine R.J., Dagle J.M., Walder J.A. Substrate specificity and kinetics of degradation of antisense oligonucleotides by a 3' exonuclease in plasma // *Antisense Res. Dev.* – 1991. – V.1. – P.141-151. doi: 10.1089/ard.1991.1.141.
138. Барановский А.Г., Бунева В.Н., Невинский Г.А. Дезоксирибонуклеазы человека // *Биохимия* – 2004. – V.69(6). – P.725-742.
139. Frittitta L., Camastra S., Baratta R., Costanzo B., D'adamo M., Graci S., Spampinato D., Maddux B., Vigneri R., Ferrannini E., Trischitta V. A soluble PC-1 circulates in human plasma: relationship with insulin resistance and associated abnormalities // *J. Clin. Endocrinol.* – 1999. – V.84(10). – P.3620-3625. doi: 10.1210/jcem.84.10.6050.
140. Barthe C., Galabert C., Guy-Crotte O., Figarella C. Plasma and serum lactoferrin levels in cystic fibrosis. Relationship with the presence of cystic fibrosis protein // *Clin. Chim. Acta* – 1989. – V.181(2). – P.183-188. doi: 10.1016/0009-8981(89)90186-1.



141. Kanyshkova T.G., Babina S.E., Semenov D.V., Isaeva N., Vlassov A.V., Neustroev K.N., Kul'minskaya A.A., Buneva V.N., Nevinsky G.A. Multiple enzymic activities of human milk lactoferrin // *Eur. J. Biochem.* – 2003. – V.270(16). – P.3353-3361. doi: 10.1046/j.1432-1033.2003.03715.x.
142. Baranovskii A.G., Odintsova E.S., Buneva V.N., Doronin B.M., Nevinsky G.A. Comparison of enzymatic properties of DNA-abzymes and human DNAses // *Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids* – 2004. – V.23. – P.1053-1056.
143. Bryzgunova O.E., Tamkovich S.N., Cherepanova A.V., Yarmoshchuk S.V., Permyakova V.I., Anykeeva O.Y., Laktionov P.P. Redistribution of free- and cell-surface-bound DNA in blood of benign and malignant prostate tumor patients // *Acta Naturae.* – 2015. – V.7(2). – P.115-118.
144. Frampton G., Hobby P., Morgan A., Staines N., Cameron J. A role for DNA in anti-DNA antibodies binding to endothelial cells // *J. Autoimmun.* – 1991. – V.4. – P.463–478.
145. Schwarzenbach H. Circulating nucleic acids and protease activities in blood of tumor patients // *Expert Opin. Biol. Ther.* – 2012. – V.12(1). – P.S163-169. doi: 10.1517/14712598.2012.674508
146. Новицкий В.В., Рязанцева Н.В., Степовая Е.А., Федорова Т.С., Кравец Е.Б., Иванов В.В., Жаворонок Т.В., Часовских Н.Ю., Чудакова О.М., Бутусова В.Н., Яковлева М.Н. Молекулярные нарушения мембраны эритроцитов при патологии разного генеза являются типовой реакцией организма: контуры проблемы // *Бюл. сиб. медицины.* – 2006. – Т.5(2). – P.62–69.
147. Jung K., Fleischhacker M., Rabien A. Cell-free DNA in the blood as a solid tumor biomarker – a critical appraisal of the literature // *Clin. Chim. Acta.* – 2010. – V.411(21-22). – P.1611-1624. doi: 10.1016/j.cca.2010.07.032.
148. Stroun M., Anker C., Lyautey J., Lederrey C., Maurice C.A. Isolation and characterization of DNA from the plasma of cancer patients // *Eur. J. Cancer Clin. Oncol.* – 1987. – V.23. – P.707-712.
149. Krieg A. CpG still rocks! Update on an accidental drug // *Nucleic Acid Ther.* – 2012. – V.22. – P.77–89.
150. Морозкин Е.С., Лосева Е.М., Задесенец К.С., Рубцов Н.Б., Власов В.В., Лактионов П.П. Исследование состава внеклеточной ДНК в культуре клеток человека с помощью FISH // *Вестник НГУ. Серия: Биология, клиническая медицина* – 2010. – Т.(1). – С.3-10.
151. Cristiano S., Leal A., Phallen J., Fiksel J., Adleff V., Bruhm D.C., Jensen S.O., Medina J.E., Hruban C., White J.R., Palsgrove D.N., Niknafs N., Anagnostou V., Forde P., Naidoo J., Marrone K., Brahmer J., Woodward B.D., Husain H., van Rooijen K.L., Ørntoft M.V.,

- Madsen A.H., van de Velde C.J.H., Verheij M., Cats A., Punt C.J.A., Vink G.R., van Grieken N.C.T., Koopman M., Fijneman R.J.A., Johansen J.S., Nielsen H.J., Meijer G.A., Andersen C.L., Scharpf R.B., Velculescu V.E. Genome-wide cell-free DNA fragmentation in patients with cancer // *Nature*. – 2019. – V.570(7761). – P.385-389. doi: 10.1038/s41586-019-1272-6.
152. Wang B.G., Huang H.Y., Chen Y.C., Bristow R.E., Kassaei K., Cheng C.C., Roden R., Sokoll L.J., Chan D.W., Shih I.M. Increased plasma DNA integrity in cancer patients // *Cancer Res*. – 2003. – V.63(14). – P.3966-3968.
153. Umetani N., Giuliano A.E., Hiramatsu S.H., Amersi F., Nakagawa T., Martino S., Hoon D.S. Prediction of breast tumor progression by integrity of free circulating DNA in serum // *J. Clin. Oncol*. – 2006. – V.24(26). – P.4270-4276.
154. Jiang W.W., Zahurak M., Goldenberg D., Milman Y., Park H.L., Westra W.H., Koch W., Sidransky D., Califano J. Increased plasma DNA integrity index in head and neck cancer patients // *Int. J. Cancer*. – 2006. – V.119(11). – P.2673-2676.
155. Holdenrieder S., Burges A., Reich O., Spelsberg F.W., Stieber P. DNA integrity in plasma and serum of patients with malignant and benign diseases // *Ann. N. Y. Acad. Sci.* – 2008. – V.1137. – P.162-170.
156. Fleischhacker M., Schmidt B. Circulating nucleic acids (CNAs) and cancer survey // *Biochim. Biophys. Acta*. – 2007. – V.1775. – P.181-232.
157. Vlassov V.V., Laktionov P.P., Rykova E.Y. Circulating nucleic acids as a potential source for cancer biomarkers // *Curr. Mol. Med.* – 2010. – V.10(2). – P.142-165.
158. Шкода О.С., Чикова Е.Д., Фоменко Н.В., Власов В.В., Лактионов П.П., Рыкова Е.Ю. Взаимосвязь циркулирующих ДНК крови с особенностями и характером иммунного ответа у больных иксодовым клещевым боррелиозом на ранних стадиях // *Сибирский медицинский журнал*. – 2012. – Т.111(4). – С.39-41.
159. Rykova E., Sizikov A., Roggenbuck D., Antonenko O., Bryzgalov L., Morozkin E., Skvortsova K., Vlassov V., Laktionov P., Kozlov V. Circulating DNA in rheumatoid arthritis: pathological changes and association with clinically used serological markers // *Arthritis Res Ther*. – 2017. – V.9(1). – P.85. doi: 10.1186/s13075-017-1295-z.
160. Пономарева А.А., Рыкова Е.Ю., Скворцова Т.Э., Черепанова А.В., Морозкин Е.С., Милейко В.А., Литвяков Н.В., Добродеев А.Ю., Завьялов А.А., Тузиков С.А., Власов В.В., Лактионов П.П., Чердынцева Н.В. Определение количества внеклеточных ДНК крови методом ПЦР, специфичной к  $\beta$ -актину и LINE-1 последовательностям при раке легкого // *Сиб. Онкол. Журн.* – 2009. – V.S2. – P.160-161.

161. Sozzi G., Conte D., Mariani L., Lo Vullo S., Roz L., Lombardo C., Pierotti M.A., Tavecchio L. Analysis of circulating tumor DNA in plasma at diagnosis and during follow-up of lung cancer patients // *Cancer Res.* – 2001. – V.61. – P.4675-4678.
162. Lo Y.M., Leung S.F., Chan L.Y., Chan A.T., Lo K.W., Johnson P.J., Huang D.P. Kinetics of plasma Epstein-Barr virus DNA during radiation therapy for nasopharyngeal carcinoma // *Cancer Res.* – 2000. – V.60. – P.2351-2355.
163. Fiegl H., Millinger S., Mueller-Holzner E., Marth C., Ensinger C., Berger A., Klocker H., Goebel G., Widschwendter M. Circulating tumor-specific DNA: a marker for monitoring efficacy of adjuvant therapy in cancer patients // *Cancer Res.* – 2005. – V.65. – P.1141-1145.
164. Holdenrieder S., Stieber P., Bodenmüller H., Busch M., Von Pawel J., Schalhorn A., Seidel D. Circulating nucleosomes in serum // *Ann. N.Y. Acad. Sci.* – 2001. – V.945(1). – P.93–102. doi:10.1111/j.1749—6632.2001.tb03869.x52.
165. Wang K., Shan S., Wang S., Gu X., Zhou X., Ren T. HMGB1-containing nucleosome mediates chemotherapy-induced metastasis of human lung cancer // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* – 2018. – V.500(3). – P.758-764. doi: 10.1016/j.bbrc.2018.04.150.
166. Tanner J.E., Forte A., Panchal C. Nucleosomes bind fibroblast growth factor-2 for increased angiogenesis in vitro and in vivo // *Mol. Cancer Res.* – 2004. – V.2(5). – P.281-288.
167. Thierry A.R., Mouliere F., Gongora C., Ollier J., Robert B., Ychou M., Del Rio M., Molina F. Origin and quantification of circulating DNA in mice with human colorectal cancer xenografts // *Nucleic Acids Res.* – 2010. – V.38(18). – P.6159–6175.
168. García Moreira V., Martínez D.L.T., Gonzalez G.E., García P.B., Menendez A.F.V. Increase in and clearance of cell-free plasma DNA in hemodialysis quantified by real-time PCR // *Clin. Chem. Lab. Med.* – 2006. – V.44(12). – P.1410–1415. doi:10.1515/CCLM.2006.252.
169. Gauthier V.J., Tyler L.N., Mannik M. Blood clearance kinetics and liver uptake of mononucleosomes in mice // *J. Immunol.* – 1996. – V.156(3). – P.1151–1156.
170. Приходько А.С., Витушкина М.В., Зиновкина Л.А., Попова Е.Н., Зиновкин Р.А. Праймирование нейтрофилов человека необходимо для их активации внеклеточной ДНК // *Биохимия* – 2016. – Т.81(6). – С.795–801.
171. Долгушин И.И., Зарипова З.З., Карпова М.И. Роль нейтрофилов в патогенезе ишемического инсульта // *Бюлл. Сиб. Мед.* – 2021. – Т.20(3). – С.152-160.
172. Алямкина Е.А., Долгова Е.В., Проскурина А.С., Рогачев В.А., Останин А.А., Черных Е.Р., Богачев С.С., Шурдов М.А. Внутриклеточные системы обнаружения экзогенных нуклеиновых кислот и механизмы запуска иммунных реакций в ответ на интернализацию экзогенной ДНК // *Медицинская иммунология* – 2013. – Т.15(5). – С.413-430.

173. Hariton-Gazal E., Rosenbluh J., Graessmann A., Gilon C., Loyter A. Direct translocation of histone molecules across cell membranes // *J. Cell. Sci.* – 2003. – V.116(Pt 22). – P.4577-4586. doi: 10.1242/jcs.00757.
174. Holmgren L., Szeles A., Rajnavolgyi E., Folkman J., Klein G., Ernberg I., Falk K.I. Horizontal transfer of DNA by the uptake of apoptotic bodies // *Blood* – 1999. – V.93. – P.3956-3963.
175. Bergsmedh A., Szeles A., Henriksson M., Bratt A., Folkman M.J., Spetz A.L., Holmgren L. Horizontal transfer of oncogenes by uptake of apoptotic bodies // *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* – 2001. – V.98. – P.6407-6411.
176. Garcia-Olmo D., Garcia-Olmo D.C., Ontanon J., Martinez E. Horizontal transfer of DNA and the "genometastasis hypothesis" // *Blood* – 2000. – V.95. – P.724-725.
177. Garcia-Olmo D., Garcia-Olmo D.C., Ontanon J., Martinez E., Vallejo M. Tumor DNA circulating in the plasma might play a role in metastasis. The hypothesis of the genometastasis // *Histol. Histopathol.* – 1999. – V.14. – P.1159-1164.
178. Burlingame R.W., Boey M.L., Starkebaum G., Rubin R.L. The central role of chromatin in autoimmune responses to histones and DNA in systemic lupus erythematosus // *J. Clin. Invest.* – 1994. – V.94(1). – P.184–192.
179. Rumore P.M., Steinman C.R. Endogenous circulating DNA in systemic lupus erythematosus: occurrence as multimeric complexes bound to histone // *J. Clin. Invest.* – 1990. – V.86(1). – P.69–74.
180. Фрумкина Л.Е., Конорова И.Л., Александрова О.П., Боголепов Н.Н., Хаспеков Л.Г. Реорганизация ультраструктуры нейронов новой коры головного мозга крыс под воздействием внеклеточной ДНК // *Морфология* – 2015. – Т.147(2). – С.7-11.
181. Chen Z., Fadiel A., Naftolin F., Eichenbaum K.D., Xia Y. Circulation DNA: Biological implications for cancer metastasis and immunology // *Med. Hypoth.* – 2005. – V.65. – P.956-961.
182. Rogers J.C., Kerstiens J.W. Capping of DNA on phytohem agglutinin stimulated human lymphoblasts // *J. Immunol.* – 1981. – V.126. – P.703–705.
183. Laktionov P.P., Tamkovich S.N., Rykova E.Y., Bryzgunova O.E., Starikov A.V., Vlassov V.V. Cell-surface-bound nucleic acids: free and cell surface-bound nucleic acids in blood of healthy donors and breast cancer patients // *Ann. N. Y. Acad. Sci.* – 2004. – V.1022. – P.221–228.
184. Andreu Z., Yáñez-Mó M. Tetraspanins in extracellular vesicle formation and function // *Front. Immunol.* – 2014. – V.16. – P.442.
185. Kharaziha P., Ceder S., Li Q., Panaretakis T. Tumor cell-derived exosomes: a message in a

- bottle // *Biochim. Biophys. Acta.* – 2012. – V.1826(1). – P.103–111.
186. Hutagalung A.H., Novick P.J. Role of Rab GTPases in membrane traffic and cell physiology // *Physiol. Rev.* – 2011. – V.91(1). – P.119–149.
187. Spang A., Shiba Y., Randazzo P.A. Arf GAPs: gatekeepers of vesicle generation // *FEBS Lett.* – 2010. – V.584(12). – P.2646–2651.
188. Hurley J.H. The ESCRT complexes // *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* – 2010. – V.45(6). – P.463–487.
189. Theos A.C., Truschel S.T., Tenza D., Hurbain I., Harper D.C., Berson J.F., Thomas P.C., Raposo G., Marks M.S. A luminal domain-dependent pathway for sorting to intraluminal vesicles of multivesicular endosomes involved in organelle morphogenesis // *Dev. Cell.* – 2006. – V.10(3). – P.343–354.
190. Ostrowski M., Carmo N.B., Krumeich S., Fanget I., Raposo G., Savina A., Moita C.F., Schauer K., Hume A.N., Freitas R.P., Goud B., Benaroch P., Hacohen N., Fukuda M., Desnos C., Seabra M.C., Darchen F., Amigorena S., Moita L.F., Thery C. Rab27a and Rab27b control different steps of the exosome secretion pathway // *Nat. Cell. Biol.* – 2010. – V.12(1). – P.19–30.
191. Hendrix A., Hume A.N. Exosome signaling in mammary gland development and cancer // *Int. J. Dev. Biol.* – 2011. – V.55(7-9). – P.879–887.
192. Clayton A., Turkes A., Navabi H., Mason M.D., Tabi Z. Induction of heat shock proteins in B-cell exosomes // *J. Cell. Sci.* – 2005. – V.118(16). – P.3631–3638.
193. Parolini I., Federici C., Raggi C., Lugini L., Palleschi S., De Milito A., Coscia C., Iessi E., Logozzi M., Molinari A., Colone M., Tatti M., Sargiacomo M., Fais S. Microenvironmental pH is a key factor for exosome traffic in tumor cells // *J. Biol. Chem.* – 2009. – V.284(49). – P.34211–34222.
194. Savina A., Furlán M., Vidal M., Colombo M.I. Exosome release is regulated by a calcium-dependent mechanism in K562 cells // *J. Biol. Chem.* – 2003. – V.278(22). – P.20083–20090.
195. 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. – V.6(9). – P.e24234.
196. Riches A., Campbell E., Borger E., Powis S. Regulation of exosome release from mammary epithelial and breast cancer cells - a new regulatory pathway // *Eur J Cancer.* – 2014. – V.50. – P.1025–1034.
197. Ogorevc E., Kralj-Iglic V., Veranic P. The role of extracellular vesicles in phenotypic cancer transformation // *Radiol. Oncol.* – 2013. – V.47. – P.197–205.

198. Lee J.K., Jang J.Y., Jeon Y.K., Kim C.W. Extracellular vesicles as an emerging paradigm of cell-to-cell communication in stem cell biology // *J. Stem Cell. Res. Ther.* – 2014. – V.4. – P.206.
199. Feng D., Zhao W.L., Ye Y.Y., Bai X.C., Liu R.Q., Chang L.F., Zhou Q., Sui S.F. Cellular internalization of exosomes occurs through phagocytosis // *Traffic.* – 2010. – V.11. – P.675–87.
200. Calzolari A., Raggi C., Deaglio S., Sposi N.M., Stafsnes 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. – V.119. – P.4486–4498.
201. Li M., Zeringer E., Barta T., Schageman J., Cheng A., Vlassov A.V. Analysis of the RNA content of the exosomes derived from blood serum and urine and its potential as biomarkers // *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci. M.* – 2014. – V.369(1652) – P.20130502. doi: 10.1098/rstb.2013.0502.
202. Jia Y., Chen Y., Wang Q., Jayasinghe U., Luo X., Wei Q., Wang J., Xiong H., Chen C., Xu B., Hu W., Wang L., Zhao W., Zhou J. Exosome: emerging biomarker in breast cancer // *Oncotarget.* – 2017. – V.8(25). – P.41717–41733. doi: 10.18632/oncotarget.16684.
203. Yoon Y.J., Kim O.Y., Gho Y.S. Extracellular vesicles as emerging intercellular communicasome // *BMB Reports.* – 2014. – V.47(10). – P.531–539.
204. Kim C.W., Lee H.M., Lee T.H., Kang C., Kleiman H. Extracellular membrane vesicles from tumor cells promote angiogenesis via sphingomyelin // *Cancer Res.* – 2002. – V.62. – P.6312–6317.
205. Staubach S., Razawi H., Hanish F.G. Proteomics of MUC1-containing lipid rafts from plasma membranes and exosomes of human breast carcinoma cells MCF-7 // *Proteomics* – 2009. – V.9(10). – P.2820–2835.
206. Laulagnier K., Motta C., Hamdi S., Roy S., Fauvelle F., Pageaux J.-F., Kobayashi T., Salles J.P., Perret B., Bonnerot C., Record M. Mast cell- and dendritic cell-derived exosomes display a specific lipid composition and an unusual membrane organization // *Biochem. J.* – 2004. – V.380(1). – P.161–171.
207. Beloribi-Djefaflija S., Siret C., Lombardo D. Exosomal lipids induce human pancreatic tumoral MiaPaCa-2 cells resistance through the CXCR4-SDF-1 $\alpha$  signaling axis // *Oncoscience* – 2015. – V.2(1). – P.15–30.
208. Grey M., Dunning C.J., Gaspar R., Grey C., Brundin P., Sparr E., Linse S. Acceleration of  $\alpha$ -synuclein aggregation by exosomes // *J. Biol. Chem.* – 2015. – V.290(5). – P.2969–2982.

209. Vlassov A.V., Magdaleno .S, Setterquist R., Conrad R. Exosomes: current knowledge of their composition, biological functions, and diagnostic and therapeutic potentials // *Biochem. Biophys. Acta.* – 2012. – V.1820(7). – P.940-948.
210. Xu L., Gimple R.C., Lau W.B., Lau B., Fei F., Shen Q., Liao X., Li Y., Wang W., He Y., Feng M., Bu H., Wang W., Zhou S. The present and future of the mass spectrometry-based investigation of the exosome landscape // *Mass. Spectrom. Rev.* – 2020. – V.39(5). – P.745-762. doi: 10.1002/mas.21635.
211. Kalra H., Drummen G.P.C., Mathivanan S. Focus on extracellular vesicles: introducing the next small big thing // *Int. J. Mol. Sci.* – 2016. – V.17(2). – P.170. doi: 10.3390/ijms17020170.
212. Tucher C., Bode K., Schiller P., Claßen L., Birr C., Souto-Carneiro M.M., Blank N., Lorenz H., Schiller M. Extracellular vesicle subtypes released from activated or apoptotic T-lymphocytes carry a specific and stimulus-dependent protein cargo // *Front. Immunol.* – 2018. – V.9. – P.534. doi: 10.3389/fimmu.2018.00534.
213. Юнусова Н.В., Тугутова Е.А., Тамкович С.Н., Кондакова И.В. Роль тетраспанинов и протеаз экзосом в опухолевой прогрессии // *Биомедицинская химия* – 2018. – Т.64(2). – P.123-133.
214. Yoshioka Y., Konishi Y., Kosaka N., Katsuda T., Kato T., Ochiya T. Comparative marker analysis of extracellular vesicles in different human cancer types // *J. Extracell. Vesicles* – 2013. – V.2. – P.20424. doi: 10.3402/jev.v2i0.20424.
215. Cordonnier M., Chanteloup G., Isambert N., Seigneuric R., Fumoleau P., Garrido C., Gobbo J. Exosomes in cancer theranostic: Diamonds in the rough // *Cell. Adhes. Migr.* – 2017. – V.11(2). – P.151–163. doi: 10.1080/19336918.2016.1250999.
216. Yanez-Mo M., Barreiro O., Gordon-Alonso M., Sala-Valdes M., Sanchez-Madrid F. Tetraspanin-enriched microdomains: a functional unit in cell plasma membranes // *Trends Cell. Biol.* – 2009. – V.19(9). – P.434–446. doi: 10.1016/j.tcb.2009.06.004.
217. Чевкина Е.М., Щербаков А.М., Журавская А.Ю., Семина С.Е., Комельков А.В., Красильников М.А. Экзосомы и передача (эпи)генетической информации опухолевыми клетками // *Успехи молекулярной онкологии* – 2015. – Т.2(3). – С.8-20. doi: 10.17650/2313-805X-2015-2-3-8-20.
218. Sterk L.M., Geuijen C.A., Van Den Berg J.G., Claessen N., Weening J.J., Sonnenberg A.J. Association of the tetraspanin CD151 with the laminin-binding integrins alpha3beta1, alpha6beta1, alpha6beta4 and alpha7beta1 in cells in culture and in vivo // *Cell. Sci.* – 2002. – V.115. – P.1161–1173.

219. Kumari S., Devi G., Badana A., Dasari V.R., Malla R.R. CD151-A striking marker for cancer therapy // *Biomark. Cancer* – 2015. – V.7. – P.7-11. doi: 10.4137/BIC.S21847.
220. Ha S.Y., Do I.G., Lee J., Park S.H., Park J.O., Kang W.K., Choi M.G., Lee J.H., Bae J.M., Kim S., Kim K.M., Sohn T.S. D151 overexpression is associated with poor prognosis in patients with pT3 gastric cancer // *Ann. Surg. Oncol.* – 2014. – V.21(4). – P.1099–1106. doi: 10.1245/s10434-013-3339-1.
221. Kwon M.J., Seo J., Kim Y.J., Kwon M.J., Choi J.Y., Kim T.E., Lee D.H., Park S., Shin Y.K., Han J., Choi Y.L. Prognostic significance of CD151 overexpression in non-small cell lung cancer // *Lung cancer* – 2013. – V.81(1). – P.109–116. doi: 10.1016/j.lungcan.2013.03.014.
222. Liu L., He B., Liu W.M., Zhou D., Cox J.V., Zhang X.A. Tetraspanin CD151 promotes cell migration by regulating integrin trafficking // *J. Biol. Chem.* – 2007. – V.282(43). – P.31631-31642.
223. Sandvig K., Llorente A. Proteomic analysis of microvesicles released by the human prostate cancer cell line PC-3 // *Mol. Cell. Proteomics* – 2012. – V.11(7). – P.M111.012914. doi: 10.1074/mcp.M111.012914.
224. Heiler S., Wang Z., Zöller M. Pancreatic cancer stem cell markers and exosomes - the incentive push // *World J. Gastroenterol.* – 2016. – V.22(26). – P.5971–6007. doi: 10.3748/wjg.v22.i26.5971.
225. Choi D.S., Lee J.M., Park G.W., Lim H.W., Bang J.Y., Kim Y.K., Kwon K.H., Kwon H.J., Kim K.P., Gho Y.S. Proteomic analysis of microvesicles derived from human colorectal cancer cells // *Proteome Res.* – 2007. – V.6(12). – P.4646-4655.
226. Silverstein R.L., Febbraio M. CD36, a scavenger receptor involved in immunity, metabolism, angiogenesis, and behavior // *Sci. Signal.* – 2009. – V.2(72). – P.re3. doi: 10.1126/scisignal.272re3.
227. Jiménez B., Volpert O.V., Crawford S.E., Febbraio M., Silverstein R.L., Bouck N. Signals leading to apoptosis-dependent inhibition of neovascularization by thrombospondin-1 // *Nat. Med.* – 2000. – V.6(1). – P.41-48. doi: 10.1038/71517.
228. Dawson D.W., Pearce S.F., Zhong R., Silverstein R.L., Frazier W.A., Bouck N.P. CD36 mediates the In vitro inhibitory effects of thrombospondin-1 on endothelial cells // *J. Cell. Biol.* – 1997. – V.138(3). – P.707-717. doi: 10.1083/jcb.138.3.707.
229. Brown E.J., Frazier W.A. Integrin-associated protein (CD47) and its ligands. *Trends Cell. Biol.* – 2001. – V.11(3). – P.130–135. doi: 10.1016/s0962-8924(00)01906-1.



230. Wang H.S., Pei F., Chen Z., Zhang L. Increased apoptosis of inflamed odontoblasts is associated with CD47 loss // *J. Dent. Res.* – 2016. – V.95(6). – P.697-703. doi: 10.1177/0022034516633639.
231. Kaur S., Martin-Manso G., Pendrak M.L., Garfield S.H., Isenberg J.S., Roberts D.D. Thrombospondin-1 inhibits VEGF receptor-2 signaling by disrupting its association with CD47 // *J. Biol. Chem.* – 2010. – V.285(50). – P.38923-38932. doi: 10.1074/jbc.M110.172304.
232. Isenberg J.S., Ridnour L.A., Dimitry J., Frazier W.A., Wink D.A., Roberts D.D. CD47 is necessary for inhibition of nitric oxide-stimulated vascular cell responses by thrombospondin-1 // *J. Biol. Chem.* – 2006. – V.281(36). – P.26069–26080. doi: 10.1074/jbc.M605040200.
233. Kazerounian S., Yee K.O., Lawler J. Thrombospondins in cancer // *Cell. Mol. Life Sci.* – 2008. – V.65(5). – P.700–712. doi: 10.1007/s00018-007-7486-z.
234. Jeanne A., Schneider C., Martiny L., Dedieu S. Original insights on thrombospondin-1-related antireceptor strategies in cancer // *Front. Pharmacol.* – 2015. – V.6. – P.252. doi: 10.3389/fphar.2015.00252.
235. Isenberg J.S., Frazier W.A., Roberts D.D. Thrombospondin-1: a physiological regulator of nitric oxide signaling // *Cell. Mol. Life Sci.* – 2008. – V.65(5). – P.728-742. doi: 10.1007/s00018-007-7488-x.
236. Hurwitz S.N., Rider M.A., Bundy J.L., Liu X., Singh R.K., Meckes D.G. Jr. Proteomic profiling of NCI-60 extracellular vesicles uncovers common protein cargo and cancer type-specific biomarkers // *Oncotarget* – 2016. – V.7(52). – P.86999-87015. doi: 10.18632/oncotarget.13569.
237. Burbano C., Rojas M., Vasquez G., Castano D. Microparticles that form immune complexes as modulatory structures in autoimmune responses // *Mediators Inflamm.* – 2015. – V.2015. – P.267590. doi: 10.1155/2015/267590.
238. Ogawa Y., Miura Y., Harazono A., Kanai-Azuma M., Akimoto Y., Kawakami H., Yamaguchi T., Toda .T, Endo T., Tsubuki M., Yanoshita R. Proteomic analysis of two types of exosomes in human whole saliva // *Biol. Pharm. Bull.* – 2011. – V.34(1). – P.13-23.
239. Lai R.C., Tan S.S., Teh B.J., Sze S.K., Arslan F., de Kleijn D.P., Choo A., Lim S.K. Proteolytic potential of the MSC exosome proteome: implication for an exosome –mediated delivery of the therapeutic proteasome // *Int. J. Proteomics.* – 2012. – V.2012. – P.971907. doi: 10.1155/2012/971907.
240. Matthews A.L., Noy P.J., Reyat J.S., Tomlinson M.G. Regulation of A disintegrin and metalloproteinase (ADAM) family sheddases ADAM10 and ADAM17: The emerging role

- of tetraspanins and rhomboids // *Platelets* – 2017. – V.28(4). – P.333-341. doi: 10.1080/09537104.2016.1184751.
241. Keller S., König A.K., Marmé F., Runz S., Wolterink S., Koensgen D., Mustea A., Sehouli J., Altevogt P. Systemic presence and tumor-growth promoting effect of ovarian carcinoma released exosomes // *Cancer Lett.* – 2009. – V.278(1). – P.73-81. doi: 10.1016/j.canlet.2008.12.028.
242. Groth E., Pruessmeyer J., Babendreyer A., Schumacher J., Pasqualon T., Dreymueller D., Higashiyama S., Lorenzen I., Grötzinger J., Cataldo D., Ludwig A. Stimulated release and functional activity of surface expressed metalloproteinase ADAM17 in exosomes // *Biochim. Biophys. Acta* – 2016. – V.1863(11). – P.2795-2808. doi: 10.1016/j.bbamcr.2016.09.002.
243. Lee S.B., Schramme A., Doberstein K., Dummer R., Abdel-Bakky M.S., Keller S., Altevogt P., Oh S.T., Reichrath J., Oxmann D., Pfeilschifter J., Mihic-Probst D., Gutwein P. ADAM10 is upregulated in melanoma metastasis compared with primary melanoma // *J. Invest. Dermatol.* – 2010. – V.130(3). – P.763-773. doi: 10.1038/jid.2009.335.
244. Levine S.J. Molecular mechanisms of soluble cytokine receptor generation // *J. Biol. Chem.* – 2008. – V.283(21). – P.14177–14181. doi: 10.1074/jbc.R700052200
245. Matthews A.L., Noy P.J., Reyat J.S., Tomlinson M.G. Regulation of a disintegrin and metalloproteinase (ADAM) family sheddases ADAM10 and ADAM17: The emerging role of tetraspanins and rhomboids // *Platelets* – 2017. – V.28(4). – P.333-341. doi: 10.1080/09537104.2016.1184751.
246. Perez-Torres M., Valle B.L., Maihle N.J., Negron-Vega L., Nieves-Alicea R., Cora E.M. Shedding of epidermal growth factor receptor is a regulated process that occurs with overexpression in malignant cells // *Exp. Cell. Res.* – 2008. – V.314(16). – P.2907-2918. doi: 10.1016/j.yexcr.2008.07.013.
247. Shimoda M., Khokha R. Metalloproteinases in extracellular vesicles // *Biochim. Biophys. Acta.* – 2017. – V.1864. – P.1989-2000. doi: 10.1016/j.bbamcr.2017.05.027.
248. Baker A.H., Edwards D.R., Murphy G. Metalloproteinase inhibitors: biological actions and therapeutic opportunities // *J. Cell Sci.* – 2002. – V.115. – P.3719-3727. doi: 10.1242/jcs.00063.
249. Runz S., Keller S., Rupp C., Stoeck A., Issa Y., Koensgen D., Mustea A., Sehouli J., Kristiansen G., Altevogt P. Malignant ascites-derived exosomes of ovarian carcinoma patients contain CD24 and EpCAM // *Gynecol. Oncol.* – 2007. – V.107(3). – P.563-571.
250. Egeblad M., Werb Z. New functions for the matrix metalloproteinases in cancer progression // *Nat. Rev. Cancer* – 2002. – V.2(3). – P.161-174.

251. Xin X., Zeng X., Gu H., Li M., Tan H., Jin Z., Hua T., Shi R., Wang H. CD147/EMMPRIN overexpression and prognosis in cancer: A systematic review and meta-analysis // *Sci. Rep.* – 2016. – V.6. – P.32804. doi: 10.1038/srep32804.
252. Millimaggi D., Mari M., D'Ascenzo S., Carosa E., Jannini E.A., Zucker S., Carta G., Pavan A., Dolo V. Tumor vesicle-associated CD147 modulates the angiogenic capability of endothelial cells // *Neoplasia* – 2007. – V.9(4). – P.349-357. doi: 10.1593/neo.07133.
253. Laursen L.S., Overgaard M.T., Søe R., Boldt H.B., Sottrup-Jensen L., Giudice L.C., Conover C.A., Oxvig C. Pregnancy-associated plasma protein-A (PAPP-A) cleaves insulin-like growth factor binding protein (IGFBP)-5 independent of IGF: implications for the mechanism of IGFBP-4 proteolysis by PAPP-A // *FEBS Lett.* – 2001. – V.504(1-2). – P.36-40. doi: 10.1016/s0014-5793(01)02760-0.
254. Li X., Liu Q., Zhou T., Zhao S., Zhou S. PAPP-A: a possible pathogenic link to the instability of atherosclerotic plaque // *Med. Hypotheses* – 2008. – V.70(3). – P.597-599. doi: 10.1016/j.mehy.2007.05.043.
255. Brooks P., Fuertes G., Murray R.Z., Bose S., Knecht E., Rechsteiner M.C., Hendil K.B., Tanaka K., Dyson J., Rivett J. Subcellular localization of proteasomes and their regulatory complexes in mammalian cells // *Biochem. J.* – 2000. – V.346. – P.155–161.
256. Kisselev A.F., Callard A., Goldberg A.L. Importance of the different proteolytic sites of the proteasome and the efficacy of inhibitors varies with the protein substrate // *J. Biol. Chem.* – 2006. – V.281(13). – P.8582-8590. doi: 10.1074/jbc.M509043200.
257. Шашова Е.Е., Колегова Е.С., Кондакова И.В., Завьялов А.А. Внутриклеточный и циркулирующий пулы протеасом: значение при злокачественных новообразованиях различных локализаций. *Сибирский онкологический журнал* – 2015. – Т.6. – С.76–82.
258. Shashova E.E., Lyupina Yu.V., Glushchenko S.A., Slonimskaya E.M., Savenkova O.V., Kulikov A.M., Gornostaev N.G., Kondakova I.V., Sharova N.P. Proteasome functioning in breast cancer: connection with clinical-pathological factors // *Plos One* – 2014. – V.9(10). – P.11. doi: 10.1371/journal.pone.0109933.
259. Ilan N., Elkin M., Vlodaysky I. Regulation, function and clinical significance of heparanase in cancer metastasis and angiogenesis // *Int. J. Biochem. Cell Biol.* – 2006. – V.38(12). – P.2018-2039. doi: 10.1016/j.biocel.2006.06.004.
260. Roucourt B., Meeussen S., Bao J., Zimmermann P., David G. Heparanase activates the syndecan-syntenin-ALIX exosome pathway // *Cell. Res.* – 2015. – V.25(4). – P.412–428. doi: 10.1038/cr.2015.29

261. Vlodayky I., Elkin M., Abboud-Jarrous G., Levi-Adam F., Fuks L., Shafat I., Ilan N. Heparanase: one molecule with multiple functions in cancer progression // *Connect Tissue Res.* – 2008. – V.49(3). – P.207-210. doi: 10.1080/03008200802143281.
262. Santibanez J.F. Urokinase type plasminogen activator and the molecular mechanisms of its regulation in cancer // *Protein Pept. Lett.* – 2017. – V.24(10). – P.936-946. doi: 10.2174/0929866524666170818161132.
263. Potter S.R., Partin A.W. Tumor markers: an update on human kallikrein 2 // *Rev. Urol.* – 2000. – V.2(4). – P.221–222.
264. Diamandis E.P., Borgoño C.A., Scorilas A., Harbeck N., Dorn J., Schmitt M. Human kallikrein 11: an indicator of favorable prognosis in ovarian cancer patients // *Clin. Biochem.* – 2004. – V.37(9). – P.823-829. doi: 10.1016/j.clinbiochem.2004.04.009.
265. Diamandis E.P., Okui A., Mitsui S., Luo L.Y., Soosaipillai A., Grass L., Nakamura T., Howarth D.J., Yamaguchi N. Human kallikrein 11: a new biomarker of prostate and ovarian carcinoma // *Cancer Res.* – 2002. – V.62(1). – P.295-300.
266. Principe S., Jones E.E., Kim Y., Sinha A., Nyalwidhe J.O., Brooks J., Semmes O.J., Troyer D.A., Lance R.S., Kislinger T., Drake R.R. In-depth proteomic analyses of exosomes isolated from expressed prostatic secretions in urine // *Proteomics* – 2013. – V.13(10-11). – P.1667-1671. doi: 10.1002/pmic.201200561.
267. Volovat S.R., Volovat C., Hordila I., Hordila D.A., Mirestean C.C., Miron O.T., Lungulescu C., Scripcariu D.V., Stolniceanu C.R., Konsoulova-Kirova A.A., Grigorescu C., Stefanescu C., Volovat C.C., Augustin I. MiRNA and LncRNA as potential biomarkers in triple-negative breast cancer: a review // *Front. Oncol.* – 2020. – V.10. – P.526850. doi: 10.3389/fonc.2020.526850.
268. Yi Y., Wu M., Zeng H., Hu W., Zhao C., Xiong M., Lv W., Deng P., Zhang Q., Wu Y. Tumor-derived exosomal non-coding RNAs: the emerging mechanisms and potential clinical applications in breast cancer // *Front. Oncol.* – 2021. – V.11. – P.738945. doi: 10.3389/fonc.2021.738945.
269. Chen X., Liu Y., Zhang Q., Liu B., Cheng Y., Zhang Y., Sun Y., Liu J., Gen H. Exosomal long non-coding RNA HOTTIP increases resistance of colorectal cancer cells to mitomycin via impairing miR-214-mediated degradation of KPNA3 // *Front. Cell. Dev. Biol.* – 2021. – V.8. – P.582723. doi: 10.3389/fcell.2020.582723.
270. Dong Y., Liang G., Yuan B., Yuan C., Yang C., Gao R. MALAT1 promotes the proliferation and metastasis of osteosarcoma cells by activating the PI3K/Akt pathway // *Tumour Biol.* – 2015. – V.36(3). – P.1477–1486. doi: 10.1007/s13277-014-2631-4.

