

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

На правах рукописи



Тамкович Светлана Николаевна

**ДЕЗОКСИРИБОНУКЛЕОПРОТЕИНОВЫЕ КОМПЛЕКСЫ
И ЭКЗОСОМЫ ПРИ РАКЕ МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ:
ДИАГНОСТИЧЕСКИЙ ПОТЕНЦИАЛ
И БИОЛОГИЧЕСКАЯ РОЛЬ**

3.1.6. Онкология, лучевая терапия (биологические науки)
1.5.4. Биохимия

Диссертация на соискание ученой степени
доктора биологических наук

Научные консультанты:
доктор биологических наук, профессор,
академик РАН
Ткачук Всеволод Арсеньевич,
доктор медицинских наук, профессор РАН
Чернышова Алена Леонидовна

Новосибирск — 2025

ОГЛАВЛЕНИЕ

ВВЕДЕНИЕ.....	5
ГЛАВА 1 ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ.....	17
1.1 Клинико-эпидемиологические особенности РМЖ.....	17
1.2 Диагностика раннего РМЖ.....	18
1.3 Перспективы использования «жидкостной биопсии» для диагностики и оценки эффективности лечения РМЖ.....	19
1.3.1 Метаболомные маркеры РМЖ.....	20
1.3.2 Белковые маркеры.....	21
1.3.3 ВнДНК.....	22
1.3.4 ВнРНК.....	25
1.3.5 Протеомные маркеры РМЖ в составе экзосом.....	26
1.4 ДНПК крови и их роль в канцерогенезе.....	29
1.4.1 Источники эндогенной внДНК в кровотоке.....	29
1.4.2 Влияние гидролаз крови на циркуляцию внДНК.....	31
1.4.3 Особенности фрагментации внДНК при патологических состояниях.....	36
1.4.4 Молекулярно-биологическая роль внДНК крови.....	37
1.5 Экзосомы крови и их роль в канцерогенезе.....	40
1.5.1 Биогенез экзосом.....	40
1.5.2 Состав экзосом.....	42
1.5.2.1 Липиды экзосом.....	42
1.5.2.2 Белки экзосом.....	43
1.5.2.2.1 Тетраспанины короны экзосом.....	44
1.5.2.2.2 Протеазы экзосом.....	47
1.5.2.3 Нуклеиновые кислоты экзосом.....	49
1.5.3 Минимальные требования для идентификации ВВ.....	49
1.5.4 Экзосомы и канцерогенез.....	50
1.5.4.1 Экзосомы и ЭМП при РМЖ.....	51
1.5.4.2 Стимуляция опухолевыми экзосомами клеточной пролиферации и миграции.....	52
1.5.4.3 Стимуляция опухолевыми экзосомами формирования метастаз.....	52
1.5.4.4 Экзосомы и ангиогенез при РМЖ.....	53
1.6 Заключение.....	54
ГЛАВА 2 МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ.....	55

2.1 Клиническая характеристика больных РМЖ.....	55
2.2 Сравнительный анализ ДНК в составе ДНПК крови Здж и больных РМЖ....	58
2.2.1 Получение внДНК плазмы и асс-ФЭ ДНК.....	58
2.2.2 Определение концентрации внДНК.....	59
2.2.3 Исследование строения концов внДНК.....	60
2.2.4 Оценка фрагментации внДНК в крови Здж и больных РМЖ.....	62
2.3 Сравнительный анализ белков в составе ДНПК крови Здж и больных РМЖ...	62
2.3.1 Выделение и анализ нативных ДНПК крови.....	62
2.3.2 Определение концентрации гистонов в плазме крови.....	63
2.3.3 Выделение гистон-содержащих ДНПК аффинной хроматографией.....	64
2.3.4 Анализ ДНК и белков в составе нативных гистон-содержащих ДНПК.....	66
2.4 Онкомаркеры в составе ДНПК крови больных РМЖ.....	67
2.4.1 Анализ аберрантно метилированной формы гена <i>RARβ2</i>	67
2.4.2 Анализ ассоциированных со злокачественным новообразованием белков в составе ДНПК.....	68
2.5 Получение из плазмы и из крови женщин, и их характеристика в соответствии с требованиями Общества по исследованию ВВ.....	69
2.6 Анализ белков в составе экзосом.....	70
2.6.1 Определение уровня 20S протеасом.....	70
2.6.2 Определение уровня ADAM-10 в короне экзосом.....	71
2.6.3 Идентификация белков экзосом методом MALDI-TOF масс-спектрометрии и биоинформатический анализ.....	71
2.6.4 Протеомные онкомаркеры в составе экзосом крови больных РМЖ.....	72
2.7 Анализ роли экзосом крови в диссеминации РМЖ на молекулярном уровне...	72
2.7.1 Анализ ДНК в составе экзосом.....	72
2.7.2 Стимуляция экзосомами формирования КПС первичными эндотелиоцитами.....	73
2.7.3 Стимуляция экзосомами клеточной подвижности.....	73
2.7.4 Стимуляция экзосомами пролиферативной активности.....	74
2.8 Методы статистической обработки данных.....	74
ГЛАВЫ 3 – 5 РЕЗУЛЬТАТЫ СОБСТВЕННЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ.....	75
ГЛАВА 3 ИССЛЕДОВАНИЕ ДНПК КРОВИ В НОРМЕ И ПРИ РМЖ.....	76
3.1 Анализ внДНК в составе ДНПК крови Здж и больных РМЖ.....	76

3.2 Анализ aberrантно-метилованной ДНК в крови Здж и больных РМЖ.....	83
3.3 Сравнительный анализ ДНПК циркулирующих в крови Здж и больных РМЖ	86
3.3.1 Методы выделения нативных ДНПК за нуклеиновую и белковую компоненту.....	88
3.3.2 Идентификация и анализ белков в составе нативных ДНПК крови Здж и первичных больных РМЖ.....	98
3.4 Опухоль-ассоциированные белки ДНПК больных РМЖ.....	113
ГЛАВА 4 СРАВНИТЕЛЬНЫЙ АНАЛИЗ СОСТАВА ЭКЗОСОМ ПЛАЗМЫ И ЭКЗОСОМ КРОВИ ЗДЖ И БОЛЬНЫХ РМЖ.....	116
4.1 Характеризация экзосом	116
4.2 Протеазы в составе экзосом крови Здж и больных РМЖ.....	122
4.3 Протеом экзосом плазмы и экзосом крови первичных больных РМЖ.....	127
4.4 Опухоль-ассоциированные белки экзосом больных РМЖ.....	135
ГЛАВА 5 ВЛИЯНИЕ МОЛЕКУЛЯРНОГО ГРУЗА ЭКЗОСОМ КРОВИ НА ДИССЕМИНАЦИЮ РМЖ.....	139
5.1 Транспорт ДНК в составе экзосом.....	139
5.2 Роль экзосом крови в формировании КПС.....	144
5.3 Влияние экзосом на клеточную подвижность.....	147
5.4 Влияние экзосом на клеточную пролиферацию.....	150
ЗАКЛЮЧЕНИЕ.....	152
ВЫВОДЫ.....	163
ПРИМЕНЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ И НАУЧНЫХ ВЫВОДОВ.....	166
СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ.....	167
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.....	169
ПРИЛОЖЕНИЯ.....	213

ВВЕДЕНИЕ

В последние десятилетия наблюдается устойчивый рост числа новых случаев злокачественных новообразований, что связано в первую очередь с увеличением продолжительности жизни, а также изменениями образа жизни и воздействием неблагоприятных факторов окружающей среды. На сегодняшний день злокачественные новообразования занимают второе место в структуре смертности населения. Среди злокачественных опухолей женского населения рак молочной железы (РМЖ) является ведущей локализацией как в России (22,5 %), так и за рубежом (23,8 %) [1]. В 2023 г. в России было диагностировано 82499 новых случаев заболевания РМЖ, средний возраст пациенток составил 62,1 года [2].

Современная диагностика РМЖ основывается на комплексном подходе, включающем методы инструментальной визуализации, такие как маммография, ультразвуковое исследование с доплерографией, магнитно-резонансная и позитронно-эмиссионная томография, сцинтимammoграфия и биопсия первичного опухолевого узла и регионарных лимфоузлов. В ряде случаев низкая информативность методов лучевой диагностики и сложности морфологической верификации диктуют необходимость многократного повторения маммографического исследования с биопсией, или заканчивается хирургическим вмешательством, как правило, в объеме секторальной резекции со срочным гистологическим исследованием. Как следствие, несмотря на доступность маммографии, у 24 % больных РМЖ определяется на поздних стадиях заболевания [2]. Данное явление связано, в том числе, с бессимптомным развитием заболевания и несвоевременным обращением пациенток к специалистам, тенденцией к более раннему старту злокачественных новообразований, а также отсутствием чувствительных биомаркеров. Несвоевременная диагностика существенно сказывается на прогнозе заболевания. Известно, что на первой стадии заболевания пятилетняя общая выживаемость составляет 98,6 %, при вовлечении регионарных лимфатических узлов — 84,9 %, при метастатической форме РМЖ — 25,9 % [3].

Разнообразие молекулярных характеристик опухоли является критически важным фактором, определяющим клиническое течение заболевания, его лечение и прогноз. Для выбора оптимальной тактики лечения РМЖ подразделяют на суррогатные «внутренние» подтипы, определяемые иммуногистохимическим анализом. В настоящее время выделяют гормон-рецептор-позитивные, HER2-негативные опухоли (чувствительные к гормональной терапии); HER2-гиперэкспрессирующие опухоли с экспрессией гормональных рецепторов или без неё (чувствительные к анти-HER2 терапии); гормон-рецептор-отрицательные,

HER2-отрицательные опухоли (трижды негативные опухоли; нечувствительные к гормональной терапии и анти-HER2 терапии). К сожалению, данный подход не всегда оказывается точным и эффективным при лечении больных РМЖ, поскольку различные молекулярные подтипы имеют значительные отличия как в патогенезе, так и в ответе на проводимую терапию, а также различный потенциал к лимфогенному и гематогенному метастазированию.

Несомненно, выявление злокачественных новообразований на ранних стадиях и повышение эффективности противоопухолевой терапии РМЖ являются актуальными задачами современной клинической и молекулярной онкологии.

Известно, что в биологических жидкостях онкологических больных постоянно находятся различные биополимеры опухолевого происхождения. Поскольку анализ этих молекул позволяет получить информацию о молекулярном портрете опухоли, их выделение из крови, мочи, слезы и других биологических жидкостей называют «жидкостной биопсией». В настоящее время на основе внеклеточных нуклеиновых кислот [4-7] и белков [8], а также биополимеров в составе внеклеточных везикул (ВВ), в том числе экзосом [9] ведутся интенсивные исследования с целью повышения эффективности диагностики и прогноза злокачественных новообразований, а также оценки эффективности противоопухолевой терапии.

Первые работы по исследованию диагностического потенциала внеклеточной ДНК (внДНК) в крови онкологических больных появились в 1970-х годах [10]. Благодаря масштабным исследованиям, на сегодняшний день известно, что во внДНК опухолевого происхождения (вноДНК) можно выявить аналогичные для ДНК злокачественной клетки точечные мутации [11], микросателлитную нестабильность [12], амплификации [13], делеции и эпигенетические изменения [14, 15]. Однако серьезным препятствием для внедрения «жидкостной биопсии» на основе вноДНК в широкую практику является низкое содержание в крови онкологических больных целевых молекул — доля вноДНК не превышает 1 % от общего содержания внДНК [16]. Повысить аналитические характеристики разрабатываемых диагностических систем позволит информация о механизмах появления, циркуляции и выведения из организма вноДНК, её первичной структуре и упаковке в дезоксирибонуклеопротеиновые комплексы (ДНПК) [17-22]. Однако информация о компонентах ДНПК и биологической активности таких комплексов на сегодняшний день крайне скудна. Показано, что в ДНПК помимо внДНК входят гистоны, а также клеточные белки и белки плазмы [19-22], защищающие нуклеиновую кислоту от гидролиза. В крови онкологических больных по сравнению со здоровыми донорами снижается уровень нуклеаз [23] и общая протеазная активность [24], при этом

возрастает концентрация внДНК [25]. Кроме того, в ряде исследований было показано, что формирование ДНПК является необходимым условием для переноса функционально активной ДНК в клетки [26] и, более того, может приводить к ее злокачественному перерождению [27].

Помимо внДНК, входящей в состав ДНПК, важную роль в прогрессировании и метастазировании опухоли играют ВВ, такие как экзосомы [28]. Характерными чертами экзосом являются их малый размер (30 — 150 нм), наличие поверхностных тетраспанинов CD9, CD63, CD81 [28], а также белков, отражающих их эндосомальное происхождение — TSG-101 и Alix [29, 30]. Как и в случае с внДНК в составе ДНПК, экзосомы секретируются всеми типами клеток и в норме циркулируют в крови в невысоких концентрациях [31]. Показано, что при развитии ЗНО изменяется состав и увеличивается концентрация ВВ [31-33]. В работах последних пяти лет были получены убедительные доказательства, что экзосомы, перенося биологически-активные молекулы от клеток-доноров к клеткам-реципиентам, являются медиаторами межклеточной коммуникации. Показано, что опухолевые экзосомы стимулируют такие канцерогенез-ассоциированные процессы, как эпителиально-мезенхимальный переход (ЭМП) [34], ангиогенез [35], клеточная пролиферация [36] и миграция [37]. Биологическая активность экзосом обеспечивается специфическим сортированием белков и различных типов РНК по время созревания везикул, и, как следствие, несмотря на сходство состава экзосом с секретирующими их клетками, они имеют отличающийся молекулярный портрет [38].

Таким образом, особенности распределения в крови ДНПК и экзосом, их биологическая активность и изменение состава при развитии злокачественных новообразований, в том числе РМЖ, в настоящее время малоизучены. На сегодняшний день не выявлены специфические ДНК-связывающие белки в составе ДНПК у больных РМЖ, что ограничивает возможности целевого обогащения внДНК и снижает аналитическую чувствительность потенциальных диагностических систем на основе «жидкостной биопсии». Отсутствуют комплексные данные о протеомном портрете экзосом и их биологической активности (в том числе в виду сложности как пробоподготовки, так и масс-спектрометрического анализа), что не позволяет идентифицировать ключевые белки, участвующие в межклеточной коммуникации, механизмах инвазии и метастазирования. Современные подходы к ранней диагностике и мониторингу РМЖ требуют формирования новых маркерных панелей, основанных на одновременном анализе нуклеиновых кислот и белков, ассоциированных с циркулирующими комплексами. Восполнение недостающих сведений обеспечит преодоление разрыва между фундаментальными знаниями о природе и

функциях ДНПК и ВВ и практической потребностью в новых эффективных диагностических и прогностических решениях для РМЖ.

Степень разработанности темы исследования

Циркулирующие опухолевые клетки [41], вноДНК [4], различные типы опухолеассоциированных некодирующих РНК [5-7] и белки, а также экзосомы, содержащие РНК и белки раковых клеток [9] в настоящее время рассматриваются как основа для разработки новых панелей для ранней дифференциальной диагностики злокачественных новообразований, выделения неблагоприятных прогностических групп и оценки эффективности терапии. Однако, несмотря на огромную перспективность неинвазивных молекулярных методов анализа, только два теста на основе анализа метилированной вноДНК имеют одобрение для диагностики рака кишечника и рака легкого на территории США, Европы и Китая [42, 43]. Необходимо отметить, что ожидания как от теста Epi proColon 2.0, так и от теста EpiroLung оказались завышенными и в настоящее время существует потребность в доработке обеих диагностических систем для повышения их чувствительности [44, 45]. Таким образом, разработка подходов для обогащения вноДНК, содержание которой в крови онкологических больных не превышает 1 % от вДНК, является актуальной задачей молекулярной онкологии и позволит улучшить диагностику злокачественных новообразований, в том числе РМЖ, методом «жидкостной биопсии».

Другим направлением для повышения эффективности выявления вноДНК может быть анализ фрагментации и распределения этих фрагментов между компонентами крови пациентов. О наличии ДНК-связывающих белков на поверхности клеток, и в том числе на плазматической мембране форменных элементов (ФЭ) крови, известно 40 лет [46], о вноДНК, ассоциированной с ФЭ — около 20 лет [47], однако фрагментация связанной фракции вноДНК до сих пор остается не исследованной, что вероятно связано с ее низкой концентрацией и отсутствием доступных прямых методов анализа.

Информации о белках, формирующих комплексы с вноДНК, в литературе крайне мало. В частности, показано, что в состав ДНПК вноДНК входят гистоны [48], амилоид Р [49], иммуноглобулины [50]. Информация о высокоспецифичных маркерных белках ДНПК позволила бы проследить механизмы возникновения таких комплексов, их взаимодействия с клетками, роль белков в транспорте ДНК в клетки и судьбе попавшей в клетку ДНК. Биологическая роль вноДНК также остается практически не исследованной, что возможно связано со сложностью ее получения в препаративных количествах. Тем не менее, работы группы G. Olmo убедительно доказывают проканцерогенный потенциал вноДНК [51, 52].

Экзосомы выявлены во всех биологических жидкостях [9, 28, 29, 31, 34], причем при злокачественных новообразованиях изменяется их состав и статистически значимо возрастает их концентрация [31, 32]. За биораспределение и связывание экзосом с клетками-мишенями или внеклеточным матриксом ответственны поверхностные рецепторы и лиганды экзосом [53]. Несмотря на лавинообразный рост числа публикаций в этой области, до сих пор не ясна биологическая роль экзосом. В частности, какова в крови роль и диагностическая значимость экзосом, ассоциированных с поверхностью ФЭ [54, 55].