271. Guescini M., Genedani S., Stocchi V., Agnati L.F. Astrocytes and glioblastoma cells release exosomes carrying mtDNA // *J. Neural. Transm.* – 2010. – V.117(1). – P.1–4.
272. Balaj L., Lessard R., Dai L., Cho Y., Pomeroy S.L., Breakefield X.O., Skog J. Tumour microvesicles contain retrotransposon elements and amplified oncogene sequences // *Nat. Commun.* – 2011. – V.2. – P.180.
273. Kahlert C., Melo S.A., Protopopov A., Tang J., Seth S., Koch M., Zhang J., Weitz J., Chin L., Futreal A., Kalluri R. Identification of double-stranded genomic DNA spanning all chromosomes with mutated KRAS and p53 DNA in the serum exosomes of patients with pancreatic cancer // *J. Biol. Chem.* – 2014. – V.289(7). – P.3869–3875.
274. Witwer K.W., Goberdhan D.C., O'Driscoll L., Théry C., Welsh J.A., Blenkiron C., Buzás E.I., Di Vizio D., Erdbrügger U., Falcón-Pérez J.M., Fu Q.-L., Hill A.F., Lenassi M., Lötvall J., Nieuwland R., Ochiya T., Rome S., Sahoo S., Zheng L. Updating MISEV: Evolving the minimal requirements for studies of extracellular vesicles // *J. Extracell. Vesicles.* – 2021. — V.10(14). – P.e12182. doi: 10.1002/jev2.12182.
275. Lässer C., Alikhani V.S., Ekström K., Eldh M., Paredes P.T., Bossios A., Sjöstrand M., Gabrielsson S., Lötvall J., Valadi H. Human saliva, plasma and breast milk exosomes contain RNA: uptake by macrophages // *J. Transl. Med.* – 2011. – V.14(9). – P.9.
276. Stefańska K., Józkwiać M., Angelova Volponi A., Shibli J.A., Golkar-Narenji A., Antosik P., Bukowska D., Piotrowska-Kempisty H., Mozdziak P., Dzięgiel P., Podhorska-Okolów M., Zabel M., Dyszkiewicz-Konwińska M., Kempisty B. The role of exosomes in human carcinogenesis and cancer therapy-recent findings from molecular and clinical research // *Cells* – 2023. – V.12(3). – P.356. doi: 10.3390/cells12030356.
277. Vyas K.S., Kaufman J., Munavalli G.S., Robertson K., Behfar A., Wyles S.P. Exosomes: the latest in regenerative aesthetics // *Regen. Med.* – 2023. – V.18(2). – P.181-194. doi: 10.2217/rme-2022-0134.
278. Zhang H.G., Grizzle W.E. Exosomes: a novel pathway of local and distant intercellular communication that facilitates the growth and metastasis of neoplastic lesions // *Am. J. Pathol.* – 2014. – V.184(1). – P.28–41.
279. Huber V., Fais S., Iero M., Lugini L., Canese P., Squarcina P., Zaccheddu A., Colone M., Arancia G., Gentile M., Seregini E., Valenti R., Ballabio G., Belli F., Leo E., Parmiani G., Rivoltini L. Human colorectal cancer cells induce T-cell death through release of proapoptotic microvesicles: role in immune escape // *Gastroenterology.* – 2005. – V.128(7). – P.1796–1804.
280. Kim J.W., Wieckowski E., Taylor D.D., Reichert T.E., Watkins S., Whiteside T.L. Fas ligand-positive membranous vesicles isolated from sera of patients with oral cancer induce

- apoptosis of activated T-lymphocytes // *Clin. Cancer Res.* – 2005. – V.11(3). – P.1010–1020.
281. Baginska J., Viry E., Paggetti J., Medves S., Berchem G., Moussay E., Janji B. The critical role of the tumor microenvironment in shaping natural killer cell-mediated antitumor immunity // *Front. Immunol.* – 2013. – V.4. – P.490.
282. Whiteside T.L. Immune modulation of T-cell and NK (natural killer) cell activities by TEXs (tumour-derived exosomes) // *BiochemSoc. Trans.* – 2013. – V.41(1). – P.245–251.
283. Krzewski K., Gil-Krzewska A., Nguyen V., Peruzzi G., Coligan J.E. LAMP1/CD107a is required for efficient perforin delivery to lytic granules and NK-cell cytotoxicity // *Blood* – 2013. – V.121(23). – P.4672–4683.
284. Feng X., Yan J., Wang Y., Zierath J.R., Nordenskjöld M., Henter J.I., Fadeel B., Zheng C. The proteasome inhibitor bortezomib disrupts tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) expression and naturalkiller (NK) cell killing of TRAIL receptor-positive multiple myeloma cells // *Mol. Immunol.* – 2010. – V.47(14). – P.2388–2396.
285. Jia Y., Chen Y., Wang Q., Jayasinghe U., Luo X., Wei Q., Wang J., Xiong H., Chen C., Xu B., Hu W., Wang L., Zhao W., Zhou J. Exosome: emerging biomarker in breast cancer // *Oncotarget* – 2017. – V.8(25). – P.41717-41733. doi: 10.18632/oncotarget.16684.
286. Liu C., Yu S., Zinn K., Wang J., Zhang L., Jia Y., Kappes J.C., Barnes S., Kimberly R.P., Grizzle W.E., Zhang H.G. Murine mammary carcinoma exosomes promote tumor growth by suppression of NK cell function // *J. Immunol.* – 2006. – V.176. – P.1375–1385.
287. Iero M., Valenti R., Huber V., Filipazzi P., Parmiani G., Fais S., Rivoltini L. Tumour released exosomes and their implications in cancer immunity // *Cell Death Diff.* – 2008. – V.15. – P.80–88.
288. Crow J., Atay S., Banskota S., Artale B., Schmitt S., Godwin A.K. Exosomes as mediators of platinum resistance in ovarian cancer // *Oncotarget* – 2017. – V.8(7). – P.11917-11936. doi: 10.18632/oncotarget.14440.
289. Zeng A., Yan W., Liu Y., Wang Z., Hu Q., Nie E., Zhou X., Li R., Wang X., Jiang T., You Y. Tumour exosomes from cells harbouring PTPRZ1-MET fusion contribute to a malignant phenotype and temozolomide chemoresistance in glioblastoma // *Oncogene* – 2017. – V.36(38). – P.5369-5381. doi: 10.1038/onc.2017.134.
290. Hendrix A., Maynard D., Pauwels P., Braems G., Denys H., Van den Broecke R., Lambert J., Van Belle S., Cocquyt V., Gespach C., Bracke M., Seabra M.C., Gahl W.A., De Wever O., Westbroek W. Effect of the secretory small GTPase Rab27B on breast cancer growth, invasion, and metastasis // *J. Natl. Cancer Inst.* – 2010. – V.102(12). – P.866-880. doi: 10.1093/jnci/djq153.

291. Rak J. Extracellular vesicles — biomarkers and effectors of the cellular interactome in cancer // *Front. Pharmacol.* – 2013. – V.4. – P.21. doi: 10.3389/fphar.2013.00021.
292. Cantaluppi V., Gatti S., Medica D., Figliolini F., Bruno S., Deregibus M.C., Sordi A., Biancone L., Tetta C., Camussi G. Microvesicles derived from endothelial progenitor cells protect the kidney from ischemia-reperfusion injury by microRNA-dependent reprogramming of resident renal cells // *Kidney Int.* – 2012. – V.82(4). – P.412–427. doi: 10.1038/ki.2012.105.
293. van Balkom B.W., de Jong O.G., Smits M., Brummelman J., den Ouden K., de Bree P.M., van Eijndhoven M.A., Pegtel D.M., Stoorvogel W., Würdinger T., Verhaar M.C. Endothelial cells require miR-214 to secrete exosomes that suppress senescence and induce angiogenesis in human and mouse endothelial cells // *Blood* – 2013. – V.121(19). – P.3997–4006. doi: 10.1182/blood-2013-02-478925.
294. Бочкарева Н.В., Кондакова И.В., Коломиец Л.А. Роль актин-связывающих белков в клеточном движении в норме и при опухолевом росте // *Молекулярная медицина.* – 2011. – Т.6. – С.4–18.
295. Pathak R., Dermardirossian C. GEF-H1: orchestrating the interplay between cytoskeleton and vesicle trafficking // *Small GTPases.* – 2013. – V.4(3). – P.174–179.
296. Hoshino D., Kirkbride K.C., Costello K., Clark E.S., Sinha S., Grega-Larson N., Tyska M.J., Weaver A.M. Exosome secretion is enhanced by invadopodia and drives invasive behavior // *Cell Rep.* – 2013. – V.5(5). – P.1159–1168.
297. Yáñez-Mó M., Gutiérrez-López M.D., Cabanas C. Functional interplay between tetraspanins and proteases // *Cell. Mol. Life Sci.* – 2011. – V.68(20). – P.3323–3335. doi: 10.1007/s00018-011-0746-y.
298. Yang X.H., Richardson A.L., Torres-Arzayus M.I., Zhou P., Sharma C., Kazarov A.R., Andzelm M.M., Strominger J.L., Brown M., Hemler M.E. CD151 accelerates breast cancer by regulating alpha 6 integrin function, signaling, and molecular organization // *Cancer Res.* – 2008. – V.68(9). – P.3204–3213. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-07-2949.
299. Sadej R., Romanska H., Kavanagh D., Baldwin G., Takahashi T., Kalia N., Berditchevski F. Tetraspanin CD151 regulates transforming growth factor beta signaling: implication in tumor metastasis // *Cancer Res.* – 2010. – V.70. – P.6059–6070. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-09-3497.
300. Li Q., Yang X.H., Xu F., Sharma C., Wang H.X., Knoblich K., Rabinovitz I., Granter S.R., Hemler M.E. Tetraspanin CD151 plays a key role in skin squamous cell carcinoma // *Oncogene* – 2013. – V.32. – P.1772–1783. doi: 10.1038/onc.2012.205.

301. Mathews J.A., Gibb D.R., Chen B.H., Scherle P., Conrad D.H. CD23 Sheddase A disintegrin and metalloproteinase 10 (ADAM10) is also required for CD23 sorting into B cell-derived exosomes // *J. Biol. Chem.* – 2010. – V.285. – P.37531-37541. doi: 10.1074/jbc.M110.141556.
302. Maretzky T., Reiss K., Ludwig A., Buchholz J., Scholz F., Proksch E., de Strooper B., Hartmann D., Saftig P. ADAM10 mediates E-cadherin shedding and regulates epithelial cell-cell adhesion, migration, and beta-catenin translocation // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* – 2005. – V.102(26). – P.9182-9187. doi: 10.1073/pnas.0500918102.
303. Burbano C., Rojas M., Vasquez G., Castano D. Microparticles that form immune complexes as modulatory structures in autoimmune responses // *Mediators Inflamm.* – 2015. – V.2015. – P.267590. doi: 10.1155/2015/267590.
304. Headland S.E., Jones H.R., Norling L.V., Kim A., Souza P.R., Corsiero E., Gil C.D., Nerviani A., Dell'Accio .F, Pitzalis C. Neutrophil-derived microvesicles enter cartilage and protect the joint in inflammatory arthritis // *Sci. Transl. Med.* – 2015. – V.7(315). – P.315ra190. doi: 10.1126/scitranslmed.aac5608.
305. Arduise C., Abache T., Li L., Billard M., Chabanon A., Ludwig A., Mauduit P., Boucheix C., Rubinstein E., Le Naour F. Tetraspanins regulate ADAM10-mediated cleavage of TNF-alpha and epidermal growth factor // *J. Immunol.* – 2008. – V.181(10). – P.7002-7013. doi: 10.4049/jimmunol.181.10.7002.
306. Lombardo G., Dentelli P., Togliatto G., Rosso A., Gili M., Gallo S., Deregibus M.C., Camussi G., Brizzi M.F. Activated Stat5 trafficking via endothelial cell-derived extracellular vesicles controls IL-3 pro-angiogenic paracrine action // *Sci. Rep.* – 2016. – V.6. – P.25689. doi: 10.1038/srep25689.
307. You Y., Shan Y., Chen J., Yue H., You B., Shi S., Li X., Cao X. Matrix metalloproteinase 13-containing exosomes promote nasopharyngeal carcinoma metastasis // *Cancer Sci.* – 2015. – V.106(12). – P.1669-1677. doi: 10.1111/cas.12818.
308. Kruger S., Abd Elmageed Z.Y., Hawke D.H., Wörner P.M., Jansen D.A., Abdel-Mageed A.B., Alt E.U., Izadpanah R. Molecular characterization of exosome-like vesicles from breast cancer cells // *BMC Cancer* – 2014. – V.14. – P.44.
309. Singh R., Pochampally R., Watabe K., Lu Z., Mo Y.Y. Exosome-mediated transfer of miR-10b promotes cell invasion in breast cancer // *Mol. Cancer.* – 2014. – V.13. – P.256.
310. Zhou W., Fong M.Y., Min Y., Somlo G., Liu L., Palomares M.R., Yu Y., Chow A., O'Connor S.T., Chin A.R., Yen Y., Wang Y., Marcusson E.G. Cancer-secreted miR-105 destroys vascular endothelial barriers to promote metastasis // *Cancer Cell.* – 2014. – V.25. – P.501–515.



311. Baroni S., Romero-Cordoba S., Plantamura I., Dugo M., D'Ippolito E., Cataldo A., Cosentino G., Angeloni V., Rossini A., Daidone M.G., Iorio M.V. Exosome-mediated delivery of miR-9 induces cancer-associated fibroblast-like properties in human breast fibroblasts // *Cell. Death Dis.* – 2016. – V.7. – P.e2312.
312. Chen W., Cheng L., Pan M., Qian Q., Zhu Y., Xu L., Ding Q. D Rhamnose  $\beta$ -Hederin against human breast cancer by reducing tumor-derived exosomes // *Oncol. Lett.* – 2018. – V.16. – P.5172–5178. doi:10.3892/ol.2018.9254.
313. Ozawa P.M.M., Alkhilaiwi F., Cavalli I.J., Malheiros D., de Souza Fonseca Ribeiro E.M., Cavalli L.R. Extracellular vesicles from triple-negative breast cancer cells promote proliferation and drug resistance in non-tumorigenic breast cells // *Breast Cancer Res. Treat.* – 2018. – V.172. – P.713–723. doi:10.1007/s10549-018-4925-5.
314. Ding J., Xu Z., Zhang Y., Tan C., Hu W., Wang M., Xu Y., Tang J. Exosome-mediated miR-222 transferring: An insight into NF- $\kappa$ B-mediated breast cancer metastasis // *Exp. Cell. Res.* – 2018. – V.369. – P.129–138. doi:10.1016/j.yexcr.2018.05.014.
315. Спирина Л.В., Кондакова И.В., Клишо Е.В., Какурина Г.В., Шишкин Д.А. Металлопротеиназы как регуляторы неоангиогенеза в злокачественных новообразованиях // *Сибирский онкологический журнал* – 2007. – Т.1. – С.67–71.
316. Gesierich S., Berezovskiy I., Ryschich E., Zöller M. Systemic induction of the angiogenesis switch by the tetraspanin D6.1A/ CO-029 // *Cancer Res.* – 2006. – V.66. – P.7083–7094.
317. Janowska-Wieczorek A., Wysoczynski M., Kijowski J., Marquez-Curtis L., Machalinski B., Ratajczak J., Ratajczak M.Z. Microvesicles derived from activated platelets induce metastasis and angiogenesis in lung cancer // *Int. J. Cancer* – 2005. – V.113(5). – P.752–760.
318. Sheldon H., Heikamp E., Turley H., Dragovic R., Thomas P., Oon C.E., Leek R., Edelmann M., Kessler B., Sainson R.C., Sargent I., Li J.L., Harris A.L. New mechanism for Notch signaling to endothelium at a distance by Delta-like 4 incorporation into exosomes // *Blood* – 2010. – V.116(13). – P.2385–2394.
319. Zou X., Gu D., Xing X., Cheng Z., Gong D., Zhang G., Zhu Y. Human mesenchymal stromal cell-derived extracellular vesicles alleviate renal ischemic reperfusion injury and enhance angiogenesis in rats // *Am. J. Transl. Res.* – 2016. – V.8(10). – P.4289–4299.
320. Mezentsev A., Merks R.M., O’Riordan E., Chen J., Mendelev N., Goligorsky M.S., Brodsky S.V. Endothelial microparticles affect angiogenesis in vitro: role of oxidative stress // *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* – 2005. – V.289(3). – P.1106–1114. doi: 10.1152/ajpheart.00265.2005.

321. Ramakrishnan D.P., Hajj—Ali R.A., Chen Y., Silverstein R.L. Extracellular vesicles activate a CD36-dependent signaling pathway to inhibit microvascular endothelial cell migration and tube formation // *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* – 2016. – V.36(3). – P.534–544. doi: 10.1161/ATVBAHA.115.307085.
322. Yang C., Mwaikambo B.R., Zhu T., Gagnon C., Lafleur J., Seshadri S., Lachapelle P., Lavoie J.C., Chemtob S., Hardy P. Lymphocytic microparticles inhibit angiogenesis by stimulating oxidative stress and negatively regulating VEGF-induced pathways // *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* – 2008. – V.294(2). – P.467–476. doi: 10.1152/ajpregu.00432.2007.
323. Brill A., Dashevsky O., Rivo J., Gozal Y., Varon D. Platelet-derived microparticles induce angiogenesis and stimulate post-ischemic revascularization // *Cardiovasc. Res.* – 2005. – V.67(1). – P.30–38. doi: 10.1016/j.cardiores.2005.04.007.
324. Brodsky S.V., Zhang F., Nasjletti A., Goligorsky M.S. Endothelium derived microparticles impair endothelial function in vitro // *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* – 2004. – V.286(5). – P.1910–1915. doi: 10.1152/ajpheart.01172.2003.
325. Le M.T., Hamar P., Guo C., Basar E., Perdigao-Henriques R., Balaj L., Lieberman J. MiR-200-containing extracellular vesicles promote breast cancer cell metastasis // *J. Clin. Invest.* – 2014. – V.124(12). – P.5109-5128.
326. Fong M.Y., Zhou W., Liu L., Alontaga A.Y., Chandra M., Ashby J., Chow A., O'Connor S.T., Li S., Chin A.R., Somlo G., Palomares M., Li Z., Tremblay J.R., Tsuyada A., Sun G., Reid M.A., Wu X., Swiderski P., Ren X., Shi Y., Kong M., Zhong W., Chen Y., Wang S.E. Breast-cancer-secreted miR-122 reprograms glucose metabolism in premetastatic niche to promote metastasis // *Nat. Cell. Biol.* – 2015. – V.124(12). – P.183-194.
327. Todorova D., Simoncini S., Lacroix R., Sabatier F., Dignat-George F. Extracellular vesicles in angiogenesis // *Circ. Res.* – 2017. – V.120(10). – P.1658-1673. doi: 10.1161/CIRCRESAHA.117.309681.
328. Rodríguez M., Silva J., Herrera A., Herrera M., Peña C., Martí P., Gil-Calderón B., Larriba M.J., Coronado M.J., Soldevilla B. Exosomes enriched in stemness/metastatic-related mRNAs promote oncogenic potential in breast cancer // *Oncotarget* 2015. – V.6. – P.40575–40587. doi:10.18632/oncotarget.5818.
329. Kia V., Paryan M., Mortazavi Y., Biglari A., Mohammadi-Yeganeh S. Evaluation of exosomal miR-9 and miR-155 targeting PTEN and DUSP14 in highly metastatic breast cancer and their effect on low metastatic cells // *J. Cell. Biochem.* – 2019. – V.120. – P.5666–5676. doi:10.1002/jcb.27850.

330. Guo L., Zhu Y., Li L., Zhou S., Yin G., Yu G., Cui H. Breast cancer cell-derived exosomal miR-20a-5p promotes the proliferation and differentiation of osteoclasts by targeting SRCIN1 // *Cancer Med.* – 2019. – V.8. – P.5687–5701. doi:10.1002/cam4.2454.
331. Kosaka N., Iguchi H., Hagiwara K., Yoshioka Y., Takeshita F., Ochiya T. Neutral sphingomyelinase 2 (nSMase2) dependent exosomal transfer of angiogenic microRNAs regulate cancer cell metastasis // *J. Biol. Chem.* – 2013. – V.288. – P.10849–10859.
332. Camacho L., Guerrero P., Marchetti D. MicroRNA and protein profiling of brain metastasis competent cell-derived exosomes // *PLoS One.* – 2013. – V.8. – P.e73790.
333. Hong L., Yang J., Han Y., Lu Q., Cao J., Syed L. High expression of miR-210 predicts poor survival in patients with breast cancer: a meta-analysis // *Gene* – 2012. – V.507. – P.135–138.
334. Злокачественные новообразования в России в 2020 году (заболеваемость и смертность). Под ред. А.Д. Каприна, В.В. Старинского, А.О. Шахзадовой. М.: МНИОИ им. П.А. Герцена – филиал ФГБУ «НМИЦ радиологии» Минздрава России, 2021. 252 с.
335. Чиссов В.И., Дарьялова С.Л. Избранные лекции по клинической онкологии. М.: Фонд паллиативной медицины, 2000.
336. Пятницкий И., Пучкова О., Гомболевский В., Низовцова Л., Ветшева Н., Морозов С. Скрининг рака молочной железы: текущие достижения, перспективы и новые технологии // *Вопросы онкологии* – 2019. – V.65(5). – P.664-671. <https://doi.org/10.37469/0507-3758-2019-65-5-664-671>.
337. Комарова Л.Е. Роль и место скрининговой маммографии в диагностике рака in situ // *Опухоли женской репродуктивной системы* – 2008. – Т.3. – С.20-23.
338. Кушлинский Н.Е., Портный С.М., Лактионов К.П. Рак молочной железы. М.: РАМН, 2005.
339. Popiel M., Mroz-Klimas D., Kasprzak R., Furmanek M. Mammary carcinoma - current diagnostic methods and symptomatology in imaging studies // *Pol. J. Radiol.* – 2012. – V.77(4). – P.35-44. doi: 10.12659/pjr.883627.
340. Серебрякова С.В., Труфанов Г.Е., Южно Е.А. Магнитно-резонансная семиотика рака молочной железы // *Опухоли женской репродуктивной системы* – 2009. – Т.4. – С.20-25.
341. Popiela T.J., Kibil W., Herman-Sucharska I., Urbanik A. The use of magnetic resonance mammography in women at increased risk for developing breast cancer // *Wideochir. Inne. Tech. Maloinwazyjne* – 2013. – V.8(1). – P.55-62. doi: 10.5114/wiitm.2011.31534.

342. Усов В.Ю., Белянин М.Л., Красулина Н.А., Староха В.В., Коломиец С.А. Применение низкопольной контрастированной МРТ грудной клетки в диагностике и оценке распространенности рака молочной железы // Радиология-практика – 2009. – V.6. – P.19-29.
343. Warning K., Hildebrandt M.G., Kristensen B., Ewertz M. Utility of 18FDG-PET/CT in breast cancer diagnostics-a systematic review // Dan. Med. Bull. – 2011. – V.58(7). P.A4289.
344. Козлов А.О., Сапожников В.Г., Халеев Д.В., Халеева Н.Н. Прогностическая ценность тонкоигольной аспирационной биопсии и биопсии режущей иглой при подозрении на рак молочной железы // Вестник новых медицинских технологий – 2007. – V.14(4). – P.95-98.
345. Игнатова Н.В., Важенин А.В., Шкута М.В. Уральский медицинский журнал – 2009. – V.4(58). – P.57-60.
346. Oakman C., Tenori L., Biganzoli L., Santarpia L., Cappadona S., Luchinat C., Leo A.D. Uncovering the metabolomic fingerprint of breast cancer // Int. J. Biochem. Cell Biol. – 2011. – V.43(7). – P.1010-1020. doi: 10.1016/j.biocel.2010.05.001.
347. Jobard E., Pontoizeau C., Blaise B.J., Bachelot T., Elena-Herrmann B., Tredan O. A serum nuclear magnetic resonance-based metabolomic signature of advanced metastatic human breast cancer // Cancer Lett. – 2013. – V.343(1). – P.33-41. doi: 10.1016/j.canlet.2013.09.011.
348. Duffy M.J. Serum tumor markers in breast cancer: are they of clinical value? // Clin. Chem. – 2006. – V.52(3). – P.345-351. doi: 10.1373/clinchem.2005.059832.
349. Mathelin C., Cromer A., Wendling C., Tomasetto C., Rio M.C. Serum biomarkers for detection of breast cancers: A prospective study // Breast Cancer Res. Treat. – 2006. – V.96(1). – P.83-90. doi: 10.1007/s10549-005-9046-2.
350. Белохвостов А.С., Румянцев А.Г. Онкомаркеры, молекулярно-генетические, иммунохимические, биохимические анализы. М.: МАКС Пресс, 2003.
351. Walker JM. (Ed.) The protein protocols handbook. Third Edition. Humana Press, Softcover, 2009.
352. Гоуфман Е.И., Мошковский С.А., Тихонова О.В., Лохов П.Г., Згода В.Г., Серебрякова М.В., Торопыгин И.Ю., Власова М.А., Сафарова М.Р., Макаров О.В., Арчаков А.И. Протеомное исследование термостабильной фракции сыворотки пациентов с различными опухолями с применением двумерного электрофореза // Биохимия – 2006. – V.71(4). – P.445-453.

353. Schone C., Hofler H., Walch A. MALDI imaging mass spectrometry in cancer research: combining proteomic profiling and histological evaluation // *Clin. Biochem.* – 2013. – V.6(6). – P.539-545. doi: 10.1016/j.clinbiochem.2013.01.018.
354. Gast M.-C.W., Schellens J.H.M., Beijnen J.H. Clinical proteomics in breast cancer: a review // *Breast Cancer Res. Treat.* – 2009. – V.116(1). – P.17-29. doi: 10.1007/s10549-008-0263-3.
355. Goncalves A., Esterni B., Bertucci F., Sauvan R., Chabannon C., Cubizolles M., Bardou V.J., Houvenaegel G., Jacquemier J., Granjeaud S., Meng X.Y., Fung E.T., Birnbaum D., Maraninchi D., Viens P., Borg J.P. Postoperative serum proteomic profiles may predict metastatic relapse in high-risk primary breast cancer patients receiving adjuvant chemotherapy // *Oncogene* – 2006. – V.25(7). – P.981–989. doi: 10.1038/sj.onc.1209131.
356. Heike Y., Hosokawa M., Osumi S., Fujii D., Aogi K., Takigawa N., Ida M., Tajiri H., Eguchi K., Shiwa M., Wakatabe R., Arikuni H., Takaue Y., Takashima S. Identification of serum proteins related to adverse effects induced by docetaxel infusion from protein expression profiles of serum using SELDI ProteinChip system // *Anticancer Res.* – 2005. – V.25. – P.1197–1203.
357. Villanueva J., Shaffer D.R., Philip J., Chaparro C.A., Erdjument-Bromage H., Olshen A.B., Fleisher M., Lilja H., Brogi E., Boyd J., Sanchez-Carbayo M., Holland E.C., Cordon-Cardo C., Scher H.I., Tempst P.J. Differential exoprotease activities confer tumor-specific serum peptidome patterns // *Clin. Invest.* – 2006. – V.116(1). – P.271–284. doi: 10.1172/JCI26022.
358. Li J., Zhang Z., Rosenzweig J., Wang Y.Y., Chan D.W. Proteomics and bioinformatics approaches for identification of serum biomarkers to detect breast cancer // *Clin. Chem.* – 2002. – V.48(8). – P.1296–1304.
359. Li J., Orlandi R., White C.N., Rosenzweig J., Zhao J., Seregni E., Morelli D., Meng X.Y., Zhang Z., Davidson N.E., Fung E.T., Chan D.W. Independent validation of candidate breast cancer serum biomarkers identified by mass spectrometry // *Clin. Chem.* – 2005. – V.51(12). – P.2229–2235. doi: 10.1373/clinchem.2005.052878.
360. Mathelin C., Cromer A., Wendling C., Tomasetto C., Rio M.C. Serum biomarkers for detection of breast cancers: A prospective study // *Breast Cancer Res. Treat.* – 2006. – V.96(1). – P.83–90.
361. van Winden A.W., Gast M.C., Beijnen J.H., Rutgers E.J., Grobbee D.E., Peeters P.H., van Gils C.H. Validation of previously identified serum biomarkers for breast cancer with SELDI-TOF MS: a case control study // *BMC Med. Genomics* – 2009. – V.2. – P.4. doi: 10.1186/1755-8794-2-4.

362. Shi Q., Harris L.N., Lu X., Li X., Hwang J., Gentleman R., Iglehart J.D., Miron A.J. Declining plasma fibrinogen alpha fragment identifies HER2-positive breast cancer patients and reverts to normal levels after surgery // *Proteome Res.* – 2006. – V.5(11). – P.2947–2955. doi: 10.1021/pr060099u.
363. Gast M.C., van Tinteren H., Bontenbal M., van Hoesel R.Q., Nooij M.A., Rodenhuis S., Span P.N., Tjan-Heijnen V.C., de Vries E.G., Harris N., Twisk J.W., Schellens J.H., Beijnen J.H. Haptoglobin phenotype is not a predictor of recurrence free survival in high-risk primary breast cancer patients // *BMC Cancer* – 2008. – V.8. – P.389. doi: 10.1186/1471-2407-8-389.
364. Drake R.R., Cazares L.H., Jones E.E., Fuller T.W., Semmes O.J., Laronga C. Challenges to developing proteomic-based breast cancer diagnostics // *OMICS J. Integr. Biol.* – 2011. – V.15(5). – P.251-259. doi: 10.1089/omi.2010.0120.
365. Abbott K.L., Aoki K., Lim J.M., Porterfield M., Johnson R., O'Regan R.M., Wells L., Tiemeyer M., Pierce M.J. Targeted glycoproteomic identification of biomarkers for human breast carcinoma // *Proteome Res.* – 2008. – V.7(4). – P.1470-1480. doi: 10.1021/pr700792g.
366. Olopade O.I., Grushko T.A., Nanda R., Huo D. Advances in breast cancer: pathways to personalized medicine // *Clin. Cancer Res.* – 2008. – V.4(24). – P.7988-7999. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-08-1211.
367. Thompson M.E. BRCA1 16 years later: nuclear import and export processes // *FEBS J.* – 2010. – V.277(15). – P.3072–3078. doi: 10.1111/j.1742-4658.2010.07733.x.
368. Garcia J.M., Garcia V., Silva J., Pen C., Dominguez G., Sanchez A., Sanfrutos L., Provencio M., Millan I., Chaparro D., Espan P., Bonilla F. Extracellular tumor DNA in plasma and overall survival in breast cancer patients // *Genes Chromosomes Cancer* – 2006. – V.45(7). – P.692–701. doi: 10.1002/gcc.20334.
369. Owens M.A., Horten B.C., Da Silva M.M. HER2 amplification ratios by fluorescence in situ hybridization and correlation with immunohistochemistry in a cohort of 6556 breast cancer tissues // *Clin. Breast Cancer* – 2004. – V.5(1). – P.63-69. doi: 10.3816/cbc.2004.n.011.
370. Murad N.A.A., Razak Z.A., Hussain R.M., Hussain S.N.A.S., Huat C.K.C., Ali S.A.C.M., Abdullah N., Muhammad R., Ibrahim N., Jamal R. Quantification of Her-2/Neu gene in breast cancer patients using real time-polymerase chain reaction (Q-PCR) and correlation with immunohistochemistry findings // *Asian Pac. J. Cancer Prev.* – 2013. – V.4(3). – P.1655-1659. doi: 10.7314/apjcp.2013.14.3.1655.

371. Weigel M.T., Dowsett M. Current and emerging biomarkers in breast cancer: prognosis and prediction // *Endocr. Relat. Cancer* – 2010. – V.17(4). – P.245–262. doi: 10.1677/ERC-10-0136.
372. Bilous M., Morey A., Armes J.E., Bell R., Button P.H., Cummings M.C., Fox S.B., Francis G.D., Waite B., McCue G., Raymond W.A., Robbins P.D., Farshid G. Assessing HER2 amplification in breast cancer: findings from the Australian In Situ Hybridization Program // *Breast Cancer Res. Treat.* – 2012. – V.134(2). – P.617-624. doi: 10.1007/s10549-012-2093-6.
373. Chen Y., Olopade O.I. MYC in breast tumor progression // *Expert Rev. Anticancer Ther.* – 2008. – V.8(10). – P.1689–1698. doi: 10.1586/14737140.8.10.1689.
374. Yasojima H., Shimomura A., Naoi Y., Kishi K., Baba Y., Shimazu K., Nakayama T., Kim S.J., Tamaki Y., Noguchi S. Association between c-myc amplification and pathological complete response to neoadjuvant chemotherapy in breast cancer // *Eur. J. Cancer.* – 2011. – V.47(12). – P.1779-1788. doi: 10.1016/j.ejca.2011.06.017.
375. Liao D.J., Dickson R.B. c-Myc in breast cancer // *Endocr. Relat. Cancer* – 2000. – V.7. – P.143-164. doi: 10.1677/erc.0.0070143.
376. de Vargas Wolfgramm E., Alves L.N.R., Stur E., Tovar T.T., De Nadai Sartori M.P., De Castro Neto A.K., Louro I.D. Analysis of genome instability in breast cancer // *Mol. Biol. Rep.* – 2013. – V.40(3). – P.2139-2144. doi: 10.1007/s11033-012-2272-x.
377. Janatova M., Pohlreich P. Microsatellite markers in breast cancer studies // *Prague Med. Rep.* – 2004. – V.105(2). – P.111-118.
378. Tokunaga E., Okada S., Yamashita N., Akiyoshi S., Kitao H., Morita M., Kakeji Y., Maehara Y. High incidence and frequency of LOH are associated with aggressive features of high-grade HER2 and triple-negative breast cancers // *Breast Cancer* – 2012. – V.19(2). – P.161-169. doi: 10.1007/s12282-010-0232-7.
379. Attwood J.T., Yung R.L., Richardson B.C. DNA methylation and the regulation of gene transcription // *Cell Mol. Life Sci.* – 2002. – V.59(2). – P.241-257. doi: 10.1007/s00018-002-8420-z.
380. Parrella P. Epigenetic signatures in breast cancer: clinical perspective // *Breast Care (Basel)* – 2010. – V.5(2). – P.66-73. doi: 10.1159/000309138.
381. Esteller M. Epigenetics in cancer // *N. Engl. J. Med.* – 2008. – V.358. –P.1148-1159. doi: 10.1056/NEJMra072067.
382. Carmona F.J., Esteller M. DNA methylation in early neoplasia // *Cancer Biomark.* – 2011. – V.9(1-6). – P.101-111. doi: 10.3233/CBM-2011-0184.

383. Jones P.A., Baylin S.B. The fundamental role of epigenetic events in cancer // *Nat. Rev. Genet.* – 2002. – V.6(3). – P.415-428. doi: 10.1038/nrg816.
384. Пальцев М.А., Залетов Д.В. Системы генетических и эпигенетических маркеров в диагностике онкологических заболеваний. М.: Медицина, 2009.
385. Widschwendter M., Jones P.A. DNA methylation and breast carcinogenesis // *Oncogene* – 2002. – V.21(35). – P.5462-5482. doi: 10.1038/sj.onc.1205606.
386. Agrawal A., Murphy R.F., Agrawal D.K. DNA methylation in breast and colorectal cancers // *Mod. Pathol.* – 2007. – V.20(7). – P.711-721. doi: 10.1038/modpathol.3800822.
387. Esteller M., Corn P.G., Baylin S.B., Herman J.G. A gene hypermethylation profile of human cancer // *Cancer Res.* – 2001. – V.61(8). – P.3225-3229.
388. Hoque M.O., Feng Q., Toure P., Dem A., Critchlow C.W., Hawes S.E., Wood T., Jeronimo C., Rosenbaum E., Stern J., Yu M., Trink B., Kiviat N.B., Sidransky D. Detection of aberrant methylation of four genes in plasma DNA for the detection of breast cancer // *J. Clin. Oncol.* – 2006. – V.24(26). – P.4262-4269. doi: 10.1200/JCO.2005.01.3516.
389. Bae Y.K., Shim Y.R., Choi J.H., Kim M.J., Gabrielson E., Lee S.J., Hwang T.Y., Shin S.O. Gene promoter hypermethylation in tumors and plasma of breast cancer patients // *Cancer Res. Treat.* – 2005. – V.37(4). – P.233-240. doi: 10.4143/crt.2005.37.4.233.
390. Ekstrom K. Exosomal Shuttle RNA. Goteborg: Intellecta Docuys AB, 2008.
391. Garzon R., Calin G.A., Croce C.M. MicroRNAs in cancer // *Annu. Rev. Med.* – 2009. V.60. –P.167-179. doi: 10.1146/annurev.med.59.053006.104707.
392. Hu G., Drescher K.M., Chen X.-M. Exosomal miRNAs: biological properties and therapeutic potential // *Front. Genet.* – 2012. – V.3. – P.56. doi: 10.3389/fgene.2012.00056.
393. He L., Thomson M.J., Hemann M.T., Hernando-Monge E., Mu D., Goodson S., Powers S., Cordon-Cardo C., Lowe S.W., Hannon G.J., Hammond S.M. A microRNA polycistron as a potential human oncogene // *Nature* – 2005. – V.35(7043). – P.828-833. doi: 10.1038/nature03552.
394. Concoran C., Friel A.M., Duffy M.J., Crown J., O'Driscoll L. Intracellular and extracellular microRNAs in breast cancer // *Clin. Chem.* – 2011. – V.57(1). – P.18-32. doi: 10.1373/clinchem.2010.150730.
395. Wittmann J., Jack H.-M. Serum microRNAs as powerful cancer biomarkers // *Biochem. Biophys. Acta* – 2010. – V.1806(2). – P.200-207. doi: 10.1016/j.bbcan.2010.07.002.
396. Goessl C., Krause H., Muller M., Heicappell R., Schrader M., Sachsinger J., Miller K. Fluorescent methylation-specific polymerase chain reaction for DNA-based detection of prostate cancer in bodily fluids // *Cancer Res.* – 2000. – V.60. – P.5941-5945.