Цель исследования: провести комплексное изучение молекулярно-биологических особенностей дезоксирибонуклеопротеиновых комплексов и экзосом крови, установить их роль в ключевых звеньях патогенеза опухолевого процесса и определить диагностическую ценность у больных раком молочной железы.

Задачи исследования:

1. Оценить фрагментацию и природу концов внДНК плазмы и внДНК, ассоциированной с ФЭ (асс-ФЭ ДНК) в крови здоровых женщин и больных раком молочной железы.

2. Оценить частоту встречаемости аберрантно-метилованной ДНК в составе низкомолекулярных и высокомолекулярных фрагментов внДНК в крови здоровых женщин и больных раком молочной железы.

3. Охарактеризовать нуклеиновый и белковый состав нативных ДНПК крови здоровых женщин и больных раком молочной железы и идентифицировать уникальные ДНК-связывающие белки и белки-«пассажиры», ассоциированные с раком молочной железы.

4. Охарактеризовать экзосомы крови (экзосомы плазмы и экзосомы, ассоциированные с ФЭ крови) здоровых женщин и больных раком молочной железы, идентифицировать белки, входящие в их состав, и провести сравнительный анализ протеомов экзосом в норме и при раке молочной железы.

5. Провести сравнительный анализ уровней протеаз ADAM-10 и 20S протеасомы в экзосомах крови здоровых женщин и больных раком молочной железы.

6. Провести сравнительный анализ влияния экзосом, выделенных из плазмы и экзосом, выделенных из цельной крови на клеточную пролиферацию и миграцию, формирование капилляро-подобных структур (КПС) в экспериментах *in vitro*.

7. Провести отбор наиболее диагностически ценных протеомных маркеров среди ДНПК и экзосом крови и сформировать панели маркеров для выявления рака молочной железы методом «жидкостной биопсии».

Научная новизна

Настоящая работа представляет собой первое комплексное исследование экзосом и ДНПК, циркулирующих в крови у первичных больных РМЖ.

Впервые выявлены особенности фрагментации и строения концов внДНК плазмы и асс-ФЭ ДНК при РМЖ, что подтверждает различные механизмы генерации внДНК в норме и при патологии. Впервые показано, что для разработки метода «жидкостной биопсии» РМЖ целесообразно использовать асс-ФЭ ДНК.

В представленном исследовании впервые продемонстрировано, что экзосомы не являются основными транспортерами внДНК. При РМЖ впервые выявлено увеличение концентрации и изменение морфологии экзосом крови.

Методом MALDI-TOF масс-спектрометрии впервые идентифицированы белки экзосом крови у больных РМЖ. Впервые показано, что при РМЖ протеом экзосом крови обогащён белками, стимулирующими ЭМП, клеточную пролиферацию и инвазию, в то время как экзосомы крови у лиц контрольной группы содержат белки, ингибирующие эти процессы. Впервые показано, что для разработки метода «жидкостной биопсии» целесообразно использовать белки экзосом крови больных РМЖ.

Впервые охарактеризованы по нуклеиново-кислотной и белковой составляющим нативные ДНПК крови у больных РМЖ и лиц контрольной группы. Методом MALDI-TOF масс-спектрометрии впервые идентифицирован протеом и установлены молекулярные функции белков гистон-содержащих ДНПК. В составе ДНПК наибольшей диагностической значимостью обладают белки, не связывающие внДНК (белки-«пассажиры»). Впервые выявленные уникальные ДНК-связывающие белки в составе ДНПК крови больных РМЖ могут быть использованы для обогащения внДНК, что повысит эффективность диагностики злокачественных новообразований методом «жидкостной биопсии».

Впервые установлены повышенные уровни ADAM-10 и 20S протеасомы в составе экзосом крови больных РМЖ, что указывает на вовлечение в опухолевую генерализацию как протеаз короны, так и протеаз внутреннего содержимого ВВ.

В экспериментах *in vitro* впервые продемонстрировано, что циркулирующие в крови больных РМЖ экзосомы стимулируют формирование КПС первичными эндотелиоцитами, пролиферацию псевдо-нормальных эпителиоцитов молочной железы линии MCF10A, а также скорость миграции злокачественных клеток линии SKBR-3. Впервые установлено, что экзосомы крови лиц контрольной группы подавляют формирование КПС, при этом стимулируют пролиферацию клеток линии MCF10A и скорость миграции клеток линии SKBR-3.

Теоретическая и практическая значимость работы

Полученные в работе результаты значительно расширяют знания об особенностях циркуляции в крови ДНПК и экзосом, в частности их распределении и составе, роли в стимулировании роста и распространении опухоли, а также о диагностической значимости биомаркеров в их составе.

Теоретическую значимость проведенной работы составляют данные об особенностях фрагментации вДНК и белковом составе ДНПК, а также морфологии и протеоме экзосом, циркулирующих в крови больных РМЖ. Комплексный анализ размера, природы концов вДНК и белков, формирующих ДНПК, показал, что как в норме, так и при патологии помимо процессов клеточной гибели, активная секреция также вносит вклад в появление вДНК в кровотоке. Полученные новые знания о размере, распределении вДНК между плазмой и ФЭ, а также ее индексе метилирования представляют значительную ценность для разработки новых методов направленного обогащения опухолевых нуклеиновых кислот. Впервые проведенная идентификация и биоинформатический анализ белков в составе ДНПК вносят вклад в понимание возможных механизмов стимуляции роста и распространения опухоли.

Сравнительный анализ морфологии и белкового состава экзосом в плазме и экзосом крови контрольной группы и больных РМЖ расширяет фундаментальные знания об участии этого типа ВВ в канцерогенезе.

Выявленные в работе уникальные белки в составе ДНПК и экзосом крови легли в основу создания способа диагностики и мониторинга онкологических заболеваний (Патент РФ 2571507 «Способ диагностики и мониторинга онкологических заболеваний с использованием экзосом крови», 24 ноября 2015 г.), что в дальнейшем может быть использовано для повышения эффективности диагностики РМЖ методом «жидкостной биопсии».

Методология и методы исследования

Работа выполнена на проспективном клиническом материале с использованием молекулярно-биологических, биохимических, биоинформатических и статистических методов в соответствии с разработанным дизайном.

Первый блок работы посвящён исследованию дезоксирибонуклеиновой составляющей циркулирующих в крови ДНПК. В частности, с помощью ПЦР в режиме «реального времени» была проведена оценка концентрации вДНК и плазмы и асс-ФЭ

ДНК контрольной группы и первичных больных РМЖ, а также с помощью лигирования адаптеров исследовано строение ее концов, а с помощью капиллярного электрофореза — фрагментация.

Второй блок работы был посвящен исследованию белков в ДНПК крови ЗдЖ и первичных больных РМЖ. Для этого ДНПК были выделены из крови аффинной хроматографией за гистоновую составляющую, белки комплексов идентифицированы масс-спектрометрией. С помощью биоинформатического анализа предсказана биологическая роль этих белков и установлены белки, стимулирующие ЭМП, ангиогенез, миграцию и пролиферацию, а также иммунносупрессию.

Третий блок работы включает сравнительное исследование морфологии (с помощью крио- и трансмиссионной электронной микроскопии) и белкового состава (с помощью масс-спектрометрии) экзосом плазмы и экзосом крови ЗдЖ и первичных больных РМЖ. Комбинация масс-спектрометрического и биоинформатического анализа позволила выявить белки экзосом, вовлеченные в транспорт внДНК, а также стимуляцию ключевых процессов канцерогенеза. Для оценки роли экзосом в развитии РМЖ *in vitro* проанализировано влияние экзосом крови на пролиферативную активность и клеточную подвижность псевдо-нормальных эпителиоцитов и клеток карциномы молочной железы, а также на формирование КПС первичными эндотелиоцитами.

Четвертый блок работы включает анализ онкомаркеров в составе экзосом и ДНПК крови больных РМЖ. В частности, исследовано распределение аберрантно метилированной формы гена *RARβ2* во внДНК, а также опухоли-ассоциированных белков в ДНПК и экзосомах крови пациентов.

Основные положения, выносимые на защиту

1. При раке молочной железы циркулирующие ДНПК имеют фундаментальные различия в молекулярной организации, а белки в их составе способны стимулировать ЭМП, клеточную пролиферацию, инвазию, миграцию и ускользание от иммунного надзора по сравнению с циркулирующими ДНПК здоровых женщин.

2. Экзосомы плазмы и цельной крови больных раком молочной железы, по сравнению с экзосомами здоровых женщин, характеризуются особенностями морфологии, спектра протеаз и играют роль в патогенезе опухолевого процесса путем стимуляции ЭМП, пролиферации и инвазии.

3. Экзосомы крови больных раком молочной железы и здоровых женщин стимулируют пролиферацию неопухолевых эпителиоцитов молочной железы и скорость

миграции клеток карциномы молочной железы, при этом имеют противоположные эффекты на формирование КПС *in vitro*.

4. У больных раком молочной железы более перспективным источником аберрантно-метилованных маркеров является вДНК, ассоциированная с форменными элементами крови, по сравнению с вДНК плазмы.

5. ВДНК, ассоциированная с форменными элементами крови, и белки ДНПК и экзосом являются перспективными диагностически ценными биомаркерами рака молочной железы.

Личный вклад автора

Диссертационная работа является самостоятельным научным трудом и выполнена преимущественно в Лаборатории молекулярной медицины Института химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН (ИХБФМ СО РАН, Новосибирск, Россия). Образцы крови получены из отделения №2 Новосибирского областного клинического онкологического диспансера в соответствии с договором о сотрудничестве. Автор лично планировала и проводила эксперименты, проводила статистическую обработку полученных данных, интерпретировала полученные результаты. Автором подготовлены научные публикации по теме диссертации, базы данных, подготовлены и получены 3 патента РФ.

Степень достоверности результатов

Диссертационная работа выполнена на 190 образцах крови условно ЗДЖ и 194 образцах крови первичных больных РМЖ. Используемые современные биохимические и молекулярно-биологические методы, биоинформатический анализ и статистическая обработка данных соответствуют поставленным цели и задачам, позволили получить статистически значимые и достоверные результаты и сделать обоснованные выводы.

Апробация работы

Результаты проведенного исследования и основные положения работы доложены и обсуждены на международных и российских конференциях: «Петровские чтения» (Санкт-Петербург, Россия, 2007); «Актуальные вопросы экспериментальной и клинической

онкологии» (Томск, Россия, 2009, 2013, 2015); EMBO Molecular medicine conference: «Common molecular mechanisms of mammary gland development and breast cancer progression» (Дублин, Ирландия, 2006); FEBS Advanced Lecture Course «Matrix Pathobiology, Signaling and Molecular Targets» (Патра, Греция, 2007); «Фундаментальные науки — медицине» (Новосибирск, Россия, 2008, 2013); The 12th Biennial Meeting International Gynecologic Cancer Society (Бангкок, Таиланд, 2008); ИМПАКТ Breast Cancer Conference (Брюссель, Бельгия, 2010); CNAPS VII «Circulating Nucleic Acids in Plasma and Serum» (Мадрид, Испания, 2011); International conference on Postgenomic technology for biomedicine (Новосибирск, Россия, 2012); 37th ESMO Congress (Вена, Австрия, 2012); The First Meeting in the Frame of French-Siberian Centre of Research and Education «Nucleic Acid — Protein Interactions for Life Sciences» (Новосибирск, Россия, 2013); «Perspectives for development of molecular and cellular biology-4» (Ереван, Армения, 2013); Съезд онкологов и радиологов стран СНГ и Евразии (Казань, Россия, 2014; Душамбе, Таджикистан, 2024); UK-Russia Workshop: Extracellular vesicles- mechanisms of biogenesis and roles in disease pathogenesis (Москва, Россия, 2015); EMBO Workshop «Cellular and molecular mechanism of tumour-microenvironment crosstalk» (Томск, Россия, 2015); VII Российский симпозиум «Белки и пептиды» (Новосибирск, Россия, 2015); Ежегодный конгресс ROOM (Сочи, Россия, 2015); CNAPS IX “Circulating Nucleic Acids in Plasma and Serum” (Берлин, Германия, 2015); «Молекулярная онкология: итоги и перспективы» (Москва, Россия, 2015–2019, 2021-2024); «Physics of cancer: interdisciplinary problems and clinical applications» (Томск, Россия, 2016, 2017); IX съезд онкологов и радиологов стран СНГ и Евразии (Минск, Белоруссия, 2016); «Химическая биология» (Новосибирск, Россия, 2016); V Съезд физиологов СНГ и V Съезд биохимиков России (Дагомыс, Россия, 2016); IX международный конгресс «Биотехнология: состояние и перспективы развития» (Москва, Россия, 2017, 2019); «Биотехнология — медицине будущего» (Новосибирск, Россия, 2017); III Национальный Конгресс по Регенеративной Медицине (Москва, Россия, 2017); Онкологический форум «Белые ночи» (Санкт-Петербург, Россия, 2019, 2020, 2022-2025); «Опухолевые маркеры: молекулярно-генетические и клинические аспекты» (Горно-Алтайск, Россия, 2019, 2022); «Инновационные исследования в биологии и в медицине» (Сочи, Россия, 2020); «Генетические технологии в трансляционной биомедицине» (Томск, Россия, 2022, 2023, 2025).

Диссертационная работа выполнена при финансовой поддержке Интеграционного проекта СО РАН с Белоруссией («Анализ циркулирующих экзосом крови в норме и при раке молочной железы», 2015-2017 гг.), РФФИ (№12-04-31365 «Транспорт эндогенных дезокси- и рибонуклеиновых кислот в крови: исследование протеома нуклеопротеиновых

комплексов и везикулярных структур в норме и патологии» и №18-415-540012 «Роль экзосом крови в развитии солидных опухолей: оценка ангиогенного потенциала и влияния на клеточную подвижность при раке молочной железы», и РНФ №22-25-00130 «Протеом циркулирующих в крови нуклеопротеиновых комплексов: поиск опухолевых маркеров и исследование роли в диссеминации рака молочной железы на молекулярном уровне».

Публикации

По теме диссертационного исследования опубликовано 100 печатных работ, из них 34 статьи в изданиях, рекомендованных ВАК Министерства науки и высшего образования Российской Федерации и журналах, индексируемых в международных реферативных базах данных SCOPUS и Web of Science. Получено 3 патента Российской Федерации на изобретение и 2 свидетельства о государственной регистрации базы данных.

Внедрение результатов исследования

Результаты диссертационного исследования используются в процессе обучения студентов на кафедре Клинической биохимии Института медицины и медицинских технологий Новосибирского национального исследовательского государственного университета в разделе курса «Биохимия патологических состояний» при изучении вопросов, посвященных аспектам биохимии опухолей и перспективным онкомаркерам (Приложение 1).

Объем и структура диссертации

Диссертационная работа изложена на 283 страницах печатного текста и состоит из введения, обзора литературы, материалов и методов исследования, результатов и их обсуждения, заключения, выводов, применение результатов и научных выводов, списка условных сокращений, списка литературы, включающего 519 источников, и 19 приложений. Диссертация иллюстрирована 51 рисунком и 30 Таблицами.

Соответствие диссертации паспортам научных специальностей

Область диссертационного исследования и полученные результаты соответствуют паспорту специальности 3.1.6. Онкология, лучевая терапия (биологические науки), а

именно пунктам 2. – Исследования на молекулярном, клеточном и органном уровнях этиологии и патогенеза злокачественных опухолей, основанные на современных достижениях ряда естественных наук (генетики, молекулярной биологии, морфологии, иммунологии, биохимии, биофизики и др.) и 3. – Разработка и совершенствование программ скрининга и ранней диагностики онкологических заболеваний и паспорту специальности 1.5.4 Биохимия, а именно пункту 1. – Проблемы строения, свойств и функционирования отдельных молекул и надмолекулярных комплексов в биологических объектах, изучение молекулярной организации структурных компонентов, выяснение путей метаболизма и их взаимосвязей.

ГЛАВА 1 ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1 Клинико-эпидемиологические особенности РМЖ

РМЖ является самым распространенным злокачественным новообразованием в мире среди женщин (более 2,3 миллиона/год случаев), составляя 23,8 % от всех видов рака [1]. В частности, в 2022 году зарегистрировано 2 308 837 новых случаев РМЖ и 665 684 летальных исходов от него [1]. В структуре заболеваемости и смертности РМЖ занимает в мире второе и четвертое место, соответственно [1]. Более высокие показатели заболеваемости в странах с развитой экономикой в настоящее время связывают с более высокой распространенностью многочисленных факторов репродуктивного риска и образа жизни (более поздний возраст наступления менопаузы, более поздний возраст при рождении первого ребенка, малое количество детей, избыточная масса тела и т.д.) [1].

Несмотря на успехи маммографического скрининга (в зависимости от страны, от 14,2 % (Республика Молдова) до 47,3 % (Чешская Республика) пациенток диагностируются на I стадии) [56], заболеваемость РМЖ продолжает расти. Таким образом, существует острая необходимость в выявлении более эффективных и неинвазивных маркеров, которые могли бы служить ориентиром не только для ранней диагностики, но и для выбора стратегии терапии для отдельных пациентов, а также более точной оценки прогноза [57].

Необходимо учитывать, что РМЖ характеризуется значительной тканевой гетерогенностью, проявляющейся различными клиническими и биологическими особенностями, что заставляет опухоль по-разному реагировать на лечение и вносит свои коррективы в терапию [58-60]. На сегодняшний день согласно рекомендациям ESMO (European Society of Medical Oncology) и RUSSCO (Российское общество клинических онкологов), выделяют следующие основные молекулярные подтипы РМЖ: Люминальный А, Люминальный В HER2-положительный, Люминальный В HER2-отрицательный, базально-клеточный и HER-2 положительный нелюминальный подтип [61]. Эти молекулярные подтипы РМЖ устанавливаются с помощью иммуногистохимического исследования опухоли [62]. Кроме того, морфологическое исследование по результатам биопсии имеет погрешность в определении подтипа РМЖ, а также не позволяет отслеживать ответ пациенток на проводимую терапию [59, 60, 63].

Поскольку инструментальные методы диагностики имеют недостаточную чувствительность для выявления РМЖ *in situ* и на I стадии заболевания, а также имеют ограничения при дифференциации доброкачественных и злокачественных опухолей и

динамического контроля за пациентами на этапах лечения [56, 57], перспективным направлением в молекулярной онкологии стал поиск новых опухолевых маркеров для выявления злокачественных новообразований методом «жидкостной биопсии».

1.2 Диагностика раннего РМЖ

Диагноз РМЖ выставляется на основании данных физикального обследования в комбинации с визуализирующими методами и подтверждается патоморфологическим исследованием. Методы визуализации включают в себя билатеральную маммографию и УЗИ молочных желез и регионарных лимфатических узлов [64]. МРТ рекомендуется только в случае семейного РМЖ с наличием BRCA-мутации и подозрении на мультифокальность.

Проводящаяся ежегодно на профилактических осмотрах маммография позволяет выявить новообразования молочной железы размером более 1 см. К недостаткам маммографии относят отсутствие возможности динамического наблюдения, сложность отличия кистозных и солидных новообразований, а также выявления диффузных злокачественных новообразований [39]. Кроме того, ложноотрицательные результаты у молодых женщин с высокой плотностью молочных желез составляют 40 % [39, 65].

УЗИ молочной железы может повысить информативность полученных при маммографии данных, но редко используется в самостоятельном варианте. Ложноположительные результаты УЗИ при диагностике РМЖ связаны с жировой инволюцией, а ложноотрицательные — со сложностью визуализации микрокальцинатов, встречающиеся при РМЖ в 42-50 % случаев. Чувствительность УЗИ для РМЖ составляет 92 %, специфичность — 34 % [39, 66]. Таким образом, низкая специфичность и зависимость результата интерпретации данных от квалификации врача являются серьезными недостатками данного диагностического метода.

МРТ молочных желез имеет сопоставимую чувствительность при выявлении РМЖ (94 % для новообразования более 0,5 см при специфичности 85,9 %). МРТ позволяет дифференцировать доброкачественные и злокачественные новообразования, однако её чувствительность снижается при диагностике метастатических лимфоузлов [39, 67-69]. Использование контрастированной низкопольной МРТ позволяет не только точно диагностировать РМЖ, но и достоверно выявлять опухолевые поражения лимфатических узлов [39, 70]. Недостатками данного метода визуализации новообразований молочных желез являются высокая стоимость и дефицит квалифицированных специалистов [39, 68, 71].

ПЭТ/КТ (позитронно-эмиссионная томография/компьютерная томография) является одним из направлений современной ядерной диагностики, которое с каждым годом все шире используется в клинической онкологии. Роль этого метода в диагностике раннего РМЖ до сих пор является предметом дискуссии в связи с различным поглощением радиофармпрепарата (чаще всего ^{18}F -фтордезоксиглюкозы) разными гистологическими видами РМЖ. В зависимости от стадии заболевания, чувствительность ПЭТ/КТ при первичном выявлении РМЖ составляет от 48 % до 96 %, специфичность — от 73 % до 100 % [39]. Кроме того, опухоли размером менее 1 см зачастую являются ложноотрицательными, что связано с пространственным разрешением ПЭТ-сканеров.

Другим современным и относительно доступным на сегодняшний день диагностическим методом исследований опухолей молочной железы в ядерной медицине является маммосцинтиграфия, которая имеет ряд преимуществ по сравнению с вышеперечисленными методами выявления РМЖ. В частности, степень накопления радиофарм-препарата ($^{99\text{m}}\text{Tc}$ -«МИБИ», $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -«Технетрил» и др.) в опухолевом очаге не зависит от плотности железистой ткани, позволяет выявлять злокачественное новообразование размером от 6 мм, в том числе имеющий мультицентричный рост [72, 73]. Чувствительность анализа зависит от биологического подтипа РМЖ и составляет в целом 82 % для пальпируемых (76 % при люминальном А и 100 % при трижды-негативном и HER2-позитивном подтипах) [72] и 52 % для непальпируемых новообразований [73].

Достоверность трепан-биопсии с определением гистологического типа, степени злокачественности, статуса рецепторов ЭР, ПР, HER2 и Ki-67 составляет около 70 % [39, 74, 75]. Патоморфологическое исследование может быть неинформативно при недостаточном количестве забранного материала или наличии некротических зон.

Таким образом, инструментальные методы выявления раннего РМЖ позволяют диагностировать опухолевый процесс не во всех случаях и требуют внедрения современных методов молекулярной онкологии. В связи с этим, требуется разработка недорогих и воспроизводимых методов, позволяющих их использование в скрининговых программах и обладающих высокой чувствительностью и специфичностью.

1.3 Перспективы использования «жидкостной биопсии» для диагностики и оценки эффективности лечения РМЖ

Проблема выявления РМЖ *in situ* и на I стадии заболевания связана как с бессимптомным течением болезни, так и с ограничениями инструментальных методов анализа и их доступностью, а также отсутствием надёжных онкомаркёров для диагностики

заболевания. Поскольку при выявлении злокачественного новообразования на I стадии вероятность ее успешного лечения достигает 92-98 % [64], поиск новых маркеров в биологических жидкостях пациенток для своевременного выявления РМЖ является одной из актуальных задач клинической онкологии вообще, молекулярной — в частности.

При диагностике РМЖ традиционными методами необходимо учитывать, гетерогенность заболевания, как в рамках нозологической формы, так и в рамках конкретного случая заболевания, поскольку опухолевый узел может содержать очаги с разной экспрессией рецепторов эстрогена, прогестерона, а также HER2. В связи с этим, традиционно используемая для диагностических целей биопсия центральной части новообразования в случае гетерогенной опухоли не гарантирует забора репрезентативного материала [76].

Кроме того, в процессе лечения и прогрессирования злокачественное новообразование может менять свои биологические характеристики. В частности, чувствительность опухоли к терапии меняется из-за потери рецепторов в метастатических и рецидивирующих очагах, а также приобретения новых мутаций, при этом повторная биопсия зачастую затруднительна, а иногда технически невозможна [76, 77].

В настоящее время выявление опухолевых клеток и ВВ, а также биополимеров этих клеток (белков, нуклеиновых кислот, метаболитов) в таких биологических жидкостях как кровь, моча, слеза, слюна и другие, называют «жидкостной биопсией» (рисунок 1).

К достоинствам использования данного разрабатываемого метода по сравнению с тканевой биопсией относят возможность проведения анализа без получения опухолевой ткани, что позволяет выявить как первичные новообразования, так и вторичные метастатические очаги. Другим достоинством «жидкостной биопсии» является отражение гетерогенности новообразования, поскольку генетическая и фенотипическая разнородность популяции опухолевых клеток представляет собой серьезную проблему как при установлении подтипа РМЖ с помощью гистологического анализа биопсийного материала, так и при лечении пациенток, повышая вероятность возникновения терапевтической, прежде всего лекарственной, резистентности [77].

1.3.1 Метаболомные маркеры РМЖ

Развитие масс-спектрометрии и ядерного магнитного резонанса стимулировало поиск в различных биологических жидкостях метаболомных маркеров — низкомолекулярных веществ (до 1 кДа) [39, 78]. Например, с помощью оценки уровня гистидина, глутамата фенилаланина, ацетоацетата, глицерола, пирувата, N-

ацетилгликопротеина и маннозы в сыворотке крови возможно дифференцировать локализованный и метастатический РМЖ [39, 79]. Однако в связи с низкой специфичностью метаболомных маркеров требуется дальнейшие исследования.

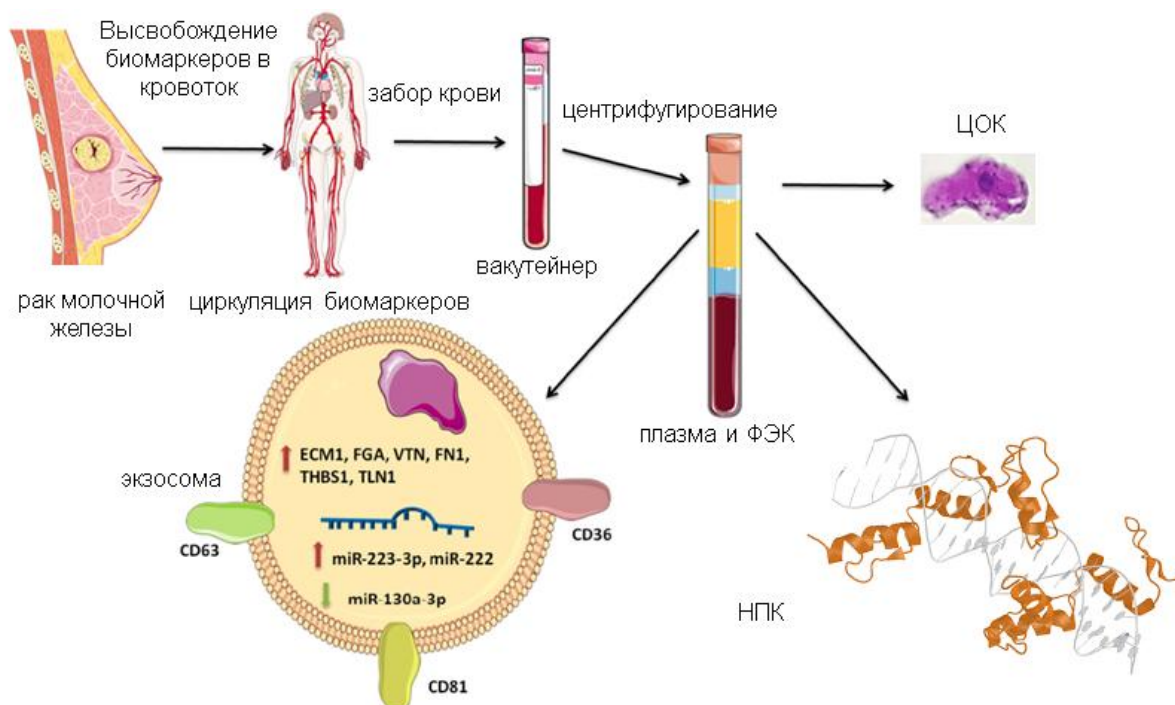


Рисунок 1 — Принцип «жидкостной биопсии» и перспективные опухолевые маркеры в ее составе

1.3.2 Белковые маркеры

Генетические изменения в трансформированных клетках приводят как изменению экспрессии белков, так и к появлению мутантных форм белков. В настоящее время для лабораторной диагностики РМЖ используется оценка уровней РЭА и СА 15.3.

РЭА является гликопротеином, продуцируемым эпителиоцитами молочной железы, бронхов и кишечного тракта. Уровень РЭА в норме составляет менее 3 нг/мл. Повышение уровня РЭА в крови неспецифично и возможно при различных злокачественных новообразованиях: до 50 % случаев РМЖ, а также при раке головы и шеи, до 90% случаев колоректального рака и рака легкого [39, 80].

СА 15.3 является муциноподобным гликопротеином и также используется для выявления РМЖ, мониторинга эффективности терапии и выявления рецидива. В сыворотке крови здоровых доноров его концентрация не превышает 28 Ед/мл. к сожалению, концентрация данного маркера на I стадии РМЖ повышается в 10 % случаев, однако при наличии метастазов — уже 74 % случаев [39, 80, 81]. Как и предыдущий онкомаркер, СА

15.3 не обладает высокой специфичностью; в частности, его уровень повышается при раке легкого (18 %) и незлокачественных заболеваниях печени (17 %) [80].

Даже при использовании суперпозиции маркеров РЭА и СА 15.3, чувствительность при диагностике первичного РМЖ составляет 31 % [39, 81]. Тем не менее, в связи с отсутствием более чувствительных онкомаркеров, РЭА и СА 15.3 входят в состав скрининговых программ в комбинации с маммографией и/или УЗИ.

Активно развивающиеся протеомные технологии оказались малоприменимы при поиске опухолевых маркеров в плазме/сыворотке крови в основном из-за обширного динамического диапазона белков, содержащихся в данных биожидкостях [82-84]. В частности, с помощью масс-спектрометрии крайне сложно выявить минорные опухоле-специфические белки, поскольку 22 мажорных белка (альбумин, фибриноген, иммуноглобулины, трансферрин, липопротеины и плазминоген) составляют 99 % всех белков плазмы [82]. Для удаления мажорных белков плазмы, разработаны коммерчески доступные иммуноаффинные колонки [85-88]. Тем не менее, несмотря на успешное удаление некоторых мажорных белков, плазма по-прежнему остается сложной биожидкостью, включающей белки из многих нормальных тканей и типов клеток. Кроме того, при иммуноистощении в связи с неспецифическим связыванием белков увеличивается вариабельность между образцами и, таким образом, снижается эффективность выявления биомаркеров [82, 83, 89]. Для упрощения анализа биологических жидкостей, на первом этапе исследования зачастую используют менее сложные образцы, такие как кондиционная среда клеточных линий. Последующая валидация потенциальных биомаркеров осуществляется путем целевого анализа образцов биологических жидкостей пациентов и клинически здоровых доноров (плазмы, мочи и др.) [90]. Для количественного измерения интересующего потенциального биомаркера в образцах используется ИФА [82], однако данный подход ограничен пределом обнаружения сигнала для клинических биомаркеров и отсутствием хорошо охарактеризованных высокоспецифичных моноклональных антител [91]. Учитывая вышеописанные проблемы, связанные с выявлением новых онкомаркеров методом масс-спектрометрии, получение ДНПК и ВВ, в том числе экзосом, и дальнейший анализ белковой составляющей позволят решить проблемы как низкой чувствительности, так и специфичности при разработке диагностически значимых панелей.

1.3.3 ВноДНК

Выявление вноДНК — уже достаточно изученная малоинвазивная процедура для молекулярной характеристики солидных опухолей. В настоящее время показано, что

вноДНК, выделенная из биологических жидкостей, характеризуется наличием генетических (точечные мутации [11, 92], микросателлитная нестабильность [12, 93], амплификация некоторых геномных последовательностей [13, 94]) и эпигенетических изменений [14, 15, 95, 96], идентичных тем, которые содержатся в опухолевой ткани. Таким образом, определение специфических изменений в структуре вноДНК крови может иметь диагностическое значение [97]. Кроме того, поскольку большинство молекулярных аномалий, детектируемых во вноДНК крови, отражают генетические и эпигенетические изменения в первичной опухоли, анализ вноДНК является перспективным методом для прогноза течения и контроля эффективности противоопухолевой терапии [74, 98, 99] (рисунок 2).

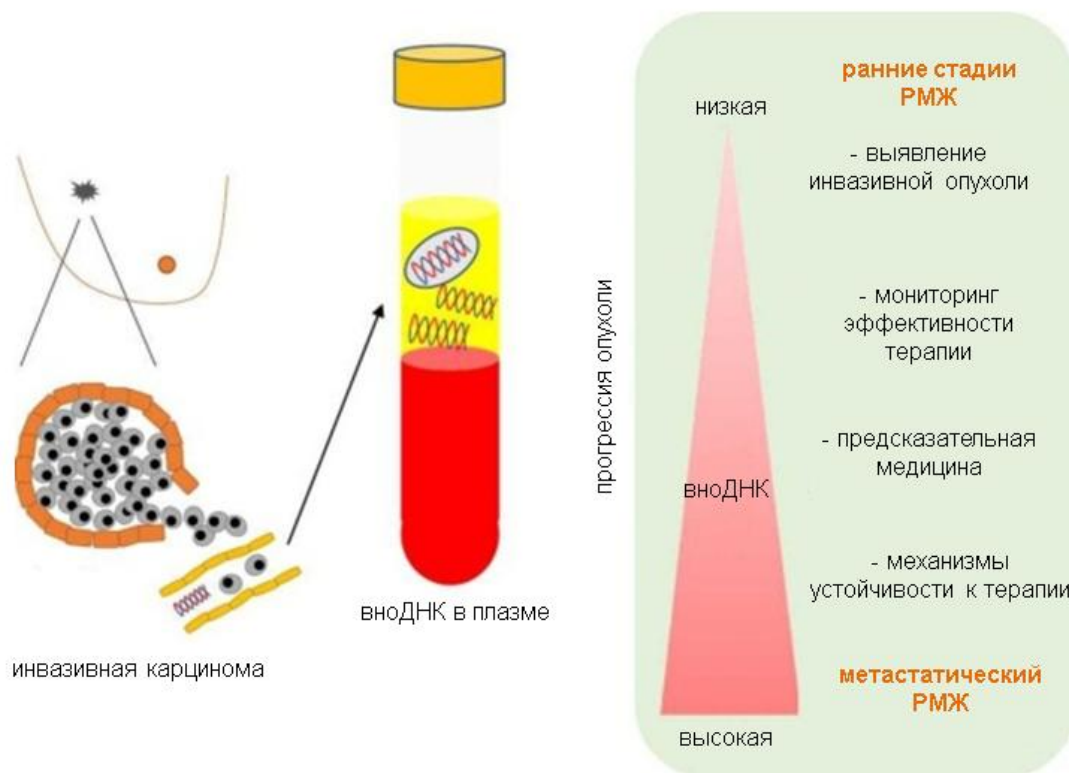


Рисунок 2 — Перспективы использования вноДНК плазмы крови для «жидкостной биопсии» РМЖ

Несмотря на то, что доля вноДНК в общем пуле вноДНК крови крайне низка (~ 2 % [25]), ПЦР-анализ и секвенирование позволяют выявить злокачественное новообразование от 1000 клеток [100]. В то же время, не все изменения в структуре вноДНК позволяют с высокой чувствительностью и специфичностью выявлять РМЖ на ранних стадиях заболевания. В частности, была показана корреляция мутации в гене p53 с неблагоприятным прогнозом течения РМЖ [101], однако в одной работе во вноДНК плазмы,

это молекулярно-генетическое изменение было выявлено в 5 % случаев раннего РМЖ [102], а в другой — 24 % случаев [103]. Определение 60 мутаций в составе внДНК плазмы с помощью панели CancerSEEK позволило повысить выявления РМЖ до чувствительности 33 % и специфичности 99 % [104].