397. Duque G., Manterola C., Otzen T., Arias C., Galindo B., Mora M., Guerrero E., García N. Clinical utility of liquid biopsy in breast cancer: A systematic review // *Clin Genet.* – 2022. – V.101(3). – P.285-295. doi: 10.1111/cge.14077.
398. Sharhan N., Messaoudi S.A., Babu S.R., Chaudhary A.B., Alsharm A.A., Alrefaei A.F., Kadasah S., Abu-Elmagd M., Assidi M., Buhmeida A., Carracedo A., Almawi W.Y. Utility of circulating cell-free DNA in assessing microsatellite instability and loss of heterozygosity in breast cancer using human identification approach // *Genes (Basel).* – 2022. – V.13(4). – P.590. doi: 10.3390/genes13040590.
399. Guan X., Liu B., Niu Y., Dong X., Zhu X., Li C., Li L., Yi Z., Sun X., Chen H., Lu S., Ma F. Longitudinal HER2 amplification tracked in circulating tumor DNA for therapeutic effect monitoring and prognostic evaluation in patients with breast cancer // *Breast* – 2020. – V.49. – P.261-266. doi: 10.1016/j.breast.2019.12.010.
400. Kougioumssidou N., Vavoulidis E., Nasioutziki M., Symeonidou M., Pratilas G.C., Mareti E., Petousis S., Chatzikyriakidou A., Grimbizis G., Theodoridis T. DNA methylation patterns of RAR-beta2 and RASSF1A gene promoters in FNAB samples from greek population with benign or malignant breast lesions // *Diagn. Cytopathol.* – 2021. – V.49. – P.153–164.
401. Yari K., Rahimi Z. Promoter methylation status of the retinoic acid receptor-beta 2 Gene in breast cancer patients: a case control study and systematic review // *Breast Care* – 2019. – V.14. – P.117–123.
402. Zhu Q., Wani M.A., El-Mahdy M., Wani G., Wani A.A. Modulation of transcriptional activity of p53 by ultraviolet radiation: linkage between p53 pathway and DNA repair through damage recognition // *Mol. Carcinog.* – 2000. – V.28(4). – P.215-224.
403. Feki A., Irminger-Finger I. Mutational spectrum of p53 mutations in primary breast and ovarian tumors // *Crit. Rev. Oncol. Hematol.* – 2004. – V.52(2). – P.103-116.
404. Silva J.M., Silva J., Sanchez A., Garcia J.M., Dominguez G., Provencio M., Sanfrutos L., Jareco E., Colas A., Espaca P., Bonilla F. Tumor DNA in plasma at diagnosis of breast cancer patients is a valuable predictor of disease-free survival // *Clin. Cancer. Res.* – 2002. – V.8. – P.3761-3766.
405. Shao Z.M., Wu J., Shen Z.Z., Nguyen M. p53 mutation in plasma DNA and its prognostic value in breast cancer patients // *Clin. Cancer Res.* – 2001. V.7. – P.2222-2227.
406. Silva J.M., Garcia J.M., Dominguez G., Silva J., Miralles C., Cantos B., Coca S., Provencio M., Espana P., Bonilla F. Persistence of tumor DNA in plasma of breast cancer patients after mastectomy // *Ann. Surg. Oncol.* – 2002. – V.9. – P.71–76.

407. Chen Y., Chen C. DNA copy number variation and loss of heterozygosity in relation to recurrence of and survival from head and neck squamous cell carcinoma: a review // *Head. Neck.* – 2008. – V.30(10). – P.1361-1383.
408. Wang Q., Larson P.S., Schlechter B.L., Zahid N., Finnemore E., de las Morenas A., Blanchard R.A., Rosenberg C.L. Loss of heterozygosity in serial plasma DNA samples during follow-up of women with breast cancer // *Int. J. Cancer.* – 2003. – V.106(6). – P.923-929.
409. Imyanitov E.N., Togo A.V., Suspitsin E.N., Grigoriev M.Y., Pozharisski K.M., Turkevich E.A., Hanson K.P., Chenevix-Trench G., Hayward N.K., Lavin M.F., Theillet C. Evidence for microsatellite instability in bilateral breast carcinomas // *Cancer Letters.* – 2000. – V.154(1). – P. 9-17.
410. Taback B., Giuliano A.E., Hansen N.M., Singer F.R., Shu S., Hoon D.S. Detection of tumor-specific genetic alterations in bone marrow from early-stage breast cancer patients // *Cancer Res.* – 2003. – V.63(8). – P.1884-1887.
411. Schwarzenbach H., Muller V., Stahmann N., Pantel K. Detection and characterization of circulating microsatellite-DNA in blood of patients with breast cancer // *Ann. N. Y. Acad. Sci.* – 2004. – V.1022. – P.25–32.
412. Shaw J.A., Smith B.M., Walsh T., Johnson S., Primrose L., Slade M.J., Walker R.A., Coombes R.C. Microsatellite alterations plasma DNA of primary breast cancer patients // *Clin. Cancer Res.* – 2000. – V.6(3). – P.1119-1124.
413. Chang H.W., Lee S.M., Goodman S.N., Singer G., Cho S.K., Sokoll L.J., Montz F.J., Roden R., Zhang Z., Chan D.W., Kurman R.J., Shih I. Assessment of plasma DNA levels, allelic imbalance, and CA 125 as diagnostic tests for cancer // *J. Natl. Cancer Inst.* – 2002. – V.94. – P.1697–1703.
414. Sorensen B.S., Mortensen L.S., Andersen J., Nexø E. Circulating HER2 DNA after trastuzumab treatment predicts survival and response in breast cancer // *Anticancer Res.* – 2010. – V.30(6). – P.2463-2468.
415. Brooks J.D., Cairns P., Shore R.E., Klein C.B., Wirgin I., Afanasyeva Y., Zeleniuch-Jacquotte A. DNA methylation in pre-diagnostic serum samples of breast cancer cases: Results of a nested case–control study // *Cancer Epidemiol.* - 2010. - V.34. - P.717-723.
416. Van De Voorde L, Speeckaert R, Van Gestel D, Bracke M, De Neve W, Delanghe J, Speeckaert M. DNA methylation-based biomarkers in serum of patients with breast cancer // *Mutat Res.* – 2012. – V.751(2). – P.304-325. doi: 10.1016/j.mrrev.2012.06.001.
417. Ponomaryova A.A., Rykova E.Y., Cherdyntseva N.V., Skvortsova T.E., Dobrodeev A.Y., Zav'yalov A.A., Tuzikov S.A., Vlassov V.V., Laktionov P.P. RAR $\beta$ 2 gene methylation level

- in the circulating DNA from blood of patients with lung cancer // *Eur. J. Cancer Prev.* – 2011. – V.20(6). – P.453-455. doi: 10.1097/CEJ.0b013e3283498eb4.
418. Petrović N., Nakashidze I., Nedeljković M. Breast cancer response to therapy: can micrnas lead the way? // *J. Mammary Gland. Biol. Neoplasia.* – 2021. – V.26(2). – P.157-178. doi: 10.1007/s10911-021-09478-3.
419. Rodrguez-Martnnez A., de Miguel-Pérez D., Ortega F.G., Garcaí-Puche J.L., Robles-Fernández I., Exposito J., Martorell-Marugan J., Carmona-Sáez P., Garrido-Navas M. del C., Rolfo C. Exosomal miRNA profile as complementary tool in the diagnostic and prediction of treatment response in localized breast cancer under neoadjuvant chemotherapy // *Breast Cancer Res.* – 2019. – V.21. – P.21. doi:10.1186/s13058-019-1109-0.
420. Li D., Wang J., Ma L.J., Yang H.B., Jing J.F., Jia M.M., Zhang X.J., Guo F., Gao J.N. Identification of serum exosomal miR-148a as a novel prognostic biomarker for breast cancer // *Eur. Rev. Med. Pharmacol. Sci.* – 2020. – V.24. – P.7303–7309. doi:10.26355/eurrev\_202007\_21889.
421. Yoshikawa M., Inuma H., Umemoto Y., Yanagisawa T., Matsumoto A., Jinno H. Exosome-encapsulated microRNA-223-3p as a minimally invasive biomarker for the early detection of invasive breast cancer // *Oncol. Lett.* – 2018. – V.15. – P.9584–9592. doi:10.3892/ol.2018.8457.
422. Hirschfeld M., Rücker G., Weiß D., Berner K., Ritter A., Jäger M., Erbes T. Urinary exosomal microRNAs as potential non-invasive biomarkers in breast cancer detection // *Mol. Diagn. Ther.* – 2020. – V.24. – P.215–232. doi:10.1007/s40291-020-00453-y
423. Ozawa P.M.M., Vieira E., Lemos D.S., Melo Souza I.L., Zanata S.M., Pankievicz V.C., Tuleski T.R., Souza E.M., Wowk P.F., Urban C.A., Kuroda F., Lima R.S., Almeida R.C., Gradia D.F., Cavalli I.J., Cavalli L.R., Malheiros D., Ribeiro E.M.S.F. Identification of miRNAs enriched in extracellular vesicles derived from serum samples of breast cancer patients // *Biomolecules* – 2020. – V.10(1). – P.150. doi: 10.3390/biom10010150.
424. McKiernan J., Donovan M.J., O'Neill V., Bentink S., Noerholm M., Belzer S., Skog J., Kattan M.W., Partin A., Andriole G., Brown G., Wei J., Thompson Jr. I.M., Carroll P. A novel urine exosome gene expression assay to predict high-grade prostate cancer at initial biopsy // *JAMA Oncol.* 2016. – V.2(7). – P.882-889. doi: 10.1001/jamaoncol.2016.0097.
425. Boukouris S., Mathivanan S. Exosomes in bodily fluids are a highly stable resource of disease biomarkers // *Proteomics Clin. Appl.* – 2015. – V.9(3-4). V.358-367. doi: 10.1002/prca.201400114.

426. Bastos-Amador P., Royo F., Gonzalez E., Conde-Vancells J., Palomo-Diez L., Borrás F.E., Falcon-Perez J.M. Proteomic analysis of microvesicles from plasma of healthy donors reveals high individual variability // *J. Proteomics*. – 2012. – V.75. – P.3574-3584.
427. Palazzolo G., Albanese N.N., Gianluca D.C., Gyax D., Vittorelli M.L., Pucci-Minafram I. Proteomic analysis of exosome-like vesicles derived from breast cancer cells // *Anticancer Res.* – 2012. – V.32. – P.847-860.
428. Gangoda L., Liem M., Ang C.S., Keerthikumar S., Adda C.G., Parker B.S., Mathivanan S. Proteomic profiling of exosomes secreted by breast cancer cells with varying metastatic potential // *Proteomics*. – 2017. – V.17(23-24). doi: 10.1002/pmic.201600370.
429. Hoshino A., Kim H.S., Bojmar L., Gyan K.E., Cioffi M., Hernandez J., Zambirinis C.P., Rodrigues G., Molina H., Heissel S., Mark M.T., Steiner L., Benito-Martin A., Lucotti S., Di Giannatale A., Offer K., Nakajima M., Williams C., Nogués L., Pelissier Vatter F.A., Hashimoto A., Davies A.E., Freitas D., Kenific C.M., Ararso Y., Buehring W., Lauritzen P., Ogitani Y., Sugiura K., Takahashi N., Alečković M., Bailey K.A., Jolissant J.S., Wang H., Harris A., Schaeffer L.M., García-Santos G., Posner Z., Balachandran V.P., Khakoo Y., Raju G.P., Scherz A., Sagi I., Scherz-Shouval R., Yarden Y., Oren M., Malladi M., Petriccione M., De Braganca K.C., Donzelli M., Fischer C., Vitolano S., Wright G.P., Ganshaw L., Marrano M., Ahmed A., DeStefano J., Danzer E., Roehrl M.H.A., Lacayo N.J., Vincent T.C., Weiser M.R., Brady M.S., Meyers P.A., Wexler L.H., Ambati S.R., Chou A.J., Slotkin E.K., Modak S., Roberts S.S., Basu E.M., Diolaiti D., Krantz B.A., Cardoso F., Simpson A.L., Berger M., Rudin C.M., Simeone D.M., Jain M., Ghajar C.M., Batra S.K., Stanger B.Z., Bui J., Brown K.A., Rajasekhar V.K., Healey J.H., de Sousa M., Kramer K., Sheth S., Baisch J., Pascual V., Heaton T.E., La Quaglia M.P., Pisapia D.J., Schwartz R., Zhang H., Liu Y., Shukla A., Blavier L., DeClerck Y.A., LaBarge M., Bissell M.J., Caffrey T.C., Grandgenett P.M., Hollingsworth M.A., Bromberg J., Costa-Silva B., Peinado H., Kang Y., Garcia B.A., O'Reilly E.M., Kelsen D., Trippett T.M., Jones D.R., Matei I.R., Jarnagin W.R., Lyden D. Extracellular vesicle and particle biomarkers define multiple human cancer // *Cell* – 2020. – V.182(4). – P.1044–1061. doi: 10.1016/j.cell.2020.07.009.
430. Toth B., Nieuwland R., Liebhardt S., Ditsch N., Steinig K., Stieber P., Rank A., Göhring P., Thaler C.J., Friese K., Bauerfeind I. Circulating microparticles in breast cancer patients: a comparative analysis with established biomarkers // *Anticancer Res.* – 2008. – V.28(2A). – P.1107-1112.
431. Pathan M., Keerthikumar S., Ang C., Gangoda L., Quek C.Y.J., Williamson N.A., Mouradov D., Sieber O.M., Simpson R.J., Salim A., Bacic A., Hill A.F., Stroud D.A., Ryan M.T., Agbinya J.I., Mariadason J.M., Burgess A.W., Mathivanan S. FunRich: An open

- access standalone functional enrichment and interaction network analysis tool // *Proteomics* – 2015. – V.15(15). – P.2597-2601. doi: 10.1002/pmic.201400515.
432. Shannon P., Markiel A., Ozier O., Baliga N., Wang J.T., Ramage D., Amin N., Schwikowski B., Ideker T. Cytoscape: a software environment for integrated models of biomolecular interaction networks // *Genome Res.* – 2003. – V.13(11). – P.2498-2504. doi: 10.1101/gr.1239303.
433. Maere S., Heymans K., Kuiper M. BiNGO: a Cytoscape plugin to assess overrepresentation of gene ontology categories in biological networks // *Bioinformatics* – 2005. – V.21(16). – P.3448-3449. doi: 10.1093/bioinformatics/bti551.
434. 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. – V.2018. – P.bay015. doi: 10.1093/database/bay015.
435. Thul P.J., Akesson L., Wiking M., Mahdessian D., Geladaki A., Blal H.A., Alm T., Asplund A., Björk L., Breckels L.M., Backström A., Danielsson F., Fagerberg L., Fall J., Gatto L., Gnann C., Hober S., Hjelmare M., Johansson F., Lee S., Lindskog C., Mulder J., Mulvey C.M., Nilsson P., Oksvold P., Rockberg J., Schutten R., Schwenk J.M., Sivertsson A., Sjöstedt E., Skogs M., Stadler C., Sullivan D.P., Tegel H., Winsnes C., Zhang C., Zwahlen M., Mardinoglu A., Pontén F., von Feilitzen K., Lilley K.S., Uhlén M., Lundberg E. A subcellular map of the human proteome // *Science* – 2017. – V.356(6340). – P.eaal3321. doi: 10.1126/science.aal3321.
436. Huntley R.P., Sawford T., Mutowo—Meullenet P., Shypitsyna A., Bonilla C., Martin M.J., O'Donovan C. The GOA database: gene Ontology annotation updates for 2015 // *Nucleic Acids Res.* – 2015. – V.43. – P.1057-1063. doi: 10.1093/nar/gku1113.
437. Szklarczyk D., Gable A.L., Lyon D., Junge A., Wyder S., Huerta—Cepas J., Simonovic M., Doncheva N.T., Morris J.H., Bork P., Jensen L., Jvon Mering C. STRING v11: protein—protein association networks with increased coverage, supporting functional discovery in genome—wide experimental datasets // *Nucleic Acids Res.* – 2019. – V.47(D1). – P.607-613. doi: 10.1093/nar/gky1131.
438. Метод выделения из крови суммарных внеклеточных нуклеиновых кислот: пат: 2554746 Рос. Федерация N 2014120562/15, заявл. 21.05.2014, опубликовано 27.06.2015, Бюл. № 18. С. 1-11.
439. Tamkovich S.N., Laktionov P.P., Rykova E.Y., Vlassov V.V. Simple and rapid procedure suitable for quantitative isolation of low and high molecular weight extracellular nucleic

- acids // *Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids*. – 2004. – V.23(6-7). – P.873-877. doi: 10.1081/NCN-200026034.
440. Bryzgunova O., Bondar A., Morozkin E., Mileyko V., Vlassov V., Laktionov P. A reliable method to concentrate circulating DNA // *Anal. Biochem.* – 2011. – V.408. – P.354–356.
441. Shechter D., Dormann H.L., Allis C.D., Hake S.B. Extraction, purification and analysis of histones // *Nature protocols* – 2007. – V.2(6). – P.1145–1457.
442. Warburg O., Christian W. Isolierung und kristallisation des garungsferments enolase // *Biochemische Zeitschrift*. – 1941. – V.310. –P.384–421.
443. Nakane P.K., Kawaoi A. Peroxidase-labeled antibody a new method of conjugation // *J. Histochem. Cytochem.* – 1974. – V.22(12). – P.1084–1091.
444. Фримель Г. Иммунологические методы. М.: Медицина, 1987.
445. Егоров А.М., Осипов А.П., Дзантиев Б.Б., Гаврилов Е.М. Теория и практика иммуноферментного анализа. М.: Высшая школа, 1991.
446. Rosenfeld J., Capdevielle J., Guillemot J.C., Ferrara P. In-gel digestion of proteins for internal sequence analysis after one- or two-dimensional gel electrophoresis // *Anal. Biochem.* – 1992. – V.203. – P.173–179.
447. Villar-Garea A., Israel L., Imhof A. Analysis of histone modifications by mass spectrometry // *Curr. Protoc. Protein Sci.* – 2008. – V.14. – Unit 14.10.
448. Pathan M., Keerthikumar S., Chisanga D., Alessandro R., Ang C.-S., Askenase P., Batagov A.O., Benito-Martin A., Camussi G., Clayton A., Collino F., Di Vizio D., Falcon-Perez J.M., Fonseca P., Fonseka P., Fontana S., Gho Y.S., Hendrix A., Hoen E.N., Iraci N., Kastaniegaard K., Kislinger T., Kowal J., Kurochkin I.V., Leonardi T., Liang Y., Llorente A., Lunavat T.R., Maji S., Monteleone F., Øverbye A., Panaretakis T., Patel T., Peinado H., Pluchino S., Principe S., Ronquist G., Royo F., Sahoo S., Spinelli C., Stensballe A., Théry C., van Herwijnen M.J.C.,Wauben M., Welton J.L., Zhao K., Mathivana S. A novel community driven software for functional enrichment analysis of extracellular vesicles data // *J. Extracell. Vesicles*. – 2017. – V.6. – P.e1321455. doi 10.1080/20013078.2017.1321455.
449. Binns D., Dimmer E., Huntley R., Barrell D., O'Donovan C., Apweiler R. QuickGO: a web-based tool for Gene Ontology searching // *Bioinformatics* – 2009. – V.25. – P.3045–3046. doi 10.1093/bioinformatics/btp536.
450. Ostertag E.M., Kazazian H.H. Jr. Biology of mammalian L1 retrotransposons // *Ann. Rev. Genet.* – 2001. – V.35. – P.501-538.
451. Schulz W.A., Steinhoff C., Florl A.R. Methylation of endogenous human retroelements in health and disease // *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* – 2006. – V.310. – P.211-250.

452. Guo Q., Hua Y. The assessment of circulating cell-free DNA as a diagnostic tool for breast cancer: an updated systematic review and meta-analysis of quantitative and qualitative assays // *Clin. Chem. Lab. Med.* – 2021. – V.59(9). – P.1479-1500. doi: 10.1515/cclm-2021-0193.
453. Choy L.Y.L., Peng W., Jiang P., Cheng S.H., Yu S.C.Y., Shang H., Olivia Tse O.Y., Wong J., Wong V.W.S., Wong G.L.H., Lam W.K.J., Chan S.L., Chiu R.W.K., Chan K.C.A., Lo Y.M.D. Single-molecule sequencing enables long cell-free DNA detection and direct methylation analysis for cancer patients // *Clin. Chem.* – 2022. – V.68(9). – P.1151-1163. doi: 10.1093/clinchem/hvac086.
454. Didenko V.V., Ngo H., Baskin D.S. Early necrotic DNA degradation: presence of blunt-ended DNA breaks, 3' and 5' overhangs in apoptosis, but only 5' overhangs in early necrosis // *Am. J. Pathol.* – 2003. – V.162(5). – P.1571-1578. doi: 10.1016/S0002-9440(10)64291-5.
455. Didenko V.V., Hornsby P.J. Presence of double-strand breaks with single-base 3' overhangs in cells undergoing apoptosis but not necrosis // *J. Cell. Biol.* – 1996. – V.135(5). – P.1369-1376. doi: 10.1083/jcb.135.5.1369.
456. Скворцова Т.Э., Лебедева А.О., Власов В.В., Лактионов П.П. Особенности метилирования вДНК в культуре первичных и трансформированных клеток // *Молекулярная медицина* – 2010. – Т.5. – С.36-42.
457. Брызгунова О.Е., Мак В.В., Власов В.В., Лактионов П.П. Исследование стабильности и циркуляции метилированных ДНК – потенциальных онкомаркеров *in vivo* и *in vitro* // *Молекулярная медицина* 2010;5:42-47.
458. Khodyrev D., Loginov V., Pronina I., Kazubskaya T., Garkavtseva R., Braga E. Methylation of promoter region of RAR- $\beta$ 2 gene in renal cell, breast, and ovarian carcinomas // *Russ. J. Genet.* – 2008. – V.44. – P.983–988.
459. Yari K., Rahimi Z. Promoter methylation status of the retinoic acid receptor-beta 2 gene in breast cancer patients: a case control study and systematic Review // *Breast Care* –2019. – V.14. – P.117–123.
460. Mirza S., Sharma G., Parshad R., Srivastava A., Gupta S.D., Ralhan R. Clinical significance of Stratifin, ER $\alpha$  and PR promoter methylation in tumor and serum DNA in Indian breast cancer patients // *Clin. Biochem.* – 2010. – V.43. – P.380–386.
461. Korshunova Y., Maloney R., Lakey N., Citek R., Bacher B., Budiman A., Ordway J., McCombie W., Leon J., Jeddloh J. Massively parallel bisulphite pyrosequencing reveals the molecular complexity of breast cancer-associated cytosine-methylation patterns obtained from tissue and serum DNA // *Genome Res.* – 2008. – V.18. – P.19–29.

462. Diehl F., Schmidt K., Choti M.A., Romans K., Goodman S., Li M., Thornton K., Agrawal N., Sokoll L., Szabo S.A. Circulating mutant DNA to assess tumor dynamics // *Nat. Med.* – 2008. – V.14. – P.985–990.
463. Ponomaryova A.A., Rykova E.Y., Cherdyntseva N.V., Skvortsova T., Dobrodeev A.Y., Zav'yalov A.A., Bryzgalov L.O., Tuzikov S.A., Vlassov V.V., Laktionov P.P. Potentialities of aberrantly methylated circulating DNA for diagnostics and post-treatment follow-up of lung cancer patients // *Lung Cancer* – 2013. – V.81. – P.397–403.
464. Ivanov M., Baranova A., Butler T., Spellman P., Mileyko V. Non-random fragmentation patterns in circulating cell-free DNA reflect epigenetic regulation // *BMC Genomics* – 2015. – V.16(Suppl. 13). – P.S1.
465. Sun K., Jiang P., Allen Chan K.C., Wong J., Cheng Y.K.Y., Liang R.H.S., Chan W., Ma E.S.K., Chan S.L., Cheng S.H. Plasma DNA tissue mapping by genome-wide methylation sequencing for noninvasive prenatal, cancer, and transplantation assessments // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* – 2015. – V.112. – P.E5503–E5512.
466. Skvortsova T.E., Bryzgunova O.E., Lebedeva A.O., Mak V.V., Vlassov V.V., Laktionov P.P. Methylated cell-free DNA in vitro and in vivo. In *Circulating Nucleic Acids in Plasma and Serum*; Gahan, P., Ed.; Springer: Dordrecht, Switzerland, 2010; Chapter 25, pp. 185–194.
467. Delmonico L., Alves G., Bines J. Cell free DNA biology and its involvement in breast carcinogenesis // *Adv. Clin. Chem.* – 2020. – V.97. – P.171–223.
468. Van der Auwera I., Bovie C., Svensson C., Trinh X.B., Limame R., van Dam P., van Laere S.J., van Marck E.A., Dirix L.Y., Vermeulen P.B. Quantitative methylation profiling in tumor and matched morphologically normal tissues from breast cancer patients // *BMC Cancer* – 2010. – V.10. – P.97.
469. Bryzgunova O., Bondar A., Ruzankin P., Laktionov P., Tarasenko A., Kurilshikov A., Epifanov R., Zaripov M., Kabilov M., Laktionov P. Locus-specific methylation of GSTP1, RNF219, and KIAA1539 genes with single molecule resolution in cell-free DNA from healthy donors and prostate tumor patients: application in diagnostics // *Cancers* – 2021. – V.13. – P.6234.
470. Bryzgunova O., Bondar A., Ruzankin P., Tarasenko A., Zaripov M., Kabilov M., Laktionov P. Locus-specific bisulfate NGS sequencing of GSTP1, RNF219, and KIAA1539 genes in the total pool of cell-free and cell-surface-bound DNA in prostate cancer: a novel approach for prostate cancer diagnostics // *Cancers (Basel)* – 2023. – V.15(2). – P.431. doi: 10.3390/cancers15020431.



471. Schwarzenbach H., Hoon D., Pantel K. Cell-free nucleic acids as biomarkers in cancer patients // *Nat. Rev. Cancer.* – 2011. – V.11(6). – P.426-437.
472. Botezatu I., Serdyuk O., Potapova G., Shelerov V., Alechina R., Molyaka Y., Anan'ev V., Bazin I., Garin A., Narimanov M., Knysh V., Melkonyan H., Umansky S., Lichtenstein A. Genetic analysis of DNA excreted in urine: a new approach for detecting specific genomic DNA sequences from cells dying in an organism // *Clin. Chem.* – 2000. – V.46. – P.1078.
473. Власов В.В., Паутова Л.В., Рыкова Е.Ю., Якубов Л.А. Взаимодействие олигонуклеотидов с белками сыворотки крови // *Биохимия* – 1993. – Т.58. – С.1247-1251.
474. Wang J., Ueno H., Masuko T., Hashimoto Y. Binding of serum albumin on tumor cells and characterization of the albumin binding protein // *J. Biochem. (Tokyo)* – 1994. – V.115(5). – P.898-903. doi: 10.1093/oxfordjournals.jbchem.a124437.
475. Arnedo A., Irache J.M., Gonzalez Gaitano G., Valganon M., Espuelas S. Bovine serum albumin modified the intracellular distribution and improved the antiviral activity of an oligonucleotide // *J. Drug Target* – 2003. – V.11(4). – P.197-204. doi: 10.1080/10611860310001595238.
476. Arnedo A., Espuelas S., Irache J.M. Albumin nanoparticles as carriers for a phosphodiester oligonucleotide // *Int. J. Pharm.* – 2002. – V.244(1-2). – P.59-72. doi: 10.1016/s0378-5173(02)00300-9.
477. Wartlick H., Spankuch-Schmitt B., Strebhardt K., Kreuter J., Langer K. Tumour cell delivery of antisense oligonucleotides by human serum albumin nanoparticles // *J. Control. Release* – 2004. – V.96(3). – P.483-495. doi: 10.1016/j.jconrel.2004.01.029.
478. Arnedo A., Irache J.M., Merodio M., Espuelas Millan M.S. Albumin nanoparticles improved the stability, nuclear accumulation and anticytomegaloviral activity of a phosphodiester oligonucleotide // *J. Control. Release* – 2004. – V.94(1). – P.217-227. doi: 10.1016/j.jconrel.2003.10.009.
479. Ivanisenko V.A., Pintus S.S., Grigorovich D.A., Kolchanov N.A. PDBSiteScan: a program for searching for active, binding and posttranslational modification sites in the 3D structures of proteins // *Nucleic Acids Res.* – 2004. – V.32. – P.W549-54. doi: 10.1093/nar/gkh439.
480. Carter D.C., Ho J.X. Structure of serum albumin // *Adv. Protein Chem.* – 1994. – V.45. – P.153-203. doi: 10.1016/s0065-3233(08)60640-3.
481. Kragh-Hansen U., Chuang V.T., Otagiri M. Practical aspects of the ligand-binding and enzymatic properties of human serum albumin // *Biol. Pharm. Bull.* – 2002. – V.25(6). – P.695-704. doi: 10.1248/bpb.25.695.

482. Watson K., Gooderham N., Davies D., Edwards R. Nucleosomes bind to cell surface proteoglycans // *J. Biol. Chem.* – 1999. – V.274(31). – P.21707-21713.
483. Kubota T., Kanai Y., Miyasaka N. Interpretation of the cross-reactivity of anti-DNA antibodies with cell surface proteins: the role of cell surface histones // *Immunol. Lett.* – 1990. – V.23(3). – P.187-194.
484. Mitra I., Nair N.K., Mishra P.K. Nucleic acids in circulation: are they harmful to the host? // *J. Biosci.* – 2012. – V.37(2). – P.301–312.
485. Vlassov V.V., Laktionov P.P., Rykova E.Y. Extracellular nucleic acids // *BioEssays* – 2007. – V.29(7). – P.654–667. doi:10.1002/bies.20604113.
486. Грызунов Г.Е., Добрецов Ю.А. Альбумин сыворотки крови в клинической медицине. М.: Ириус, 1994.
487. Kustanovich A., Schwartz R., Peretz T., Grinshpun A. Life and death of circulating cell—free DNA // *Cancer Biol. Ther.* – 2019. – V.20(8). – P.1057–1067. <https://doi.org/10.1080/15384047.2019.1598759>.
488. Stephan F., Marsman G., Bakker L.M., Bulder I., Stavenuiter F., Aarden L.A., Zeerleder S. Cooperation of factor VII-activating protease and serum DNase I in the release of nucleosomes from necrotic cells // *Arthritis Rheumatol.* – 2014. – V.66(3). – P.686–693. doi:10.1002/art.38265.
489. Martin M., Leffler J., Smolag K.I., Mytych J., Bjork A., Chaves L.D., Alexander J.J., Quigg R.J., Blom A.M. Factor H uptake regulates intracellular C3 activation during apoptosis and decreases the inflammatory potential of nucleosomes // *Cell Death Differ.* – 2016. – V.23(5). – P.903–911. doi:10.1038/cdd.2015.164.
490. Sacks D., Baxter B., Campbell B.C.V. Multisociety consensus quality improvement revised consensus statement for endovascular therapy of acute ischemic stroke // *Int. J. Stroke* – 2018. – V.13(6). – P.612-632. doi: 10.1177/1747493018778713.
491. Liu F., Frick A., Yuan X., Huang L. Dysopsonin activity of serum DNA-binding proteins favorable for gene delivery // *J. Pharmacol. Exp. Ther.* – 2010. – V.332(2). – P.500-504. doi:10.1124/jpet.109.159541.
492. Jones P., Binns D., Chang H. InterProScan 5: genome-scale protein function classification // *Bioinformatics* – 2014. – V.30(9). – P.1236–1240. doi: 10.1093/bioinformatics/btu031.
493. Finn R.D., Attwood T.K., Babbitt P.C. InterPro in 2017 – beyond protein family and domain annotations // *Nucleic Acids Res.* – 2017. – V.45(D1). – P.D190–D199. doi: 10.1093/nar/gkw1107.

494. Rieu S., Geminard C., Rabesandratana H., Sainte-Marie J., Vidal M. Exosomes released during reticulocyte maturation bind to fibronectin via integrin  $\alpha 4 \beta 1$  // *Eur. J. Biochem.* – 2000. – V.267(2). – P.583-590.
495. Garcia M.F., Moore C.D., Schulz K.N., Harrison M.M., Zhu H., Zaret K.S. Structural features of transcription factors associating with nucleosome binding // *Mol. Cell* – 2019. – V.75(5). – P.921–932. doi:10.1016/j.molcel.2019.06.009.
496. Xu J., Zhang X., Pelayo R., Monestier M., Ammollo C.T., Semeraro F., Taylor F.B., Esmon N.L., Lupu F., Esmon C.T. Extracellular histones are major mediators of death in sepsis // *Nat. Med.* – 2009. – V.15(11). – P.1318–1321. doi:10.1038/nm.2053.
497. Tian J., Avalos A.M., Mao S., Chen B., Senthil K., Wu H., Parroche P., Drabic S., Golenbock D., Sirois C., Hua J., An L.L., Audoly L., Rosa G.L., Bierhaus A., Naworth P., Marshak-Rothstein A., Crow M.K., Fitzgerald K.A., Latz E., Kiener P.A., Coyle A.J. Toll-like receptor 9-dependent activation by DNA-containing immune complexes is mediated by HMGB1 and RAGE // *Nat. Immunol.* – 2007. – V.8(5). – P.487–496.
498. Scaffidi P., Misteli T., Bianchi M.E. Release of chromatin protein HMGB1 by necrotic cells triggers inflammation // *Nature* – 2002. – V.418(6894). – P.191–195.
499. Wang K., Shan S., Wang S., Gu X., Zhou X., Ren T. HMGB1—containing nucleosome mediates chemotherapy-induced metastasis of human lung cancer // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* – 2018. – V.500(3). – P.758-764. doi: 10.1016/j.bbrc.2018.04.150.
500. Stros M. HMGB proteins: interactions with DNA and chromatin // *Biochim. Biophys. Acta* – 2010. – V.1799(1-2). – P.101—113. doi: 10.1016/j.bbagr.2009.09.008.
501. 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. – V.123(5). – P.687-696. doi: 10.1182/blood-2013-10-530469.
502. Minciocchi 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. – V.40. – P.41-51. doi: 10.1016/j.semcdb.2015.02.010.
503. Yunusova N.V., Patysheva M.R., Molchanov S.V., Zambalova E.A., Grigor'eva A.E., Kolomiets L.A., Ochirov M.O., Tamkovich S.N., Kondakova I.V. Metalloproteinases at the surface of small extracellular vesicles in advanced ovarian cancer: Relationships with ascites volume and peritoneal canceromatosis index // *Clin. Chim. Acta* – 2019. – V.494. – P.116–122. doi 10.1016/j.cca.2019.03.1621.
504. 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. Chim. Acta* – 2019. – V.495. – P.529-537. doi: 10.1016/j.cca.2019.05.028.
505. Emelyanov A., Shtam T., Kamyshinsky R., Garaeva L., Verlov N., Miliukhina I., Kudrevatykh A., Gavrilov G., Zabrodskaya Y., Pchelina S., Konevega A. Cryo-electron microscopy of extracellular vesicles from cerebrospinal fluid // *PLoS One* – 2020. – V.15. – P.e0227949. doi: 10.1371/journal.pone.0227949.
506. Höög J.L., Lötvall J. Diversity of extracellular vesicles in human ejaculates revealed by cryo-electron microscopy // *J. Extracell. Vesicles* – 2015. – V.4. – P.28680. doi: 10.3402/jev.v4.28680.
507. Hassuna N., Monk P.N., Moseley G.W., Partridge L.J. Strategies for targeting tetraspanin proteins: potential therapeutic applications in microbial infections // *BioDrugs* – 2009. – V.23(6). – P.341-359. doi: 10.2165/11315650-000000000-00000.
508. Sadej R., Grudowska A., Turczyk L., Kordek R., Romanska H.M. CD151 in cancer progression and metastasis: a complex scenario // *Lab. Invest.* – 2014. – V.94(1). – P.41-51. doi: 10.1038/labinvest.2013.136.
509. Malla R.R., Pandrangi S., Kumari S., Gavara M.M., Badana A.K. Exosomal tetraspanins as regulators of cancer progression and metastasis and novel diagnostic markers // *Asia Pac. J. Clin. Oncol.* – 2018. – V.14(6). – P.383-391. doi: 10.1111/ajco.12869.
510. Buchanan P.C., Boylan K.L.M., Walcheck B. Ectodomain shedding of the cell adhesion molecule Nectin-4 in ovarian cancer is mediated by ADAM10 and ADAM17 // *J. Biol. Chem.* – 2017. – V.292(15). – P.6339–6351. doi:10.1074/jbc.M116. 746859.
511. Leech A.O., Vellanki S.H., Rutherford E.J., Keogh A., Jahns H., Hudson L., O'Donovan N., Sabri S., Abdulkarim B., Sheehan K.M., Kay E.W., Young L.S., Hill A.D.K., Smith Y.E., Hopkins A.M. Cleavage of the extracellular domain of junctional adhesion molecule-A is associated with resistance to anti-HER2 therapies in breast cancer settings // *Breast Cancer Res.* – 2018. – V.20(1). – P.140. doi: 10.1186/s13058-018-1064-1.
512. Miller M.A., Meyer A.S., Beste M.T., Lasisi Z., Reddy S., Jeng K.W., Chen C.H., Han J., Isaacson K., Griffith L.G., Lauffenburger D.A. ADAM-10 and -17 regulate endometriotic cell migration via concerted ligand and receptor shedding feedback on kinase signaling // *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* – 2013. – V.110(22). – P.E2074-83. doi: 10.1073/pnas.1222387110.
513. Lee S.B., Schramme A., Doberstein K., Dummer R., Abdel-Bakky M.S., Keller S., Altevogt P., Oh S.T., Reichrath J., Oxmann D., Pfeilschifter J., Mihic-Probst D., Gutwein P. ADAM10 is upregulated in melanoma metastasis compared with primary melanoma // *J. Invest. Dermatol.* – 2010. – V.130(3). – P.763-773. doi: 10.1038/jid.2009.335.