Другим примером сложности выявления опухоль-специфических изменений является детекция микросателлитной нестабильности [39, 105]. При РМЖ наиболее частый аллельный дисбаланс наблюдается на хромосомах 7q, 16q, 17p и 17q [39, 106], однако в составе внДНК опухолевоспецифичные микросателлитные перестройки при карциноме молочной железы *in situ* детектируют от 6 % (AR(X), FgA, GGAA4D07, TH2) до 33 % (D11S488, DM1, D17S654) случаев [39, 102, 107, 108]. В другой работе было показано, что 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, D10S197, D9S161 до 18 % для D17S654 при использовании внДНК плазмы крови больных РМЖ [39, 109]. Таким образом, поиск оптимальных биомаркеров для выявления РМЖ методом «жидкостной биопсии» остаётся актуальной задачей молекулярной онкологии.

Амплификация таких генов, как HER-2, в плазме крови больных РМЖ также может рассматриваться в качестве маркера для «жидкостной биопсии» [110]. Действительно, у больных с HER2-положительном РМЖ амплификация HER2 в составе внДНК плазмы была выявлена в 73 % случаев, среди них уровень числа копий HER2 у каждого пациента резко снижался после 6 недель лечения HER2-таргетной терапией и коррелировал с беспрогрессивной выживаемостью [94].

Маркерами раннего этапа трансформации клетки являются метилирование по 5 положению цитозина в CpG-островках промоторных областей генов опухолевой супрессии и протоонкогенов [111–113]. С помощью ПЦР, специфичной к метилированию, возможно выявлять 0,1 % метилированной ДНК в общем пуле неметилированной ДНК [11, 114]. В настоящее время для повышения эффективности выявления РМЖ используют панели эпигенетических маркеров [11, 115]. В частности, анализ абберантного метилирования *RARβ2*, *RASSF1A*, *APC* и *GSTP1* показал, что в сыворотке крови больных РМЖ в 62 % случаев выявляется хотя бы один эпигенетический маркер [116]. В другой работе было показано, что несмотря на невысокую частоту выявления индивидуальных маркеров *Cyclin D2*, *RARβ2*, *Twist* и *HIN-1* в составе внДНК плазмы крови (в 6 %, 16 %, 36 % и 54 % случаев, соответственно), хотя бы один ген был метилирован в 67 % образцов [117].

Для улучшения аналитических характеристик диагностических панелей возможно использование асс-ФЭ ДНК. Например, анализ метилирования промоторных областей

генов *RASSF1A* и *RARβ2* в составе суммарной внДНК крови (включает внДНК плазмы и асс-ФЭ ДНК) позволяет выявить рак легкого чувствительностью 90 % и специфичностью 82 % [118].

Таким образом, в связи с невысокой чувствительностью и тканеспецифичностью пока существуют ограничения на использование молекулярно-генетических и эпигенетических маркеров в клинической медицине [119]. Развитие молекулярно-биологических методов анализа позволят выявить тканеспецифичные ДНК-маркёры для диагностики, оценки прогноза течения заболевания и ответа на лечение РМЖ методом «жидкостной биопсии».

1.3.4 ВноРНК

К внеклеточной РНК опухолевого происхождения (вноРНК) относят длинные некодирующие РНК, кольцевые РНК, микроРНК и другие, однако наибольшее количество информации пока накоплено для микроРНК. Вызывая репрессию трансляции [120], микроРНК участвуют в таких физиологически-значимых процессах, как пролиферация, клеточная дифференцировка и апоптоз [121]. Поскольку в опухолевых клетках присутствует уникальный профиль экспрессии микроРНК [122, 123], поиск маркеров на основе микроРНК как в составе белковых комплексов, так и в составе экзосом в биологических жидкостях является крайне перспективным [122].

Учитывая, что микроРНК имеет высокую консервативность, очевидно, что создание на их основе тканеспецифических панелей для диагностики злокачественных новообразований методом «жидкостной биопсии» будет крайне затруднительно. В то же время, с помощью оценки микроРНК в крови возможна оценка эффективности противоопухолевой терапии и выявления остаточной болезни. В частности, было показано, что пониженный уровень *miR-148a* в составе экзосом крови больных РМЖ коррелировал с неблагоприятным прогнозом заболевания [124], а панель из *miR-18b*, *miR-103*, *miR-107* и *miR-652*, позволяет выявить рецидив у пациенток с первичным ТН-РМЖ [125]. В другой работе сравнительный анализ ЦОК и микроРНК в составе экзосом, выделенных из образцов крови больных РМЖ до и после проведения неоадьювантной терапии, показал, что повышенный уровень *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 оценки как эффективности лечения, так и прогноза течения заболевания [126].

1.3.5 Протеомные маркеры РМЖ в составе экзосом

Известно, что все клетки секретируют во внеклеточное пространство различные ВВ, в том числе экзосомы — мембранные ВВ диаметром 30-150 нм, имеющие на своей поверхности CD9, CD63 и CD81 [128, 129]. Содержимое экзосом лишь частично отражает состав родительской клетки, поскольку при созревании ВВ в них идет упаковка определенных биологически-активных молекул. Тем не менее, анализ белкового состава экзосом различных биологических жидкостей является перспективным направлением для поиска опухолеспецифичных маркеров злокачественных новообразований, в том числе РМЖ. Как было рассмотрено ранее (п. 1.3.2), непосредственной детекции опухолевых белков в плазме крови мешает гиперпредставленность мажорных белков. В тоже время, выделение ВВ позволяет снизить «шум» мажорных белков и повысить содержание целевых белков в дальнейшем анализе (рисунок 3) [129].

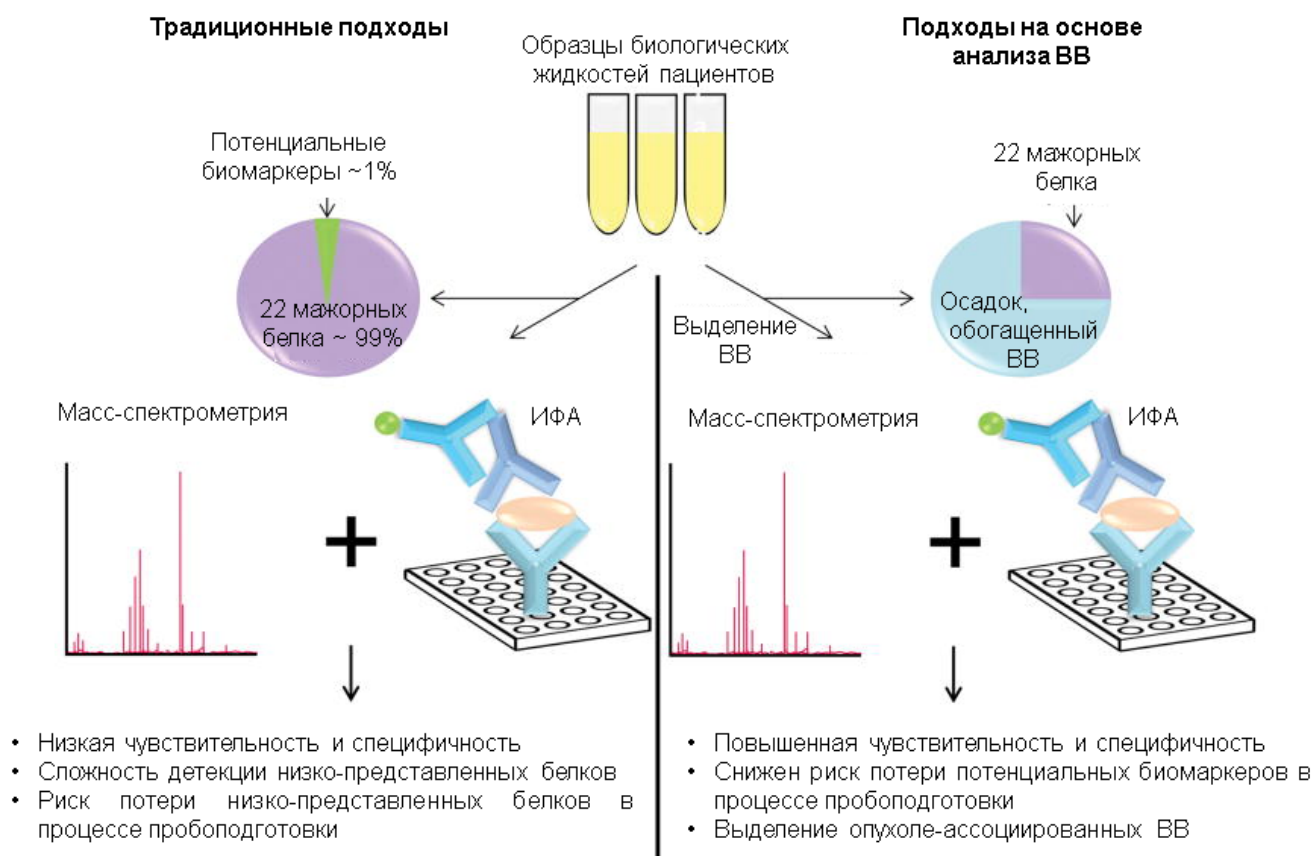


Рисунок 3 — Достоинства использования ВВ для поиска новых биомаркеров [127]

Дополнительным достоинством поиска опухолевых маркеров в составе экзосом является наличие мембраны, защищающей содержимое везикул от гидролаз биологических жидкостей. Поскольку концентрация экзосом в биологических жидкостях значительно

выше, чем ЦОК ($\sim 10^8$ против 10), очевидна перспективность поиска опухоль-специфических белков в составе экзосом для разработки методов диагностики, прогноза течения и оценки эффективности противоопухолевой терапии злокачественных новообразований методом «жидкостной биопсии» [28, 130].

На 30 января 2025 г. в базе данных Vesiclepedia (<http://microvesicles.org/index.html>) содержится информация о 8 452 везикулярных белках, и она постоянно пополняется.

Недавно было показано, что экзосомы из линий карциномы молочной железы являются богатым источником белков и поверхностных биомаркеров, связанных с РМЖ, и могут быть использованы для диагностики и прогноза данного заболевания [131, 132]. Однако при анализе содержимого экзосом, циркулирующих в крови онкологических больных, необходимо учитывать, что помимо опухолевых экзосом в крови присутствуют экзосомы эндотелиоцитов и других неопухолевых клеток, а также клеток опухолевого микроокружения [133].

Поиск опухолевых маркеров в составе экзосом осложняется высокой индивидуальной вариабельностью белкового груза везикул даже в группе здоровых доноров. При сравнении протеомных профилей экзосом плазмы крови 15 клинически здоровых доноров только 9 из 109 идентифицированных экзосомальных белков присутствовали во всех образцах [134]. Избегая проблемы низкой воспроизводимости между разными образцами, а также решая проблему количества белка для масс-спектрометрии, большинство исследователей работают с экзосомами клеточных культур, что отражено в базе данных Vesiclepedia. В результате авторы приводят данные о тысячах белков в составе экзосом, полученных из кондиционированных сред различных клеточных линий. В частности, были успешно проанализированы протеомы экзосом, секретированных клеточными линиями, имитирующих трижды-негативный (BT-549, Hs578T, LM2, MDA-MB-231), HER-2 позитивный (HCC1419, HCC1954, JIMT1, SKBR-3) и люминальный А (MCF-7) подтипы РМЖ [135] и идентифицировано 4648 белков. Однако авторы не учитывают, что поскольку размер экзосом составляет менее 150 нм, везикула не может содержать более 100 белков. Таким образом, нет смысла получать слишком большое количество экзосом и описывать белки, которые могут быть обнаружены в экзосомах крови с очень низкой вероятностью.

Для подтверждения гипотезы, что ВВ являются идеальным источником диагностически-значимых молекул для «жидкостной биопсии», были проанализированы протеомы ВВ из различных источников. Было показано, что белки ВВ из плазмы крови имеют высокий коэффициент корреляции с белковым составом ВВ из сыворотки крови этих же доноров ($r^2 = 0,92$), затем следуют ВВ костного мозга человека ($r^2 = 0,65$) и

лимфатической жидкости ($r^2 = 0,64$) и меньше всего коррелируют с ВВ, секретированными клеточными линиями человека ($r^2 = 0,15$) и ВВ тканевых эксплантов ($r^2 = 0,24$), что говорит о сложности протеомов ВВ плазмы и лимфы, которые могут быть причиной расхождения с протеомами ВВ тканей [136]. Следует отметить, что опухоли молочной железы характеризуются значительной вариабельностью клеточного состава, а также гистологической, экспрессионной и генотипической гетерогенностью [137]. Тем не менее, различными группами исследователей выделен ряд претендентов на роль протеомных маркеров РМЖ в составе экзосом (таблица 1).

Таблица 1 — Потенциальные протеомные маркеры для «жидкостной биопсии» в составе экзосом крови больных РМЖ [138]

Белок	Источник экзосом	Ссылка
CD82	98 пациентов с РМЖ и 80 здоровых доноров	[139]
CD151	12 пациентов с РМЖ и 12 здоровых доноров, клеточные линии: BT5-49, MDA-MB-468, MDA-MB-231, T47-D, MCF-7	[140]
CD24+EpCAM	Первичные клеточные культуры пациентов больных РМЖ и здоровых доноров	[141]
HER2	Клеточные линии: SK-BR-3 и BT-474	[142]
OSF-2	Клеточные линии: MCF-7 и MDA-MB-231, 67NR и 4T1	[143]
HSP70, Del-1, FN1, альтернативно сплайсированный сурвивин	20 пациентов РМЖ и 14 здоровых доноров	[144, 145]
GPC1	Клеточные линии: MDA-MB-231, MCF-10A	[146]
FGB, FGA, FGG, CFH, PLG, IGHV3-53, APCS, CFHR1, IGHV3-48, CFHR2, IGHV4-59, IGHV3-11, IGHG3	18 с РМЖ и 43 здоровых донора	[147]

Несмотря на предыдущие исследования по поиску белковых биомаркеров в экзосомах, секретируемых клеточными линиями карциномы молочной железы [128, 132,

148], в настоящее время отсутствует консенсус по экзосомальным маркерам опухоли из-за ограниченности наборов протеомных данных ВВ из образцов биологических жидкостей для всестороннего анализа и интерпретации данных.

Поскольку наиболее перспективными объектами для поиска маркеров для диагностики, прогноза течения и оценки эффективности противоопухолевой терапии злокачественных новообразований, в том числе РМЖ, являются внДНК и ВВ, дальнейшие части обзора будут посвящены рассмотрению состава внДНК и экзосом, особенностям циркуляции и биологической роли в канцерогенезе.

1.4 ДНПК крови и их роль в канцерогенезе

1.4.1 Источники эндогенной внДНК в кровотоке

Показано, что внДНК появляется в крови в результате дифференцировки ФЭ, клеточной гибели, а также активной секреции (рисунок 4), при этом доля экзогенной внДНК не превышает 0,1 % [35].

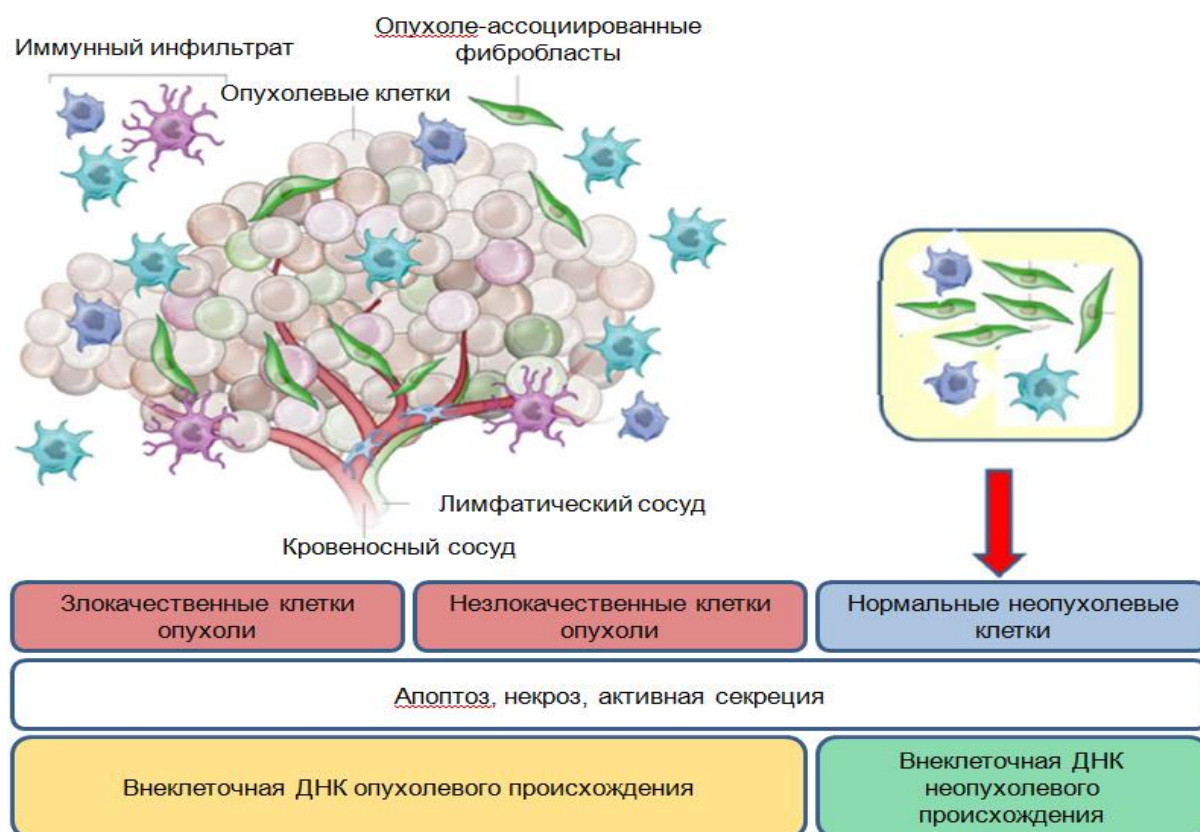


Рисунок 4 — Источники внДНК крови [148]

Известно, что ежедневно обновляется около 1 % эритроцитов. Учитывая количество этих ФЭ в крови взрослого человека ($\sim 25\text{--}30 \times 10^{12}$), в результате эритропоэза в составе ядер эритробластов выделяется до 1,28 г ДНК. Теоретический расчет показывает, что, если бы такая ДНК не поглощалась макрофагами, ее концентрация в крови составляла бы не менее 0,26 мкг/мл [149].