514. Mofers A., Pellegrini P., Linder S., D'Arcy P. Proteasome-associated deubiquitinases and cancer // *Cancer Metastasis Rev.* – 2017. – V.36(4). – P.635-653. doi: 10.1007/s10555-017-9697-6.
515. Shashova E.E., Kolegova E.S., Zav'yalov A.A., Slonimskaya E.M., Kondakova I.V. Changes in the activity of proteasomes and calpains in metastases of human lung cancer and breast cancer // *Bull Exp Biol Med.* – 2017. – V.163(4). – P.486-489. doi: 10.1007/s10517-017-3834-7.
516. Shashova E.E., Lyupina Y.V., Glushchenko S.A., Slonimskaya E.M., Savenkova O.V., Kulikov A.M., Gornostaev N.G., Kondakova I.V., Sharova N.P. Proteasome functioning in breast cancer: connection with clinical-pathological factors // *PLoS One* – 2014. – V.9(10). – P.e109933. doi: 10.1371/journal.pone.0109933.
517. Lai R.C., Tan S.S., Teh B.J., Sze S.K., Arslan F., de Kleijn D.P., Choo A., Lim S.K. Proteolytic potential of the MSC exosome proteome: implications for an exosome-mediated delivery of therapeutic proteasome // *J. Proteomics* – 2012.– V.2012. – P.971907. doi: 10.1155/2012/971907.
518. Dieudé M., Bell C., Turgeon J., Beillevaire D., Pomerleau L., Yang B., Hamelin K., Qi S., Pallet N., Béland C., Dhahri W., Cailhier J.-F., Rousseau M., Duchez A.-C., Lévesque T., Lau A., Rondeau C., Gingras D., Muruve D., Rivard A., Cardinal H., Perreault C., Desjardins M., Boilard E., Thibault P., Hébert M.-J. The 20S proteasome core, active within apoptotic exosome-like vesicles, induces autoantibody production and accelerates rejection // *Sci. Transl. Med.* – 2015. – V.7(318). – P.318ra200. doi: 10.1126/scitranslmed.aac9816.
519. Stoeck A., Keller S., Riedle S., Sanderson M.P., Runz S., Naour F.L., Gutwein P., Ludwig A., Rubinstein E., Altevogt P. A role for exosomes in the constitutive and stimulus-induced ectodomain cleavage of L1 and CD44 // *Biochem J.* – 2006. – V.393(Pt 3). – P.609-618. doi: 10.1042/BJ20051013.
520. Arduise C., Abache T., Li L., Billard M., Chabanon A., Ludwig A., Mauduit P., Boucheix C., Rubinstein E., Naour F.L. Tetraspanins regulate ADAM10-mediated cleavage of TNF-alpha and epidermal growth factor // *J. Immunol.* – 2008. – V.181(10). – P.7002-7013. doi: 10.4049/jimmunol.181.10.7002.
521. Li W., Li C., Zhou T., Liu X., Liu X., Li X., Chen D. Role of exosomal proteins in cancer diagnosis // *Mol. Cancer* – 2017. – V.16(1). – P.145. doi: 10.1186/s12943-017-0706-8.
522. Hoshino A., Costa-Silva B., Shen T.L., Rodrigues G., Hashimoto A., Mark M.T., Molina H., Kohsaka S., Giannatale A.D., Ceder S., Singh S., Williams C., Soplod N., Uryu K., Pharmed L., King T., Bojmar L., Davies A.E., Ararso Y., Zhang T., Zhang H., Hernandez J., Weiss J.M., Dumont-Cole V.D., Kramer K., Wexler L.H., Narendran A., Schwartz G.K., Healey

- J.H., Sandstrom P., Labori K.J., Kure E.H., Grandgenett P.M., Hollingsworth M.A., de Sousa M., Kaur S., Jain M., Mallya K., Batra S.K., Jarnagin W.R., Brady M.S., Fodstad O., Muller V., Pantel K., Minn A.J., Bissell M.J., Garcia B.A., Kang Y., Rajasekhar V.K., Ghajar C.M., Matei I., Peinado H., Bromberg J., Lyden D. Tumour exosome integrins determine organotropic metastasis // *Nature* – 2015. – V.527(7578). – P.329-335. doi: 10.1038/nature15756.
523. Tecalco-Cruz A.C., Ramírez-Jarquín J.O. Mechanisms that increase stability of estrogen receptor alpha in breast cancer // *Clin. Breast Cancer* – 2017. – V.17(1). – P.1–10. doi: 10.1016/j.clbc.2016.07.015.
524. Sannino S., Brodsky J.L. Targeting protein quality control pathways in breast cancer // *BMC Biol.* – 2017. – V.15(1). – P.109. doi: 10.1186/s12915-017-0449-4.
525. Yerlikaya A., Kanbur E., Stanley B.A., Tümer E. The Ubiquitin-proteasome pathway and epigenetic modifications in cancer // *Anticancer Agents Med. Chem.* – 2021. – V.21(1). – P.20–32. doi: 10.2174/1871520620666200811114159.
526. Harris D.A., Patel S.H., Gucek M., Hendrix A., Westbroek W., Taraska J.W. Exosomes released from breast cancer carcinomas stimulate cell movement // *PLoS One* – 2015. – V.10. – P.e0117495. doi: 10.1371/journal.pone.0117495.
527. Zhang W., Ou X., Wu X. Proteomics profiling of plasma exosomes in epithelial ovarian cancer: a potential role in the coagulation cascade, diagnosis and prognosis // *Int. J. Oncol.* – 2019. – V.54. – P.1719–1733. doi: 10.3892/ijo.2019.4742.
528. Chen Y., Xie Y., Xu L., Zhan S., Xiao Y., Gao Y., Wu B., Ge W. Protein content and functional characteristics of serum-purified exosomes from patients with colorectal cancer revealed by quantitative proteomics // *Int. J. Cancer* – 2017. – V.140. – P.900–913. doi: 10.1002/ijc.30496.
529. Raimondo F., Morosi L., Chinello C., Magni F., Pitto M. Advances in membranous vesicle and exosome proteomics improving biological understanding and biomarker discovery // *Proteomics* – 2011. – V.11. – P.709–720. doi: 10.1002/pmic.201000422.
530. Rosa-Fernandes L., Rocha V.B., Carregari V.C., Urbani A., Palmisano G. A perspective on extracellular vesicles proteomics // *Front. Chem.* – 2017. – V.5. – P.102. doi: 10.3389/fchem.2017.00102.
531. Wu A.Y., Ueda K., Lai C.P. Proteomic analysis of extracellular vesicles for cancer diagnostics // *Proteomics* – 2019. – V.19(1–2). – P.e1800162. doi: 10.1002/pmic.201800162.
532. 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. – V.2019. – P.1639854. doi: 10.1155/2019/1639854.
533. 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. – V.70(4). – P.1668–1678. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-09-2470.
534. Mathivanan S., Ji H., Simpson R.J. Exosomes: extracellular organelles important in intercellular communication // *J. Proteomics* – 2010. – V.73(10). – P.1907–1920. doi: 10.1016/j.jprot.2010.06.006.
535. 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. – V.18(9). – P.977–979.
536. Uhlen M., Fagerberg L., Hallstrom B.M., Lindskog C., Oksvold P., Mardinoglu A., Sivertsson A., Kampf C., Sjöstedt E., Asplund A., Olsson I., Edlund K., Lundberg E., Navani S., Szigartyo C.A., Odeberg J., Djureinovic D., Takanen J.O., Hober S., Alm T., Edqvist P.H., Berling H., Tegel H., Mulder J., Rockberg J., Nilsson P., Schwenk J.M., Hamsten M., von Feilitzen K., Forsberg M., Persson L., Johansson F., Zwahlen M., von Heijne G., Nielsen J., Pontén F. Tissue-based map of the human proteome // *Science* – 2015. – V.347(6220). – P.1260419. DOI: 10.1126/science.1260419.
537. Uhlen M., Zhang C., Lee S., Sjöstedt E., Fagerberg L., Bidkhorji G., Benfeitas R., Arif M., Liu Z., Edfors F., Sanli K., von Feilitzen K., Oksvold P., Lundberg E., Hober S., Nilsson P., Mattsson J., Schwenk J.M., Brunnström H., Glimelius B., Sjöblom T., Edqvist P.-H., Djureinovic D., Micke P., Lindskog C., Mardinoglu A., Ponten F. A pathology atlas of the human cancer transcriptome // *Science* – 2017. – V.357. – P.eaan2507. doi: 10.1126/science.aan2507.
538. Pontén F., Schwenk J.M., Asplund A., Edqvist P.H. The Human Protein Atlas as a proteomic resource for biomarker discovery // *J. Intern. Med.* – 2011. – V.270. – P.428–446. doi: 10.1111/j.1365-2796.2011.02427.x.
539. Kwon C.H., Park H.J., Choi J.H., Lee J.R., Kim H.K., Jo H.J., Kim H.S., Oh N., Song G.A., Park D.Y. Snail and serpinA1 promote tumor progression and predict prognosis in colorectal cancer // *Oncotarget* – 2015. – V.6(24). – P.20312–20326. doi: 10.18632/oncotarget.3964.
540. Livasy C.A., Karaca G., Nanda R., Tretiakova M.S., Olopade O.I., Moore D.T., Perou C.M. Phenotypic evaluation of the basal-like subtype of invasive breast carcinoma // *Mod. Pathol.* – 2006. – V.19(2). – P.264–271. doi: 10.1038/modpathol.3800528.

541. Tang H., Long Q., Zhuang K., Yan Y., Han K., Guo H., Lu X. miR-665 promotes the progression of gastric adenocarcinoma via elevating FAK activation through targeting SOCS3 and is negatively regulated by lncRNA MEG3 // *J. Cell. Physiol.* – 2020. – V.235(5). – P.4709–4719. doi: 10.1002/jcp.29349.
542. Chu Q., Shen D., He L., Wang H., Liu C., Zhang W. Prognostic significance of SOCS3 and its biological function in colorectal cancer // *Gene* – 2017. – V.627. – P.114–122. doi: 10.1016/j.gene.2017.06.013.
543. Tian Z., Yao G., Song H., Zhou Y., Geng J. IGF2R expression is associated with the chemotherapy response and prognosis of patients with advanced NSCLC // *Cell. Physiol. Biochem.* – 2014. – V.34. – P.1578–1588. doi: 10.1159/000 366361.
544. Soudy R., Etayash H., Bahadorani K., Lavasanifar A., Kaur K. Breast cancer targeting peptide binds keratin 1: a new molecular marker for targeted drug delivery to breast cancer. // *Mol. Pharm.* – 2017. – V.14(3). – P.593-604.
545. Schulte I., Batty E.M., Pole J.C., Blood K.A., Mo S., Cooke S.L., Ng C., Howe K.L., Chin S.F., Brenton J.D., Caldas C., Howarth K.D., Edwards P.A. Structural analysis of the genome of breast cancer cell line ZR-75-30 identifies twelve expressed fusion genes // *BMC Genomics.* – 2012. – V.13. – P.719. doi: 10.1186/1471-2164-13-719.
546. Zhang Y., Yang F. Analyzing the disease module associated with osteosarcoma via a network- and pathway-based approach // *Exp. Ther. Med.* – 2018. – V.16(3). – P.2584-2592.
547. Shtam T., Naryzhny S., Samsonov R., Karasik D., Mizgirev I., Kopylov A., Petrenko E., Zabrodskaya Y., Kamyshinsky R., Nikitin D. Plasma exosomes stimulate breast cancer metastasis through surface interactions and activation of FAK signaling // *Breast Cancer Res. Treat.* – 2019. – V.174. – P.129–141.
548. Li R., Wang Y., Zhang X., Feng M., Ma J., Li J., Yang X., Fang F., Xia Q., Zhang Z., Shang M., Jiang S. Exosome-mediated secretion of LOXL4 promotes hepatocellular carcinoma cell invasion and metastasis // *Mol. Cancer* – 2019. – V.18(1). – P.18. doi: 10.1186/s12943-019-0948-8.
549. Li Z., Zeng C., Nong Q., Long F., Liu J., Mu Z., Chen B., Wu D., Wu H. Exosomal leucine-rich-alpha2-glycoprotein 1 derived from non-small-cell lung cancer cells promotes angiogenesis via TGF- $\beta$  signal pathway // *Mol. Ther. Oncolytics* – 2019. – V.14. – P.313–322. doi: 10.1016/j.omto.2019.08.001.
550. Conigliaro A., Cicchini C. Exosome-mediated signaling in epithelial to mesenchymal transition and tumor progression // *J. Clin. Med.* – 2018. – V.8(1). – P.26. doi: 10.3390/jcm8010026.



551. Jeppesen D.K., Fenix A.M., Franklin J.L., Higginbotham J.N., Zhang Q., Zimmerman L.J., Liebler D.C., Ping J., Liu Q., Evans R., Fissell W.H., Patton J.G., Rome L.H., Burnette D.T., Coffey R.J. Reassessment of Exosome Composition // *Cell* – 2019. – V.177(2). – P.428-445. doi:10.1016/j.cell.2019.02.029.
552. Kalavska K., Minarik T., Vlkova B., Manasova D., Kubickova M., Jurik A., Mardiak J., Sufliarsky J., Celec P., Mego M. Prognostic value of various subtypes of extracellular DNA in ovarian cancer patients // *J. Ovarian Res.* – 2018. – V.11(1). – P.85. doi: 10.1186/s13048-018-0459-z.
553. Zhang W., Ou X., Wu X. Proteomics profiling of plasma exosomes in epithelial ovarian cancer: A potential role in the coagulation cascade, diagnosis and prognosis // *Int. J. Oncol.* – 2019. – V.54(5). – P.1719–1733. doi: 10.3892/ijo.2019.4742.
554. Buzas E.I., Toth E.A., Sodar B.W., Szabo-Taylor K.E. Molecular interactions at the surface of extracellular vesicles // *Semin Immunopathol.* – 2018. – V.40(5). – P.453–464. doi: 10.1007/s00281-018-0682-0.
555. Zheng J., Liu C., Shi J., Wen K., Wang X. AIM2 inhibits the proliferation, invasion and migration, and promotes the apoptosis of osteosarcoma cells by inactivating the PI3K/AKT/mTOR signaling pathway // *Mol. Med. Rep.* – 2022. – V.2592. – P.53. doi: 10.3892/mmr.2021.12569.
556. Corona R.I., Seo J.H., Lin X., Hazelett D.J., Reddy J., Fonseca M.A.S., Abassi F., Lin Y.G., Mhaweche-Fauceglia P.Y., Shah S.P., Huntsman D.G., Gusev A., Karlan B.Y., Berman B.P., Freedman M.L., Gayther S.A., Lawrenson K. Non-coding somatic mutations converge on the PAX8 pathway in ovarian cancer // *Nat. Commun.* – 2020. – V.11(1). – P.2020. doi: 10.1038/s41467-020-15951-0.
557. Yang M., Wang A., Li C., Sun J., Yi G., Cheng H., Liu X., Wang Z., Zhou Y., Yao G., Wang S., Liang R., Li B., Li D., Zhao H. Methylation-induced silencing of ALDH2 facilitates lung adenocarcinoma bone metastasis by activating the MAPK pathway // *Front. Oncol.* – 2020. – V.10. – P.1141. doi: 10.3389/fonc.2020.01141.
558. Du C., Ma X., Meruvu S., Hugendubler L., Mueller E. The adipogenic transcriptional cofactor ZNF638 interacts with splicing regulators and influences alternative splicing // *J. Lipid Res.* – 2014. – V.55(9). – P.1886–1896. doi: 10.1194/jlr.M047555.
559. Al-Nedawi K., Meehan B., Micallef J., Lhotak V., May L., Guha A., Rak J. Intercellular transfer of the oncogenic receptor EGFRvIII by microvesicles derived from tumour cells // *Nat. Cell. Biol.* – 2008. – V.10(5). – P.619-624. doi: 10.1038/ncb1725.
560. Qiu J.J., Lin X.J., Zheng T.T., Tang X.-Y., Zhang Y., Hua K.-Q. The exosomal long noncoding RNA aHIF is upregulated in serum from patients with endometriosis and

- promotes angiogenesis in endometriosis // *Reprod Sci.* – 2019. – V.26(12). – P.1590-1602. doi: 10.1177/1933719119831775.
561. Qiu J.-J., Lin X.-J., Tang X.-Y., Zheng T.-T., Lin Y.-Y., Hua K.-Q. Exosomal metastasis-associated lung adenocarcinoma transcript 1 promotes angiogenesis and predicts poor prognosis in epithelial ovarian cancer // *Int. J. Biol. Sci.* – 2018. – V.14(14). – P.1960-1973. doi: 10.7150/ijbs.28048.
562. Park J.E., Tan H.S., Datta A., Lai R.C., Zhang H., Meng W., Lim S.K., Sze S.K. Hypoxic tumor cell modulates its microenvironment to enhance angiogenic and metastatic potential by secretion of proteins and exosomes // *Mol. Cell. Proteomics* – 2010. – V.9(6). – P.1085-1099. doi: 10.1074/mcp.M900381-MCP200.
563. Aranda E., Owen G.I. A semi-quantitative assay to screen for angiogenic compounds and compounds with angiogenic potential using the EA.hy926 endothelial cell line // *Biol. Res.* – 2009. – V.42(3). – P.377-389.
564. Matsuura Y., Wada H., Eguchi H., Gotoh K., Kobayashi S., Kinoshita M., Kubo M., Hayashi K., Iwagami Y., Yamada D., Asaoka T., Noda T., Kawamoto K., Takeda Y., Tanemura M., Umeshita K., Doki Y., Mori M. Exosomal miR-155 derived from hepatocellular carcinoma cells under hypoxia promotes angiogenesis in endothelial cells // *Dig. Dis. Sci.* – 2019. – V.64(3). – P.792-802. doi: 10.1007/s10620-018-5380-1.
565. Ludwig N., Yerneni S.S., Razzo B.M., Whiteside T.L. Exosomes from HNSCC promote angiogenesis through reprogramming of endothelial cells // *Mol. Cancer Res.* – 2018. – V.16(11). – P.1798-808. doi: 10.1158/1541-7786.MCR-18-0358.
566. Zeng Z., Li Y., Pan Y., Lan X., Song F., Sun J., Zhou K., Liu X., Ren X., Wang F., Hu J., Zhu X., Yang W., Liao W., Li G., Ding Y., Liang L. Cancer-derived exosomal miR-25-3p promotes pre-metastatic niche formation by inducing vascular permeability and angiogenesis // *Nat Commun.* – 2018. – V.9(1). – P.5395. doi: 10.1038/s41467-018-07810-w.
567. Rubtsova S.N., Zhitnyak I.Y., Gloushankova N.A. A novel role of e-cadherin-based adherens junctions in neoplastic cell dissemination // *PLoS One* – 2015. – V.10(7). – P.e0133578.
568. Arora H., Qureshi R., Park W.Y. miR-506 regulates epithelial mesenchymal transition in breast cancer cell lines // *PLoS One* – 2013. – V.8(5). – P.e64273. doi: 10.1371/journal.pone.0064273.
569. Almendros I., Khalyfa A., Trzepizur W., Gileles-Hillel A., Huang L., Akbarpour M., Andrade J., Farré R., Gozal D. Tumor cell malignant properties are enhanced by circulating

- exosomes in sleep apnea // *Chest* – 2016. – V.150(5). – P.1030–1041. doi: 10.1016/j.chest.2016.08.1438.
570. Khalyfa A., Almendros I., Gileles-Hillel A., Akbarpour M., Trzepizur W., Mokhlesi B., Huang L., Andrade J., Farré R., Gozal D. Circulating exosomes potentiate tumor malignant properties in a mouse model of chronic sleep fragmentation // *Oncotarget* –2016. – V.7(34). – P.54676–54690. doi: 10.18632/oncotarget.10578.

## ПРИЛОЖЕНИЕ 1

Приложение 1А. Белки НПК крови условно ЗЖ\*.

UniprotID	Название белка	Gene Name	Score
P51665	26S proteasome non-ATPase regulatory subunit 7	PSMD7	66
Q92665	28S ribosomal protein S31, mitochondrial	MRPS31	70
Q9HD33	39S ribosomal protein L47, mitochondrial	MRPL47	56
Q6H8Q1	Actin-binding LIM protein 2	ABLIM2	61
Q8WXI4	Acyl-coenzyme A thioesterase 11	ACOT11	62
P40123	Adenylyl cyclase-associated protein 2	CAP2	66
P24298	Alanine aminotransferase 1	GPT	61
P18825	Alpha-2C adrenergic receptor	ADRA2C	57
Q7Z5R6	<i>Amyloid beta A4 precursor protein-binding family B member 1-interacting protein</i>	APBB1IP	63
Q96LR9	Apolipoprotein L domain-containing protein 1	APOLD1	62
O43918	Autoimmune regulator	AIRE	61
P08588	<i>Beta-1 adrenergic receptor</i>	ADRB1	60
Q6Y288	<i>Beta-1,3-glucosyltransferase</i>	B3GALTL	94
Q03060	<i>cAMP-responsive element modulator</i>	CREM	56
P08311	Cathepsin G	CTSG	68
P29973	cGMP-gated cation channel alpha-1	CNGA1	60
Q8TDX6	Chondroitin sulfate N-acetylgalactosaminyltransferase 1	CSGALNACT1	60
Q13111	Chromatin assembly factor 1 subunit A	CHAF1A	95
Q92187	CMP-N-acetylneuramate-poly-alpha-2,8-sialyltransferase	ST8SIA4	78
Q96HJ3	Coiled-coil domain-containing protein 34	CCDC34	57
A6NFT4	Coiled-coil domain-containing protein 42B	CCDC42B	63
A2IDD5	<i>Coiled-coil domain-containing protein 78</i>	CCD78	70
Q86UT8	Coiled-coil domain-containing protein 84	CCDC84	58
P08174	Complement decay-accelerating factor	CD55	75
P36980	Complement factor H-related protein 2	CFHR2	72
Q9BR76	Coronin-1B	COR1B	93
P17812	CTP synthase 1	CTPS1	64
Q9P126	C-type lectin domain family 1 member B	CLEC1B	66
Q6NT55	Cytochrome P450 4F22	CYP4F22	59

Q7Z7J5	<i>Developmental pluripotency-associated protein 2</i>	DPPA2	71
P25205	DNA replication licensing factor MCM3	MCM3	61
O75190	DnaJ homolog subfamily B member 6	DNAJB6	96
O60941	Dystrobrevin beta	DTNB	65
Q8N7E2	E3 ubiquitin-protein ligase ZNF645	ZNF645	58
O75354	Ectonucleoside triphosphate diphosphohydrolase 6	ENTPD6	61
A8MZ26	<i>EF-hand calcium-binding domain-containing protein 9</i>	EFCAB9	65
Q9BY07	<i>Electrogenic sodium bicarbonate cotransporter 4</i>	SLC4A5	78
Q6NXG1	Epithelial splicing regulatory protein 1	ESRP1	79
P55010	Eukaryotic translation initiation factor 5	EIF5	70
P14324	Farnesyl pyrophosphate synthase	FPPS	57
Q6PCT2	F-box/LRR-repeat protein 19	FBXL19	57
Q5T3I0	G patch domain-containing protein 4	GPATCH4	57
O96020	G1/S-specific cyclin-E2	CCNE2	82
Q99999	Galactosylceramide sulfotransferase	GAL3ST1	59
Q92990	Glomulin	GLMN	66
P06744	Glucose-6-phosphate isomerase	GPI	67
P23415	Glycine receptor subunit alpha-1	GLRA1	62
Q02108	<i>Guanylate cyclase soluble subunit alpha-3</i>	GUCY1A3	60
Q7LGA3	Heparan sulfate 2-O-sulfotransferase 1	HS2ST1	72
Q8WW32	High mobility group protein B4	HMGB4	60
O14929	Histone acetyltransferase type B catalytic subunit	HAT1	56
Q9BTM1	Histone H2A.J	H2AFJ	75
P31271	Homeobox protein Hox-A13	HOXA13	67
P17483	Homeobox protein Hox-B4	HOXB4	58
Q00444	<i>Homeobox protein Hox-C5</i>	HOXC5	92
P31273	Homeobox protein Hox-C8	HOXC8	65
Q92819	Hyaluronan synthase 2	HAS2	74
Q9NSI5	Immunoglobulin superfamily member 5	IGSF5	66
Q8NBZ0	<i>INO80 complex subunit E</i>	INO80E	89
P14735	<i>Insulin-degrading enzyme</i>	IDE	77
Q9NV88	Integrator complex subunit 9	INTS9	80
P20592	Interferon-induced GTP-binding protein Mx2	MX2	68

Q8IXL9	IQ domain-containing protein F2	IQCF2	56
O95198	Kelch-like protein 2	KLHL2	58
Q8N4N8	Kinesin-like protein KIF2B	KIF2B	60
O00522	<i>Krev interaction trapped protein 1</i>	KRIT1	70
Q13118	Krueppel-like factor 10	KLF10	68
Q03252	Lamin-B2	LMNB2	62
Q96BZ8	Leukocyte receptor cluster member 1	LENG1	68
P49137	MAP kinase-activated protein kinase 2	MAPKAPK2	86
A6NI15	Mesogenin-1	MSGN1	58
P02795	Metallothionein-2	MT2A	60
Q2M296	Methenyltetrahydrofolate synthase domain-containing protein	MTHFSD	57
Q96AQ8	<i>Mitochondrial calcium uniporter regulator 1</i>	CCDC90A	60
Q9BVV7	Mitochondrial import inner membrane translocase subunit Tim21	TIMM21	66
Q99558	<i>Mitogen-activated protein kinase kinase kinase 14</i>	MAP3K14	61
Q99683	Mitogen-activated protein kinase kinase kinase 5	MAP3K5	71
Q8NB16	Mixed lineage kinase domain-like protein	MLKL	68
P19105	<i>Myosin regulatory light chain 12A</i>	MYL12A	60
P24844	<i>Myosin regulatory light polypeptide 9</i>	MYL9	57
P48163	<i>NADP-dependent malic enzyme</i>	MAOX	73
Q9HD90	Neurogenic differentiation factor 4	NEUROD4	72
Q9Y639	Neuroplastin	NPTN	57
Q99784	Noelin	OLFM1	64
Q96PB7	Noelin-3	OLFM3	77
P48745	<i>NOV homolog</i>	NOV	57
Q8NGW1	Olfactory receptor 6B3	OR6B3	80
P30559	Oxytocin receptor	OXTR	73
Q15391	P2Y purinoceptor 14	P2RY14	56
Q9UQ90	<i>Paraplegin</i>	SPG7	61
Q9BRP8	Partner of Y14 and mago	WIBG	65
Q8IV76	PAS domain-containing protein 1	PASD1	66
O75570	<i>Peptide chain release factor 1, mitochondrial</i>	MTRF1	70
Q9NYL4	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase FKBP11	FKBP11	87
Q9BY49	Peroxisomal trans-2-enoyl-CoA reductase	PECR	63

Q9BUL5	PHD finger protein 23	PHF23	65
Q8N4E4	Phosducin-like protein 2	PDCL2	63
Q6NWWY9	Pre-mRNA-processing factor 40 homolog B	PRPF40B	63
Q9H000	Probable E3 ubiquitin-protein ligase makorin-2	MKRN2	68
Q5JPH6	Probable glutamate--tRNA ligase, mitochondrial	EARS2	59
Q99680	<i>Probable G-protein coupled receptor 22</i>	GPR22	76
A2RTX5	Probable threonine-tRNA ligase 2, cytoplasmic	TARSL2	57
Q9ULL5	Proline-rich protein 12	PRR12	58
Q2TB18	Protein asteroid homolog 1	ASTE1	68
Q9UKY7	Protein CDV3 homolog	CDV3	61
Q13394	Protein mab-21-like 1	MAB21L1	57
O15151	Protein Mdm4	MDM4	58
P00734	Prothrombin	F2	59
Q5JUK9	<i>Putative G antigen family D member 1</i>	PAGE3	56
Q8N1L4	Putative inactive cytochrome P450 family member 4Z2	CYP4Z2P	59
Q5I0G3	Putative malate dehydrogenase 1B	MDH1B	86
Q9Y383	Putative RNA-binding protein Luc7-like 2	LUC7L2	61
Q5EBN2	Putative tripartite motif-containing protein 61	TRIM61	70
Q96NF6	Putative uncharacterized protein C8orf49	C8orf49	80
A8MUU9	Putative uncharacterized protein ENSP00000383309	YV023	66
A8MU76	<i>Putative UPF0607 protein ENSP00000381418</i>	N/A	60
A8MX80	<i>Putative UPF0607 protein ENSP00000383144</i>	YM017	68
Q9H974	Queuine tRNA-ribosyltransferase subunit QTRTD1	QTRTD1	62
Q3YEC7	Rab-like protein 6	RABL6	74
Q09MP3	RAD51-associated protein 2	RAD51AP2	62
Q86UC2	Radial spoke head protein 3 homolog	RSPH3	68
Q8IV61	Ras guanyl-releasing protein 3	RASGRP3	69
P20340	Ras-related protein Rab-6A	RAB6A	58
P11233	<i>Ras-related protein Ral-A</i>	RALA	59
P11234	Ras-related protein Ral-B	RALB	62
Q7Z6I6	Rho GTPase-activating protein 30	ARHGAP30	82
Q5TG30	Rho GTPase-activating protein 40	ARHGAP40	70
O43307	Rho guanine nucleotide exchange factor 9	ARHGEF9	57

P23443	Ribosomal protein S6 kinase beta-1	RPS6KB1	69
Q96CM3	RNA pseudouridylate synthase domain-containing protein 4	RPUSD4	58
Q9Y324	rRNA-processing protein FCF1 homolog	FCF1	64
Q2I0M5	R-spondin-4	RSPO4	67
Q92599	Septin-8	SEPT8	64
P34896	Serine hydroxymethyltransferase, cytosolic	SHMT1	78
Q13243	Serine/arginine-rich splicing factor 5	SRSF5	76
Q8WU08	<i>Serine/threonine-protein kinase 32A</i>	STK32A	68
Q86UX6	Serine/threonine-protein kinase 32C	STK32C	60
P50454	Serpin H1	SERPINH1	61
Q9BZQ2	SHC SH2 domain-binding protein 1-like protein	SHCBP1L	61
Q8IX30	Signal peptide, CUB and EGF-like domain-containing protein 3	SCUBE3	61
Q9NR83	SLC2A4 regulator	SLC2A4RG	75
P62314	<i>Small nuclear ribonucleoprotein Sm D1</i>	SNRPD1	65
Q9NYB5	Solute carrier organic anion transporter family member 1C1	SLCO1C1	80
Q86UG4	Solute carrier organic anion transporter family member 6A1	SLCO6A1	62
Q8NHX4	<i>Spermatogenesis-associated protein 3</i>	SPATA3	67
Q01081	<i>Splicing factor U2AF 35 kDa subunit</i>	U2AF1	112
Q8WXA9	Splicing regulatory glutamine/lysine-rich protein 1	SREK1	78
Q13033	<i>Striatin-3</i>	STRN3	66
Q7Z422	<i>SUZ domain-containing protein 1</i>	SZRD1	58
Q9BQG1	Synaptotagmin-3	SYT3	75
Q15573	TATA box-binding protein-associated factor RNA polymerase I subunit A	TAF1A	58
P17987	T-complex protein 1 subunit alpha	TCP1	81
Q9H2G4	<i>Testis-specific Y-encoded-like protein 2</i>	TSPYL2	79
Q13114	TNF receptor-associated factor 3	TRAF3	66
Q56UQ5	TPT1-like protein	TPT1L	68
P17535	<i>Transcription factor jun-D</i>	JUND	68
Q16514	Transcription initiation factor TFIID subunit 12	TAF12	68
Q00577	Transcriptional activator protein Pur-alpha	PURA	67
Q15629	<i>Translocating chain-associated membrane protein 1</i>	TRAM1	73
Q8N609	<i>Translocating chain-associated membrane protein 1-like 1</i>	TRAM1L1	62
Q99442	Translocation protein SEC62	SEC62	72



Q7Z5M5	Transmembrane channel-like protein 3	TMC3_	83
Q9NXH9	tRNA (guanine(26)-N(2))-dimethyltransferase	TRMT1	58
Q16560	U11/U12 small nuclear ribonucleoprotein 35 kDa protein	SNRNP35	65
Q15695	U2 small nuclear ribonucleoprotein auxiliary factor 35 kDa subunit-related protein 1	ZRSR1	80
C9J2P7	Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase 17-like protein 15	USP17L15	63
Q9UPT9	<i>Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase 22</i>	UBP22	68
Q16763	<i>Ubiquitin-conjugating enzyme E2</i>	UBE2S	63
Q9Y3C8	Ubiquitin-fold modifier-conjugating enzyme 1	UFC1	68
O75310	UDP-glucuronosyltransferase 2B11	UGT2B11	56
Q8IXR9	Uncharacterized protein C12orf56	C12orf56	56
Q8NEA5	Uncharacterized protein C19orf18	C19orf18	59
Q5T8R8	Uncharacterized protein C9orf66	C9orf66	60
Q5VIR6	Vacuolar protein sorting-associated protein 53 homolog	VPS53	62
O95670	V-type proton ATPase subunit G	ATP6V1G2	58
Q96JC4	Zinc finger protein 479	ZNF479	59

\*универсальные белки выделены курсивом.