Помимо дифференцировки ФЭ, источником внДНК является **апоптоз**. С учетом ежедневной гибели $\sim 10^{11}$ до 10^{12} клеток, концентрация такой ДНК в крови могла бы составлять 2 мг/мл [149]. Погибшие клетки поглощаются макрофагами, дендритными клетками и эндотелиоцитами, однако часть апоптотической ДНК все таки попадает в кровоток, поскольку известно, что внДНК циркулирует в крови в комплексах с гистонами H2A, H2B, H3 и H4 [150] и зачастую имеет размер, кратный нуклеосоме — 140-180 п.н. [98, 149-152]. Более того, уровень внДНК в составе нуклеосом значительно возрастает при аутоиммунных заболеваниях [44] и различных злокачественных новообразованиях, в том числе РМЖ [151, 152]. С помощью ИФА на основе антител против гистонов было показано, что по сравнению со ЗЖ у больных с не метастатическим и с метастатическим РМЖ уровень нуклеосом в плазме крови возрастал в 15 и 12 раз, соответственно [98, 149].

Другим доказательством апоптотического происхождения основной части внДНК является индекс целостности, отражающий фрагментацию циркулирующей в крови ДНК. С помощью количественной ПЦР были оценены концентрации фрагментов апоптотического (ген *PTGS2*, последовательность длиной 124 п.н.) и некротического (ген *Reprimo*, последовательность длиной 271 п.н.) происхождения в крови больных раком мочевого пузыря и с доброкачественной гиперплазией предстательной железы [153]. Путем расчета отношения фрагментов *PTGS2* / *Reprimo* было установлено преобладание апоптотической гибели клеток над некротической.

С помощью секвенирования внДНК плазмы крови здоровых доноров на платформе 454 GS-FLX System (Roche) также было показано, что в циркуляции представлена преимущественно апоптотическая ДНК [154]. В частности, было показано, что состав внДНК плазмы соответствует геномной ДНК, но содержит больше *Alu*-элементов и меньше длинных повторов *L1* и *L2*.

В целом **некроз** встречается реже, чем апоптоз. Поскольку в данном случае активируются лизосомальные протеазы и нуклеазы, поступившие в кровоток фрагменты ДНК имеют бóльшую (до 10 000 п.н.), чем при апоптозе, длину [149, 155]. Показано, что повышенная концентрация внДНК в сыворотке крови онкологических больных коррелирует с дозой и количеством циклов радиационной терапии, что косвенно указывает на интенсивный некроз раковых клеток [149, 156]. Кроме того, концентрация внДНК в

крови также возрастает за счет вклада некротический ДНК при травмах [156] и ишемии [149, 157].

Повышение концентрации внДНК при культивировании клеток с крайне малыми количествами апоптотических и некротических клеток [149, 158], свидетельствует в пользу *активной секреции* внДНК. Показано, что концентрация внДНК в кондиционной среде коррелирует с интенсивностью клеточного гликолиза. Более того, было показано, что при длительном культивировании клеток снижается доля нуклеосом и возрастает доля более длинной внДНК, что исключает апоптотическое или некротическое происхождение внДНК [159]. Исследование кинетики накопления внДНК в кондиционных средах первичных эндотелиоцитов пупочной вены человека и клеткок аденокарциномы линии HeLa выявило общую тенденцию — ДНК активно секретируется клетками в ходе лаг-фазы и в начале фазы экспоненциального роста [160]. Активная секреция нуклеосом также была показана в результате активации нейтрофилов путем инкубации с 12-о-тетрадеканоил-форбол-13-ацетатом и аprotинином, с обогащённой тромбоцитами плазмой и коллагеном I типа [161].

Путем добавления различных ингибиторов белковой секреции (монензина, глибурида, метиламина, оуабаина, цитохалазина и хлорокина) к первичным эндотелиоцитам пупочной вены человека и клеткам аденокарциномы линии HeLa, было установлено, что существуют различные механизмы генерации внДНК [162, 163].

1.4.2 Влияние гидролаз крови на циркуляцию внДНК

Поддержание постоянной концентрации внДНК в биологических жидкостях [25] и гидролиз в течение нескольких минут синтетических олигонуклеотидов [164] указывают на существование механизмов защиты эндогенной ДНК от гидролаз.

В ранних работах было показано наличие ДНК в составе ВВ [165], однако позднее, с помощью фильтрации плазмы крови через поры диаметром от 0,22 до 0,5 мкм и дальнейшей количественной оценки β -глобина было показано, что фильтрация не влияет на концентрацию ДНК в образцах, что указывает, что основная часть внДНК крови не содержится в апоптотических тельцах и ВВ [166].

Защиту внДНК от гидролаз крови может также обеспечить упаковка нуклеиновой кислоты в олигонуклеосомные частицы [149] (рисунок 5).

Наличие нуклеосом в плазме крови было подтверждено во многих работах как с помощью электрофореза агарозном геле [155, 167, 168], так и ИФА на основе антител против гистонов [98], а выявленная корреляция ($R = 0,327$, $p = 0,001$) концентрации внДНК

с концентрацией нуклеосом в сыворотке крови здоровых доноров и больных РМЖ дополнительно свидетельствует о циркуляции внДНК в комплексах с гистонами [24]. Поскольку гистоны способны напрямую проникать через плазматическую мембрану [169], вероятно упаковка ДНК в олигонуклеосомные частицы облегчает перенос внДНК внутрь клетки-реципиента. В частности, в составе внДНК присутствует локус для связывания с гистонами H3K27me2, что вероятно способствует экспорту ДНК в клетки [169].

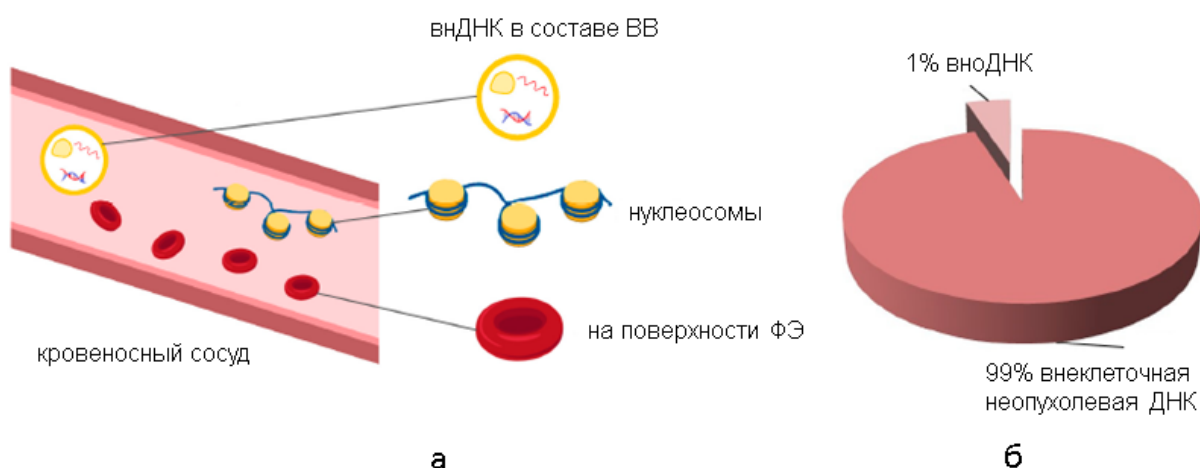


Рисунок 5 — ВнДНК крови: (а) форма циркуляции и (б) доля внДНК в общем пуле внДНК [76]

Помимо формирования комплексов с гистонами, внДНК может связываться с белками сыворотки крови [149, 170]. Показано, что сформированные комплексы дезоксирибоолигонуклеотидов с альбумином после введения в кровь мышей обладают значительно большей стабильностью, чем синтетическая ДНК [171]. В ранних работах были предприняты попытки изучения ДНК-связывающих белков крови. В частности, было показано, что эти белки крайне гетерогенны (более 20 фракций) и имеют молекулярную массу от 20 до 700 кДа [20, 171]. В настоящее время для многих мажорных белков плазмы крови показана ДНК-связывающая активность (альбумин, иммуноглобулины классов А, М и G [20, 172], белок системы комплемента C1q [173, 174], фибронектин [175], лактоферрин [176], лизоцим [177] и др.), однако не ясно, какие еще белки входят в состав ДНПК. Помимо белков, внДНК может формировать комплексы с ЛПВП липопротеинами. В частности, было показано, что ~12 % внДНК циркулирует в крови в составе таких комплексов [178].

Недавно было показано, что белки ДНПК влияют на длительность циркуляции внДНК. В частности, тромбоцитарный фактор 4, гистон H4, цитоплазматический β -актин, β 1-глобин, альбумин, предшественник тромбоспондина, α -цепи гемоглобина, и гистон-

подобные белки путем формирования комплексов с вДНК увеличивают ее время циркуляции и снижают поглощение гепатоцитами [179].

Поскольку на плазматических мембранах клеток и ФЭ идентифицированы ДНК- и гистон-связывающие белки [180-182], а площадь мембран ФЭ составляет не менее $0,76 \text{ м}^2/1 \text{ мл крови}$ [149], можно предположить, что доля асс-ФЭ ДНК, выше, чем вДНК плазмы (рисунок 5). В частности, описаны высоко-аффинные ДНК-связывающие белки с молекулярными массами 28, 59 и 79 кДа на плазматической мембране лимфоцитов [149, 180] и 30 кДа — на мембране лейкоцитов [149, 183]. Показано, что белок мембраны лейкоцитов представлен на 67 % лимфоцитов и 98 % моноцитов и способен связывать ДНК (до $2,6 \times 10^6$ молекул/клетку) [184]. На плазматической мембране эритроцитов также представлены ДНК-связывающие белки с молекулярной массой 30 кДа [149, 181] и 42 кДа [149, 185].

Кроме того, на поверхности лейкоцитов, моноцитов, макрофагов и НК присутствует белок Мас-1, который в присутствии ионов Ca^{2+} или Mg^{2+} способен связывать олигонуклеотиды [186], причем субъединицы Мас-1 α М (195 кДа) и β 2 (95 кДа) связывают ДНК с различными константами диссоциации — $1,7 \times 10^{-5} \text{ М}$ и $8,8 \times 10^{-6} \text{ М}$, соответственно. На плазматической мембране эндотелиоцитов человека также были идентифицированы белки, связывающие ДНК с $K_d = 5\text{-}25 \times 10^{-10} \text{ М}$ — Ku70 и Ku80 [187]. Для тромбоцитов выявлена способность связывать бактериальную одноцепочечную ДНК (до $2,75 \text{ нг} / 10^6$ ФЭ), однако не ясно, какие белки участвуют в этом процессе [149, 188].

ДНПК могут связываться с плазматической мембраной клетки не только за нуклеиновую, но и за белковую составляющую. Действительно, два связывающих нуклеосомы белка с молекулярной массой 29 и 69 кДа выявлены на поверхности моноклеарных клеток периферической крови человека и Т-лимфоцитах мыши [189]. На поверхности фибробластов также был выявлен белок с молекулярной массой 94 кДа, связывающий только нуклеосомы и не связывающий отдельно ДНК или гистоны [190]. В другой работе на плазматической мембране фибробластов был выявлен белок с молекулярной массой 50 кДа, также обладающий высокой аффинностью к нуклеосомам ($K_d \sim 7 \times 10^{-9} \text{ М}$, 9×10^7 молекул на клетку) [191].

Помимо специфического связывания ДНПК с плазматической мембраной клетки, было показано, что часть комплексов связана неспецифически. Связывание, основанное на разноименных зарядах — вДНК-полианиона с фосфолипидами клеточных мембран — осуществляется при участии катионов двухвалентных металлов, в первую очередь Ca^{2+} и Mg^{2+} [192]. Кроме того, лизин- и аргинин-богатые белки плазматической мембраны клетки также могут взаимодействовать с ДНК и усиливать ее связывание с мембраной. В

частности, на культурах клеток лейкоцитов и фибробластов было продемонстрировано, что связывание фаговой и плазмидной ДНК с поверхностью клеток зависит от концентрации Mg^{2+} в среде, достигая 2500 молекул ДНК фага Т7/клетку [192].

Таким образом, формирование комплексов внДНК с белками и липопротеинами, и связывание этих ДНПК с поверхностью ФЭ обеспечивает долговременную циркуляцию эндогенных нуклеиновых кислот в кровотоке, несмотря на высокую нуклеазную активность (по разным оценкам от $4,4 \times 10^{-3}$ до 2,5 ед. акт./мл) [193]. В тоже время протеазы, гидролизующие белки в составе ДНПК, также влияют на криенс внДНК. Очевидно, что активность гидролаз крови регулируются соотношением концентрации ферментов и их ингибиторов, поэтому основную роль играет суммарная ферментативная активность крови [149, 194].

Действительно, при исследовании длительности выведения ДНК из кровотока мыши было показано, что однопечечный дезоксирибоолигонуклеотид длиной 15 н. элиминируется на 99,9 % через 5 мин, а через 15 мин уже не детектируется [195], при этом более высокомолекулярная внДНК плазмы человека более стабильна: через 5 мин детектируется ~ 6 % ДНК, через 45 мин — 2 %, однако затем уровень снова возрастает до примерно 6 % и сохраняется более 4-х ч. [196], что может быть связано с депонированием введенной ДНК тканями и последующей её диффузией в кровеносное русло. Длительность циркуляции фрагментов Y-хромосомы плода в кровотоке родившей женщины заметно выше (в среднем 16,3 мин), что может быть связано с природной упаковкой внДНК в комплексы с белками и липопротеинами [197].

С помощью экспериментов на мышах, дефицитных по различным ДНКазам, было показано, что деградация геномной ДНК идет в клетке участием DFFB, а в дальнейшем гидролизе ДНК в плазме крови принимают участие преимущественно ДНКазы I и ДНКазы 1L3 [198].

ДНКазы I (КФ 3.1.21.1) или нейтральная ДНКазы является основной нуклеазой крови [199]. Для этого фермента характерны зависимость от ионов Mg^{2+} и Ca^{2+} , нейтральный pH-оптимум и образование в качестве продукта гидролиза фрагментов ДНК с фосфатом на 5'-конце [194, 200]. В литературе представлены противоречивые данные как о концентрации (от $3,2 \pm 1,4$ нг/мл [201] до $18,4 \pm 6,7$ нг/мл [202]), так и об активности ДНКазы I ($4,4 \pm 1,8$ ед. акт./л [203] до $(0,2-6,3) \times 10^3$ ед. акт./л [204]) в плазме крови. Показано, что при некоторых заболеваниях, например системной красной волчанке [205] и злокачественных новообразованиях [206], активность ДНКазы I достоверно снижается, а концентрация внДНК — увеличивается.

ДНКазы II (К.Ф. 3.1.22.1) или кислая ДНКазы менее представлена в крови. Для этого фермента характерны кислый pH-оптимум, отсутствие потребности в активаторах и образование в качестве продуктов реакции нуклеозид-3'-фосфатов [203, 207]. Показано, что активность ДНКазы II в сыворотке крови здоровых доноров составляет $0,11 \pm 0,009$ усл. ед./мг белка [208].

Фосфодиэстераза I (К.Ф. 3.1.4.1) является неспецифической экзонуклеазой. Для этого фермента характерны зависимость скорости реакции гидролиза от ионов двухвалентных металлов, щелочной pH-оптимум и образование в качестве продуктов реакции нуклеозид-5'-фосфатов [209, 210]. Показано, что фосфодиэстераза выполняет в крови защитную функцию, гидролизуя экзогенные нуклеиновые кислоты [211]. Концентрация неспецифической экзонуклеазы в крови составляет $29,7 \pm 2,9$ нг/мл [212].

Для лактоферрина и иммуноглобулинов также показана каталитическая активность по отношению к нуклеиновым кислотам [213]. Для этих белков характерны нейтральный pH-оптимум и зависимость от ионов двухвалентных металлов [214, 215].

В литературе представлены данные о снижении суммарной активности ДНКаз крови и возрастании уровня внДНК в крови больных со злокачественными новообразованиями [216, 217]. Необходимо отметить, что нуклеазная активность практически не влияет на концентрацию асс-ФЭ ДНК и не вносит значимого вклада в процесс фрагментации и диссоциации ДНК с клеточной мембраной [216].

Очевидно, что на доступность гидролиза нуклеазами внДНК в крови влияют формирование ДНПК и суммарная активность протеаз крови [218]. Показано, что суммарная протеазная активность в плазме крови больных РМЖ коррелирует ($r = 0,676$, $p = 0,001$) с повышенной концентрацией внДНК [219]. В другой работе была выявлена корреляция между протеазной и каспазной активностями ($r = 0,539$, $p = 0,0001$), а также между каспазной активностью и концентрацией нуклеосом ($r = 0,268$, $p = 0,008$) в сыворотке крови больных РМЖ [24]. Тем не менее, до сих пор отсутствуют прямые доказательства влияния протеаз, и каспаз в частности, на гидролиз белков, связывающих асс-ФЭ ДНК.

Таким образом, часть внДНК циркулирует в крови в составе ДНПК, а часть — связана с ФЭ. Путем связывания с плазматическими мембранами клеток внДНК способна проникать в клетки-реципиенты, либо подвергаться деградации и выведению.

1.4.3 Особенности фрагментации вДНК при патологических состояниях

Поскольку для исследования концентрации вДНК в крови требуются чувствительные методы, учитывающие фрагментацию нуклеиновой кислоты, данные работ раннего периода значительно отличаются друг от друга [11, 25] и от современных работ. Выявленные противоречия связаны с различной пробоподготовкой образцов, нормированием данных, в том числе ПЦР. В частности, в 1987 г. путем выделения из плазмы вДНК фенольной экстракцией с последующим электрофорезом в агарозном геле было показано, что размер нуклеиновой кислоты составляет от 0,5 до 21 т.п.н. [220]. В 2000 г. уже с использованием коммерческого набора QIAamp Blood Kit (Qiagen, Германия) была выделена вДНК плазмы крови больных с различными типами злокачественных новообразований и ее размер проанализирован с помощью электрофореза в агарозном геле [155]. Было показано, что вДНК представлена преимущественно фрагментами, кратными нуклеосоме (180 п.н., 360 и 540 п.н.), при этом в некоторых образцах была обнаружена высокомолекулярная ДНК (более чем 10000 п.н.). В другой работе также было показано наличие низко-, так и высокомолекулярных фрагментов вДНК в крови больных злокачественными новообразованиями. Кроме того, авторы показали наличие только высокомолекулярных фрагментов вДНК в крови здоровых доноров [168].

Позднее было установлено, что в норме вДНК плазмы крови представлена преимущественно фрагментами ~176 п.н., с выступающими 5'-концами и с высоким содержанием GC на 5'- и 3'-концах [221], а вДНК кондиционной среды первичных эндотелиоцитов, первичных фибробластов, а также линии HeLa имеет размер от 180 до 1000 п.н., а асс-ФЭ ДНК представлена фрагментами от 3500 до 20000 п.н. [222, 223].

С помощью ПЦР в режиме «реального времени» была проведена оценка уровня фрагментации вДНК на основе индекса целостности, который рассчитывается как соотношение низко- и высокомолекулярных фрагментов ДНК. Было установлено, что с помощью индекса целостности вДНК крови возможно с чувствительностью 59 % и специфичностью 100 % дифференцировать женщин с доброкачественными и злокачественными новообразованиями яичников [224]. В другой работе было показано, что с помощью индекса целостности вДНК возможно дифференцировать здоровых доноров и больных с злокачественными новообразованиями головы и шеи [225]. Кроме того, индекса целостности вДНК плазмы крови коррелирует с прогрессированием РМЖ и его метастазированием в лимфатические узлы [226].

В литературе также представлены попытки соотнести концентрацию асс-ФЭ ДНК с развитием патологических состояний. Например, с помощью количественной ПЦР было

показано, что при иксодовом клещевом боррелиозе статистически значимо возрастают концентрация внДНК плазмы и концентрация асс-ФЭ ДНК [227], а при ревматоидном артрите — возрастает концентрация внДНК плазмы и снижается концентрация асс-ФЭ ДНК [228].

При исследовании распределения внДНК в крови онкологических больных было установлено перераспределение содержания внДНК в плазме и асс-ФЭ ДНК, [229]. В частности, при немелкоклеточном раке легкого с помощью количественной ПЦР установлено снижение концентрации асс-ФЭ ДНК, при этом концентрации внДНК плазмы не изменяется [229]. Таким образом, оценка концентрации внДНК может быть полезна для мониторинга эффективности противоопухолевой терапии [230–232].

Таким образом, в крови циркулируют как низко-, так и высокомолекулярные фрагменты внДНК, причем в норме большая ее часть ассоциирована с ФЭ. Выделение и анализ гетерогенных по размеру и в малой концентрации внДНК являются пока нерешенными проблемами, затрудняющими разработку метода «жидкостной биопсии».

1.4.4 Молекулярно-биологическая роль внДНК крови

Несмотря на интенсивные исследования концентрации внДНК в крови, ее размера и формы циркуляции, биологические эффекты этой эндогенной нуклеиновой кислоты в циркуляции остаются мало изучены.

Хорошо описаны иммуностимулирующие свойства ДНК как в запуске антибактериального, так и противовирусного ответов [233–235], причем индукция анти-ДНК антител возникает только при введении нуклеосом, а не очищенной внДНК [236]. Показано, что нуклеосомы не обладают цитотоксичностью [235], в отличие от свободных гистонов в крови, которые могут вызывать тромбоз и почечную дисфункцию [237]. Показано, что секретированные спленоцитами и лимфоцитами тимуса мышей нуклеосомы стимулируют поликлональную В-клеточную активацию *in vitro* [150], а также активируют праймированные гранулоцитарно-макрофагальным колоние-стимулирующим фактором нейтрофилы [238].

Кроме того, внДНК может являться частью паутинообразных структур нейтрофильного происхождения (NETs), в состав которых помимо ДНК входят белки гранул нейтрофилов [239, 240]. NETs возникают в результате гибели нейтрофилов и могут стимулировать рост опухоли благодаря наличию в них помимо ДНК множества активных факторов, таких как миелопероксидаза, катепсины, интерлейкины и другие [241], при этом

функцией ДНК является образование каркаса, который связывается с ламинином и поддерживает близость между NET-протеазами и опухолевыми клетками [242].

Также благодаря отрицательно-заряженному декзосирибофосфатному остову ДНК в составе ДНК-ловушек способствует возникновению системных патологических процессов. В частности, внДНК способна активировать тромбоциты, что приводит к запуску коагуляционного каскада, способствуя развитию опухоли-ассоциированных тромбозов [240, 243].

Возможность переноса вирусной и опухолевой ДНК в составе апототических телец от клеток-доноров к клеткам-реципиентам была подтверждена на моделях *in vitro* и *in vivo* [244, 245]. Таким образом, горизонтальный перенос ДНК может приводить к онкотрансформации клеток и образованию опухолей. Для подтверждения интеграции внДНК в здоровые соматические клетки и участия в развитии метастазов, клетки аденокарциномы кишечника DHD/K12-PROb (DHD) трансфецировали плазмидой pCDNA3.1CAT, содержащий ген устойчивости к неомицину, и вводили крысам [27, 246] (рисунок 6).

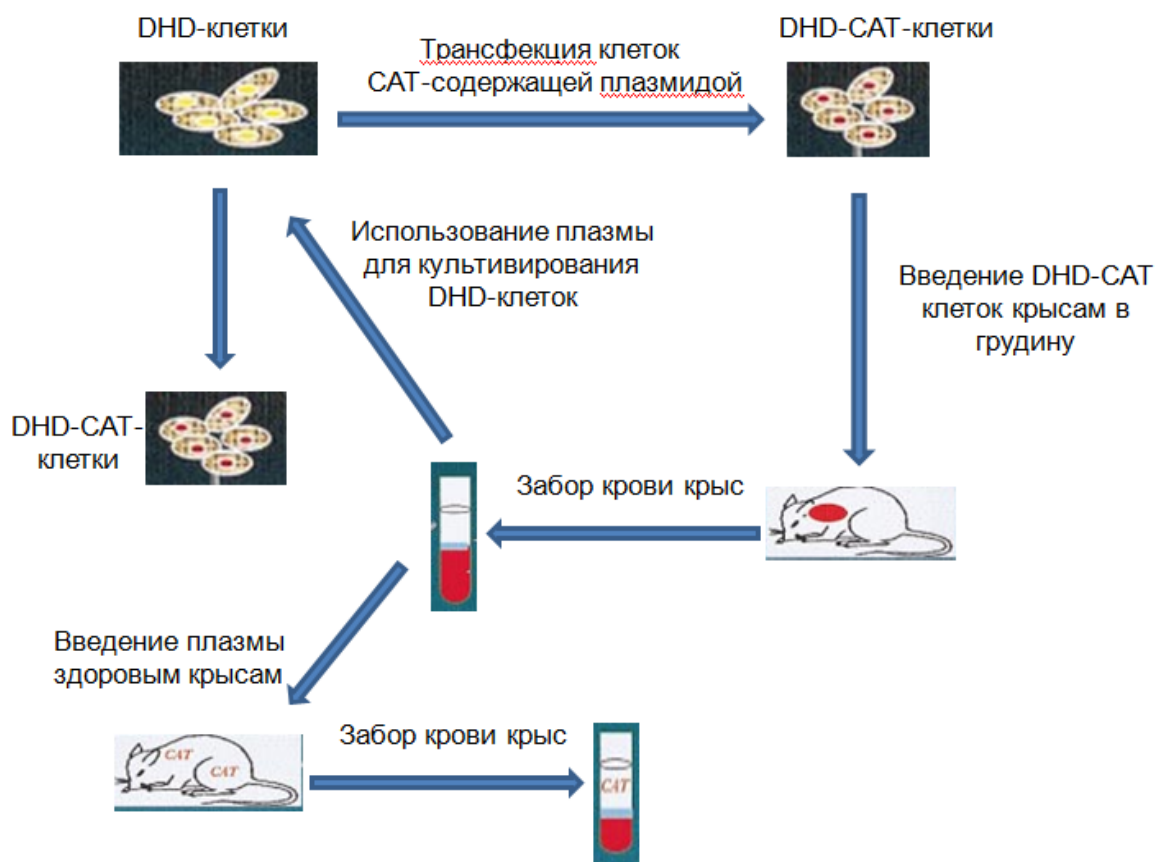


Рисунок 6 — Схема развития генометастазов [246]

Через 7 дней после введения, с помощью ПЦР на мутацию *K-ras*, опухолевая ДНК была выявлена в легких животных, через три недели — в плазме крови, а через пять недель — после центрифугирования образцов крови в верхнем слое эритроцитов, обогащенном лейкоцитами, что подтверждает гипотезу о большей устойчивости к гидролазам крови асс-ФЭ ДНК (рисунок 6).

На основании полученных данных, авторы выдвинули гипотезу о возможности трансфекции нормальных клеток вноДНК в составе ДНПК, что в свою очередь может приводить к метастазированию (рисунок 7) [247]. Эта гипотеза позволяет объяснить образование тканеспецифичных метастазов: в составе ДНПК есть «адрес» — белок, с которым способен аффинно связаться белок-рецептор, присутствующий на плазматической мембране определенных клеток-реципиентов [181, 248]. Механизм проникновения вноДНК в составе нуклеосом к клетки-реципиенты предполагается энерго-независимый, поскольку отрицательно-заряженный дезоксирибофосфатный остов вступает в неспецифические нековалентные ионные взаимодействия с положительно заряженными гистонами и белками плазматической мембраны [249].

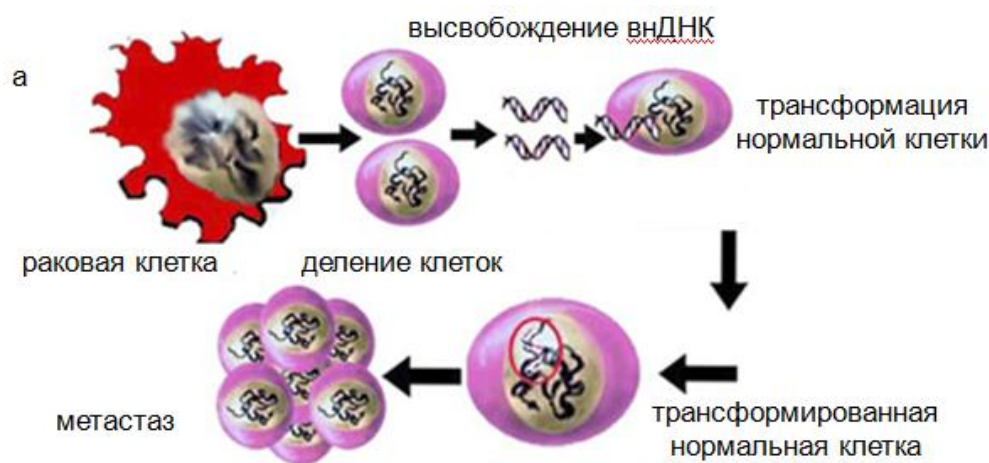


Рисунок 7 — Механизм трансфекции нормальных клеток вноДНК [247]

Ассоциация вноДНК с плазматической мембраной ФЭ, вероятно, может приврдить не только к увеличению длительности циркуляции ДНПК в кровотоке, но и упрощает доставку вноДНК к удалённым клеткам-мишеням [250]. Действительно, наличие асс-ФЭ ДНК было обнаружено как в крови здоровых доноров [247], так и пациентов с различными заболеваниями [227–229], при этом снижение концентрации такой ДНК в некоторых случаях может объясняться отсутствием рецептора к ДНК на поверхности клеток крови онкологических больных или потерей ДНК-связывающих свойств в связи с мутацией [47].

Помимо горизонтального переноса информации, внДНК в составе нуклеосом способна активировать NF- κ B/Rel-A путь, что приводит к повышению экспрессии IL-8, вовлеченного в ранние стадии ангиогенеза [251]. Также была показана способность нуклеосом формировать комплексы гепарин-связывающими ангиогенными факторами (FGF-1, FGF-2, VEGF и TGF β -1), что приводит к стимуляции ангиогенеза *in vitro* и *in vivo* [252]. Эти данные не только указывают на роль нуклеосом в прогрессировании заболевания [19], но проясняют, почему гипоксические и гиперваскуляризованные области опухолевых тканей зачастую находятся рядом.

Таким образом, детальное исследование состава циркулирующих в крови ДНПК и анализ строения ДНК и функций ДНК-связывающих белков позволят не только прояснить механизмы появления и выведения внДНК в кровотоке при различных патологических состояниях, но и расширить фундаментальные знания о биологической роли внДНК.

1.5 Экзосомы крови и их роль в канцерогенезе

1.5.1 Биогенез экзосом

В настоящее время принято разделение всех ВВ на два подтипа — микровезикулы или эктосомы и малые везикулы, к которым в том числе относят и экзосомы.

К *микровезикулам* относят ВВ диаметром от 100 до 1000 нм, формирующиеся в результате выпячивания плазматической мембраны и её дальнейшего отшнуровывания. Поскольку в литературе отсутствуют данные по направленному сортированию биополимеров в микровезикулы, вероятно, содержимое эктосом отражает состав родительских клеток [253].

В отличие от эктосом, *экзосомы* достаточно гомогенны по размеру (от 30 до 150 нм) и имеют характерную чашеобразную форму. Поскольку при созревании экзосом в них идет направленный сортирование биополимеров, большинство работ по исследованию биологической роли ВВ и разработке методов «жидкостной биопсии» сконцентрированы именно на малых ВВ. В целом, биогенез экзосом — сложный и многоступенчатый процесс (рисунок 8). Сначала плазматическая мембрана инвагинируется внутрь, образуя первичную эндосому, которая окружает биомолекулы [254, 255]. В этот момент с первичной эндосомой связывается белок Rab5, который затем в дальнейшем запускает работу таких белков, как фосфоинозитолкиназа, ранний эндосомальный антиген 1 и рабенозин-5 [254, 255].

Фосфатидилинозитол-3-фосфат связывается с ESCRT-0, что инициирует дальнейшую сборку комплексов ESCRT-I и ESCRT-II. Эти белковые комплексы семейства ESCRT запускают процесс формирования мультивезикулярных телец (МВТ), которые

образуются в результате отпочкования эндосомной мембраны в сторону просвета. Во время этого процесса белки и цитозольные компоненты захватываются и заключаются во интралюминальные везикулы (ИЛВ) [256]. Сформированные MBT либо деградируют после слияния с лизосомами, либо сливаются с плазматической мембраной, высвобождая ИЛВ, которые во внеклеточном пространстве называются "экзосомами" [257]. Необходимо отметить, что содержание холестерина в мембране влияет на судьбу MBT: богатые холестерином MBT склонны к секреции экзосом, а с низким уровнем холестерина чаще подвержены деградации [258]. Кроме того, на секрецию клетками экзосом влияют белки семейства Rab (Rab5A, Rab9A, Rab2 Rab27A, Rab27B) [259].