#### Приложение 1Б. Белки НПК крови больных РМЖ\*.

UniprotID	Название белка	Gene Name	Score
Q9NZE8	39S ribosomal protein L35, mitochondrial	MRPL35	70
P32754	4-hydroxyphenylpyruvate dioxygenase	HPD	58
P46777	60S ribosomal protein L5	RPL5	60
P23526	Adenosylhomocysteinase	AHCY	58
Q969X2	Alpha-N-acetylgalactosaminide alpha-2,6-sialyltransferase 6	ST6GALNAC6	62
Q7Z5R6	<i>Amyloid beta A4 precursor protein-binding family B member 1-interacting protein</i>	APBB1IP	83
P48751	Anion exchange protein 3	SLC4A3	81
Q75V66	Anoctamin-5	ANO5	77
O95236	Apolipoprotein L3	APOL3	56
Q86W34	Archaemetzincin-2	AMZ2	59
Q8TF01	Arginine/serine-rich protein PNISR	PNISR	68
O95260	Arginyl-tRNA--protein transferase 1	ATE1	64
O15392	Baculoviral IAP repeat-containing protein 5	BIRC5	56
P08588	<i>Beta-1 adrenergic receptor</i>	ADRB1	67

Q6Y288	<i>Beta-1,3-glucosyltransferase</i>	B3GALTL	61
Q03060	<i>cAMP-responsive element modulator</i>	CREM	82
Q9NS84	Carbohydrate sulfotransferase 7	CHST7	70
Q9HCP0	Casein kinase I isoform gamma-1	CSNK1G1	93
Q5EG05	Caspase recruitment domain-containing protein 16	CARD16	204
P29466	Caspase-1	CASP1	64
Q8NEC5	Cation channel sperm-associated protein 1	CATSPER1	61
Q9H6E4	Coiled-coil domain-containing protein 134	CCDC134	57
A2IDD5	<i>Coiled-coil domain-containing protein 78</i>	CCDC78	58
Q03591	Complement factor H-related protein 1	CFHR1	60
P61201	COP9 signalosome complex subunit 2	COPS2	76
P21728	D(1A) dopamine receptor	DRD1	63
Q7Z7J5	<i>Developmental pluripotency-associated protein 2</i>	DPPA2	73
O75912	Diacylglycerol kinase iota	DGKI	60
O95886	Disks large-associated protein 3	DLGAP3	57
Q9H1X3	DnaJ homolog subfamily C member 25	DNAJC25	117
Q5T447	E3 ubiquitin-protein ligase HECTD3	HECTD3	63
Q9H6Y7	E3 ubiquitin-protein ligase RNF167	RNF167	62
Q6AZZ1	E3 ubiquitin-protein ligase TRIM68	TRIM68	68
Q05215	Early growth response protein 4	EGR4	67
Q16206	Ecto-NOX disulfide-thiol exchanger 2	ENOX2	58
A8MZ26	<i>EF-hand calcium-binding domain-containing protein 9</i>	EFCAB9	79
Q9BY07	<i>Electrogenic sodium bicarbonate cotransporter 4</i>	SLC4A5	62
A0FGR8	Extended synaptotagmin-2	ESYT2	60
Q14332	Frizzled-2	FZD2	72
O75084	Frizzled-7	FZD7	94
Q86XJ1	GAS2-like protein 3	GAS2L3	82
P48167	Glycine receptor subunit beta	GLRB	85
Q08379	Golgin subfamily A member 2	GOLGA2	63
Q99578	GTP-binding protein Rit2	RIT2	64
O95837	Guanine nucleotide-binding protein subunit alpha-14	GNA14	91
Q02108	<i>Guanylate cyclase soluble subunit alpha-3</i>	GUCY1A3	67
O96004	Heart- and neural crest derivatives-expressed protein 1	HAND1	61

Q92598	Heat shock protein 105 kDa	HSPH1	69
P60608	HERV-F(c)2_7q36.2 provirus ancestral Env polyprotein	EFC2_HUMAN	58
Q99626	Homeobox protein CDX-2	CDX2	65
P17482	Homeobox protein Hox-B9	HOXB9	62
Q00444	<i>Homeobox protein Hox-C5</i>	HOXC5	59
A6NJT0	Homeobox protein unc-4 homolog	UNCX	58
Q8NBZ0	<i>INO80 complex subunit E</i>	INO80E	77
P14735	<i>Insulin-degrading enzyme</i>	IDE	87
P14316	Interferon regulatory factor 2	IRF2	57
Q8IYV9	Izumo sperm-egg fusion protein 1	IZUMO1	60
Q5VZ72	Izumo sperm-egg fusion protein 3	IZUMO3	56
Q7Z3Y9	Keratin, type I cytoskeletal 26	K1C26	57
Q96EK5	KIF1-binding protein	KIAA1279	75
O00522	<i>Krev interaction trapped protein 1</i>	KRIT1	61
Q9BYE3	Late cornified envelope protein 3D	LCE3D_HUMAN	59
Q9NZU5	LIM and cysteine-rich domains protein 1	LMCD1	66
P06858	Lipoprotein lipase	LPL	63
Q68DH5	LMBR1 domain-containing protein 2	LMBRD2	57
Q9H239	Matrix metalloproteinase-28	MMP28	74
A0JLT2	Mediator of RNA polymerase II transcription subunit 19	MED19	70
Q96AQ8	<i>Mitochondrial calcium uniporter regulator 1</i>	CCDC90A	56
Q9P0P8	Mitochondrial transcription rescue factor 1	MTRES1	105
Q99558	<i>Mitogen-activated protein kinase kinase kinase 14</i>	MAP3K14	70
Q9P2K5	Myelin expression factor 2	MYEF2	64
P05976	Myosin light chain 1/3, skeletal muscle isoform	MYL1	60
P19105	<i>Myosin regulatory light chain 12A</i>	MYL12A	78
O14950	Myosin regulatory light chain 12B	MYL12B	57
P24844	<i>Myosin regulatory light polypeptide 9</i>	MYL9	72
P48163	<i>NADP-dependent malic enzyme</i>	ME1	59
E9PAV3	Nascent polypeptide-associated complex subunit alpha	NACA	57
Q99608	Necdin	NDN	78
O00401	Neural Wiskott-Aldrich syndrome protein	WASL	60
Q13562	Neurogenic differentiation factor 1	NEUROD1	66

P29371	Neuromedin-K receptor	TACR3	67
Q69YI7	Nuclear apoptosis-inducing factor 1	NAIF1	62
Q9Y3N9	Olfactory receptor 2W1	OR2W1	58
Q15645	Pachytene checkpoint protein 2 homolog	TRIP13	93
Q8TE04	Pantothenate kinase 1	PANK1	69
Q9UQ90	<i>Paraplegin</i>	SPG7	64
Q96NR3	Patched domain-containing protein 1	PTCHD1	65
O75570	<i>Peptide chain release factor 1, mitochondrial</i>	MTRF1	91
F5H284	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase A-like 4D	PPIAL4D	60
P23942	Peripherin-2	PRPH2	69
O43189	PHD finger protein 1	PHF1	67
Q9P215	Pogo transposable element with KRAB domain	POGK	69
Q9NZM6	Polycystic kidney disease 2-like 2 protein	PKD2L2	69
Q5SY16	Polynucleotide 5'-hydroxyl-kinase NOL9	NOL9	59
Q96KK3	Potassium voltage-gated channel subfamily S member 1	KCNS1	66
Q6PIU1	Potassium voltage-gated channel subfamily V member 1	KCNV1	60
P61758	Prefoldin subunit 3	VBP1	90
Q99680	<i>Probable G-protein coupled receptor 22</i>	GPR22	77
Q5T4B2	Probable inactive glycosyltransferase 25 family member 3	CERCAM	96
O95456	Proteasome assembly chaperone 1	PSMG1	66
O15234	Protein CASC3	CASC3	60
P48745	<i>Protein NOV homolog</i>	NOV	56
P49757	Protein numb homolog	NUMB	66
B4DS77	Protein shisa-9	SHISA9	68
P60059	Protein transport protein Sec61 subunit gamma	SEC61G	61
Q5JUK9	<i>Putative G antigen family D member 1</i>	PAGE3	61
Q06416	Putative POU domain, class 5, transcription factor 1B	POU5F1B	90
Q96IC2	Putative RNA exonuclease NEF-sp	44M2.3	60
Q9Y6Q9	Putative uncharacterized protein ENSP00000380701	YQ045_HUMAN	61
A8MU76	<i>Putative UPF0607 protein ENSP00000381418</i>	N/A	60
A8MV72	Putative UPF0607 protein ENSP00000382826	N/A	82
A8MX80	<i>Putative UPF0607 protein ENSP00000383144</i>	N/A	72
Q92670	Putative zinc finger protein 75C	ZNF75CP	57

P43487	Ran-specific GTPase-activating protein	RANBP1	56
Q15404	Ras suppressor protein 1	RSU1	63
P11233	<i>Ras-related protein Ral-A</i>	RALA	58
Q5HYW3	Retrotransposon gag domain-containing protein 4	RGAG4	62
Q9UJK0	Ribosome biogenesis protein TSR3 homolog	TSR3	72
A6NCQ9	RING finger protein 222	RNF222	93
Q5JTH9	RRP12-like protein	RRP12	70
Q8WU08	<i>Serine/threonine-protein kinase 32A</i>	STK32A	82
P48995	Short transient receptor potential channel 1	TRPC1	62
Q8N7X8	SIGLEC family-like protein 1	SIGLECL1	65
P62314	<i>Small nuclear ribonucleoprotein Sm D1</i>	SNRPD1	72
Q9UKG4	Solute carrier family 13 member 4	SLC13A4	61
Q9BQ15	SOSS complex subunit B1	NABP2	56
Q9HB58	Sp110 nuclear body protein	SP110	65
Q8NHX4	<i>Spermatogenesis-associated protein 3</i>	SPATA3	66
Q8NB90	Spermatogenesis-associated protein 5	SPATA5	58
Q01081	<i>Splicing factor U2AF 35 kDa subunit</i>	U2AF1	90
Q9Y3M8	StAR-related lipid transfer protein 13	STARD13	57
Q13033	<i>Striatin-3</i>	STRN3	87
Q7Z422	<i>SUZ domain-containing protein 1</i>	SZRD1	59
Q6STE5	SWI/SNF-related matrix-associated actin-dependent regulator of chromatin subfamily D member 3	SMARCD3	66
Q6XYQ8	Synaptotagmin-10	SYT10	60
Q9BXF9	Tektin-3	TEKT3	117
Q9H2G4	<i>Testis-specific Y-encoded-like protein 2</i>	TSYL2_HUMAN	69
Q49AM3	Tetratricopeptide repeat protein 31	TTC31	88
Q6PGP7	Tetratricopeptide repeat protein 37	TTC37	62
Q92623	Tetratricopeptide repeat protein 9A	TTC9	61
Q9BT49	THAP domain-containing protein 7	THAP7	68
P05412	Transcription factor AP-1	JUN	73
P17535	<i>Transcription factor jun-D</i>	JUND	68
Q9Y5Q3	Transcription factor MafB	MAFB	61
Q15629	<i>Translocating chain-associated membrane protein 1</i>	TRAM1	57
Q8N609	<i>Translocating chain-associated membrane protein 1-like 1</i>	TRAM1L1	56

Q9UM00	Transmembrane and coiled-coil domain-containing protein 1	TMCO1	66
Q96AN5	Transmembrane protein 143	TMEM143	74
Q9H813	Transmembrane protein 206	TMEM206	60
Q9Y2B1	Transmembrane protein 5	TMEM5	62
Q7Z4G4	tRNA (guanine(10)-N2)-methyltransferase homolog	TRMT11	58
Q9UJT0	Tubulin epsilon chain	TUBE1	65
Q13454	Tumor suppressor candidate 3	TUSC3	67
O75317	Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase 12	USP12	68
Q9UPT9	<i>Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase 22</i>	UBP22	93
Q8WUN7	Ubiquitin domain-containing protein 2	UBTD	58
Q16763	<i>Ubiquitin-conjugating enzyme E2 S</i>	UBE2S	63
Q96C57	Uncharacterized protein C12orf43	C12orf43	68
Q6ZW13	Uncharacterized protein C16orf86	C16orf86	93
O00159	Unconventional myosin-Ic	MYO1C	65
Q9NRQ5	UPF0443 protein C11orf75	C11orf75	56
P15692	Vascular endothelial growth factor A	VEGFA	61
O60504	Vinexin	SORBS3	66
Q52LC2	V-type proton ATPase subunit S1-like protein	ATP6AP1L	60
Q8TAF7	Zinc finger protein 461	ZNF461	58
Q96N20	Zinc finger protein 75A	ZNF75A	68
P51815	Zinc finger protein 75D	ZNF75D	57
Q9UPG8	Zinc finger protein PLAGL2	PLAGL2	61

\*универсальные белки выделены курсивом.



Приложение 1Г. Белки и предсказанная для них классификация InterPro и категории GO в составе НПК крови условно ЗЖ.

Protein	InterPro classification	GO (Biological Process)	GO (Molecular Function)	GO (Cellular Component)
A2IDD5.1	IPR029329	None predicted	None predicted	None predicted
A2RTX5.1	IPR002320; IPR012675; IPR012676; IPR004095; IPR018163; IPR012947; IPR006195; IPR002314; IPR033728; IPR004154	GO:0006418 tRNA aminoacylation for protein translation; GO:0006435 threonyl-tRNA aminoacylation; GO:0043039 tRNA aminoacylation	GO:0000166 nucleotide binding; GO:0004812 aminoacyl-tRNA ligase activity; GO:0004829 threonine-tRNA ligase activity; GO:0005524 ATP binding; GO:0016876 ligase activity, forming aminoacyl-tRNA and related	GO:0005737 cytoplasm
A6NFT4.3	IPR025252	None predicted	None predicted	None predicted
A6NI15.1	IPR011598	None predicted	GO:0046983 protein dimerization activity	None predicted
A8MU76.2		None predicted	None predicted	None predicted
A8MUU9.3		None predicted	None predicted	None predicted
A8MX80.2		None predicted	None predicted	None predicted
A8MZ26.2	IPR011992; IPR002048	None predicted	GO:0005509 calcium ion binding	None predicted
C9J2P7.1	IPR028889; IPR001394; IPR006861; IPR018200	GO:0006511 ubiquitin-dependent protein catabolic process; GO:0016579 protein deubiquitination	GO:0036459 thiol-dependent ubiquitinyl hydrolase activity	None predicted
O00522.2	IPR032022; IPR020683; IPR019749; IPR000299; IPR014352; IPR019748; IPR002110	None predicted	GO:0005515 protein binding	GO:0005856 cytoskeleton
O14929.1	IPR017380; IPR019467; IPR016181	GO:0006348 chromatin silencing at telomere; GO:0016568 chromatin modification; GO:0016573 histone acetylation	GO:0004402 histone acetyltransferase activity	GO:0005634 nucleus
O15151.2	IPR016495; IPR015458; IPR003121; IPR001876; IPR013083; IPR001841	GO:0043066 negative regulation of apoptotic process; GO:0071157 negative regulation of cell cycle arrest	GO:0005515 protein binding; GO:0008270 zinc ion binding	GO:0005634 nucleus
O43307.3	IPR001452; IPR000219; IPR011993; IPR001849	GO:0035023 regulation of Rho protein signal transduction	GO:0005089 Rho guanyl-nucleotide exchange factor activity; GO:0005515 protein binding	None predicted
O43918.1	IPR008087; IPR004865; IPR010919; IPR000770; IPR013083; IPR011011; IPR001965; IPR019787; IPR019786	GO:0006959 humoral immune response	GO:0003677 DNA binding; GO:0005515 protein binding; GO:0008270 zinc ion binding; GO:0045182 translation regulator activity	GO:0005634 nucleus; GO:0005737 cytoplasm



O60941.1	IPR017432; IPR015153; IPR011992; IPR015154; IPR000433	None predicted	GO:0008270 zinc ion binding	None predicted
O75190.2	IPR001623; IPR018253	None predicted	None predicted	None predicted
O75310.1	IPR002213	GO:0008152 metabolic process	GO:0016758 transferase activity, transferring hexosyl groups	None predicted
O75354.3	IPR000407	None predicted	GO:0016787 hydrolase activity	None predicted
O75570.2	IPR005139; IPR014720; IPR000352	GO:0006415 translational termination	GO:0003747 translation release factor activity; GO:0016149 translation release factor activity, codon specific	GO:0005737 cytoplasm
O95198.2	IPR017096; IPR011333; IPR000210; IPR011705; IPR015916; IPR006652	None predicted	GO:0005515 protein binding	None predicted
O95670.1	IPR005124	GO:0015992 proton transport	GO:0016820 hydrolase activity, acting on acid anhydrides,	GO:0016471 vacuolar proton- transporting V-type ATPase complex
O96020.1	IPR013763; IPR006671; IPR004367	None predicted	None predicted	GO:0005634 nucleus
P00734.2	IPR001314; IPR003966; IPR000294; IPR017857; IPR013806; IPR000001; IPR018992; IPR009003; IPR001254; IPR018056; IPR018114; IPR033116	GO:0006508 proteolysis; GO:0007596 blood coagulation	GO:0004252 serine-type endopeptidase activity; GO:0005509 calcium ion binding	GO:0005576 extracellular region
P02795.1	IPR003019; IPR000006; IPR017854; IPR023587; IPR018064	None predicted	GO:0046872 metal ion binding	None predicted
P06744.4	IPR001672; IPR023096; IPR018189	GO:0006094 gluconeogenesis; GO:0006096 glycolytic process	GO:0004347 glucose-6-phosphate isomerase activity	None predicted
P08174.4	IPR000436	None predicted	None predicted	None predicted
P08311.2	IPR001314; IPR009003; IPR001254; IPR018114; IPR033116	GO:0006508 proteolysis	GO:0004252 serine-type endopeptidase activity	None predicted
P08588.2	IPR000276; IPR002233; IPR000507; IPR017452	GO:0007186 G-protein coupled receptor signaling pathway; GO:0007189 adenylate cyclase- activating G-protein coupled receptor; GO:0045823 positive regulation of heart contraction	GO:0004930 G-protein coupled receptor activity; GO:0004935 adrenergic receptor activity; GO:0004940 beta1-adrenergic receptor activity	GO:0016021 integral component of membrane
P11233.1	IPR001806; IPR020849; IPR027417; IPR005225	GO:0007165 signal transduction; GO:0007264 small GTPase mediated signal transduction	GO:0005525 GTP binding	GO:0016020 membrane

P11234.1	IPR001806; IPR020849; IPR027417; IPR005225	GO:0007165 signal transduction; GO:0007264 small GTPase mediated signal transduction	GO:0005525 GTP binding	GO:0016020 membrane
P14324.4	IPR000092; IPR008949	GO:0008299 isoprenoid biosynthetic process	None predicted	None predicted
P14735.4	IPR011249; IPR011237; IPR011765; IPR007863; IPR032632; IPR001431	GO:0006508 proteolysis	GO:0003824 catalytic activity; GO:0004222 metalloendopeptidase activity; GO:0046872 metal ion binding	None predicted
P17483.2	IPR017995; IPR009057; IPR001356; IPR020479; IPR001827; IPR017970	GO:0006355 regulation of transcription, DNA-templated	GO:0003677 DNA binding; GO:0003700 transcription factor activity, sequence-specific DNA; GO:0043565 sequence-specific DNA binding	GO:0005634 nucleus
P17535.3	IPR002112; IPR005643; IPR008917; IPR004827	GO:0006355 regulation of transcription, DNA-templated	GO:0003677 DNA binding; GO:0003700 transcription factor activity, sequence-specific DNA; GO:0043565 sequence-specific DNA binding	None predicted
P17812.2	IPR004468; IPR027417; IPR017456; IPR029062; IPR017926	GO:0006221 pyrimidine nucleotide biosynthetic process	GO:0003883 CTP synthase activity	None predicted
P17987.1	IPR002423; IPR017998; IPR012715; IPR027413; IPR027410; IPR027409; IPR002194	GO:0006457 protein folding	GO:0005524 ATP binding; GO:0051082 unfolded protein binding	None predicted
P18825.2	IPR000276; IPR002233; IPR000735; IPR017452	GO:0006940 regulation of smooth muscle contraction; GO:0007186 G-protein coupled receptor signaling pathway; GO:0019229 regulation of vasoconstriction; GO:0030168 platelet activation	GO:0004930 G-protein coupled receptor activity; GO:0004935 adrenergic receptor activity; GO:0004938 alpha2-adrenergic receptor activity	GO:0016021 integral component of membrane
P19105.2	IPR011992; IPR002048; IPR015070; IPR018247	None predicted	GO:0005509 calcium ion binding	None predicted
P20340.3	IPR001806; IPR027417; IPR005225	GO:0007264 small GTPase mediated signal transduction	GO:0005525 GTP binding	None predicted
P20592.1	IPR022812; IPR001401; IPR027417; IPR030381; IPR000375; IPR020850; IPR003130; IPR019762	None predicted	GO:0003924 GTPase activity; GO:0005525 GTP binding	None predicted
P23415.2	IPR006201; IPR006028; IPR008127; IPR008128; IPR006202; IPR006029; IPR018000	GO:0006810 transport; GO:0006811 ion transport; GO:0006821 chloride transport	GO:0005230 extracellular ligand-gated ion channel activity; GO:0016594 glycine binding; GO:0016934 extracellular-glycine-gated chloride channel activity; GO:0022824 transmitter-gated ion channel activity	GO:0005887 integral component of plasma membrane; GO:0016020 membrane; GO:0016021 integral component of membrane; GO:0045211 postsynaptic membrane

P23443.2	IPR016238; IPR011009; IPR000719; IPR000961; IPR017892; IPR017441; IPR008271	GO:0006468 protein phosphorylation; GO:0007165 signal transduction	GO:0004672 protein kinase activity; GO:0004674 protein serine/threonine kinase activity; GO:0005524 ATP binding	None predicted
P24298.3	IPR015424; IPR004839; IPR015421; IPR015422	GO:0009058 biosynthetic process	GO:0003824 catalytic activity; GO:0030170 pyridoxal phosphate binding	None predicted
P24844.4	IPR011992; IPR002048; IPR018247	None predicted	GO:0005509 calcium ion binding	None predicted
P25205.3	IPR031327; IPR008046; IPR012340; IPR027925; IPR027417; IPR001208; IPR003593; IPR018525	GO:0006260 DNA replication; GO:0006270 DNA replication initiation	GO:0003677 DNA binding; GO:0003678 DNA helicase activity; GO:0005524 ATP binding	GO:0005634 nucleus; GO:0042555 MCM complex
P29973.3	IPR005821; IPR014710; IPR018490; IPR000595; IPR032406; IPR018488	GO:0006811 ion transport; GO:0055085 transmembrane transport	GO:0005216 ion channel activity	GO:0016020 membrane
P30559.2	IPR000276; IPR001817; IPR002062; IPR017452	GO:0007186 G-protein coupled receptor signaling pathway	GO:0004930 G-protein coupled receptor activity; GO:0004990 oxytocin receptor activity; GO:0005000 vasopressin receptor activity	GO:0016021 integral component of membrane
P31271.3	IPR022067; IPR009057; IPR001356; IPR017970	GO:0006355 regulation of transcription, DNA-templated	GO:0003677 DNA binding; GO:0043565 sequence-specific DNA binding	None predicted
P31273.2	IPR009057; IPR001356; IPR020479; IPR001827; IPR000047; IPR017970	GO:0006355 regulation of transcription, DNA-templated	GO:0003677 DNA binding; GO:0003700 transcription factor activity, sequence-specific DNA; GO:0043565 sequence-specific DNA binding	None predicted
P34896.1	IPR001085; IPR015424; IPR015421; IPR015422; IPR019798	GO:0006544 glycine metabolic process; GO:0006563 L-serine metabolic process	GO:0003824 catalytic activity; GO:0004372 glycine hydroxymethyltransferase activity; GO:0016740 transferase activity; GO:0030170 pyridoxal phosphate binding	None predicted
P36980.1	IPR000436	None predicted	None predicted	None predicted
P40123.1	IPR013992; IPR017901; IPR016098; IPR013912; IPR006599; IPR018106; IPR028417	GO:0000902 cell morphogenesis; GO:0007010 cytoskeleton organization	GO:0003779 actin binding	None predicted
P48163.1	IPR001891; IPR012301; IPR016040; IPR012302; IPR015884	GO:0006108 malate metabolic process; GO:0055114 oxidation-reduction process	GO:0004470 malic enzyme activity; GO:0004471 malate dehydrogenase (decarboxylating) (NAD+) activity; GO:0051287 NAD binding	None predicted

P48745.1	IPR012395; IPR009030; IPR000867; IPR001007; IPR006208; IPR006207; IPR000884; IPR017891	GO:0001558 regulation of cell growth	GO:0005515 protein binding; GO:0005520 insulin-like growth factor binding	GO:0005576 extracellular region
P49137.1	IPR011009; IPR000719; IPR027442; IPR017441; IPR008271	GO:0006468 protein phosphorylation	GO:0004672 protein kinase activity; GO:0005524 ATP binding	None predicted
P50454.2	IPR023796; IPR023795	None predicted	None predicted	None predicted
P51665.2	IPR000555; IPR024969	None predicted	GO:0005515 protein binding	None predicted
P55010.2	IPR016189; IPR002735; IPR016190; IPR016024; IPR003307; IPR016021	GO:0006413 translational initiation	GO:0003743 translation initiation factor activity; GO:0005488 binding; GO:0005515 protein binding	None predicted
P62314.1	IPR010920; IPR001163	None predicted	None predicted	None predicted
Q00444.1	IPR017995; IPR009057; IPR001356; IPR020479; IPR001827; IPR017970	GO:0006355 regulation of transcription, DNA-templated	GO:0003677 DNA binding; GO:0003700 transcription factor activity, sequence-specific DNA; GO:0043565 sequence-specific DNA binding	GO:0005634 nucleus
Q00577.2	IPR006628	None predicted	None predicted	None predicted
Q01081.3	IPR009145; IPR000571; IPR012677; IPR000504; IPR003954	GO:0000398 mRNA splicing, via spliceosome	GO:0000166 nucleotide binding; GO:0003676 nucleic acid binding; GO:0003723 RNA binding; GO:0046872 metal ion binding	GO:0089701 U2AF
Q02108.2	IPR024096; IPR011644; IPR011645; IPR029787; IPR001054; IPR018297	GO:0006182 cGMP biosynthetic process; GO:0009190 cyclic nucleotide biosynthetic process; GO:0035556 intracellular signal transduction	GO:0004383 guanylate cyclase activity; GO:0016849 phosphorus-oxygen lyase activity; GO:0020037 heme binding	None predicted
Q03060.5	IPR001630; IPR003102; IPR004827	GO:0006355 regulation of transcription, DNA-templated	GO:0003677 DNA binding; GO:0003700 transcription factor activity, sequence-specific DNA; GO:0005515 protein binding; GO:0043565 sequence-specific DNA binding	GO:0005634 nucleus
Q03252.3	IPR001664; IPR001322; IPR018039	None predicted	GO:0005198 structural molecule activity	GO:0005882 intermediate filament
Q09MP3.1	IPR031419	None predicted	None predicted	None predicted
Q13033.3	IPR013258; IPR015943; IPR017986; IPR001680; IPR020472; IPR019775	None predicted	GO:0005515 protein binding	None predicted

Q13111.2	IPR022043; IPR003917; IPR029091; IPR029105; IPR001750; IPR010933	GO:0006120 mitochondrial electron transport, NADH to ubiquinone; GO:0055114 oxidation-reduction process	GO:0008137 NADH dehydrogenase (ubiquinone) activity	None predicted
Q13114.2	IPR012227; IPR013083; IPR001841; IPR008974; IPR013323; IPR001293; IPR002083; IPR017907	GO:0007165 signal transduction; GO:0016567 protein ubiquitination; GO:0042981 regulation of apoptotic process	GO:0004842 ubiquitin-protein transferase activity; GO:0005515 protein binding; GO:0008270 zinc ion binding	None predicted
Q13118.1	IPR015880; IPR013087; IPR007087	None predicted	GO:0003676 nucleic acid binding; GO:0046872 metal ion binding	None predicted
Q13243.1	IPR012677; IPR000504	None predicted	GO:0000166 nucleotide binding; GO:0003676 nucleic acid binding	None predicted
Q13394.1	IPR024810	None predicted	None predicted	None predicted
Q15391.1	IPR000276; IPR005466; IPR017452	GO:0007186 G-protein coupled receptor signaling pathway	GO:0004930 G-protein coupled receptor activity; GO:0045028 G-protein coupled purinergic nucleotide receptor	GO:0016021 integral component of membrane
Q15573.1	IPR016629	GO:0006360 transcription from RNA polymerase I promoter	None predicted	GO:0000120 RNA polymerase I transcription factor complex
Q15629.3	IPR016447; IPR013599; IPR006634	None predicted	None predicted	GO:0016021 integral component of membrane
Q15695.2	IPR009145; IPR000571; IPR012677; IPR000504; IPR003954	GO:0000398 mRNA splicing, via spliceosome	GO:0000166 nucleotide binding; GO:0003676 nucleic acid binding; GO:0003723 RNA binding; GO:0046872 metal ion binding	GO:0089701 U2AF
Q16514.1	IPR009072; IPR003228	GO:0006352 DNA-templated transcription, initiation	GO:0046982 protein heterodimerization activity	GO:0005669 transcription factor TFIID complex
Q16560.1	IPR012677; IPR000504	None predicted	GO:0000166 nucleotide binding; GO:0003676 nucleic acid binding	None predicted
Q16763.2	IPR016135; IPR000608; IPR023313	None predicted	None predicted	None predicted
Q210M5.2	IPR009030; IPR006212; IPR000884	None predicted	None predicted	None predicted
Q2M296.2	IPR002698; IPR024185; IPR012677; IPR000504	None predicted	GO:0000166 nucleotide binding; GO:0003676 nucleic acid binding	None predicted
Q2TB18.1	IPR006085; IPR029060	GO:0006281 DNA repair	GO:0004518 nuclease activity	None predicted
Q3YEC7.2	IPR001806; IPR027417	GO:0007264 small GTPase mediated signal transduction	GO:0005525 GTP binding	None predicted
Q56UQ5.2	IPR018105; IPR011057; IPR011323; IPR018103	None predicted	None predicted	None predicted
Q5EBN2.1	IPR013083; IPR001841; IPR000315;	None predicted	GO:0005515 protein binding; GO:0008270 zinc ion binding	GO:0005622 intracellular

	IPR017907			
Q5I0G3.1	IPR016040; IPR015955	GO:0005975 carbohydrate metabolic process; GO:0055114 oxidation-reduction process	GO:0003824 catalytic activity; GO:0016616 oxidoreductase activity, acting on the CH-OH group of	None predicted
Q5JPH6.2	IPR000924; IPR004527; IPR014729; IPR020058; IPR020061; IPR008925; IPR020751; IPR001412	GO:0006418 tRNA aminoacylation for protein translation; GO:0006424 glutamyl-tRNA aminoacylation; GO:0043039 tRNA aminoacylation	GO:0000049 tRNA binding; GO:0000166 nucleotide binding; GO:0004812 aminoacyl-tRNA ligase activity; GO:0004818 glutamate-tRNA ligase activity; GO:0005524 ATP binding; GO:0016876 ligase activity, forming aminoacyl-tRNA and related	GO:0005737 cytoplasm
Q5JUK9.1	IPR031320	None predicted	None predicted	None predicted
Q5T3I0.2	IPR000467	None predicted	GO:0003676 nucleic acid binding	None predicted
Q5T8R8.1		None predicted	None predicted	None predicted
Q5TG30.3	IPR008936; IPR000198	GO:0007165 signal transduction	None predicted	None predicted
Q5VIR6.1	IPR007234	None predicted	None predicted	None predicted
Q6H8Q1.2	IPR001781; IPR032402; IPR003128	GO:0007010 cytoskeleton organization	GO:0003779 actin binding; GO:0008270 zinc ion binding	None predicted
Q6NT55.1	IPR001128; IPR002401; IPR017972	GO:0055114 oxidation-reduction process	GO:0005506 iron ion binding; GO:0016705 oxidoreductase activity, acting on paired donors, with; GO:0020037 heme binding	None predicted
Q6NWX9.1	IPR001202; IPR002713	None predicted	GO:0005515 protein binding	None predicted
Q6NXG1.2	IPR012337; IPR012677; IPR000504	None predicted	GO:0000166 nucleotide binding; GO:0003676 nucleic acid binding	None predicted
Q6PCT2.3	IPR002857; IPR013083; IPR011011; IPR001965; IPR019787; IPR001810; IPR032675; IPR006553; IPR019786	None predicted	GO:0003677 DNA binding; GO:0005515 protein binding; GO:0008270 zinc ion binding	None predicted
Q6Y288.2	IPR003378; IPR029044	None predicted	GO:0016757 transferase activity, transferring glycosyl groups	GO:0016020 membrane
Q7LGA3.1	IPR005331; IPR027417	None predicted	GO:0008146 sulfotransferase activity	GO:0016021 integral component of membrane
Q7Z422.1	IPR024771; IPR024642	None predicted	None predicted	None predicted
Q7Z5M5.3	IPR012496	None predicted	None predicted	GO:0016021 integral component of membrane
Q7Z5R6.1	IPR029071; IPR000159; IPR011993; IPR001849	GO:0007165 signal transduction	None predicted	None predicted
Q7Z6I6.3	IPR008936; IPR000198	GO:0007165 signal transduction	None predicted	None predicted
Q7Z7J5.2	IPR003034; IPR025892;	None predicted	None predicted	None predicted

	IPR025891			
Q86UC2.1	IPR009290	None predicted	None predicted	None predicted
Q86UG4.2	IPR004156; IPR020846; IPR002350	GO:0006810 transport	GO:0005215 transporter activity; GO:0005515 protein binding	GO:0016020 membrane
Q86UT8.1	IPR028015	None predicted	None predicted	None predicted
Q86UX6.1	IPR011009; IPR000719; IPR017441; IPR008271	GO:0006468 protein phosphorylation	GO:0004672 protein kinase activity; GO:0005524 ATP binding	None predicted
Q8IV61.1	IPR000651; IPR023578; IPR001895; IPR011992; IPR002048; IPR020454; IPR002219; IPR018247	GO:0007264 small GTPase mediated signal transduction; GO:0035556 intracellular signal transduction	GO:0005085 guanyl-nucleotide exchange factor activity; GO:0005509 calcium ion binding	None predicted
Q8IV76.1	IPR000014	None predicted	None predicted	None predicted
Q8IX30.1	IPR000742; IPR001881; IPR009030; IPR024731; IPR026823; IPR011641; IPR000859; IPR018097; IPR000152; IPR013032	None predicted	GO:0005509 calcium ion binding; GO:0005515 protein binding	None predicted
Q8IXL9.1	IPR000048	None predicted	GO:0005515 protein binding	None predicted
Q8IXR9.3	IPR027878	None predicted	None predicted	None predicted
Q8N1L4.2	IPR001128	GO:0055114 oxidation-reduction process	GO:0005506 iron ion binding; GO:0016705 oxidoreductase activity, acting on paired donors, with; GO:0020037 heme binding	None predicted
Q8N4E4.2	IPR012336; IPR024253	None predicted	None predicted	None predicted
Q8N4N8.3	IPR027417; IPR001752; IPR019821	GO:0007018 microtubule-based movement	GO:0003777 microtubule motor activity; GO:0005524 ATP binding; GO:0008017 microtubule binding	None predicted
Q8N609.2	IPR016447; IPR013599; IPR006634	None predicted	None predicted	GO:0016021 integral component of membrane
Q8N7E2.1	IPR013083; IPR001841; IPR007087; IPR017907	None predicted	GO:0005515 protein binding; GO:0008270 zinc ion binding; GO:0046872 metal ion binding	None predicted
Q8NB16.1	IPR011009; IPR000719; IPR001245	GO:0006468 protein phosphorylation	GO:0004672 protein kinase activity; GO:0005524 ATP binding	None predicted
Q8NBZ0.1		None predicted	None predicted	None predicted
Q8NEA5.1		None predicted	None predicted	None predicted
Q8NGW1.1	IPR000276; IPR000725; IPR017452	GO:0007186 G-protein coupled receptor signaling pathway	GO:0004930 G-protein coupled receptor activity; GO:0004984 olfactory receptor activity	GO:0016021 integral component of membrane

Q8NHX4.2	IPR026717	None predicted	None predicted	None predicted
Q8TDX6.2	IPR008428; IPR029044	None predicted	GO:0008376 acetylgalactosaminyltransferase activity	GO:0032580 Golgi cisterna membrane
Q8WU08.2	IPR011009; IPR000719; IPR017441; IPR008271	GO:0006468 protein phosphorylation	GO:0004672 protein kinase activity; GO:0005524 ATP binding	None predicted
Q8WW32.2	IPR009071	None predicted	None predicted	None predicted
Q8WXA9.1	IPR012677; IPR000504	None predicted	GO:0000166 nucleotide binding; GO:0003676 nucleic acid binding	None predicted
Q8WXI4.1	IPR029069; IPR006683; IPR033120; IPR002913; IPR023393	None predicted	GO:0008289 lipid binding	None predicted
Q92187.1	IPR001675; IPR012163	GO:0006486 protein glycosylation	GO:0008373 sialyltransferase activity	GO:0030173 integral component of Golgi membrane
Q92599.4	IPR016491; IPR027417; IPR030379	None predicted	GO:0005525 GTP binding	None predicted
Q92665.3	IPR026299	None predicted	GO:0003735 structural constituent of ribosome	GO:0005763 mitochondrial small ribosomal subunit
Q92819.1	IPR029044; IPR001173	None predicted	None predicted	None predicted
Q92990.2	IPR013877	None predicted	None predicted	None predicted
Q96AQ8.1	IPR024461	None predicted	None predicted	None predicted
Q96BZ8.1	IPR019339	None predicted	None predicted	None predicted
Q96CM3.1	IPR020103; IPR006145; IPR006224	GO:0001522 pseudouridine synthesis; GO:0009451 RNA modification	GO:0003723 RNA binding; GO:0009982 pseudouridine synthase activity	None predicted
Q96HJ3.2		None predicted	None predicted	None predicted
Q96JC4.1	IPR001909; IPR015880; IPR013087; IPR007087	GO:0006355 regulation of transcription, DNA-templated	GO:0003676 nucleic acid binding; GO:0046872 metal ion binding	GO:0005622 intracellular
Q96LR9.2	IPR008405	GO:0006869 lipid transport; GO:0042157 lipoprotein metabolic process	GO:0008289 lipid binding	GO:0005576 extracellular region
Q96NF6.1		None predicted	None predicted	None predicted
Q96PB7.1	IPR011044; IPR022082; IPR003112	None predicted	None predicted	None predicted
Q99442.1	IPR004728; IPR011991	GO:0015031 protein transport	GO:0008565 protein transporter activity	GO:0016021 integral component of membrane
Q99558.2	IPR017425; IPR011009; IPR000719; IPR017441; IPR008271	GO:0006468 protein phosphorylation	GO:0004672 protein kinase activity; GO:0005524 ATP binding	None predicted
Q99680.2	IPR000276; IPR017452	GO:0007186 G-protein coupled receptor signaling pathway	GO:0004930 G-protein coupled receptor activity	GO:0016021 integral component of membrane



Q99683.1	IPR025136; IPR011009; IPR000719; IPR013761; IPR017441; IPR008271	GO:0006468 protein phosphorylation	GO:0004672 protein kinase activity; GO:0005524 ATP binding	None predicted
Q99784.4	IPR022082; IPR011044; IPR003112	None predicted	None predicted	None predicted
Q99999.1	IPR009729; IPR027417	GO:0009247 glycolipid biosynthetic process	GO:0001733 galactosylceramide sulfotransferase activity	GO:0005794 Golgi apparatus; GO:0016021 integral component of membrane
Q9BQG1.1	IPR000008; IPR001565	None predicted	GO:0005515 protein binding	GO:0016020 membrane
Q9BR76.1	IPR015048; IPR015943; IPR017986; IPR001680; IPR019775	None predicted	GO:0005515 protein binding	None predicted
Q9BRP8.1	IPR015362	None predicted	None predicted	None predicted
Q9BTM1.1	IPR002119; IPR009072; IPR007125; IPR032454; IPR032458	None predicted	GO:0003677 DNA binding; GO:0046982 protein heterodimerization activity	GO:0000786 nucleosome; GO:0005634 nucleus
Q9BUL5.1	IPR013083; IPR011011; IPR001965; IPR019787	None predicted	GO:0005515 protein binding; GO:0008270 zinc ion binding	None predicted
Q9BVV7.1	IPR013261	GO:0030150 protein import into mitochondrial matrix	None predicted	GO:0005744 mitochondrial inner membrane presequence translocase
Q9BY07.2	IPR003020; IPR003024; IPR013769; IPR016152; IPR011531	GO:0006810 transport; GO:0006820 anion transport	GO:0005215 transporter activity; GO:0005452 inorganic anion exchanger activity; GO:0008509 anion transmembrane transporter activity	GO:0016020 membrane; GO:0016021 integral component of membrane
Q9BY49.2	IPR002347; IPR016040	None predicted	None predicted	None predicted
Q9BZQ2.2	IPR006633; IPR011050; IPR012334; IPR006626	None predicted	None predicted	None predicted
Q9H000.2	IPR000571; IPR013083; IPR001841; IPR018957; IPR017907	None predicted	GO:0005515 protein binding; GO:0008270 zinc ion binding; GO:0046872 metal ion binding	None predicted
Q9H2G4.1	IPR002164	GO:0006334 nucleosome assembly	None predicted	GO:0005634 nucleus
Q9H974.1	IPR002616; IPR028592	GO:0006400 tRNA modification; GO:0008616 queuosine biosynthetic process	GO:0008479 queuine tRNA-ribosyltransferase activity	None predicted
Q9HD33.2	IPR010729	GO:0006412 translation	GO:0003735 structural constituent of ribosome	GO:0005761 mitochondrial ribosome
Q9HD90.2	IPR016637; IPR011598; IPR022575	GO:0006355 regulation of transcription, DNA-templated; GO:0007399 nervous system development	GO:0046983 protein dimerization activity	None predicted

Q9NR83.4	IPR015880; IPR007087	None predicted	GO:0046872 metal ion binding	None predicted
Q9NSI5.2	IPR000996; IPR013783; IPR007110; IPR013098; IPR003599	GO:0006886 intracellular protein transport; GO:0016192 vesicle-mediated transport	GO:0005198 structural molecule activity; GO:0005515 protein binding	GO:0030130 clathrin coat of trans-Golgi network vesicle; GO:0030132 clathrin coat of coated pit
Q9NV88.2	IPR001279; IPR022712	None predicted	None predicted	None predicted
Q9NXH9.1	IPR002905; IPR029063; IPR000571	GO:0008033 tRNA processing	GO:0003723 RNA binding; GO:0004809 tRNA (guanine-N2-)-methyltransferase activity; GO:0046872 metal ion binding	None predicted
Q9NYB5.1	IPR004156; IPR020846; IPR002350	GO:0006810 transport	GO:0005215 transporter activity; GO:0005515 protein binding	GO:0016020 membrane
Q9NYL4.1	IPR001179	GO:0006457 protein folding	None predicted	None predicted
Q9P126.2	IPR016187; IPR016186; IPR001304	None predicted	None predicted	None predicted
Q9UKY7.1	IPR026806	None predicted	None predicted	None predicted
Q9ULL5.2	IPR025451	None predicted	None predicted	None predicted
Q9UPT9.2	IPR013083; IPR001607; IPR028889; IPR001394; IPR018200	GO:0006511 ubiquitin-dependent protein catabolic process; GO:0016579 protein deubiquitination	GO:0008270 zinc ion binding; GO:0036459 thiol-dependent ubiquitinyl hydrolase activity	None predicted
Q9UQ90.2	IPR005936; IPR011546; IPR027417; IPR003593; IPR003959; IPR000642	GO:0006508 proteolysis	GO:0004222 metalloendopeptidase activity; GO:0005524 ATP binding; GO:0008270 zinc ion binding	GO:0016020 membrane; GO:0016021 integral component of membrane
Q9Y324.1	IPR006984; IPR029060; IPR002716	None predicted	None predicted	GO:0032040 small-subunit processome
Q9Y383.2	IPR004882	GO:0006376 mRNA splice site selection	GO:0003729 mRNA binding	GO:0005685 U1 snRNP
Q9Y3C8.3	IPR014806; IPR016135	None predicted	None predicted	None predicted
Q9Y639.2	IPR016243; IPR013783; IPR007110; IPR003599; IPR003598	GO:0007169 transmembrane receptor protein tyrosine kinase signaling	GO:0004714 transmembrane receptor protein tyrosine kinase activity; GO:0005515 protein binding	None predicted

Приложение 1Д. Белки и предсказанная для них классификация InterPro и категории GO в составе НКК больных РМЖ.