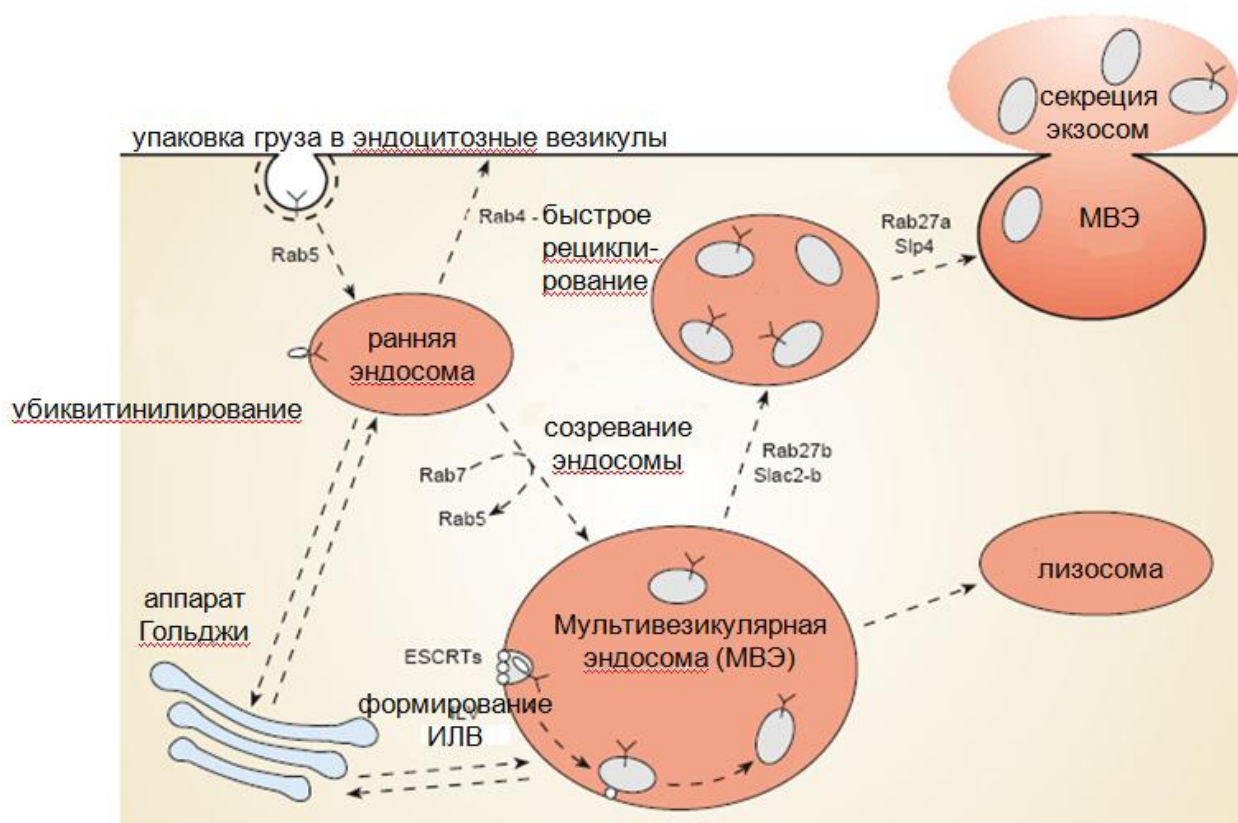


Рисунок 8 — Биогенез экзосом [29]

Показано, что секрецию экзосом стимулирует тепловой шок [260], закисление среды [261], повышение внутриклеточной концентрации Ca^{2+} [262], и т.д. Более того, на культурах клеток молочной железы был выявлен механизм обратной связи, влияющий на секрецию экзосом [263].

1.5.2 Состав экзосом

По литературным данным, концентрация экзосом составляет $\sim 10^8$ - 10^{12} экзосом/мл плазмы крови [31, 57, 264]. Наблюдаемые отличия данных объясняются как различными подходами к выделению экзосом, так и методами оценки концентрации ВВ. Поскольку диаметр экзосом составляет 30-150 нм, то внутренний радиус этого типа ВВ ~ 10 -70 нм, а внутренний объем одной экзосомы $\sim 4 \times 10^{-24} - 1,5 \times 10^{-21}$ м³. Таким образом, в экзосому возможно поместить ~ 70 -25 000 малых молекул РНК или небольшого белка [264].

1.5.2.1 Липиды экзосом

При исследовании липидного состава экзосом было показано, что соотношение липидов малых ВВ варьирует в зависимости от клеточного происхождения, и более того, состав мембран экзосом и секретирующих их клеток также значительно отличается [265]. В частности, с помощью асимметричного фракционирования в полевом потоке было показано, что экзосомы, секретированные клетками молочной железы (линия MDA-MB-231) содержали 80-90 % фосфатидилхолина (холестерин в измерения не включался), а экзосомы, секретированные клетками, имитирующими панкреатический рак (линия AsPC-1) — 60 % фосфатидилхолина и 30 % сфингомиелина [266]. В целом, мембрана экзосом богата холестерином и фосфатидилхолином [267]. В частности, масс-спектрометрический анализ экзосом, секретированных клетками РС-3 выявил обогащение такими липидами, как холестерол, длинноцепочечные сфинголипиды и фосфатидилсерин 18:0/18. Кроме того, по сравнению с родительскими клетками в мембране экзосом выявлено обогащение гликосфинголипидами (гексозилцерамид и лактозилцерамид) [268].

Очевидно, что состав липидов мембран экзосом может влиять на функциональность малых ВВ. Например, повышенное содержание сфингомиелина, фосфатидилинозитола и холестерина способствует устойчивости экзосом физиологическом диапазоне pH [269], при этом сфингомиелин обладает проангиогенными свойствами, индуцируя миграцию эндотелиоцитов и формирование и ветвление сосудов [270].

База данных Vesiclepedia на 15 июля 2025 г. содержит информацию о 3838 липидах в составе ВВ и экзосом, полученных как из кондиционных клеточных сред, так и биологических жидкостей. Очевидно, что липиды играют разнообразную функциональную роль в организме, влияя в том числе на различные этапы биогенеза экзосом, их метаболизм и биораспределение. Таким образом, фундаментальные исследования, посвященные влиянию состава липидов на текучесть мембраны экзосом и их дальнейшую

интернализацию, может пролить свет не только на биологическую активность экзосом, но и способствовать разработке подходов по доставке терапевтических молекул в составе искусственных ВВ.

1.5.2.2 Белки экзосом

Учитывая направленный сортинг биологически-активных молекул в экзосомы в процессе их созревания, эти малые ВВ лишь отчасти повторяют состав родительской клетки [138]. Кроме того, для этого типа ВВ известны характерные белки, отличающие их от других везикул, такие как CD9, CD63, CD81, Alix и Tsg101. Анализ наиболее часто представленных белков в составе экзосом с помощью программного обеспечения STRING (<https://string-db.org/>) выявил их взаимосвязь и вовлеченность в единые процессы (рисунок 9) [138].

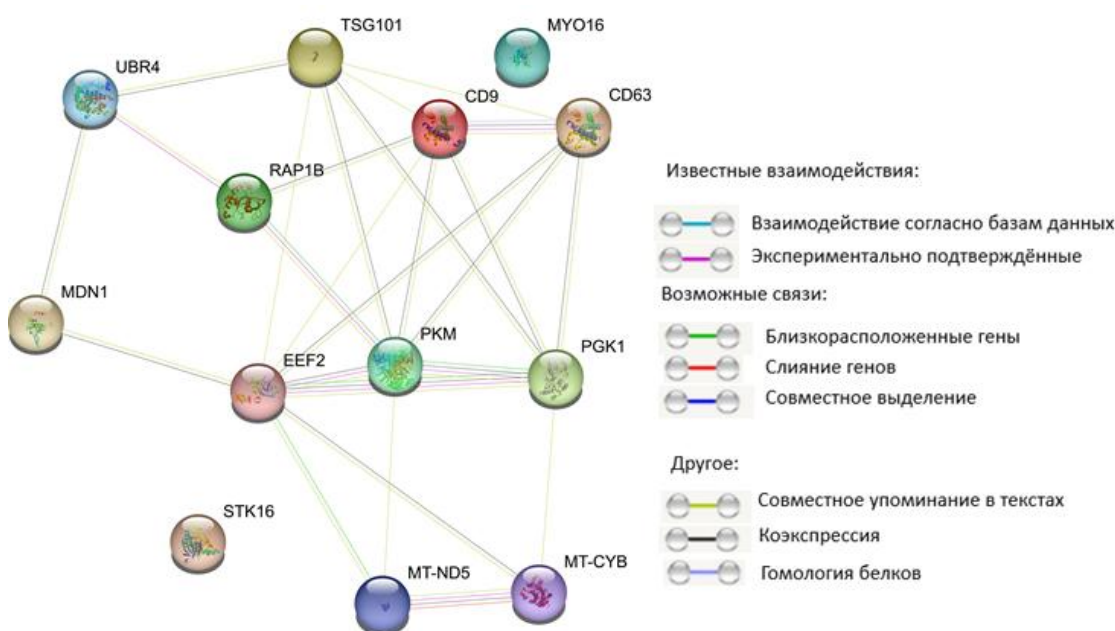


Рисунок 9 — Взаимосвязь наиболее характерных белков экзосом [138]

Согласно данным базы Vesiclepedia, на 15 июля 2025 г. в составе экзосом описано 566 9119 белков. Гетерогенность протеомного груза экзосом в первую очередь связывают с морфологией родительских клеток, направленным сортигом молекул в эти ВВ, условиями, в которых находятся клетки (тепловой шок, гипоксия и т.д.), а также методы получения экзосом [271, 272].

1.5.2.2.1 Тетраспанины короны экзосом

Тетраспанины — семейство мембранных белков, характеризующиеся общей специфической молекулярной структурой, представленной четырьмя трансмембранными доменами, малой внеклеточной петлей и большой внеклеточной петлей с 4, 6, 7 или 8 консервативными цистеиновыми остатками, а также короткими цитоплазматическими хвостами [273]. Тетраспанины обычно посттрансляционно модифицированы путем гликозилирования во внеклеточных доменах и пальмитоилирования внутриклеточных цистеинов, а также содержат мотив сортировки для нацеливания на внутриклеточный компартмент, который может опосредовать интернализацию через ассоциированные белки [273]. Тетраспанины обладают сильной предрасположенностью к ассоциации друг с другом, в результате формируются микродомены, взаимодействующие в свою очередь с трансмембранными и цитозольными (интегрины, иммуноглобулины, протеазы и др.) сигнальными белками [274]. В целом, тетраспанины вовлечены во многие клеточные процессы, такие как клеточная адгезия [275], регуляция клеточной подвижности и/или морфологии, слияние, передача сигналов и другие функции [276].

Из-за высокого содержания тетраспанинов в экзосомах, CD9, CD81, CD63 и CD82 чаще всего используют в качестве специфических маркеров этих малых ВВ. Однако, поскольку тетраспанины также присутствуют на плазматической мембране клеток, эти трансмембранные белки могут входить в состав непосредственно отпочковывающихся от мембраны микровезикул. Отличительными чертами экзосом от других везикул является обогащение интегринными ($\alpha 2$, $\alpha 6$, $\beta 1$ и $\beta 4$) и такими белками как ALIX и TSG101 [277].

Хотя механизмы адресной доставки и поглощения экзосом клетками-реципиентами в настоящее время до конца не изучены, очевидно, что молекулы, входящие в состав тетраспаниновых микродоменов клеток-реципиентов, особенно тетраспанины, интегрины и другие белки адгезии, играют ключевую роль в этих процессах [278].

Поскольку в пределах клеточной мембраны общими компонентами тетрапаниновых доменов являются тетраспанины, интегрины, другие рецепторы адгезии и трансмембранные рецепторные белки, изменения в экспрессии специфических тетраспанинов могут модулировать адресность и интернализацию экзосом, тем самым влияя на клетки-реципиенты. Эксперименты *in vitro* и *in vivo* показали, что экзосомы распространяются по всему организму, избирательно связываясь с клетками в зависимости от комплексов экзосом с тетраспанином и клеточных лигандов [279]. В частности, было показано, что экзосомальные тетраспанины CD9 и CD81 вместе с интегрином $\alpha v \beta 3$ участвуют в формировании адреса и поглощении экзосом дендритными клетками, а

комплекс тетраспанина-8 с субъединицей интегринов CD49d ($\alpha 4$) определяет специфическое нацеливание и поглощение опухолевых экзосом эндотелиальными клетками [280]. В другой работе было показано, что после обработки антителами против тетраспанина-8, CD9, CD81 и CD151 наблюдалось снижение поглощения ВВ клетками-реципиентами [281]. Следует отметить, что в некоторых случаях клеточный ответ может индуцироваться экзосомами без их интернализации, что было показано в ряде исследований [282, 283].

В крови человека наиболее часто встречаются экзосомы, содержащие CD9, CD63 и CD81.

CD9 является тетраспанином с молекулярным весом 15,91 kDa [284] и экспрессируется во многих кроветворных и негемопоэтических клетках, включая эпителиальные, эндотелиальные и стромальные клетки, а также большинство типов злокачественных клеток [285]. Как типичный представитель суперсемейства тетраспанинов, CD9 участвует в формировании тетраспаниновых доменов, влияя таким образом на клеточную активность: внутриклеточную передачу сигналов, пролиферацию, миграцию, инвазию и адгезию [286]. В литературе представлены противоречивые данные о роли CD9 при РМЖ: по одним данным супрессирует опухоль, по другим — промотирует метастатическую активность [287]. Было показано, что такие этапы метастатического каскада, как интравазация, колонизация и рост вторичных опухолей, зависят от экспрессии CD9 [288]. CD9 также может способствовать опухолевому ангиогенезу и лимфангиогенезу [285]. Благодаря ассоциации с Е-кадхерином и β -катенином, CD9 играет важную роль в клеточном экспорте β -катенина экзосомами, что может модулировать сигнальный путь wnt112. Аналогичным образом, благодаря взаимодействию с CD9 в экзосомы включается металлопептидаза CD10 [289].

CD63 — мембранный белок, принадлежащий к суперсемейству белков тетраспанинов, с молекулярной массой 14,27 кДа [284]. CD63 представлен на поверхности тромбоцитов и таких иммунных клетках, как активированные моноциты, макрофаги, гранулоциты, лимфоциты [290], дендритные клетки, а также на некоторых опухолевых клетках. Поскольку этот белок локализуется также в эндосомах, на лизосомальной мембране и на других клеточных мембранах [291], CD63 рассматривается как поздний эндосомальный, лизосомальный, а также экзосомальный маркерный белок. Было показано, что CD63 связывается как напрямую, так и опосредованно с широким спектром белков. Эти белки включают интегрины (LFA-1, 1, 2, 3, 4 и 6), рецепторы клеточной поверхности (FcRI, МНС-II и CD3), тетраспанины (CD9, CD151, CD81 и CD82), киназы (Lyn, Hck и фосфатидилинозитол-4-киназа), адапторные полипептиды (AP-2, AP-4 и AP-3) и другие

белковые молекулы, такие как синтенин-1 и антиген L6 [292]. Благодаря этим взаимодействиям CD63 может влиять на такие клеточные процессы, таких как реорганизация актинового цитоскелета, активация тромбоцитов, клеточная адгезия, клеточная миграция, а также играть важную функцию в локализации и модуляции внутриклеточного транспорта белков [293].

В литературе представлены противоречивые данные о том, что этот белок способен проявлять как опухоль-супрессивную, так и проопухолевую активность при различных типах рака [294]. В частности, было показано, что ось CD63-TIMP-1 стимулирует РМЖ, индуцируя экспрессию карбоновой ангидразы IX, закисляющей внеклеточную среду [295]. Кроме того, у больных РМЖ экспрессия CD63 положительно коррелирует с уровнем экспрессии HER-2 [296]. Также было показано, что CD63 может приводить лекарственной устойчивости к противоопухолевым препаратам. Было показано, что CD63+ раково-ассоциированные фибробласты способствуют устойчивости клеток карциномы молочной железы к тамоксифену через экзосомальную miR-22 [297]. Кроме того, было показано, что лекарственная устойчивость и инвазивный потенциал клеток РМЖ контролируется гликозилированием CD63 и MDR1 [298]. В другой работе было продемонстрировано, что CD63-содержащие экзосомы превращают классические макрофаги M1 в M2, создавая благоприятную среду для метастазирования в лимфатические узлы при трижды негативном РМЖ [299], при этом лечение анти-CD63 антителами значительно снижает метастазирование в грудную полость, лимфатические узлы и легкие [300].

CD81 является тетраспанином с молекулярной массой 17,96 кДа [284], широко представленным на поверхности плазматических мембран клеток. CD81 вовлечен в транспортировку белков, слияние клеток и межклеточное взаимодействие [301, 302]. Кроме того, CD81 регулирует миграцию и инвазию клеток и, следовательно, участвует в прогрессировании рака. Показано, что этот тетраспанин экспрессируется в большинстве видов рака, включая РМЖ, а изменение экспрессии CD81 коррелирует с прогнозом заболевания [302]. На мышинных моделях РМЖ было показано, что экзосомы, секретированные опухоль-ассоциированными фибробластами, обогащены тетраспанинами CD63, CD81 и CD82, при этом только CD81 отвечает за груз Wnt 11. Секретированные в строму опухоли, эти экзосомы интернализуются клетками РМЖ, в которых Wnt11 способствует миграции клеток и метастазированию [303].

Таким образом, тетраспанины CD9, CD63 и CD81 вовлечены в формирование экзосом и отбор молекулярного груза в эти малые ВВ, выбор мишени и поглощение

экзосом клетками-рецепиентами, а также запуск в клетках различных процессов, способствующих росту и метастазированию опухоли.

1.5.2.2.2 Протеазы экзосом

Одним из отличий в молекулярном грузе экзосом от других типов ВВ является высокое содержание ферментов, составляя до трети белков [304].

К достаточно хорошо изученным протеазам экзосом относятся тетраспанин-ассоциированные металлопротеазы семейств ADAMs (A Disintegrin and Metalloproteinases) и MMPs (Matrix Metalloproteinases) [304].

ADAMs — это семейство трансмембранных и секретируемых белков длиной около 750 а.к.о. Из всех членов семейства ADAMs только 12 белков обладают протеолитической активностью (ADAM-8, -9, -10, -12, -15, -17, -19, -20, -21, -28, -30 и -33), регулируя клеточную адгезию путем гидролиза эктодоменов различных рецепторов клеточной поверхности и сигнальных молекул. Эти протеазы вовлечены в различные физиологические процессы, однако при раке некоторые ADAM усиливают агрессивное поведение злокачественных клеток, стимулируя пролиферацию клеток через активацию рецептора EGFR и индукцию ЭМП через гидролиз E-кадгерина [305]. Наиболее изученными шеддазами являются ADAM-10 и ADAM17, причем обе идентифицированы в составе экзосом [304]. В частности, ADAM-10 ассоциирована в составе экзосом с тетраспанинами CD9 и CD81 [306], ее субстратами являются различные поверхностные белки, включая мембранно-связанные формы предшественников цитокинов, хемокинов и факторов роста (например, CXCL16 и EGF), молекулы адгезии (N-кадгерин, E-кадгерин, VE-кадгерин, CD44) и Notch-рецепторы [307].