Protein	InterPro classification	GO (Biological Process)	GO (Molecular Function)	GO (Cellular Component)
A0FGR8.1	IPR031468; IPR000008	None predicted	GO:0005515 protein binding; GO:0008289 lipid binding	None predicted
A0JLT2.2	IPR019403	GO:0006357 regulation of transcription from RNA polymerase II	GO:0001104 RNA polymerase II transcription cofactor activity	GO:0016592 mediator complex
A2IDD5.1	IPR029329	None predicted	None predicted	None predicted
A6NCQ9.1	IPR013083; IPR001841; IPR027370; IPR017907	None predicted	GO:0005515 protein binding; GO:0008270 zinc ion binding	None predicted
A6NJT0.1	IPR009057; IPR001356; IPR017970	GO:0006355 regulation of transcription, DNA-templated	GO:0003677 DNA binding; GO:0043565 sequence-specific DNA binding	None predicted
A8MU76.2		None predicted	None predicted	None predicted
A8MV72.2		None predicted	None predicted	None predicted
A8MX80.2		None predicted	None predicted	None predicted
A8MZ26.2	IPR011992; IPR002048	None predicted	GO:0005509 calcium ion binding	None predicted
B4DS77.3	IPR026910	None predicted	None predicted	None predicted
E9PAV3.1		None predicted	None predicted	None predicted
F5H284.1	IPR024936; IPR029000; IPR002130; IPR020892	GO:0000413 protein peptidyl-prolyl isomerization; GO:0006457 protein folding	GO:0003755 peptidyl-prolyl cis-trans isomerase activity	None predicted
O00159.4	IPR027417; IPR001609; IPR010926; IPR000048	None predicted	GO:0003774 motor activity; GO:0005515 protein binding; GO:0005524 ATP binding	GO:0016459 myosin complex
O00401.2	IPR011993; IPR000697; IPR000095; IPR011026; IPR003124	GO:0007015 actin filament organization	GO:0003779 actin binding	None predicted
O00522.2	IPR032022; IPR020683; IPR019749; IPR000299; IPR014352; IPR019748; IPR002110	None predicted	GO:0005515 protein binding	GO:0005856 cytoskeleton
O14950.2	IPR011992; IPR002048; IPR015070; IPR018247	None predicted	GO:0005509 calcium ion binding	None predicted
O15234.2	IPR018545	None predicted	None predicted	None predicted
O15392.3	IPR001370	None predicted	None predicted	None predicted
O43189.3	IPR002999; IPR013083; IPR011011; IPR001965; IPR019787; IPR025894; IPR019786	None predicted	GO:0005515 protein binding; GO:0008270 zinc ion binding	None predicted
O60504.2	IPR003127; IPR001452	None predicted	GO:0005515 protein binding	None predicted
O75084.2	IPR000539; IPR020067; IPR017981	GO:0007166 cell surface receptor signaling pathway	GO:0004888 transmembrane signaling receptor activity; GO:0005515 protein binding	GO:0016020 membrane
O75317.2	IPR028889; IPR001394; IPR018200	GO:0006511 ubiquitin-dependent protein catabolic process; GO:0016579 protein deubiquitination	GO:0036459 thiol-dependent ubiquitinyl hydrolase activity	None predicted

O75570.2	IPR005139; IPR014720; IPR000352	GO:0006415 translational termination	GO:0003747 translation release factor activity; GO:0016149 translation release factor activity, codon specific	GO:0005737 cytoplasm
O75912.1	IPR002219; IPR001206; IPR016064; IPR000756; IPR020683; IPR002110	GO:0007205 protein kinase C-activating G-protein coupled receptor; GO:0035556 intracellular signal transduction	GO:0004143 diacylglycerol kinase activity; GO:0005515 protein binding; GO:0016301 kinase activity	None predicted
O95236.3	IPR008405	GO:0006869 lipid transport; GO:0042157 lipoprotein metabolic process	GO:0008289 lipid binding	GO:0005576 extracellular region
O95260.2	IPR017137; IPR007471; IPR007472; IPR016181	GO:0016598 protein arginylation	GO:0004057 arginyltransferase activity	None predicted
O95456.1	IPR016565	GO:0043248 proteasome assembly	None predicted	GO:0005783 endoplasmic reticulum
O95837.1	IPR001019; IPR000654; IPR027417; IPR011025	GO:0007165 signal transduction; GO:0007186 G- protein coupled receptor signaling pathway	GO:0001664 G-protein coupled receptor binding; GO:0003924 GTPase activity; GO:0004871 signal transducer activity; GO:0005525 GTP binding; GO:0019001 guanyl nucleotide binding; GO:0031683 G-protein beta/gamma-subunit complex binding	None predicted
O95886.3	IPR005026	GO:0023052 signaling	None predicted	None predicted
O96004.1	IPR011598	None predicted	GO:0046983 protein dimerization activity	None predicted
P05412.2	IPR002112; IPR005643; IPR008917; IPR004827	GO:0006355 regulation of transcription, DNA-templated	GO:0003677 DNA binding; GO:0003700 transcription factor activity, sequence-specific DNA; GO:0043565 sequence-specific DNA binding	None predicted
P05976.3	IPR011992; IPR002048	None predicted	GO:0005509 calcium ion binding	None predicted
P06858.1	IPR000734; IPR016272; IPR002330; IPR029058; IPR013818; IPR001024	GO:0006629 lipid metabolic process	GO:0004465 lipoprotein lipase activity; GO:0005515 protein binding; GO:0052689 carboxylic ester hydrolase activity	None predicted
P08588.2	IPR000276; IPR002233; IPR000507; IPR017452	GO:0007186 G-protein coupled receptor signaling pathway; GO:0007189 adenylate cyclase-activating G-protein coupled receptor; GO:0045823 positive regulation of heart contraction	GO:0004930 G-protein coupled receptor activity; GO:0004935 adrenergic receptor activity; GO:0004940 beta1-adrenergic receptor activity	GO:0016021 integral component of membrane
P11233.1	IPR001806; IPR020849; IPR027417; IPR005225	GO:0007165 signal transduction; GO:0007264 small GTPase mediated signal transduction	GO:0005525 GTP binding	GO:0016020 membrane
P14316.2	IPR017431; IPR011991; IPR001346; IPR019817	GO:0006355 regulation of transcription, DNA-templated	GO:0000975 regulatory region DNA binding; GO:0003700 transcription factor activity, sequence-specific DNA	None predicted
P14735.4	IPR011249; IPR011237; IPR011765; IPR007863; IPR032632; IPR001431	GO:0006508 proteolysis	GO:0003824 catalytic activity; GO:0004222 metalloendopeptidase activity; GO:0046872 metal ion binding	None predicted
P15692.2	IPR029034; IPR000072; IPR027928; IPR023581	None predicted	GO:0008083 growth factor activity; GO:0008201 heparin binding	GO:0016020 membrane

P17482.2	IPR017112; IPR006711; IPR009057; IPR001356; IPR020479; IPR017970	GO:0006351 transcription, DNA-templated; GO:0006355 regulation of transcription, DNA-templated	GO:0003677 DNA binding; GO:0043565 sequence-specific DNA binding	GO:0005634 nucleus
P17535.3	IPR002112; IPR005643; IPR008917; IPR004827	GO:0006355 regulation of transcription, DNA-templated	GO:0003677 DNA binding; GO:0003700 transcription factor activity, sequence-specific DNA; GO:0043565 sequence-specific DNA binding	None predicted
P19105.2	IPR011992; IPR002048; IPR015070; IPR018247	None predicted	GO:0005509 calcium ion binding	None predicted
P21728.1	IPR000276; IPR000929; IPR001413; IPR017452	GO:0007186 G-protein coupled receptor signaling pathway; GO:0010579 positive regulation of adenylate cyclase activity; GO:0042311 vasodilation	GO:0004930 G-protein coupled receptor activity; GO:0004952 dopamine neurotransmitter receptor activity	GO:0005887 integral component of plasma membrane; GO:0016021 integral component of membrane
P23526.4	IPR000043; IPR016040; IPR015878; IPR020082	GO:0006730 one-carbon metabolic process	GO:0004013 adenosylhomocysteinase activity	None predicted
P23942.1	IPR018499; IPR000830; IPR008952; IPR018498	GO:0007601 visual perception	None predicted	GO:0016021 integral component of membrane
P24844.4	IPR011992; IPR002048; IPR018247	None predicted	GO:0005509 calcium ion binding	None predicted
P29371.1	IPR000276; IPR001681; IPR001013; IPR017452	GO:0007186 G-protein coupled receptor signaling pathway	GO:0004930 G-protein coupled receptor activity; GO:0004995 tachykinin receptor activity	GO:0005886 plasma membrane; GO:0016021 integral component of membrane
P29466.1	IPR017350; IPR011029; IPR001315; IPR029030; IPR015917; IPR001309; IPR002138; IPR016129; IPR033139	GO:0006508 proteolysis; GO:0006915 apoptotic process; GO:0042981 regulation of apoptotic process	GO:0004197 cysteine-type endopeptidase activity; GO:0008234 cysteine-type peptidase activity	None predicted
P32754.2	IPR005956; IPR029068; IPR004360	GO:0009072 aromatic amino acid family metabolic process; GO:0055114 oxidation-reduction process	GO:0003868 4- hydroxyphenylpyruvate dioxygenase activity; GO:0016701 oxidoreductase activity, acting on single donors with	None predicted
P43487.1	IPR011993; IPR000156	GO:0046907 intracellular transport	None predicted	None predicted
P46777.3	IPR005485; IPR025607	GO:0006412 translation	GO:0003735 structural constituent of ribosome; GO:0008097 5S rRNA binding	GO:0005622 intracellular; GO:0005840 ribosome
P48163.1	IPR001891; IPR012301; IPR016040; IPR012302; IPR015884	GO:0006108 malate metabolic process; GO:0055114 oxidation- reduction process	GO:0004470 malic enzyme activity; GO:0004471 malate dehydrogenase (decarboxylating) (NAD <sup>+</sup> ) activity; GO:0051287 NAD binding	None predicted
P48167.1	IPR006201; IPR008060; IPR006202; IPR006029; IPR018000	GO:0006810 transport; GO:0006811 ion transport; GO:0006821 chloride transport	GO:0005230 extracellular ligand- gated ion channel activity; GO:0016934 extracellular-glycine- gated chloride channel activity	GO:0016020 membrane; GO:0016021 integral component of membrane; GO:0045211 postsynaptic membrane
P48745.1	IPR012395; IPR009030; IPR000867; IPR001007; IPR006208; IPR006207; IPR000884; IPR017891	GO:0001558 regulation of cell growth	GO:0005515 protein binding; GO:0005520 insulin-like growth factor binding	GO:0005576 extracellular region
P48751.2	IPR003020; IPR001717; IPR002979; IPR016152; IPR013769; IPR011531; IPR018241	GO:0006810 transport; GO:0006820 anion transport	GO:0005215 transporter activity; GO:0005452 inorganic anion exchanger activity; GO:0008509 anion transmembrane transporter	GO:0016020 membrane; GO:0016021 integral component of membrane

			activity	
P48995.1	IPR004729; IPR002153; IPR005457; IPR020683; IPR013555; IPR005821; IPR002110	GO:0006811 ion transport; GO:0055085 transmembrane transport; GO:0070588 calcium ion transmembrane transport	GO:0005216 ion channel activity; GO:0005262 calcium channel activity; GO:0005515 protein binding	GO:0016020 membrane; GO:0016021 integral component of membrane
P49757.2	IPR016698; IPR011993; IPR006020; IPR010449	None predicted	GO:0005515 protein binding	None predicted
P51815.2	IPR008916; IPR003309; IPR001909; IPR015880; IPR013087; IPR007087	GO:0006355 regulation of transcription, DNA-templated	GO:0003676 nucleic acid binding; GO:0003700 transcription factor activity, sequence-specific DNA; GO:0046872 metal ion binding	GO:0005622 intracellular
P60059.1	IPR001901; IPR008158; IPR022943; IPR023391	GO:0006605 protein targeting; GO:0006886 intracellular protein transport; GO:0015031 protein transport	GO:0015450 P-P-bond-hydrolysis- driven protein transmembrane	GO:0016020 membrane
P60608.1	IPR018154	None predicted	None predicted	None predicted
P61201.1	IPR011990; IPR000717; IPR011991	None predicted	GO:0005515 protein binding	None predicted
P61758.3	IPR009053; IPR004127; IPR016655	GO:0006457 protein folding	None predicted	GO:0016272 prefoldin complex
P62314.1	IPR010920; IPR001163	None predicted	None predicted	None predicted
Q00444.1	IPR017995; IPR009057; IPR001356; IPR020479; IPR001827; IPR017970	GO:0006355 regulation of transcription, DNA-templated	GO:0003677 DNA binding; GO:0003700 transcription factor activity, sequence-specific DNA; GO:0043565 sequence-specific DNA binding	GO:0005634 nucleus
Q01081.3	IPR009145; IPR000571; IPR012677; IPR000504; IPR003954	GO:0000398 mRNA splicing, via spliceosome	GO:0000166 nucleotide binding; GO:0003676 nucleic acid binding; GO:0003723 RNA binding; GO:0046872 metal ion binding	GO:0089701 U2AF
Q02108.2	IPR024096; IPR011644; IPR011645; IPR029787; IPR001054; IPR018297	GO:0006182 cGMP biosynthetic process; GO:0009190 cyclic nucleotide biosynthetic process; GO:0035556 intracellular signal transduction	GO:0004383 guanylate cyclase activity; GO:0016849 phosphorus- oxygen lyase activity; GO:0020037 heme binding	None predicted
Q03060.5	IPR001630; IPR003102; IPR004827	GO:0006355 regulation of transcription, DNA-templated	GO:0003677 DNA binding; GO:0003700 transcription factor activity, sequence-specific DNA; GO:0005515 protein binding; GO:0043565 sequence-specific DNA binding	GO:0005634 nucleus
Q03591.2	IPR000436	None predicted	None predicted	None predicted
Q05215.3	IPR015880; IPR013087; IPR007087	None predicted	GO:0003676 nucleic acid binding; GO:0046872 metal ion binding	None predicted
Q06416.2	IPR010982; IPR000327; IPR013847; IPR009057; IPR001356; IPR017970	GO:0006355 regulation of transcription, DNA-templated	GO:0003677 DNA binding; GO:0003700 transcription factor activity, sequence-specific DNA; GO:0043565 sequence-specific DNA binding	None predicted
Q08379.3	IPR024858	None predicted	None predicted	GO:0005794 Golgi apparatus

Q13033.3	IPR013258; IPR015943; IPR017986; IPR001680; IPR020472; IPR019775	None predicted	GO:0005515 protein binding	None predicted
Q13454.1	IPR021149; IPR012336	None predicted	None predicted	None predicted
Q13562.3	IPR016637; IPR011598; IPR022575	GO:0006355 regulation of transcription, DNA-templated; GO:0007399 nervous system development	GO:0046983 protein dimerization activity	None predicted
Q14332.1	IPR000539; IPR020067; IPR017981	GO:0007166 cell surface receptor signaling pathway	GO:0004888 transmembrane signaling receptor activity; GO:0005515 protein binding	GO:0016020 membrane
Q15404.3	IPR032675; IPR003591; IPR001611	None predicted	GO:0005515 protein binding	None predicted
Q15629.3	IPR016447; IPR013599; IPR006634	None predicted	None predicted	GO:0016021 integral component of membrane
Q15645.2	IPR001270; IPR027417; IPR003593; IPR003959; IPR003960	None predicted	GO:0005524 ATP binding	None predicted
Q16206.2	IPR012677; IPR000504	None predicted	GO:0000166 nucleotide binding; GO:0003676 nucleic acid binding	None predicted
Q16763.2	IPR016135; IPR000608; IPR023313	None predicted	None predicted	None predicted
Q49AM3.3	IPR011990; IPR013026; IPR019734	None predicted	GO:0005515 protein binding	None predicted
Q52LC2.1	IPR024722	None predicted	None predicted	None predicted
Q5EG05.1	IPR011029; IPR001315	GO:0042981 regulation of apoptotic process	None predicted	None predicted
Q5HYW3.1	IPR032549	None predicted	None predicted	None predicted
Q5JTH9.2	IPR016024; IPR011989; IPR012978	None predicted	GO:0005488 binding	None predicted
Q5JUK9.1	IPR000883; IPR031320; IPR023616; IPR023615	GO:0009060 aerobic respiration; GO:0055114 oxidation-reduction process	GO:0004129 cytochrome-c oxidase activity; GO:0005506 iron ion binding; GO:0009055 electron carrier activity; GO:0020037 heme binding	GO:0016021 integral component of membrane
Q5SY16.1	IPR032319	None predicted	None predicted	None predicted
Q5T447.1	IPR008979; IPR004939; IPR000569	None predicted	GO:0004842 ubiquitin-protein transferase activity	None predicted
Q5T4B2.1	IPR002654; IPR029044	None predicted	None predicted	None predicted
Q5VZ72.4	IPR029389; IPR001128	GO:0055114 oxidation- reduction process	GO:0005506 iron ion binding; GO:0016705 oxidoreductase activity, acting on paired donors, with; GO:0020037 heme binding	None predicted
Q68DH5.1	IPR006876	None predicted	None predicted	None predicted
Q69YI7.1	IPR028002	None predicted	None predicted	None predicted
Q6AZZ1.1	IPR013083; IPR001841; IPR000315; IPR001870; IPR013320; IPR003879; IPR006574; IPR003877; IPR017907	None predicted	GO:0005515 protein binding; GO:0008270 zinc ion binding	GO:0005622 intracellular
Q6PGP7.1	IPR013026; IPR011990; IPR019734	None predicted	GO:0005515 protein binding	None predicted

Q6PIU1.2	IPR028325; IPR003968; IPR003970; IPR011333; IPR000210; IPR003131; IPR027359; IPR005821	GO:0006811 ion transport; GO:0006813 potassium ion transport; GO:0051260 protein homooligomerization; GO:0055085 transmembrane transport	GO:0005216 ion channel activity; GO:0005249 voltage-gated potassium channel activity; GO:0005515 protein binding	GO:0008076 voltage-gated potassium channel complex; GO:0016020 membrane
Q6STE5.1	IPR003121; IPR019835	None predicted	GO:0005515 protein binding	None predicted
Q6XYQ8.1	IPR000008; IPR001565	None predicted	GO:0005515 protein binding	GO:0016020 membrane
Q6Y288.2	IPR003378; IPR029044	None predicted	GO:0016757 transferase activity, transferring glycosyl groups	GO:0016020 membrane
Q6ZW13.2	IPR031516	None predicted	None predicted	None predicted
Q75V66.1	IPR007632; IPR032394	None predicted	GO:0046983 protein dimerization activity	None predicted
Q7Z3Y9.2	IPR001664; IPR002957	None predicted	GO:0005198 structural molecule activity	GO:0005882 intermediate filament
Q7Z422.1	IPR024771; IPR024642	None predicted	None predicted	None predicted
Q7Z4G4.1	IPR016691; IPR029063; IPR000241; IPR002052	GO:0032259 methylation	GO:0003676 nucleic acid binding; GO:0008168 methyltransferase activity	None predicted
Q7Z5R6.1	IPR029071; IPR000159; IPR011993; IPR001849	GO:0007165 signal transduction	None predicted	None predicted
Q7Z7J5.2	IPR003034; IPR025892; IPR025891	None predicted	None predicted	None predicted
Q86W34.2	IPR012962; IPR024079	None predicted	GO:0008237 metalloproteinase activity; GO:0008270 zinc ion binding	None predicted
Q86XJ1.1	IPR001715; IPR003108	None predicted	GO:0005515 protein binding; GO:0008017 microtubule binding	None predicted
Q8IYV9.2	IPR029389; IPR013783; IPR007110; IPR032699	None predicted	GO:0005515 protein binding	None predicted
Q8N609.2	IPR016447; IPR013599; IPR006634	None predicted	None predicted	GO:0016021 integral component of membrane
Q8N7X8.1	IPR013783; IPR007110	None predicted	GO:0005515 protein binding	None predicted
Q8NB90.3	IPR009010; IPR027417; IPR003593; IPR003959; IPR003960	None predicted	GO:0005524 ATP binding	None predicted
Q8NBZ0.1		None predicted	None predicted	None predicted
Q8NEC5.3	IPR027359; IPR005821	GO:0006811 ion transport; GO:0055085 transmembrane transport	GO:0005216 ion channel activity	GO:0016020 membrane
Q8NHX4.2	IPR026717	None predicted	None predicted	None predicted
Q8TAF7.2	IPR001909; IPR015880; IPR007087; IPR013087	GO:0006355 regulation of transcription, DNA-templated	GO:0003676 nucleic acid binding; GO:0046872 metal ion binding	GO:0005622 intracellular
Q8TE04.2	IPR004567; IPR000440	GO:0015937 coenzyme A biosynthetic process; GO:0055114 oxidation- reduction process	GO:0004594 pantothenate kinase activity; GO:0005524 ATP binding; GO:0008137 NADH dehydrogenase (ubiquinone) activity	None predicted
Q8TF01.2	IPR031937	None predicted	None predicted	None predicted
Q8WU08.2	IPR011009; IPR000719; IPR017441; IPR008271	GO:0006468 protein phosphorylation	GO:0004672 protein kinase activity; GO:0005524 ATP binding	None predicted



Q8WUN7.2	IPR032752; IPR029071; IPR000626	None predicted	GO:0005515 protein binding; GO:0043130 ubiquitin binding	None predicted
Q92598.1	IPR013126; IPR029047; IPR029048; IPR018181	None predicted	None predicted	None predicted
Q92623.3	IPR011990; IPR013026; IPR019734; IPR013105	None predicted	GO:0005515 protein binding	None predicted
Q92670.2	IPR008916; IPR003309; IPR001909; IPR015880; IPR013087; IPR007087	GO:0006355 regulation of transcription, DNA-templated	GO:0003676 nucleic acid binding; GO:0003700 transcription factor activity, sequence-specific DNA; GO:0046872 metal ion binding	GO:0005622 intracellular
Q969X2.1	IPR001675	GO:0006486 protein glycosylation	GO:0008373 sialyltransferase activity	None predicted
Q96AN5.1	IPR022227	None predicted	None predicted	None predicted
Q96AQ8.1	IPR024461	None predicted	None predicted	None predicted
Q96C57.2		None predicted	None predicted	None predicted
Q96EK5.1	IPR022083; IPR011990	None predicted	GO:0005515 protein binding	None predicted
Q96IC2.1	IPR012337; IPR013520; IPR012677; IPR000504	None predicted	GO:0000166 nucleotide binding; GO:0003676 nucleic acid binding	None predicted
Q96KK3.2	IPR028325; IPR003968; IPR003971; IPR011333; IPR000210; IPR003131; IPR027359; IPR005821	GO:0006811 ion transport; GO:0006813 potassium ion transport; GO:0051260 protein homooligomerization; GO:0055085 transmembrane transport	GO:0005216 ion channel activity; GO:0005249 voltage-gated potassium channel activity; GO:0005515 protein binding	GO:0008076 voltage-gated potassium channel complex; GO:0016020 membrane
Q96N20.1	IPR001909; IPR015880; IPR013087; IPR007087	GO:0006355 regulation of transcription, DNA-templated	GO:0003676 nucleic acid binding; GO:0046872 metal ion binding	GO:0005622 intracellular
Q96NR3.2	IPR003392; IPR000731	None predicted	None predicted	GO:0016021 integral component of membrane
Q99558.2	IPR017425; IPR011009; IPR000719; IPR017441; IPR008271	GO:0006468 protein phosphorylation	GO:0004672 protein kinase activity; GO:0005524 ATP binding	None predicted
Q99578.1	IPR001806; IPR020849; IPR027417; IPR005225	GO:0007165 signal transduction; GO:0007264 small GTPase mediated signal transduction	GO:0005525 GTP binding	GO:0016020 membrane
Q99608.1	IPR002190	None predicted	None predicted	None predicted
Q99626.3	IPR006820; IPR009057; IPR001356; IPR020479; IPR000047; IPR017970	GO:0006355 regulation of transcription, DNA-templated; GO:0007275 multicellular organism development	GO:0003677 DNA binding; GO:0043565 sequence-specific DNA binding	GO:0005634 nucleus
Q99680.2	IPR000276; IPR017452	GO:0007186 G-protein coupled receptor signaling pathway	GO:0004930 G-protein coupled receptor activity	GO:0016021 integral component of membrane
Q9BQ15.1	IPR012340; IPR004365	None predicted	GO:0003676 nucleic acid binding	None predicted
Q9BT49.2	IPR006612	None predicted	GO:0003676 nucleic acid binding	None predicted
Q9BXF9.1	IPR000435	None predicted	None predicted	None predicted
Q9BY07.2	IPR003020; IPR003024; IPR013769; IPR016152; IPR011531	GO:0006810 transport; GO:0006820 anion transport	GO:0005215 transporter activity; GO:0005452 inorganic anion exchanger activity; GO:0008509 anion transmembrane transporter activity	GO:0016020 membrane; GO:0016021 integral component of membrane
Q9BYE3.1	IPR028205	GO:0008544 epidermis	None predicted	None predicted

		development		
Q9H1X3.1	IPR001623	None predicted	None predicted	None predicted
Q9H239.2	IPR021190; IPR016293; IPR002477; IPR024079; IPR006026; IPR001818; IPR033739; IPR000585; IPR018487	GO:0006508 proteolysis	GO:0004222 metalloendopeptidase activity; GO:0005509 calcium ion binding; GO:0008237 metallopeptidase activity; GO:0008270 zinc ion binding	GO:0031012 extracellular matrix
Q9H2G4.1	IPR002164	GO:0006334 nucleosome assembly	None predicted	GO:0005634 nucleus
Q9H6E4.1	IPR026321	None predicted	None predicted	None predicted
Q9H6Y7.1	IPR003137; IPR013083; IPR001841; IPR011016	None predicted	GO:0005515 protein binding; GO:0008270 zinc ion binding	None predicted
Q9H813.1	IPR029366	None predicted	None predicted	None predicted
Q9HB58.5	IPR004865; IPR010919; IPR000770; IPR013083; IPR011011; IPR001965; IPR019787; IPR001487; IPR019786	None predicted	GO:0003677 DNA binding; GO:0005515 protein binding; GO:0008270 zinc ion binding	GO:0005634 nucleus
Q9HCP0.1	IPR011009; IPR000719; IPR022247; IPR017441; IPR008271	GO:0006468 protein phosphorylation	GO:0004672 protein kinase activity; GO:0004674 protein serine/threonine kinase activity; GO:0005524 ATP binding	None predicted
Q9NRQ5.1	IPR027960	None predicted	None predicted	None predicted
Q9NS84.2	IPR016469; IPR027417; IPR000863	GO:0005975 carbohydrate metabolic process	GO:0008146 sulfotransferase activity	GO:0000139 Golgi membrane
Q9NZE8.3	IPR021137	GO:0006412 translation	GO:0003735 structural constituent of ribosome	GO:0005622 intracellular; GO:0005840 ribosome
Q9NZM6.2	IPR003915; IPR013122	None predicted	GO:0005509 calcium ion binding	GO:0016020 membrane
Q9NZU5.1	IPR010442; IPR033724; IPR001781	None predicted	GO:0008270 zinc ion binding	None predicted
Q9P0P8.1		None predicted	None predicted	None predicted
Q9P215.2	IPR001909; IPR018586; IPR009057; IPR006600; IPR004875	GO:0006355 regulation of transcription, DNA-templated	GO:0003676 nucleic acid binding; GO:0003677 DNA binding	GO:0005622 intracellular
Q9P2K5.3	IPR012677; IPR000504	None predicted	GO:0000166 nucleotide binding; GO:0003676 nucleic acid binding	None predicted
Q9UJK0.1	IPR022968; IPR007209; IPR007177	None predicted	None predicted	None predicted
Q9UJT0.1	IPR000217; IPR004057; IPR003008; IPR018316; IPR008280; IPR023123; IPR017975	GO:0007017 microtubule-based process	GO:0003924 GTPase activity; GO:0005525 GTP binding	GO:0005874 microtubule
Q9UKG4.2	IPR001898	GO:0006814 sodium ion transport; GO:0055085 transmembrane transport	GO:0005215 transporter activity	GO:0016020 membrane
Q9UM00.1	IPR002809; IPR008559	None predicted	None predicted	GO:0016020 membrane
Q9UPG8.1	IPR015880; IPR013087; IPR007087	None predicted	GO:0003676 nucleic acid binding; GO:0046872 metal ion binding	None predicted
Q9UPT9.2	IPR013083; IPR001607; IPR028889; IPR001394; IPR018200	GO:0006511 ubiquitin-dependent protein catabolic process; GO:0016579 protein	GO:0008270 zinc ion binding; GO:0036459 thiol-dependent ubiquitinyl hydrolase activity	None predicted

		deubiquitination		
Q9UQ90.2	IPR005936; IPR011546; IPR027417; IPR003593; IPR003959; IPR000642	GO:0006508 proteolysis	GO:0004222 metalloendopeptidase activity; GO:0005524 ATP binding; GO:0008270 zinc ion binding	GO:0016020 membrane; GO:0016021 integral component of membrane
Q9Y2B1.1	IPR004263	None predicted	None predicted	None predicted
Q9Y3M8.2	IPR013761; IPR001660; IPR008936; IPR000198; IPR002913; IPR023393	GO:0007165 signal transduction	GO:0005515 protein binding; GO:0008289 lipid binding	None predicted
Q9Y3N9.1	IPR000276; IPR000725; IPR017452	GO:0007186 G-protein coupled receptor signaling pathway	GO:0004930 G-protein coupled receptor activity; GO:0004984 olfactory receptor activity	GO:0016021 integral component of membrane
Q9Y5Q3.2	IPR013592; IPR008917; IPR004826; IPR004827	GO:0006355 regulation of transcription, DNA-templated	GO:0003677 DNA binding; GO:0003700 transcription factor activity, sequence-specific DNA; GO:0043565 sequence-specific DNA binding	GO:0005634 nucleus

Приложение 1Е. Сводный список категорий GO «Клеточные компоненты» по результатам анализа функционального обогащения белков НПК крови условно ЗЖ и больных РМЖ

Категории GO «Клеточные компоненты»	Условно ЗЖ	Больные РМЖ
GO:0000120 RNA polymerase I transcription factor complex	1	-
GO:0000139 Golgi membrane	-	1
GO:0000786 nucleosome	1	-
GO:0005576 extracellular region	3	2
GO:0005622 intracellular	2	8
GO:0005634 nucleus	10	7
GO:0005669 transcription factor TFIID complex	1	-
GO:0005685 U1 snRNP	1	-
GO:0005737 cytoplasm	4	1
GO:0005744 mitochondrial inner membrane presequence translocase	1	-
GO:0005761 mitochondrial ribosome	1	-
GO:0005763 mitochondrial small ribosomal subunit	1	-
GO:0005783 endoplasmic reticulum	-	1
GO:0005794 Golgi apparatus	1	1
GO:0005840 ribosome	-	2
GO:0005856 cytoskeleton	1	1
GO:0005874 microtubule	-	1
GO:0005882 intermediate filament	1	1
GO:0005886 plasma membrane	-	1
GO:0005887 integral component of plasma membrane	1	1
GO:0008076 voltage-gated potassium channel complex	-	2
GO:0016020 membrane	10	19

GO:0016021 integral component of membrane	15	15
GO:0016272 prefoldin complex	-	1
GO:0016459 myosin complex	-	1
GO:0016471 vacuolar proton-transporting V-type ATPase complex	1	-
GO:0016592 mediator complex	-	1
GO:0030130 clathrin coat of trans-Golgi network vesicle	1	-
GO:0030132 clathrin coat of coated pit	1	-
GO:0030173 integral component of Golgi membrane	1	-
GO:0031012 extracellular matrix	-	1
GO:0032040 small-subunit processome	1	-
GO:0032580 Golgi cisterna membrane	1	-
GO:0042555 MCM complex	1	-
GO:0045211 postsynaptic membrane	1	1
GO:0089701 U2AF	2	1
Всего разных категорий GO: 36 (100%)	26 (72%)	22 (61%)
Всего белков:	65	70

Приложение 1Ж. Сводный список категорий GO «Молекулярные функции» по результатам анализа функционального обогащения белков НПК крови условно ЗЖ и больных РМЖ

Категории GO «Молекулярные функции»	Условно ЗЖ	Больные РМЖ
GO:0000049 tRNA binding	1	-
GO:0000166 nucleotide binding	9	4
GO:0000975 regulatory region DNA binding	-	1
GO:0001104 RNA polymerase II transcription cofactor activity	-	1
GO:0001664 G-protein coupled receptor binding	-	1
GO:0001733 galactosylceramide sulfotransferase activity	1	-
GO:0003676 nucleic acid binding	10	14
GO:0003677 DNA binding	10	11
GO:0003678 DNA helicase activity	1	-
GO:0003700 transcription factor activity, sequence-specific DNA	5	9
GO:0003723 RNA binding	4	1
GO:0003729 mRNA binding	1	-
GO:0003735 structural constituent of ribosome	2	2
GO:0003743 translation initiation factor activity	1	-

GO:0003747 translation release factor activity	1	1
GO:0003755 peptidyl-prolyl cis-trans isomerase activity	-	1
GO:0003774 motor activity	-	1
GO:0003777 microtubule motor activity	1	-
GO:0003779 actin binding	2	1
GO:0003824 catalytic activity	4	1
GO:0003868 4-hydroxyphenylpyruvate dioxygenase activity	-	1
GO:0003883 CTP synthase activity	1	-
GO:0003924 GTPase activity	1	2
GO:0004013 adenosylhomocysteinase activity	-	1
GO:0004057 arginyltransferase activity	-	1
GO:0004129 cytochrome-c oxidase activity	-	1
GO:0004143 diacylglycerol kinase activity	-	1
GO:0004197 cysteine-type endopeptidase activity	-	1
GO:0004222 metalloendopeptidase activity	2	3
GO:0004252 serine-type endopeptidase activity	2	-
GO:0004347 glucose-6-phosphate isomerase activity	1	-
GO:0004372 glycine hydroxymethyltransferase activity	1	-
GO:0004383 guanylate cyclase activity	1	1
GO:0004402 histone acetyltransferase activity	1	-
GO:0004465 lipoprotein lipase activity	-	1
GO:0004470 malic enzyme activity	1	1
GO:0004471 malate dehydrogenase (decarboxylating) (NAD <sup>+</sup> ) activity	1	1
GO:0004518 nuclease activity	1	-
GO:0004594 pantothenate kinase activity	-	1
GO:0004672 protein kinase activity	7	3
GO:0004674 protein serine/threonine kinase activity	1	1
GO:0004714 transmembrane receptor protein tyrosine kinase activity	1	-
GO:0004809 tRNA (guanine-N2-)-methyltransferase activity	1	-
GO:0004812 aminoacyl-tRNA ligase activity	2	-

GO:0004818 glutamate-tRNA ligase activity	1	-
GO:0004829 threonine-tRNA ligase activity	1	-
GO:0004842 ubiquitin-protein transferase activity	1	1
GO:0004871 signal transducer activity	-	1
GO:0004888 transmembrane signaling receptor activity	-	2
GO:0004930 G-protein coupled receptor activity	6	5
GO:0004935 adrenergic receptor activity	2	1
GO:0004938 alpha2-adrenergic receptor activity	1	-
GO:0004940 beta1-adrenergic receptor activity	1	1
GO:0004952 dopamine neurotransmitter receptor activity	-	1
GO:0004984 olfactory receptor activity	1	1
GO:0004990 oxytocin receptor activity	1	-
GO:0004995 tachykinin receptor activity	-	1
GO:0005000 vasopressin receptor activity	1	-
GO:0005085 guanyl-nucleotide exchange factor activity	1	-
GO:0005089 Rho guanyl-nucleotide exchange factor activity	1	-
GO:0005198 structural molecule activity	2	1
GO:0005215 transporter activity	3	3
GO:0005216 ion channel activity	1	4
GO:0005230 extracellular ligand-gated ion channel activity	1	1
GO:0005249 voltage-gated potassium channel activity	-	2
GO:0005262 calcium channel activity	-	1
GO:0005452 inorganic anion exchanger activity	1	2
GO:0005488 binding	1	1
GO:0005506 iron ion binding	2	2
GO:0005509 calcium ion binding	6	7
GO:0005515 protein binding	25	33
GO:0005520 insulin-like growth factor binding	1	1
GO:0005524 ATP binding	13	8
GO:0005525 GTP binding	6	4

GO:0008017 microtubule binding	1	1
GO:0008083 growth factor activity	-	1
GO:0008097 5S rRNA binding	-	1
GO:0008137 NADH dehydrogenase (ubiquinone) activity	-	1
GO:0008146 sulfotransferase activity	-	1
GO:0008168 methyltransferase activity	-	1
GO:0008137 NADH dehydrogenase (ubiquinone) activity	1	-
GO:0008146 sulfotransferase activity	1	-
GO:0008201 heparin binding	-	1
GO:0008234 cysteine-type peptidase activity	-	1
GO:0008237 metallopeptidase activity	-	2
GO:0008270 zinc ion binding	12	10
GO:0008289 lipid binding	2	3
GO:0008373 sialyltransferase activity	1	1
GO:0008376 acetylgalactosaminyltransferase activity	1	-
GO:0008479 queuine tRNA-ribosyltransferase activity	1	-
GO:0008509 anion transmembrane transporter activity	1	2
GO:0008565 protein transporter activity	1	-
GO:0009055 electron carrier activity	-	1
GO:0009982 pseudouridine synthase activity	1	-
GO:0015450 P-P-bond-hydrolysis-driven protein transmembrane	-	1
GO:0016149 translation release factor activity, codon specific	1	1
GO:0016301 kinase activity	-	1
GO:0016594 glycine binding	1	-
GO:0016616 oxidoreductase activity, acting on the CH-OH group	1	-
GO:0016701 oxidoreductase activity, acting on single donors	-	1
GO:0016705 oxidoreductase activity, acting on paired donors	2	1
GO:0016740 transferase activity	1	-
GO:0016757 transferase activity, transferring glycosyl groups	1	1
GO:0016758 transferase activity, transferring hexosyl groups	1	-

GO:0016787 hydrolase activity	1	-
GO:0016820 hydrolase activity, acting on acid anhydrides,	1	-
GO:0016849 phosphorus-oxygen lyase activity	1	1
GO:0016876 ligase activity, forming aminoacyl-tRNA and related	2	-
GO:0016934 extracellular-glycine-gated chloride channel activity	1	1
GO:0019001 guanyl nucleotide binding	-	1
GO:0020037 heme binding	3	3
GO:0022824 transmitter-gated ion channel activity	1	-
GO:0030170 pyridoxal phosphate binding	2	-
GO:0031683 G-protein beta/gamma-subunit complex binding	-	1
GO:0036459 thiol-dependent ubiquitinyl hydrolase activity	2	2
GO:0043130 ubiquitin binding	-	1
GO:0043565 sequence-specific DNA binding	6	9
GO:0045028 G-protein coupled purinergic nucleotide receptor	1	-
GO:0045182 translation regulator activity	1	-
GO:0046872 metal ion binding	10	8
GO:0046982 protein heterodimerization activity	2	-
GO:0046983 protein dimerization activity	2	3
GO:0051082 unfolded protein binding	1	-
GO:0051287 NAD binding	1	1
GO:0052689 carboxylic ester hydrolase activity	-	1
Всего категорий GO: 125	90 (72%)	84 (67%)
Всего белков:	227	218

Приложение 13. Сводный список категорий GO «Биологические процессы» по результатам анализа функционального обогащения белков НПК крови условно ЗЖ и больных РМЖ

Категории GO «Биологические процессы»	Условно ЗЖ	Больные РМЖ
GO:0000398 mRNA splicing, via spliceosome	2	1
GO:0000413 protein peptidyl-prolyl isomerization; GO:0006457 protein folding	-	1



GO:0000902 cell morphogenesis	1	-
GO:0001522 pseudouridine synthesis	1	-
GO:0001558 regulation of cell growth	1	1
GO:0005975 carbohydrate metabolic process	1	1
GO:0006094 gluconeogenesis	1	-
GO:0006096 glycolytic process	1	-
GO:0006108 malate metabolic process	1	1
GO:0006120 mitochondrial electron transport, NADH to ubiquinone	1	-
GO:0006182 cGMP biosynthetic process	1	1
GO:0006221 pyrimidine nucleotide biosynthetic process	1	-
GO:0006260 DNA replication	1	-
GO:0006270 DNA replication initiation	1	-
GO:0006281 DNA repair	1	-
GO:0006334 nucleosome assembly	1	1
GO:0006348 chromatin silencing at telomere	1	-
GO:0006351 transcription, DNA-templated	-	1
GO:0006352 DNA-templated transcription, initiation	1	-
GO:0006355 regulation of transcription, DNA-templated	8	16
GO:0006357 regulation of transcription from RNA polymerase II	-	1
GO:0006360 transcription from RNA polymerase I promoter	1	-
GO:0006376 mRNA splice site selection	1	-
GO:0006400 tRNA modification	1	-
GO:0006412 translation	1	2
GO:0006413 translational initiation	1	-
GO:0006415 translational termination	1	1
GO:0006418 tRNA aminoacylation for protein translation	2	-
GO:0006424 glutamyl-tRNA aminoacylation	1	-
GO:0006435 threonyl-tRNA aminoacylation	1	-
GO:0006457 protein folding	2	1
GO:0006468 protein phosphorylation	7	3

GO:0006486 protein glycosylation	1	1
GO:0006508 proteolysis	4	4
GO:0006511 ubiquitin-dependent protein catabolic process	2	2
GO:0006544 glycine metabolic process	1	-
GO:0006563 L-serine metabolic process	1	-
GO:0006605 protein targeting	-	1
GO:0006629 lipid metabolic process	-	1
GO:0006730 one-carbon metabolic process	-	1
GO:0006810 transport	4	3
GO:0006811 ion transport	2	5
GO:0006813 potassium ion transport	-	2
GO:0006814 sodium ion transport	-	1
GO:0006820 anion transport	1	2
GO:0006821 chloride transport	1	1
GO:0006869 lipid transport	1	1
GO:0006886 intracellular protein transport	1	1
GO:0006915 apoptotic process	-	1
GO:0006940 regulation of smooth muscle contraction	1	-
GO:0006959 humoral immune response	1	-
GO:0007010 cytoskeleton organization	2	-
GO:0007015 actin filament organization	-	1
GO:0007017 microtubule-based process	-	1
GO:0007018 microtubule-based movement	1	-
GO:0007165 signal transduction	7	5
GO:0007166 cell surface receptor signaling pathway	-	2
GO:0007169 transmembrane receptor protein tyrosine kinase signaling	1	-
GO:0007186 G-protein coupled receptor signaling pathway	6	6
GO:0007189 adenylate cyclase-activating G-protein coupled receptor	1	1
GO:0007205 protein kinase C-activating G-protein coupled receptor	-	1
GO:0007264 small GTPase mediated signal transduction	5	2

GO:0007275 multicellular organism development	-	1
GO:0007399 nervous system development	1	1
GO:0007596 blood coagulation	1	-
GO:0007601 visual perception	-	1
GO:0008033 tRNA processing	1	-
GO:0008152 metabolic process	1	-
GO:0008299 isoprenoid biosynthetic process	1	-
GO:0008544 epidermis development	-	1
GO:0008616 queuosine biosynthetic process	1	-
GO:0009058 biosynthetic process	1	-
GO:0009060 aerobic respiration	-	1
GO:0009072 aromatic amino acid family metabolic process	-	1
GO:0009190 cyclic nucleotide biosynthetic process	1	1
GO:0009247 glycolipid biosynthetic process	1	-
GO:0009451 RNA modification	1	-
GO:0010579 positive regulation of adenylate cyclase activity	-	1
GO:0015031 protein transport	1	1
GO:0015937 coenzyme A biosynthetic process	-	1
GO:0015992 proton transport	1	-
GO:0016192 vesicle-mediated transport	1	-
GO:0016567 protein ubiquitination	1	-
GO:0016568 chromatin modification	1	-
GO:0016573 histone acetylation	1	-
GO:0016579 protein deubiquitination	2	2
GO:0016598 protein arginylation	-	1
GO:0019229 regulation of vasoconstriction	1	-
GO:0023052 signaling	-	1
GO:0030150 protein import into mitochondrial matrix	1	-
GO:0030168 platelet activation	1	-
GO:0032259 methylation	-	1

GO:0035023 regulation of Rho protein signal transduction	1	-
GO:0035556 intracellular signal transduction	2	2
GO:0042157 lipoprotein metabolic process	1	1
GO:0042311 vasodilation	-	1
GO:0042981 regulation of apoptotic process	1	2
GO:0043039 tRNA aminoacylation	2	-
GO:0043066 negative regulation of apoptotic process	1	-
GO:0043248 proteasome assembly	-	1
GO:0045823 positive regulation of heart contraction	1	1
GO:0046907 intracellular transport	-	1
GO:0051260 protein homooligomerization	-	2
GO:0055085 transmembrane transport	1	5
GO:0055114 oxidation-reduction process	5	5
GO:0071157 negative regulation of cell cycle arrest	1	1
Всего категорий GO: 106	79 (75%)	62 (58%)
Всего белков:	126	115

Приложение 1И. Белки, для которых классификация категорий по базам данных InterPro и GO не была проведена\*.

Белок	Ген (Gene ID)	Условно ЗЖ	Больные PMЖ	Краткое описание белка
A8MU76.2	NPAP1L (729159)	+	+	NPAP1L nuclear pore associated protein 1 like
A8MUU9.3		+		Неохарактеризованный белок
A8MV72.2	LOC100132229 (100132229)		+	LOC100132229 nuclear pore associated protein 1 pseudogene
A8MX80.2	LOC100129307 (100129307)	+	+	LOC100129307 putative UPF0607 protein ENSP00000383144
E9PAV3.1	NACA (4666)		+	NACA nascent polypeptide associated complex subunit alpha
Q5T8R8.1	C9orf66 (157983)	+		C9orf66 chromosome 9 open reading frame 66
Q8NBZ0.1	INO80E (283899)	+	+	INO80E INO80 complex subunit E
Q8NEA5.1	C19orf18 (147685)	+		C19orf18 chromosome 19 open reading frame 18

Q96C57.2	C12orf43 (64897)		+	C12orf43 chromosome 12 open reading frame 43
Q96HJ3.2	CCDC34 (91057)	+		CCDC34 coiled-coil domain containing 34
Q96NF6.1	C8orf49 (606553)	+		C8orf49 chromosome 8 open reading frame 49 (putative)
Q9P0P8.1	C6orf203 (51250)		+	C6orf203 chromosome 6 open reading frame 203

\* Код белка в соответствии с UniProtKB/Swiss-Prot.

Приложение 1К. Белки экзосом плазмы крови условно здоровых женщин.

Uniprot ID	Protein	Gene Name
Q4LEZ3	Alanine and arginine-rich domain-containing protein	AARD
P02760	Alpha-1-microglycoprotein	AMBP
Q13424	Alpha-1-syntrophin	SNTA1
P02765	Alpha-2-HS-glycoprotein	AHSG
P01023	Alpha-2-macroglobulin	A2M
P23109	AMP deaminase 1	AMPD1
P02647	Apolipoprotein A-I	APOA1
P06727	Apolipoprotein A-IV	APOA4
P04114	Apolipoprotein B-100	APOB
P02649	Apolipoprotein E	APOE
O95831	Apoptosis-inducing factor 1, mitochondrial	AIFM1
O75531	Barrier-to-autointegration factor	BANF1
Q99728	BRCA1-associated RING domain protein 1	BARD1
Q8N5S9	Calcium/calmodulin-dependent protein kinase kinase 1	CAMKK1
P08962	CD63 antigen	CD63
P60033	CD81 antigen	CD81
P21926	CD9 antigen	CD9
Q8TDI0	Chromodomain-helicase-DNA-binding protein 5	CHD5
P10909	Clusterin	CLU
Q96PX6	Coiled-coil domain-containing protein 85A	CCDC85A
P01024	Complement C3	C3
P08603	Complement factor H	CFH
P61201	COP9 signalosome complex subunit 2	COPS2
Q6QEF8	Coronin-6	CORO6
P12074	Cytochrome c oxidase subunit 6A1, mitochondrial	COX6A1

O14672	Disintegrin and metalloproteinase domain-containing protein 10	ADAM10
Q969K3	E3 ubiquitin-protein ligase RNF34	ENF34
Q8TES7	Fas-binding factor 1	FBF1
P02671	Fibrinogen alpha chain	FGA
P02675	Fibrinogen beta chain	FGB
P02679	Fibrinogen gamma chain	FGG
O15520	Fibroblast growth factor 10	FGF10
P02751	Fibronectin	FN1
Q96DB9	FXYD domain-containing ion transport regulator 5	FXYD5
P06396	Gelsolin	GSN
O60861	Growth arrest-specific protein 7	GAS7
P00738	Haptoglobin	HP
P00739	Haptoglobin-related protein	HPR
O96004	Heart- and neural crest derivatives-expressed protein 1	HAND1
P68871	Hemoglobin subunit beta	HBB
P02790	Hemopexin	HPX
P01859	Ig gamma-2 chain C region	IGHG2
P01834	Ig kappa chain C region	IGKC
A0M8Q6	Ig lambda-7 chain C region	IGLC7
P01871	Ig mu chain C region	IGHM
P0DOX6	Immunoglobulin mu heavy chain	
O14862	Interferon-inducible protein AIM2	AIM2
P02750	Leucine-rich alpha-2-glycoprotein	LRG
Q16674	Melanoma-derived growth regulatory protein	MIA
H0YGS3	Microfibrillar-associated protein 5	MFAP5
Q8N159	N-acetylglutamate synthase, mitochondrial	NAGS
O43678	NADH dehydrogenase [ubiquinone] 1 alpha subcomplex subunit 2	NDUFA2
P60323	Nanos homolog 3	NANOS3
Q9GZT8	NIF3-like protein 1	NIF3L1
P55209	Nucleosome assembly protein 1-like 1	NAP1L1
P56373	P2X purinoceptor 3	P2RX3
O00329	Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate 3-kinase catalytic subunit delta isoform	PIK3CD
P78356	Phosphatidylinositol 4-kinase type 2-beta	PIP4K2B

Q6IQ23	Pleckstrin homology domain-containing family A member 7	PLEKHA7
Q9HCQ7	Pro-FMRFamide-related neuropeptide VF	NPVF
P50749	Ras association domain-containing protein 2	RASSF2
Q8TDF6	RAS guanyl-releasing protein 4	RASGRP4
P61224	Ras-related GTP-binding protein B	RAP1B
Q9UL26	Ras-related protein Rab-22A	RAB22A
Q8WXH6	Ras-related protein Rab-40A	RAB40A
P40938	Replication factor C subunit 3	RFC3
O75526	RNA-binding motif protein, X-linked-like-2	RBMXL2
P11801	Serine/threonine-protein kinase H1	PSKH1
P02787	Serotransferrin	TF
P02768	Serum albumin	ALB
P25063	Signal transducer CD24	CD24
Q9NUR3	Transmembrane protein 74B	TMEM74B
P02766	Transthyretin	TTR
O43557	Tumor necrosis factor ligand superfamily member 14	TNFSF14
O43399	Tumor protein D54	TPD52L2
P43403	Tyrosine-protein kinase ZAP-70	ZAP70
A0A1B0GU71	Uncharacterized protein CFAP97D2	CFAP97D2
F8VUA8	Uncharacterized protein CLBA1	CLBA1
O43309	Zinc finger and SCAN domain-containing protein 12	ZSCAN12
Q9Y2P0	Zinc finger protein 835	ZNF835
Q15776	Zinc finger protein with KRAB and SCAN domains 8	ZKSCAN8

Приложение 1Л. Белки экзосом крови условно здоровых женщин.

Uniprot	Protein	Gene Name
Q4LEZ3	Alanine and arginine-rich domain-containing protein	AARD
P02760	Alpha-1-microglycoprotein	AMBP
P02765	Alpha-2-HS-glycoprotein	AHSG
P01023	Alpha-2-macroglobulin	A2M
P23109	AMP deaminase 1	AMPD1
A6NCL7	Ankyrin repeat domain-containing protein 33B	ANKRD33B

P06727	Apolipoprotein A-IV	APOA4
O95831	Apoptosis-inducing factor 1, mitochondrial	AIFM1
O75531	Barrier-to-autointegration factor	BANF1
P53674	Beta-crystallin B1	CRYBB1
P31327	Carbamoyl-phosphate synthase [ammonia], mitochondrial	CPS1
P08962	CD63 antigen	CD63
P60033	CD81 antigen	CD81
P21926	CD9 antigen	CD9
P10909	Clusterin	CLU
Q11201	CMP-N-acetylneuraminate-beta-galactosamide-alpha-2,3-sialyltransferase 1	ST3GAL1
Q69YQ0	Cytospin-A	SPECC1L
O14672	Disintegrin and metalloproteinase domain-containing protein 10	ADAM10
O95602	DNA-directed RNA polymerase I subunit RPA1	POLR1A
O15520	Fibroblast growth factor 10	FGF10
Q9P2W7	Galactosylgalactosylxylosylprotein 3-beta-glucuronosyltransferase 1	B3GAT1
P06396	Gelsolin	GSN
P48506	Glutamate--cysteine ligase catalytic subunit	GCLC
Q9UK05	Growth/differentiation factor 2	GDF2
O60832	H/ACA ribonucleoprotein complex subunit 4	DKC1
P00739	Haptoglobin-related protein	HPR
P02790	Hemopexin	HPX
P01871	Ig mu chain C region	IGHM
P01871	Immunoglobulin heavy constant mu	IGHM
A0M8Q6	Immunoglobulin lambda constant 7	IGLC7
P0DOX6	Immunoglobulin mu heavy chain	
O14862	Interferon-inducible protein AIM2	AIM2
P26440	Isovaleryl-CoA dehydrogenase, mitochondrial	IVD
P02750	Leucine-rich alpha-2-glycoprotein	LRG
O15054	Lysine-specific demethylase 6B	KDM6B
Q7Z553	MAM domain-containing glycosylphosphatidylinositol anchor protein 2	MDGA2
H0YGS3	Microfibrillar-associated protein 5	MFAP5
Q49MG5	Microtubule-associated protein 9	MAP9
Q504T8	Midnolin	MIDN



Q86VE0	Myb-related transcription factor, partner of profilin	MYPOP
P05976	Myosin light chain 1/3, skeletal muscle isoform	MYL1
Q6P1J9	Parafibromin	CDC73
Q08426	Peroxisomal bifunctional enzyme	EHHADH
P78356	Phosphatidylinositol 4-kinase type 2-beta	PIP4K2B
P49763	Placenta growth factor	PGF
P02545	Prelamin-A/C	LMNA
Q6ZS02	Putative GED domain-containing protein DNMI1P46	DNMI1P46
Q49A33	Putative zinc finger protein 876	ZNF876P
P31749	RAC-alpha serine/threonine-protein kinase	AKT1
Q9H6Z4	Ran-binding protein 3	RANBP3
P61224	Ras-related GTP-binding protein B	RAP1B
P11801	Serine/threonine-protein kinase H1	PSKH1
P02787	Serotransferrin	TF
P02768	Serum albumin	ALB
P25063	Signal transducer CD24	CD24
O43399	Tumor protein D54	TPD52L2
A8MU93	Uncharacterized protein C17orf100	C17orf100
Q9HBI5	Uncharacterized protein C3orf14	C3orf14
P49748	Very long-chain specific acyl-CoA dehydrogenase, mitochondrial	ACADVL
Q9UJW7	Zinc finger protein 229	ZNF229
Q8N8C0	Zinc finger protein 781	ZNF781

Приложение 1М. Белки экзосом плазмы больных РМЖ.

Uniprot	Protein	Gene Name
Q86TS9	39S ribosomal protein L52, mitochondrial	MRPL52
P46779	60S ribosomal protein L28	RPL28
Q53FZ2	Acyl-coenzyme A synthetase ACSM3, mitochondrial	ACSM3
P01009	Alpha-1-antitrypsin	SERPINA1
P02760	Alpha-1-microglycoprotein	AMBP
P02765	Alpha-2-HS-glycoprotein	AHSG
P02489	Alpha-crystallin A chain	CRYAA
A0A140G945	Alpha-crystallin A2 chain	CRYAA2

P02511	Alpha-crystallin B chain	CRYAB
Q5CZ79	Ankyrin repeat domain-containing protein 20B	ANKRD20A8P
Q9BYT9	Anoctamin-3	ANO3
P02647	Apolipoprotein A-I	APOA1
P06727	Apolipoprotein A-IV	APOA4
P04114	Apolipoprotein B-100	APOB
Q9P291	Armadillo repeat-containing X-linked protein 1	ARMCX1
O75027	ATP-binding cassette sub-family B member 7, mitochondrial	ABCB7
O75531	Barrier-to-autointegration factor	BANF1
P18075	Bone morphogenetic protein 7	BMP7
P11586	C-1-tetrahydrofolate synthase, cytoplasmic	MTHFD1
P17655	Calpain-2 catalytic subunit	CAPN2
Q9Y2W7	Calsenilin	KCNIP3
P11717	Cation-independent mannose-6-phosphate receptor	IGF2R
P08962	CD63 antigen	CD63
P60033	CD81 antigen	CD81
P21926	CD9 antigen	CD9
Q5VT06	Centrosome-associated protein 350	CEP350
P10909	Clusterin	CLU
Q5M9N0	Coiled-coil domain-containing protein 158	CCDC158
P01024	Complement C3	C3
Q96EY8	Corrinoid adenosyltransferase	MMAB
P17540	Creatine kinase S-type, mitochondrial	CKMT2
O14672	Disintegrin and metalloproteinase domain-containing protein 10	ADAM10
O15514	DNA-directed RNA polymerase II subunit RPB4	POLR2D
O00429	Dynamin-1-like protein	DNM1L
Q9Y4J8	Dystrobrevin alpha	DTNA
Q8IYI6	Exocyst complex component 8	EXOC8
Q8N9H8	Exonuclease mut-7 homolog	EXD3
Q8TES7	Fas-binding factor 1	FBF1
P02679	Fibrinogen gamma chain	FGG
Q9NYZ3	G2 and S phase-expressed protein 1	GTSE1
Q9UKW4	Guanine nucleotide exchange factor VAV3	VAV3

P00738	Haptoglobin	HP
<a href="#">P69905</a>	Haptoglobin alpha chain	
P00739	Haptoglobin-related protein	HPR
P68871	Hemoglobin subunit beta	HBB
P02790	Hemopexin	HPX
Q9NWT6	Hypoxia-inducible factor 1-alpha inhibitor	HIF1AN
P01876	Immunoglobulin heavy constant alpha 1	IGHA1
P01857	Immunoglobulin heavy constant gamma 1	IGHG1
P01834	Immunoglobulin kappa constant	IGKC
P01619	Immunoglobulin kappa light chain	IGKV3-20
Q96Q89	Kinesin-like protein KIF20B	KIF20B
O15066	Kinesin-like protein KIF3B	KIF3B
Q9BVG8	Kinesin-like protein KIFC3	KIFC3
P02750	Leucine-rich alpha-2-glycoprotein	LRG
P11310	Medium-chain specific acyl-CoA dehydrogenase, mitochondrial	ACADM
Q8NFA2	NADPH oxidase organizer 1	NOXO1
P0CE72	Oncomodulin-1	OCM
Q8NEY8	Periphilin-1	PPHLN1
Q8WXW3	Progesterone-induced-blocking factor 1	PIBF1
Q969Q5	Ras-related protein Rab-24	RAB24
P02787	Serotransferrin	TF
P02768	Serum albumin	ALB
Q5VZ18	SH2 domain-containing adapter protein E	SHE
P25063	Signal transducer CD24	CD24
Q29RF7	Sister chromatid cohesion protein PDS5 homolog A	PDS5A
O15050	TPR and ankyrin repeat-containing protein 1	TRANK1
Q9NQ34	Transmembrane protein 9B	TMEM9B
P02766	Transthyretin	TTR
Q9BT92	Trichoplein keratin filament-binding protein	TCHP
O43399	Tumor protein D54	TPD52L2
Q96RL7	Vacuolar protein sorting-associated protein 13A	VPS13A
O00555	Voltage-dependent P/Q-type calcium channel subunit alpha-1A	CACNA1A
Q969S3	Zinc finger protein 622	ZNF622

## Приложение 1Н. Белки экзосом крови больных РМЖ

Uniprot	Protein	Gene Name
P01009	Alpha-1-antitrypsin	SERPINA1
P04217	Alpha-1B-glycoprotein	A1BG
P02760	Alpha-1-microglycoprotein	AMBP
Q13424	Alpha-1-syntrophin	SNTA1
P02765	Alpha-2-HS-glycoprotein	AHSG
Q92624	Amyloid protein-binding protein 2	APPBP2
P02647	Apolipoprotein A-I	APOA1
P06727	Apolipoprotein A-IV	APOA4
O75531	Barrier-to-autointegration factor	BANF1
P13497	Bone morphogenetic protein 1	BMP1
Q9NZU7	Calcium-binding protein 1	CABP1
P08962	CD63 antigen	CD63
P60033	CD81 antigen	CD81
P21926	CD9 antigen	CD9
P10909	Clusterin	CLU
Q8IYE0	Coiled-coil domain-containing protein 146	CCDC146
Q4G0S7	Coiled-coil domain-containing protein 152	CCDC152
Q5M9N0	Coiled-coil domain-containing protein 158	CCDC158
Q96PX6	Coiled-coil domain-containing protein 85A	CCDC85A
P01024	Complement C3	C3
Q9H9E3	Conserved oligomeric Golgi complex subunit 4	COG4
Q8IYA6	Cytoskeleton-associated protein 2-like	CKAP2L
O14672	Disintegrin and metalloproteinase domain-containing protein 10	ADAM10
Q68J44	Dual specificity phosphatase DUPD1	DUPD1
P49761	Dual specificity protein kinase CLK3	CLK3
Q9Y4E5	E3 SUMO-protein ligase ZNF451	ZNF451
Q7L5Y9	E3 ubiquitin-protein transferase MAEA	MAEA
Q8IUS5	Epoxide hydrolase 4	EPHX4
O15083	ERC protein 2	ERC2

Q8N9H8	Exonuclease mut-7 homolog	EXD3
Q15024	Exosome complex component RRP42	EXOSC7
P02671	Fibrinogen alpha chain	FGA
P02675	Fibrinogen beta chain	FGB
P02679	Fibrinogen gamma chain	FGG
P50440	Glycine amidinotransferase, mitochondrial	GATM
P48167	Glycine receptor subunit beta	GLRB
Q9UKW4	Guanine nucleotide exchange factor VAV3	VAV3
P00738	Haptoglobin	HP
<a href="#">P69905</a>	Haptoglobin alpha chain	
P00739	Haptoglobin-related protein	HPR
Q15477	Helicase SKI2W	SKIV2L
P09601	Heme oxygenase 1	HMOX1
P02790	Hemopexin	HPX
Q16775	Hydroxyacylglutathione hydrolase, mitochondrial	HAGH
P01859	Immunoglobulin heavy constant gamma 2	IGHG2
A0A0B4J1X5	Immunoglobulin heavy variable 3-74	IGHV3-74
P01834	Immunoglobulin kappa constant	IGKC
Q14571	Inositol 1,4,5-trisphosphate receptor type 2	ITPR2
Q14624	Inter-alpha-trypsin inhibitor heavy chain H4	ITIH4
P35527	Keratin, type I cytoskeletal 9	KRT9
P04264	Keratin, type II cytoskeletal 1	KRT1
P02538	Keratin, type II cytoskeletal 6A	KRT6A
P04259	Keratin, type II cytoskeletal 6B	KRT6B
P02750	Leucine-rich alpha-2-glycoprotein	LRG
Q7L5N7	Lysophosphatidylcholine acyltransferase 2	LPCAT2
O95243	Methyl-CpG-binding domain protein 4	MBD4
Q9NQG6	Mitochondrial dynamics protein MID51	MIEF1
Q8WXR4	Myosin-IIb	MYO3B
P16233	Pancreatic triacylglycerol lipase	PNLIP
O15018	PDZ domain-containing protein 2	PDZD2
O95613	Pericentrin	PCNT
Q08426	Peroxisomal bifunctional enzyme	EHHADH

Q9NSD9	Phenylalanine-tRNA ligase beta subunit	FARSB
Q6P1J6	Phospholipase B1, membrane-associated	PLB1
Q9H4Q4	PR domain zinc finger protein 12	PRDM12
Q5VWM5	PRAME family member 9/15	PRAMEF9
Q99623	Prohibitin-2	PHB2
Q14005	Pro-interleukin-16	IL16
Q14320	Protein FAM50A	FAM50A
Q13522	Protein phosphatase 1A	PPM1A
O60397	Putative cytochrome c oxidase subunit 7A3, mitochondrial	COX7A2P2
Q7RTT3	Putative protein SSX9	SSX9P
Q5R372	Rab GTPase-activating protein 1-like	RABGAP1L
Q9H6Z4	Ran-binding protein 3	RANBP3
P55199	RNA polymerase II elongation factor ELL	ELL2
Q92622	Run domain Beclin-1-interacting and cysteine-rich domain-containing protein	RUBCN
Q9NZJ4	Sacsin	SACS
Q13535	Serine/threonine-protein kinase ATR	ATR
P02787	Serotransferrin	TF
O75635	Serpin B7	SERPINB7
P02768	Serum albumin	ALB
P25063	Signal transducer CD24	CD24
O15020	Spectrin beta chain, non-erythrocytic 2	SPTBN2
Q8NEQ6	Steroid receptor-associated and regulated protein	SRARP
O14543	Suppressor of cytokine signaling 3	SOCS3
A0A589	T cell receptor beta variable	TRBV4-3
Q9H497	Torsin-3A	TOR3A
O15050	TPR and ankyrin repeat-containing protein 1	TRANK1
Q16890	Tumor protein D53	TPD52L1
O43399	Tumor protein D54	TPD52L2
P62987	Ubiquitin-60S ribosomal protein L40	UBA52
A0A1B0GVM6	Uncharacterized protein C11orf97	C11orf97
Q8NDD1	Uncharacterized protein C1orf131	C1orf131
Q8WXS5	Voltage-dependent calcium channel gamma-8 subunit	CACNG8
Q52M93	Zinc finger protein 585B	ZNF585B

Q2M218	Zinc finger protein 630	ZNF630
Q15776	Zinc finger protein with KRAB and SCAN domains 8	ZKSCAN8

Приложение 10. Универсальные белки экзосом, идентифицированные в крови условно здоровых женщин и больных РМЖ

Название белка	Gene Name	Score
Disintegrin and metalloproteinase domain-containing protein 10	ADAM10	60
Tumor protein D54	TPD52L2	61
Barrier-to-autointegration factor	BANF1	57
Haptoglobin	HP	74
Haptoglobin-related protein	HPR	60
Complement C3	C3	137
Ig kappa chain C region	IGKC	59
Ig gamma-2 chain C region	IGHG2	59
Apolipoprotein A-I	APOA1	176
Fibrinogen alpha chain	FGA	57
Fibrinogen beta chain	FGB	60
Fibrinogen gamma chain	FGG	67
Leucine-rich alpha-2-glycoprotein	LRG	60
Alpha-1-microglycoprotein	AMBP	60
Alpha-2-HS-glycoprotein	AHSG	60
Transthyretin	TTR	58
Serum albumin	ALB	149
Serotransferrin	TF	137
Hemopexin	HPX	60
Apolipoprotein B-100	APOB	56
Gelsolin	GSN	60
Apolipoprotein A-IV	APOA4	60
CD63 antigen	CD63	60
Clusterin	CLU	60
CD9 antigen	CD9	60
Signal transducer CD24	CD24	60
CD81 antigen	CD81	60
Hemoglobin subunit beta	HBB	72
Peroxisomal bifunctional enzyme	EHHADH	56
Alpha-1-syntrophin	SNTA1	60
Zinc finger protein with KRAB and SCAN domains 8	ZKSCAN8	56
Fas-binding factor 1	FBF1	56
Coiled-coil domain-containing protein 85A	CCDC85A	64
Ran-binding protein 3	RANBP3	56

## Список публикаций по теме диссертации

**Статьи:**

1. **Тамкович С.Н.**, Власов В.В., Лактионов П.П. Циркулирующие дезоксирибонуклеиновые кислоты крови и их использование в медицинской диагностике. Обзор. Молекулярная биология, 2008, Т. 42, С. 12-23. DOI: 10.1134/S0026893308010020.
2. **Тамкович С.Н.**, Войцицкий В.Е., Лактионов П.П. Современные методы диагностики рака молочной железы». Обзор. Биомедицинская химия, 2014, Т.60(2), С. 141-160. DOI: 10.18097/PBMC20146002141.
3. **С. Н. Тамкович**, Б.П. Челобанов, Т.Г. Дужак. Метод выделения циркулирующих в крови нуклеопротеиновых комплексов. Известия академии наук. Серия химическая, 2015, Т.6, С. 1458-1463. DOI 10.1007/s11172-015-1032-1.
4. **С. Н. Тамкович**, Д. С. Сердюков, О. С. Тутанов, Т. Г. Дужак, П. П. Лактионов. Идентификация белков в составе циркулирующих в крови нуклеопротеиновых комплексов. Биоорганическая химия, 2015, Т. 41(6), С. 686-695. DOI 10.1134/S1068162015060163.
5. **S. Tamkovich**, O. Bryzgunova. Protease activity and cell-free DNA in blood of healthy donors and breast cancer patients. J. Immunoassay and Immunochemistry, 2016, V. 37(2), P. 141-53. DOI: 10.1080/15321819.2015.1069745
6. **Тамкович С.Н.**, Тутанов О.С., Лактионов П.П. Экзосомы: механизмы возникновения, состав, транспорт, биологическая активность, использование в диагностике. Обзор. Биологические мембраны, 2016, Т. 33(3), С. 163-175. DOI: 10.1134/S1990747816020112.
7. **S.N. Tamkovich**, O.S. Tutanov, D.S. Serdukov, M.S. Belenikin, A.G. Shlikht, N.A. Kirushina, T.G. Duzhak, V.E. Voytsitskiy, Y.P. Tsentalovich, V.A. Tkachuk, P.P. Laktionov. Protein content of circulating nucleoprotein complexes. Adv. Exp. Med. Biol., 2016. V. 924, P. 133-136. DOI: 10.1007/978-3-319-42044-8\_26.
8. **S.N. Tamkovich**, N.A. Kirushina, V.E. Voytsitskiy, V.A. Tkachuk, P.P. Laktionov. Features of circulating DNA fragmentation in blood of healthy females and breast cancer patients. Adv. Exp. Med. Biol., 2016. V. 924, P. 47-51. DOI 10.1007/978-3-319-42044-8\_10.
9. **С.Н. Тамкович**, Ю.С. Бакакина, О.С. Тутанов, А.К. Сомов, Н.А. Кирюшина, Л.В. Дубовская, И.Д. Волотовский, П.П. Лактионов. Протеомный анализ циркулирующих экзосом крови в норме и при злокачественных новообразованиях молочной железы. Биоорганическая химия, 2017, Т. 43(2), С. 146-156. DOI: 10.1134/S1068162017020157.
10. Григорьева А.Е., Дырхеева Н.С., Брызгунова О.Е., **Тамкович С.Н.**, Челобанов Б.П., Рябчикова Е.И. Контаминация препаратов экзосом, выделенных из биологических



жидкостей. Биомедицинская химия, 2017, Т. 63(1), С. 91-96. DOI: 10.18097/PBMC20176301091.

11. **Тамкович С.Н.**, Юнусова Н.В., Стахеева М.Н., Сомов А.К., Фролова А.Е., Кирюшина Н.А., Афанасьев С.Г., Григорьева А. Е., Лактионов П.П., Кондакова И.В. Выделение и характеристика экзосом плазмы крови больных раком молочной железы и колоректальным раком. Биомедицинская химия, 2017, Т. 63(2), С. 165-169. DOI:10.1134/S1990750817030106.

12. Юнусова Н.В., **Тамкович С.Н.**, Кондакова И.В. Экзосомы в различных биологических жидкостях: состав и функции. Обзор. Молекулярная медицина, 2017, Т. 15, С. 14-22.

13. Yunusova N.V., **Tamkovich S.N.**, Stakheeva M.N., Grigor'eva A.A., Somov A.K., Tugutova E.A., Kolomiets L.A., Molchanov S.V., Afanas'ev S.G., Kakurina G.V., Choynzonov E.L., Kondakova I.V. The Characterization of Exosomes from Biological Fluids of Patients with Different Types of Cancer. AIP Conf. Proc., 2017, V. 1882, P. 020080-1 - 020080-4. DOI: 10.1063/1.5001659.

14. **S.N. Tamkovich**, A.K. Somov, K.V. Karpukhina, A.E. Grigor'eva, N.V. Yunusova, M.N. Stakheeva, V.E. Voytsitskiy, I.V. Kondakova, P.P. Laktionov. Isolation and Characterization of Exosomes from Blood of Patients with Mastopathy and Breast Cancer. AIP Conf. Proc., 2017, V. 1882, P. 020075-1 - 020075-5. DOI: 10.1063/1.5001654.

15. **С.Н. Тамкович**, Н.В. Юнусова, А.К. Сомов, С.Г. Афанасьев, Г.В. Какурина, Е.С. Колегова, Е.А. Тугутова, И.В. Кондакова. Сравнительный субпопуляционный анализ экзосом плазмы крови больных злокачественными новообразованиями. Биомедицинская химия, 2018, Т. 64(1), С. 110-114. DOI:10.1134/S1990750818020130.

16. Н.В. Юнусова, Е.А. Тугутова, **С.Н. Тамкович**, И.В. Кондакова. Роль тетраспанинов и протеаз экзосом в опухолевой прогрессии. Биомедицинская химия, 2018, Т. 64(2), С. 123-133. DOI:10.1134/S1990750818030095.

17. **S.N. Tamkovich**, N.V. Yunusova, E.A. Tugutova, A.K. Somov, K.V. Proskura, L.A. Kolomiets, M. Stakheeva, A.E. Grigor'eva, P.P. Laktionov, I.V. Kondakova. Protease Cargo in Circulating Exosomes of Breast Cancer and Ovarian Cancer Patients. Asian Pac. J. Cancer Prev., 2019, V. 20(1), P. 255-262. DOI: 10.31557/APJCP.2019.20.1.255.

18. **S. Tamkovich**, O. Tutanov, A. Efimenko, A. Grigor'eva, E. Ryabchikova, N. Kirushina, V. Vlassov, V. Tkachuk, P. Laktionov. Blood Circulating Exosomes Contain Distinguishable Fractions of Free and Cell-Surface-Associated Vesicles. Curr. Mol. Med., 2019, V. 19(4), P. 273-285. DOI: 10.2174/1566524019666190314120532.

19. **S.N. Tamkovich**, P.P. Laktionov. Cell-surface-bound circulating DNA in the blood: biology and clinical application. IUBMB Life. 2019, V. 71(9), P. 1201-1210. DOI: 10.1002/iub.2070.

20. А.К. Сомов, Н.В. Юнусова, Т.А. Штам, К.В. Проскура, Е.А. Замбалова, П.П. Лактионов, **С.Н. Тамкович**. ADAM-10 на поверхности экзосом крови больных раком молочной железы: новые механизмы опухолевой диссеминации. Вопросы онкологии, 2019, Т.65 (5), С. 678-683.
21. O. Tutanov, E. Orlova, K. Proskura, A. Grigor'eva, N. Yunusova, Y. Tsentalovich, A. Alexandrova, **S. Tamkovich**. Proteomic Analysis of Blood Exosomes from Healthy Females and Breast Cancer Patients Reveals an Association between Different Exosomal Bioactivity on Non-tumorigenic Epithelial Cell and Breast Cancer Cell Migration in Vitro. *Biomolecules*, 2020, V. 10, P. 495. DOI:10.3390/biom10040495.
22. О.С. Тутанов, Ю.С. Бакакина, К.В. Проскура, А.Е. Григорьева, В.Э. Сяхович, С.А. Беляев, Е.И. Рябчикова, Ю.П. Центалович, П.П. Лактионов, **С.Н. Тамкович**. Поиск протеомных маркеров рака молочной железы в составе суммарных экзосом крови. Сибирский онкологический журнал, 2020, V. 19(2), P. 49–61, DOI: 10.21294/1814-4861-2020-19-2-49-61.
23. M. Konoshenko, G. Sagaradze, E. Orlova, T. Shtam, K. Proskura, R. Kamyshinsky, N. Yunusova, A. Alexandrova, A. Efimenko, **S. Tamkovich**. Total Blood Exosomes in Breast Cancer: Potential Role in Crucial Steps of Tumorigenesis. *Int. J. Mol. Sci.* 2020, V. 21(19), P. 7341. DOI:10.3390/ijms21197341.
24. O. Tutanov, K. Proskura, R. Kamyshinsky, T. Shtam, Y. Tsentalovich, **S. Tamkovich**. Protein profiling of plasma and total blood exosomes in breast cancer: a potential role in tumor progression, diagnosis, and prognosis. *Front. Oncol.*, 2020, V. 10, P. 580891. DOI: 10.3389/fonc.2020.580891.
25. O.S. Tutanov, K.V. Proskura, A.E. Grigor'eva, Yu.P. Tsentalovich, **S.N. Tamkovich**. Identification of tumor dissemination facilitating proteins in exosomes associated with blood cells of breast cancer patients. *Russian Journal of Bioorganic Chemistry*, 2020, V. 46(6), P. 1018–1033. DOI: 10.1134/S1068162020060357.
26. N. Yunusova, E. Kolegova, E. Sereda, L. Kolomiets, A. Villert, M. Patysheva, I. Rebeda, A. Grigor'eva, N. Tarabanovskaya, I. Kondakova, **S. Tamkovich**. Plasma Exosomes of Patients with Breast and Ovarian Tumors Contain an Inactive 20S Proteasome. *Molecules*, 2021, V. 26(22), P. 6965. DOI:10.3390/molecules26226965.
27. Tutanov O., Shtam T., Grigor'eva A., Tupikin A., Tsentalovich Y., **Tamkovich S.** Blood plasma exosomes contain circulating DNA in their crown. *Diagnostics (Basel)*. 2022, V. 12(4), P. 854. DOI: 10.3390/diagnostics12040854.
28. Tutanov O., **Tamkovich S.** The influence of proteins on fate and biological role of circulating DNA. *Int. J. Mol. Sci.* 2022, V. 23(13), P. 7224. DOI: 10.3390/ijms23137224.
29. Shefer A., Yalovaya A., **Tamkovich S.** Exosomes in breast cancer: involvement in tumor dissemination and prospects for liquid biopsy. *Int. J. Mol. Sci.* 2022, V. 23, P. 8845. DOI:23168845.

30. **Tamkovich S.**, Tupikin A., Kozyakov A., Laktionov P. Size and methylation index of cell-free and cell-surface-bound DNA in blood of breast cancer patients in the context of liquid biopsy. *Int. J. Mol. Sci.* 2022, V. 23, P. 8919. DOI:10.3390/ijms23168919.

31. O. Tutanov, A. Shefer, Y. Tsentalovich, **S. Tamkovich**. Comparative Analysis of Molecular Functions and Biological Role of Proteins from Cell-Free DNA-Protein Complexes Circulating in Plasma of Healthy Females and Breast Cancer Patients. *Int. J. Mol. Sci.* 2023, V. 24(8), P. 7279. DOI:10.3390/ijms24087279.

***Патенты:***

32. Лактионов П.П., **Тамкович С.Н.**, Рыкова Е.Ю., Власов В.В. Способ выделения нуклеиновых кислот. Патент РФ № 2272072 от 20 марта 2006 г.

33. **Тамкович С.Н.**, Лактионов П.П., Тутанов О.С., Рябчикова Е.И., Григорьева А.Е., Власов В.В. Способ получения экзосом из крови. Патент РФ 2556825 от 18.06.2015.

34. **Тамкович С.Н.**, Лактионов П.П., Тутанов О.С., Власов В.В. Способ диагностики и мониторинга онкологических заболеваний с использованием экзосом крови. Патент РФ 2571507 от 24.11.2015.

35. **Тамкович С.Н.**, Милейко В.А., Попов А.В., Власов В.В., Лактионов П.П. База данных учета биологических образцов и описания клинико-патологических характеристик пациентов с новообразованиями молочной железы. Свидетельство о государственной регистрации базы данных № 2012621042, зарегистрировано 5 октября 2012 г

***Тезисы конференций:***

36. Е.Ю. Рыкова, Т.Э. Скворцова, **С.Н. Тамкович**, О.Е. Брызгунова, А.В. Стариков, Н.П. Кузнецова, В.В. Власов, П.П. Лактионов. Новые направления в разработке неинвазивных методов диагностики рака молочной железы. Конференция по фундаментальной онкологии «Петровские чтения - 2006» // Санкт-Петербург, Россия, 14 апреля 2006. Тезисы 2-й Российской конференции по фундаментальной онкологии, с. 30.

37. Скворцова Т.Э., **Тамкович С.Н.**, Брызгунова О.Е., Пермьякова В.И., Стариков А.В., Кузнецова Н.П., Власов В.В., Рыкова Е.Ю., Лактионов П.П. Анализ циркулирующих ДНК крови в дифференциальной диагностике опухолей молочной железы. Региональная конференция молодых ученых «Актуальные вопросы экспериментальной и клинической онкологии» // Томск, Россия, 20 апреля 2006, Сборник материалов региональной конференции молодых ученых, С. 54-55.

38. **S. Tamkovich**, T. Skvortsova, E. Rykova, O. Bryzgunova, V. Vlassov, P. Laktionov. Circulating DNA in breast cancer diagnostics. EMBO Molecular medicine conference: "Common molecular mechanisms of mammary gland development and breast cancer progression" // Dublin, Ireland, 6-8 June 2006. Abstract book. P.81.

39. **С.Н. Тамкович**, Е.Ю. Рыкова, Т.Э. Скворцова, О.Е. Брызгунова, А.В. Стариков, В.И. Пермякова, Н.П. Кузнецова, В.В. Власов, П.П. Лактионов. Циркулирующие ДНК крови в диагностике опухолей молочной железы. Конференция по фундаментальной онкологии «Петровские чтения - 2007» // Санкт-Петербург, Россия, 20 апреля 2007, Научно-практический журнал «Вопросы онкологии», Т. 53, № 1, 2007 г., Тезисы 3-й Российской конференции по фундаментальной онкологии, с. 25.
40. **Tamkovich SN**, Brizgunova OE, Vlassov VV, Laktionov PP. Influence of protease activity on DNA concentration in human blood. FEBS Advanced Lecture Course “Matrix Pathobiology, Signaling and Molecular Targets” // Patras, Greece, May 21-26 2007, Book of abstracts, p. 97.
41. **С.Н. Тамкович**. Исследование последовательностей фрагментов внеклеточных ДНК крови здоровых доноров и онкологических больных. Материалы XLVI международной научной студенческой конференции «Студент и научно-технический прогресс». Секция «Молекулярный дизайн и экологически безопасные технологии». Новосибирск, Россия, 27-30 апреля 2008. С. 33.
42. Черепанова А.В., **Тамкович С.Н.**, Брызгунова О.Е., Елистратова Е.В., В.В. Власов, П.П. Лактионов. Активность дезоксирибонуклеаз и концентрация циркулирующей ДНК в крови здоровых доноров и онкологических больных. Научная конференция «Фундаментальные науки - медицине» // Новосибирск, Россия, 2-5 сентября 2008, Сборник тезисов конференции, С. 49.
43. Бондарь А.А., **Тамкович С.Н.**, Морозов И.В., Бондарь А.А., Власов В.В., Лактионов П.П. Исследование последовательностей фрагментов внеклеточных ДНК крови здоровых доноров и онкологических больных. Научная конференция «Фундаментальные науки - медицине» // Новосибирск, Россия, 2-5 сентября 2008, Сборник тезисов конференции, С. 50.
44. **S.N. Tamkovich**, T.E. Skvortsova, O.E. Bryzgunova, A.V. Starikov, V.I. Permyakova, E.Y. Rykova, V.V. Vlassov, P.P. Laktionov. Circulating DNA in diagnostic of breast tumors. The 12<sup>th</sup> Biennial Meeting International Gynecologic Cancer Society. // Bangkok, Thailand, October 25-28, 2008, Abstracts disk.
45. Бондарь А.А., **Тамкович С.Н.**, Морозов И.В., Бондарь А.А., Власов В.В., Лактионов П.П. Исследование последовательностей фрагментов внеклеточных ДНК крови здоровых доноров и онкологических больных. IV Региональная конференция молодых ученых им. академика РАМН Н.В. Васильева «Актуальные вопросы экспериментальной и клинической онкологии» // Томск, Россия, 24 апреля 2009, Сибирский онкологический журнал, приложение №1, с. 35.
46. **S.N. Tamkovich**, A.A. Bondar, O.E. Bryzgunova, I.V. Morozov, A.A. Bondar, A.V. Starikov, V.I. Permyakova, V.V. Vlassov, P. P. Laktionov. Circulating nucleic acids in blood of healthy

- donors and breast cancer patients. IMPAKT Breast Cancer Conference // Brussels, Belgium, 6-8 May 2010, *Annals of Oncology*, V. 21, Suppl. 4, iv31, doi:10.1093/annonc/mdq141.
47. E.Y. Rykova, E.S. Morozkin, E.M. Loseva, A.A. Ponomaryova, E.V. Elistratova, V.A. Mileiko, A.V. Cherepanova, T.E. Skvortsova, O.E. Bryzgunova, **S.N. Tamkovich**, N.V. Cherdyntseva, V.V. Vlassov, P.P. Laktionov. Cell-free and cell-bound circulating nucleic acids complex: mechanisms of generation, concentration and content. CNAPS VII "Circulating Nucleic Acids in Plasma and Serum" // 24-25 October 2011, Madrid, Spain. *Journal of Nucleic Acids Investigation*, 2011, V. 2, Supp. 1, P. 3
48. **S.N. Tamkovich**. Aberrantly methylated DNA as circulating DNA-oncomarker. Collaborative workshop on biomarkers // 16 January 2012, Moscow, Russia, Book of abstracts, p. 14-15.
49. **S.N. Tamkovich**, T.G. Duzhak, A.V. Starikov, V.V. Vlassov, P.P. Laktionov. Novel approach for identification of DNA-binding proteins of blood cell surface. International conference on Postgenomic technology for biomedicine // 25-29 June 2012, Novosibirsk, Book of abstracts, p. 114
50. **S.N. Tamkovich**, T.G. Duzhak, A.V. Starikov, V.V. Vlassov, P.P. Laktionov. Novel approach for identification of DNA-binding proteins of blood cell surface. FEBS Advanced Lecture Course "Sofia School of protein science: structure and dynamics of biological macromolecules" // 9-14 September 2012, Sofia, Bulgaria, Book of abstracts, p. 91
51. **S.N. Tamkovich**, V.A. Myleiko, A.V. Starikov, V.I. Permyakova, V.V. Vlassov, P.P. Laktionov. Quantification of tumor-specific DNA in blood of healthy women and breast cancer patients. 37th ESMO Congress // 28 September-2 October 2012, Vienna, Austria, *Annals of Oncology*, 2012, Vol. 23, Supp. 9, P. ix95-115.
52. **С.Н. Тамкович**, В.А. Милейко, А.В. Стариков, В.И. Пермякова, Н.А. Кирюшина, В.Е. Войцицкий, В.В. Власов, П.П. Лактионов. Эпигенетические ДНК-маркеры и белковые маркеры крови при раке молочной железы. VIII конференция молодых ученых-онкологов им. академика РАМН Н.В. Васильева «Актуальные вопросы экспериментальной и клинической онкологии» // Томск, Россия, 26 апреля 2013, *Сибирский онкологический журнал*, приложение №1, с. 88-89.
53. **С.Н. Тамкович**, Дужак Т.Г., А.В. Стариков, В.И. Пермякова, Н.А. Кирюшина, В.Е. Войцицкий, В.В. Власов, П.П. Лактионов. Сравнительное протеомное исследование экзосом крови здоровых женщин и больных раком молочной железы. VIII конференция молодых ученых-онкологов им. академика РАМН Н.В. Васильева «Актуальные вопросы экспериментальной и клинической онкологии» // Томск, Россия, 26 апреля 2013, *Сибирский онкологический журнал*, приложение №1, с. 89-90.
54. **S. Tamkovich**, T. Duzhak, E. Ryabchikova, N. Kirushina, V. Permyakova, V. Voicitskyi, V. Vlassov, P. Laktionov. Proteomic analysis of exosomes from blood of healthy donors and breast

cancer patients. «The First Meeting in the Frame of French-Siberian Centre of Research and Education “Nucleic Acid - Protein Interactions for Life Sciences”. // Novosibirsk, Russia, 13-15 May 2013, Abstract book, P.80

55. **С.Н. Тамкович**, Дужак Т.Г., Н.А. Кирюшина, В.И. Пермякова, В.Е. Войцицкий, В.В. Власов, П.П. Лактионов. Исследование протеома нуклеопротеиновых комплексов, циркулирующих в крови здоровых женщин и больных раком молочной железы. Конференция «Фундаментальные науки-медицине» // Новосибирск, Россия, 16-20 сентября 2013, Сборник тезисов, С 146-147.

56. **S.N. Tamkovich**, N.A. Kirushina, V.I. Permyakova, V.E. Voicitskyi, V.V. Vlassov, P.P. Laktionov. Characterization of circulating DNA in blood of healthy donors and breast cancer patients. The international young scientist conference «Perspectives for development of molecular and cellular biology-4» // Erevan, Armenia, 21-22 October 2013, Biological journal of Armenia, V. LXV, P. 143-144.

57. **S. Tamkovich**, N. Kirushina, V. Permyakova, V. Voicitskyi, V. Vlassov, P. Laktionov. Characterization of circulating DNA in blood of healthy donors and breast cancer patients. CNAPS VIII “Circulating Nucleic Acids in Plasma and Serum” // 7-8 November 2013, Baltimore, USA. Abstract book, 2013, P. 30.

58. **Тамкович С.Н.**, Тутанов О.С., Григорьева А.Е., Н.А. Кирюшина, Пермякова В.И., Войцицкий В.Е., В.В. Власов, Рябчикова Е.И., П.П. Лактионов. Сравнительное исследование экзосом крови здоровых женщин и больных раком молочной железы. VIII съезд онкологов и радиологов стран СНГ и Евразии // Казань, Россия, 16-18 сентября 2014, Евразийский онкологический журнал, 2014, Т. 3, С. 124-125, 1025.

59. Тутанов О.С., **Тамкович С.Н.**, Григорьева А.Е., Рябчикова Е.И., П.П. Лактионов. Сравнительное протеомное исследование экзосом крови здоровых женщин и больных раком молочной железы. I Международная конференция молодых учёных биотехнологов, молекулярных биологов и вирусологов OpenBio // Кольцово, Россия, 7-8 октября 2014, Сборник тезисов, С 100-101.

60. **S. Tamkovich**, O. Tutanov, A. Grigor'eva, T. Duzhak, N. Kirushina, V. Permyakova, E. Ryabchikova, V. Voicitskyi, V. Vlassov, P. Laktionov. Cell surface bound and cell free exosomes in blood of healthy and breast cancer women. UK-Russia Workshop: Extracellular vesicles-mechanisms of biogenesis and roles in disease pathogenesis // Moscow, Russia, 1-5/03/2015, Journal of Extracellular Vesicles 2015, 4: 28165.

61. О.С. Тутанов, **С.Н. Тамкович**, А.Е. Григорьева, Е.И. Рябчикова, Т.Г. Дужак, П.П. Лактионов. Сравнительное протеомное исследование экзосом крови здоровых женщин и больных раком молочной железы. X конференция молодых ученых-онкологов им. академика

- РАМН Н.В. Васильева «Актуальные вопросы экспериментальной и клинической онкологии» // Томск, Россия, 22 мая 2015, Сибирский онкологический журнал, приложение №1, с. 82-83.
62. **S. Tamkovich**, O. Tutanov, A. Grigor'eva, T. Duzhak, N. Kirushina, V. Permyakova, E. Ryabchikova, V. Voicitskyi, V. Vlassov, P. Laktionov. Blood cell-surface-bound exosomes as a new source of tumor-specific microRNA. EMBO Workshop «Cellular and molecular mechanism of tumour-microenvironment crosstalk» // Tomsk, Russia, 9-12 July 2015, European Journal of Cancer. 2015, Supp. 13(1). P. 59-60. DOI: 10.1016/j.ejcsup.2015.08.106
63. **S. Tamkovich**, A. Bondar, I. Morozov, N. Kirushina, V. Permyakova, V. Voitsitskiy, P. Laktionov. The characterization of total circulating DNA from blood of healthy donors and cancer patients. EMBO Workshop «Cellular and molecular mechanism of tumour-microenvironment crosstalk» // Tomsk, Russia, 9-12 July 2015, European Journal of Cancer. 2015, Supp. 13(1). P. 59-60. DOI: 10.1016/j.ejcsup.2015.08.107
64. **Тамкович С.Н.**, Сердюков Д.С., Тутанов О.С., Дужак Т.Г., Кирюшина Н.А., Войцицкий В.Е., Лактионов П.П. Выделение и идентификация нуклеопротеиновых комплексов, циркулирующих в крови здоровых женщин и больных раком молочной железы. VII Российский симпозиум «Белки и пептиды» // Новосибирск, 12–17 июля 2015, Материалы симпозиума, с. 235.
65. Тутанов О.С., **Тамкович С.Н.**, Дужак Т.Г., Рябчикова Е.И., Григорьева А.Е., Лактионов П.П. Сравнительное протеомное исследование экзосом крови здоровых женщин и больных раком молочной железы. VII Российский симпозиум «Белки и пептиды» // Новосибирск, 12–17 июля 2015, Материалы симпозиума, с. 254.
66. **С. Н. Тамкович**, О. С. Тутанов, А. Е. Григорьева, Н. А. Кирюшина, В. И. Пермякова, В. Е. Войцицкий, В. В. Власов, Е. И. Рябчикова, П. П. Лактионов. Диагностический потенциал экзосом, связанных с форменными элементами крови. II Ежегодный конгресс ROOM // Сочи, 3-5 сентября 2015 г, Спецвыпуск "Материалы II Ежегодного конгресса ROOM. Инновации в диагностике и лечении рака молочной железы", с. 91.
67. **S.N. Tamkovich**, O.S. Tutanov, D.S. Serdukov, T.G. Duzhak, N.A. Kirushina, V.V. Vlassov, P.P. Laktionov. DNA/protein content of circulating nucleoprotein complexes. CNAPS IX "Circulating Nucleic Acids in Plasma and Serum" // 10-12 September 2015, Berlin, Germany. Abstract book, 2015, P. 98.
68. **S.N. Tamkovich**, N.A. Kirushina, V.V. Vlassov, P.P. Laktionov. cirDNA size and termini in blood of healthy females and breast cancer patients. CNAPS IX "Circulating Nucleic Acids in Plasma and Serum" // 10-12 September 2015, Berlin, Germany. Abstract book, 2015, P. 92-93.
69. **Тамкович С.Н.**, Тутанов О.С., Григорьева А.Е., Кирюшина Н.А., Пермякова В.И., Войцицкий В.Е., Рябчикова Е.И., Лактионов П.П. Диагностический потенциал экзосом,

связанных с клетками крови. Российская конференция «Молекулярная онкология: итоги и перспективы» // Москва, Россия, 16-17 декабря 2015, Журнал Успехи молекулярной онкологии, Т. 2, № 4, С. 39-40

70. Yunusova N.V., **Tamkovich S.N.**, Stakheeva M.N., Afanas'ev S.G., Frolova A.Y., Kondakova I.V. The Characterization of Exosome from Blood Plasma of Patients with Colorectal Cancer. International conference "Physics of cancer: interdisciplinary problems and clinical applications". Tomsk, Russia, March 22-25, 2016. Book of abstracts, P. 30.

71. **Тамкович С. Н.**, Тутанов О. С., Григорьева А. Е., Дужак Т. Г., Центалович Ю. П., Кирюшина Н. А., Пермякова В. И., Рябчикова Е. И., Войцицкий В. Е., Лактионов П. П. Протеом экзосом крови при раке молочной железы. IX съезд онкологов и радиологов стран СНГ и Евразии // Минск, Белоруссия, 15-17 июня 2016, Евразийский онкологический журнал, 2016, Т. 4, С. 613.

72. Тутанов О. С., Сомов А. К., **Тамкович С. Н.**, Бакакина Ю. С., Дубовская Л. В., Юнусова Н. В., Волотовский И. Д., Кирюшина Н. А., Войцицкий В. Е., Лактионов П. П. Анализ циркулирующих экзосом крови в норме и при злокачественных новообразованиях молочной железы. Международная конференция, посвященная 90-летию академика Д.Г. Кнорре «Химическая биология» // Новосибирск, 24-28 июля 2016 г., Материалы международной конференции, посвященной 90-летию академика Д.Г. Кнорре. Новосибирск, 2016. – 217 с, ISBN 978-5-85957-131-4, С. 153.

73. Тутанов О. С., **Тамкович С. Н.**, Шлихт А. Г., Беленикин М. С., Кирюшина Н. А., Сердюков Д. С., Войцицкий В. Е., Центалович Ю. П., Лактионов П. П. Идентификация белков, опосредующих транспорт внеклеточных ДНК в кровотоке. Международная конференция, посвященная 90-летию академика Д.Г. Кнорре «Химическая биология» // Новосибирск, 24-28 июля 2016 г., Материалы международной конференции, посвященной 90-летию академика Д.Г. Кнорре. Новосибирск, 2016. – 217 с, ISBN 978-5-85957-131-4, С. 154.

74. Tutanov O.S., **Tamkovich S.N.**, Bakakina Y.S., Dubovskaya L.V., Tsentalovich Y.P., Volotovskiy I.D., Laktionov P.P. Looking for proteomic markers of breast cancer in blood exosomes. The X international conference on bioinformatics of genome regulation and structure\systems biology. // Novosibirsk, 28 Aug-2 Sep 2016. Book of abstracts, p. 325.

75. **Тамкович С.Н.**, Тутанов О.С., Дужак Т.Г., Центалович Ю.П., Лактионов П.П. Протеомный анализ циркулирующих в крови экзосом. V Съезд физиологов СНГ и V Съезд биохимиков России // Дагомыс, Россия, 3-9 октября 2016 г., Acta Naturae, спецвыпуск Т 1, С 45-46.



76. **Тамкович С.Н.**, Тутанов О.С., Дужак Т.Г., Кирюшина Н.А., Тарабановская Н.А., Слонимская Е.М., Войцицкий В.Е., Центалович Ю.П., Лактионов П.П. Протеомный анализ циркулирующих в крови нуклеопротеиновых комплексов. V Съезд физиологов СНГ и V Съезд биохимиков России // Дагомыс, Россия, 3-9 октября 2016 г., Acta Naturae, спецвыпуск Т 2, С 124.
77. **Тамкович С.Н.**, Бакакина Ю.С., Сомов А.К., Тутанов О.С., Кирюшина Н.А., Карпухина К.В., Дубовская Л.В., Войцицкий В.Е., Волотовский И.Д., Лактионов П.П. Протеомный анализ циркулирующих экзосом крови в норме и при злокачественных новообразованиях молочной железы. Российская конференция «Молекулярная онкология: итоги и перспективы» // Москва, Россия, 6-8 декабря 2016, Журнал Успехи молекулярной онкологии, 2016, Т 4, С. 99.
78. O.S. Tutanov, **S.N. Tamkovich**, A. Grigoryeva, E. Ryabchikova, T. Duzhak, Y. Tsentalovich, P. Laktionov, V. Vlassov. Breast cancer blood-derived exosomes: Characterization of protein composition in search for new biomarkers. *Annals of Oncology* 27 (Supplement 9): ix1–ix8, 2016. doi:10.1093/annonc/mdw573
79. **Тамкович С. Н.**, Тутанов О. С., Центалович Ю. П., Сомов А. К., Карпухина К. В., Юнусова Н. В., Войцицкий В. Е., Власов В. В., Лактионов П.П. Анализ протеома циркулирующих в крови экзосом. IX международный конгресс «Биотехнология: состояние и перспективы развития» // Москва, Россия, 20-22 февраля 2017, Сборник тезисов, Ч. 1, С. 225-227.
80. Бакакина Ю. С., **Тамкович С. Н.**, Тутанов О. С., Дубовская Л. В., Лактионов П.П. Протеомный анализ экзосом крови для поиска биомаркеров рака молочной железы. IX международный конгресс «Биотехнология: состояние и перспективы развития» // Москва, Россия, 20-22 февраля 2017, Сборник тезисов, Ч. 1, С. 246-247.
81. Yunusova N.V., **Tamkovich S.N.**, Grigor'eva A.A., Somov A.K., Kolomiets L.A., Molchanov S.V., Afanas'ev S.G., Kakurina G.V., Choynzonov E.L., Kondakova I.V. The characterization of exosomes from biological fluids of patients with different type of cancer. International conference "Physics of cancer: interdisciplinary problems and clinical applications". Tomsk, Russia, 23-26 мая 2017, Сборник тезисов, С. 39
82. **Tamkovich S.N.**, Карпухина К.В., Somov A.K., Стахеева М.Н., Grigoryeva A.E., Войцицкий В.Е., Laktionov P.P. Isolation and Characterization of Exosomes from Blood of Patients with Mastopathy and Breast Cancer. International conference "Physics of cancer: interdisciplinary problems and clinical applications". Tomsk, Russia, 23-26 мая 2017, Сборник тезисов, С. 62.

83. **Тамкович С. Н.**, Тутанов О. С., Сомов А. К., Карпухина К. В., Юнусова Н. В., Григорьева А. Е., Кирюшина Н. А., Войцицкий В. Е., Стахеева М. Н., Рябчикова Е. И., Власов В. В., Лактионов П. П. Эпигенетические и протеомные маркеры в составе экзосом крови больных раком молочной железы. Всероссийская конференция с международным участием «Биотехнология – медицине будущего» // Новосибирск, Россия, 24-26 июля 2017, Материалы конференции, С. 104.
84. P.P. Laktionov, **S.N. Tamkovich**, N.A. Kirushina, V.V. Vlassov. RAR $\beta$ 2 gene methylation level in the cell-free and cell-bound DNA from breast cancer patient blood. 10<sup>th</sup> CNAPS "Circulating Nucleic Acids in Plasma and Serum" // 20-22 September 2017, France. Abstract book, P. 58
85. **Тамкович С.Н.**, Сомов А.К., Г.Д. Сагарадзе, Тутанов О.С., Карпухина К.В., Д.И.Клемешова, Юнусова Н.В., Власов В.В., Центалович Ю.П., В.А. Ткачук, Лактионов П.П. Ангиогенные свойства циркулирующих в крови экзосом. III Национальный Конгресс по Регенеративной Медицине // 15 - 18 Ноября 2017, Москва, Россия. Гены & клетки, 2017, Т. XII, No 3, С. 241.
86. **С. Н. Тамкович**, А. К. Сомов, Г. Д. Сагарадзе, О. С. Тутанов, К. В. Карпухина, Д. И. Клемешова, Н. В. Юнусова, В. В. Власов, Ю. П. Центалович, В. А. Ткачук, П. П. Лактионов. Ангиогенные свойства циркулирующих экзосом крови. Всероссийская конференция «Молекулярная онкология: итоги и перспективы» // Москва, Россия, 6-8 декабря 2017, Журнал Успехи молекулярной онкологии, 2017, Т 4, С. 45.
87. Тутанов О.С., Лактионов П.П., Центалович Ю.П., **Тамкович С.Н.** Исследование протеома экзосом крови с целью поиска новых неинвазивных маркеров рака молочной железы. Материалы IV петербургского международного онкологического форума "Белые ночи 2018", с. 281
88. **Тамкович С.Н.**, Сомов А.В., Юнусова Н.В., Тугутова Е.А., Проскура К.В., Штам Т.А., Стахеева М.Н., Кондакова И.В., Лактионов П.П. Протеазы экзосом у больных раком молочной железы. Всероссийская конференция «Молекулярная онкология: итоги и перспективы» // Москва, Россия, 17-19 декабря 2018, Журнал Успехи молекулярной онкологии, 2018, Т. 5(№4), С. 62.
89. Сомов А. К., Тутанов О. С., Проскура К. В., Штам Т. А., Григорьева А. Е., Юнусова Н. В., Рябчикова Е. И., Лактионов П. П., **Тамкович С. Н.** Сравнительный анализ экзосом кондиционных сред и биологических жидкостей. Международный Конгресс «Биотехнология: состояние и перспективы развития. Науки о жизни», Секция «Внеклеточные везикулы и циркулирующие микроРНК» // Москва, Россия, 25-27 февраля

2019, Материалы Международного Конгресса, С. 169-171. ISBN: 978-5-9909118-0-2, ISSN: 2312-640X

90. **Тамкович С.Н.**, Сагарадзе Г.Д., Сомов А.К., Проскура К.В., Юнусова Н.В., Лактионов П.П., Ткачук В.А. Суммарные экзосомы крови онкологических больных стимулируют ангиогенез в системе *in vitro*. V Петербургский онкологический форум «Белые Ночи – 2019» // Санкт-Петербург, 20-23 июня 2019 г, Сборник тезисов. СПб., 2019. – 534 с, ISBN 978-5-9908557-9-3, С. 238.

91. Тутанов О.С., Бакакина Ю.С., Проскура К.В., Дубовская Л.В., Войцицкий В.Е., **Тамкович С.Н.**, Сомов А.К., Волоотовский И.Д., Лактионов П.П. Белки экзосом, ассоциированных с поверхностью форменных элементов крови, как новый источник материала для неинвазивной диагностики рака молочной железы. V Петербургский онкологический форум «Белые Ночи – 2019» // Санкт-Петербург, 20-23 июня 2019 г, Сборник тезисов. СПб., 2019. – 534 с, ISBN 978-5-9908557-9-3, С. 230-231

92. **С. Н. Тамкович**, О. С. Тутанов, А. К. Сомов, К. В. Проскура, Н. В. Юнусова, А. Е. Григорьева, В. Е. Войцицкий, Е. И. Рябчикова, Ю. П. Центалович, В. В. Власов, П. П. Лактионов. Эпигенетические и протеомные маркеры в составе экзосом крови больных раком молочной железы. II Всероссийская конференция с международным участием «Опухолевые маркеры: молекулярно-генетические и клинические аспекты» // Республика Алтай, г. Горно-Алтайск, 2–5 июля 2019 г., Материалы конференции, С. 54-55. ISBN 978-5-4437-0931-4.

93. Тутанов О.С., Коношенко М.Ю., Проскура К.В., Сагарадзе Г.Д., Юнусова Н.В., **Тамкович С.Н.** Идентификация вовлеченных в стимуляцию ангиогенеза белков и микроРНК в составе экзосом крови больных раком молочной железы. Всероссийская конференция «Молекулярная онкология: итоги и перспективы» // Москва, Россия, 16-18 декабря 2019, Журнал Успехи молекулярной онкологии, 2019, Т. 6(№4), С. 93-94.

94. **Тамкович С.Н.**, Тутанов О.С., Проскура К.В., Григорьева А.Е., Центалович Ю.П. Идентификация белков в составе экзосом, ассоциированных с поверхностью форменных элементов крови больных раком молочной железы, вовлечённых в диссеминацию опухоли. VI Петербургский онкологический форум «Белые Ночи – 2020» // Санкт-Петербург, 25-28 июня 2020 г, Сборник тезисов. СПб., 2020. – 426 с, ISBN 978-5-6043599-6-9, С. 314.

95. Тутанов О.С., Проскура К.В., Центалович Ю.П., **Тамкович С. Н.** Поиск протеомных маркеров рака молочной железы в составе суммарных экзосом крови. Международная конференция «Инновационные исследования в биологии и в медицине». // Сочи, 25-27 ноября 2020 г. Сборник тезисов международной конференции, С. 108-109.

96. О.С. Тутанов, М.Ю. Коношенко, К.В. Проскура, Е.А. Орлова, Г.Д. Сагарадзе, Т.А. Штам, Н.В. Юнусова, А.Ю. Александрова, **С.Н. Тамкович**. Циркулирующие в крови больных

раком молочной железы экзосомы в опухолевой диссеминации. VI Всероссийская конференция по Молекулярной онкологии // Москва, Россия, 21-23 декабря 2021, Журнал Успехи молекулярной онкологии, 2021, Т 8 (4), С. 70.

97. Тутанов О.С., Коношенко М.Ю., Проскура К.В., Орлова Е., Сагарадзе Г.Д., Штам Т.А., Юнусова Н.В., Александрова А.Ю., **Тамкович С.Н.** Роль циркулирующих в крови экзосом в диссеминации рака молочной железы на молекулярном уровне. VIII Петербургский международный онкологический форум «Белые Ночи – 2022» // Санкт-Петербург, 27 июня – 3 июля 2022 г, Материалы VIII Петербургского международного онкологического форума «Белые ночи • 2022». СПб., 2022. – 493 с, ISSN 0507–375, С. 442-443.

98. **Тамкович С.Н.**, Тутанов О.С., Центалович Ю.П. Сравнительный протеомный анализ циркулирующих нуклеопротеиновых комплексов крови здоровых женщин и больных раком молочной железы. IV Всероссийская конференция с международным участием «Опухолевые маркеры: фундаментальные и клинические аспекты» // Майма, Республика Алтай, 2-6 августа 2022 г, Материалы конференции «Опухолевые маркеры: фундаментальные и клинические аспекты». Москва: Блок-Принт, 2022. – 152 с., ISBN 978-5-6048456-5-3, С. 113-115.

99. О.С. Тутанов, А.И. Яловая, И.А. Рекеда, Т.А. Штам, Н.В. Юнусова, А.Ю. Александрова, **С.Н. Тамкович.** Роль циркулирующих в крови экзосом в прогрессии рака молочной железы. I Международная конференция «Генетические технологии в трансляционной биомедицине» // Томск, 5–7 сентября 2022 г., Материалы I Международной конференции: Генетические технологии в трансляционной биомедицине. – Томск: Изд-во СибГМУ, 2022. – 40 с. ISBN 978-5-98591-158-9, С. 25-26.

100. **С. Н. Тамкович**, А. А. Шефер, Е. И. Джугашвили. Поиск опухолевых маркеров в составе нуклеопротеиновых комплексов, циркулирующих в крови больных раком молочной железы. VII Всероссийская конференция по Молекулярной онкологии // Москва, Россия, 21-23 декабря 2022, Журнал Успехи молекулярной онкологии, 2022, Т 9 (4), С. 79.