Известно, что терапия больных с HER2+ РМЖ включает трастузумаб (моноклональное анти-HER2 антитело), однако позднее рак рецидивирует в более резистентной форме [308]. Показано, что после лечения трастузумабом повышается уровень ADAM10, при этом HER2 является субстратом для ADAM10. В результате гидролиза шеддазой внеклеточного домена HER2 образуется растворимая форма HER2, уровень которой является прогностическим фактором снижения беспрогрессивной выживаемости [309]. Более того, повышенная экспрессия ADAM10 и ADAM17 была выявлена в большинстве случаев ТН-РМЖ [310]. Установлено, что ингибирование ADAM10 снижает миграцию клеток, иммитирующих ТН-РМЖ [311], а реэкспрессия этой шеддазы восстанавливает клеточную пролиферацию, миграцию и инвазию [312].

ADAM17 имеет схожую с ADAM10 специфичность и, как следствие, общие с ней субстраты [313]. Многочисленные данные свидетельствуют, что при РМЖ достоверное увеличение экспрессии ADAM17 на поверхности клеток ассоциируется с высокой инвазивностью и лекарственной устойчивостью раковых клеток. Показано, что ADAM17 влияет на прогрессию РМЖ, стимулируя клеточную пролиферацию, инвазию, ангиогенез и резистентность к трастузумабу [314].

MMPs — это семейство цинк-зависимых эндопептидаз, которые играют важнейшую роль в деградации компонентов внеклеточного матрикса [315]. Эти ферменты, как и ADAMs, вовлечены различные физиологические процессы, включая ремоделирование тканей, воспаление и заживление ран. Эти ферменты также вносят значительный вклад в прогрессирование злокачественных новообразований: способствуя росту, инвазии и метастазированию опухоли, они могут разрушать базальные мембраны и другие структуры внеклеточного матрикса, что облегчает распространение раковых клеток в организме [316]. Более того, разрушая компоненты внеклеточного матрикса, MMPs высвобождают факторы, усиливающие ангиогенез (в том числе фактор роста эндотелия сосудов (VEGF)) и снабжающие опухоль необходимыми питательными веществами и кислородом [317].

В составе экзосом крови больных со злокачественными новообразованиями, наиболее исследованными являются MMP-2 и MMP-9 [318]. Установлено, что уровень MMP-9 в короне экзосом повышается у больных с остеосаркомой [319], а также в составе экзосом, секретированных клетками, имитирующими рак поджелудочной железы [320], РМЖ [321] и рак легких [322].

К наиболее изученным протеазам экзосом, не ассоциированных с тетраспанинами, относят 20S протеасомы [304]. Изначально каталитически-активные внеклеточные протеасомы были обнаружены в плазме крови и спинномозговой жидкости [323-325]. Дальнейший протеомный анализ аффинно-очищенных внеклеточных протеасом показал, что внеклеточные протеасомы не содержат 19S или PA200 регуляторных частиц и представлены исключительно 20S-комплексом. Более того, был установлен набор из 15 белков, взаимодействующих с протеасомой, причем ранее эти белки были описаны как белки экзосом [326]. Принимая во внимание, что в составе экзосом выявлены все компоненты 20S-протеасомы [327], а при злокачественных новообразованиях в крови возрастает как количество внеклеточных протеасом, так и протеасом в составе экзосом [328], можно предположить, что ВВ являются основными переносчиками протеасом между клетками.

1.5.2.3 Нуклеиновые кислоты экзосом

На сегодняшний день получены многочисленные доказательства наличия различных типов РНК в составе экзосом [329, 330], из них наиболее изученными являются мРНК и микроРНК: в базе данных Vesiclepedia на 20 июля 2025 г. содержится информация о 27692 мРНК и 22858 микроРНК. Получены многократные убедительные доказательства о переносе между клетками РНК в составе экзосом без потери функциональности нуклеиновых кислот [329–331]. Одним из наиболее ярких примеров данного феномена является перенос РНК в составе экзосом, секретированных тамоксифен-резистентными клетками, имитирующими карциному молочной железы, в нерезистентные клетки-реципиенты, что вызывает существенное подавление эстрогена. Более того, среди 421 микроРНК, гиперэкспрессированных в экзосомах, секретированных резистентными клетками и являющихся ингибиторами рецептора эстрогенов ER α , 21 микроРНК были общими с донорскими клетками [332]. Перенос экзосомами мРНК также приводит к изменению в реципиентных клетках таких базовых процессов, как клеточная дифференцировка, деление, апоптоз и т.д. [330].

Длинные некодирующие РНК (днРНК) также входят в состав экзосом и, путем модуляции экспрессии генов через многочисленные механизмы, влияют на транскрипционные, посттранскрипционные, трансляционные и эпигенетические пути [330, 333]. Показано, что уровень экзосомальных днРНК коррелируют с прогрессированием рака и метастазированием, что указывает на их высокий потенциал в качестве биомаркеров для диагностики, прогноза течения злокачественных новообразований и ответа на противоопухолевую терапию [334].

В ограниченном количестве работ приводятся данные о наличии ДНК длиной более 10 т.п.н. в составе экзосом [165]. Учитывая размер экзосом, расчеты показывают невозможность упаковки высокомолекулярной ДНК в этот тип ВВ. Вероятно, авторы в препарате экзосом имеют значительную примесь апоптотических телец размером не менее 500 нм.

1.5.3 Минимальные требования для идентификации ВВ

Поскольку секретированные клетками везикулы являются крайне гетерогенной популяцией, международным обществом по исследованию внеклеточных везикул (International Society for Extracellular Vesicles (ISEV) (<https://www.isev.org>) приняты и каждые два года обновляются минимальные экспериментальные требования для

идентификации ВВ. Однако необходимо отметить, что в связи с активно развивающимися методами выделения и характеристики ВВ, «золотой стандарт» для экзосом пока отсутствует [335]. Одними из значимых аспектов, влияющих на полученные данные, относятся длительность хранения образца до начала выделения экзосом, пробоподготовка и метод выделения этого типа ВВ. Согласно последним методическим указаниям ISEV, перед началом работ ВВ необходимо охарактеризовать по морфологии, по размеру и, в случае экзосом, наличие характерных белковых маркеров. В последнем случае рекомендовано идентифицировать белки в составе экзосом с помощью вестерн-блоттинга либо проточной цитофлуориметрии [335].

1.5.4 Экзосомы и канцерогенез

В настоящее время получены убедительные доказательства об экзосомах как основных транспортерах биологически-активных молекул между клетками [336, 337]. Однако до сих пор не ясны механизмы этой межклеточной коммуникации, в том числе регуляция секреции и поглощения экзосом клетками-реципиентами, механизмов внутриклеточной «сортировки» молекулярного груза в экзосомы, распределения между компонентами крови и длительности циркуляции экзосом, а также адресности доставки молекул.

Известно, что взаимодействие злокачественных клеток с опухолевым микроокружением имеет решающее значение для прогрессирования как первичного очага, так и формирования отдаленных метастазов. Показано, что экзосомы опухолевого происхождения вовлечены в регуляцию ЭМП, клеточной пролиферации и подвижности, стимуляцию ангиогенеза и ускользание от иммунного надзора (рисунок 10).

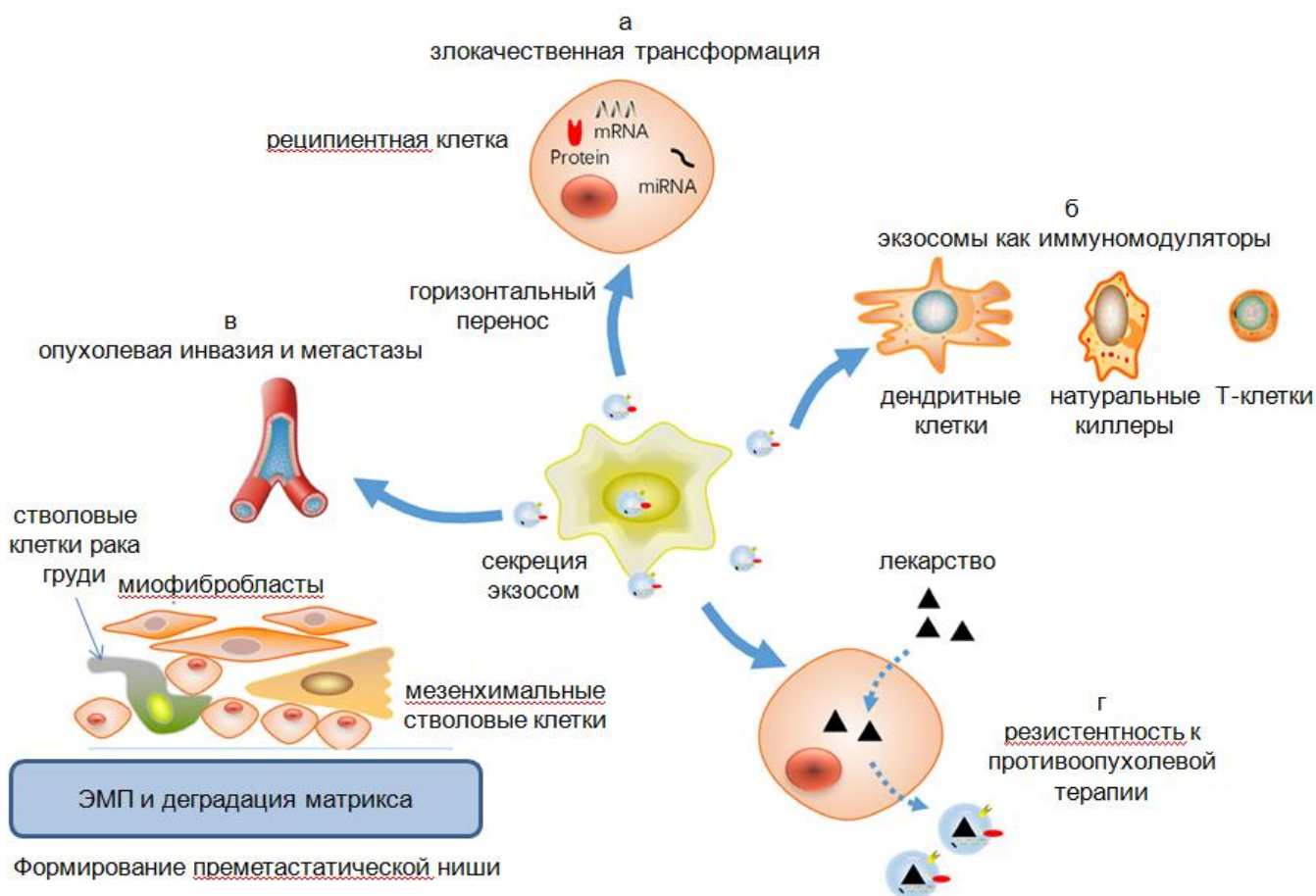


Рисунок 10 — Роль экзосом при диссеминации РМЖ: (а) опухолевые клетки секретируют экзосомы, молекулярный груз которых влияет на клетки-реципиенты; (б) ингибирование иммунного надзора с помощью переноса опухолевых экзосом к дендритным, НК- и Т-клеткам; (в) стимуляция опухолевыми экзосомами инвазии и метастазирования; (г) формирование резистентности злокачественных клеток к противоопухолевой терапии [338]

1.5.4.1 Экзосомы и ЭМП при РМЖ

На сегодняшний день получены убедительные доказательства участия молекулярного груза экзосом в ЭМП [339]. В частности, химиотерапевтические препараты стимулируют клетки карциномы молочной железы к секреции экзосом, нагруженных микроРНК, приводящих к химиорезистентности [340, 341]. В другой работе было продемонстрировано, что секретируемые опухоль-ассоциированными фибробластами экзосомы путем переноса митохондриальной ДНК и IL-6 и активин-А в клетки карциномы молочной железы стимулируют окислительное фосфорилирование, что приводит к развитию резистентности к эндокринной терапии [342, 343].

1.5.4.2 Стимуляция опухолевыми экзосомами клеточной пролиферации и миграции

Известно, что состав биополимеров опухолевых экзосом влияет на пролиферацию, миграцию и инвазивный потенциал клеток-реципиентов. Например, инкубация экзосом, секретированных клетками линии HCC1806, иммитирующих ТН-РМЖ, с линией MCF10A приводила к стимуляции пролиферации псевдо-нормальных эпителиоцитов молочной железы, что возможно было опосредовано изменениями уровнях экспрессии 70 микроРНК, влияющих на PI3K/АКТ, MAPK и HIF1A [344].

В другой работе было показано, что инкубация экзосом, содержащих miR-222, с различными клеточными линиями РМЖ способствовала увеличению клеточной миграции и инвазии клеток путем подавления в них экспрессии PDLIM2, при этом ранее было известно, что уровень этой микроРНК повышен в плазме больных РМЖ на терминальных стадиях, а также коррелирует с высокой агрессивностью линий карциномы молочной железы [345].

1.5.4.3 Стимуляция опухолевыми экзосомами формирования метастаз

Известно, что экзосомы опухолевого происхождения взаимодействуют с нетрансформированными клетками в будущем участке метастаза и привлекают раковые клетки в пре-метастатическую нишу [346]. В частности, показано, что опухолевые экзосомы переносят ADAM-10, ADAM-17, кадгерин, фибронектин, которые стимулируют рост и метастазирование опухоли [347].

Кроме того, секретированные карциномой молочной железы экзосомы усиливают метастазирование РМЖ путем активации киназы фокальной адгезии/Src-зависимых белков и увеличения продукции провоспалительных цитокинов и MMP9 [348].

В экспериментах *in vitro* и *in vivo* было показано, что экзосомальная miR-222 также способствует росту и метастазированию РМЖ, возможно, через снижение регуляции опухолевых генов-супрессоров *PDZ* и *PDLIM2*, а также последующую активацию NF-κB [345]. Кроме того, секретлируемые клетками РМЖ экзосомы обогащены miR-1910-3p, перенос которой через регуляцию *MTMR3* и активацию сигнального пути NF-κB, способствует росту и метастазированию карциномы молочной железы [349]. Инвазивный потенциал клеток карциномы молочной железы повышает также экзосомальная miR-10b, которая снижает в клетках-реципиентах уровень экспрессии генов-мишеней *HOXD 10* и *KLF4* [350], а miR-105 в составе экзосом регулирует миграцию злокачественных клеток путем нацеливания на ZO-1 [351].

Поскольку для каждого злокачественного новообразования характерны определенные локализации метастаз, были предприняты попытки предсказать по молекулярному грузу экзосом «органотропные метастазы», в том числе для РМЖ. Установлено, что повышенный уровень miR-4443 в составе секретированных клетками карциномы молочной железы экзосом стимулирует формирование метастаз в печени [352]. На другой мышинной модели метастазирования РМЖ было показано, что экзосомальная miR-183-5p ингибирует перенос PPP1CA в макрофаги, тем самым способствуя секреции провоспалительных цитокинов IL-2 и TNF- α [353]. На модели ТН-РМЖ, который чаще всего метастазирует в легкие и мозг, было показано, что как в клетках, так и секретлируемых ими экзосомах повышен уровень miR-9, miR-20a-5p и miR-155 [354, 355], при этом перенос miR-20a-5p в составе экзосом в первичные макрофаги костного мозга мыши способствует остеокластогенезу [355]. Также было обнаружено, что высокий уровень miR-210 и нейтральной сфингомиелиназы 2 (nSMase2) в составе экзосом крови у больных РМЖ коррелирует с наличием регионарных метастаз [356] и плохой выживаемостью [357, 358]. Установлено, что miR-210 в составе экзосом стимулирует ангиогенез в микроокружении опухоли и метастазирование в мозг, при этом высокая экспрессия miR-210 коррелирует с метастазами в мозг у больных РМЖ.

1.5.4.4 Экзосомы и ангиогенез при РМЖ

Известно, что на разрастание опухолевых клеток и метастазирование влияет перфузия крови, поскольку сосудистые образования могут обеспечивать поступление достаточного количества микро- и макроэлементов в паренхиму опухоли. По сравнению с естественными сосудами, кровеносные сосуды в опухоли характеризуются дезорганизованной структурой и неконтролируемой утечкой [359]. В целом баланс между про- и антиангиогенными факторами может предопределять судьбу ангиогенеза внутри опухолевой массы. Гипоксические условия, воспалительная реакция и генетические мутации клеток в опухолевой массе стимулируют ангиогенез [360]. Кроме того, было показано, что секретлируемые злокачественными клетками экзосомы также стимулируют ангиогенез. В составе молекулярного груза экзосом при злокачественных новообразованиях идентифицированы такие про-ангиогенные биополимеры, как не кодирующие РНК (miR-31 [361], miR-125a [362], miR-126 [363, 364], miR-150 [365], miR-214 [366], miR-296 [364]) и различные белки (MMP, фактор роста эндотелия сосудов (VEGF), пептиды и др.) [367, 368]. На различных животных моделях установлено, что экзосомы, секретированные линиями MDA-MB-231 и MCF-7, иммитирующими РМЖ, стимулируют не только миграцию

опухолевых клеток и метастазирование, но и активное формирование КПС эндотелиоцитами [369]. Кроме того, в экспериментах *in vitro* было продемонстрировано, что тетраспанины экзосом стимулируют такие ангиогенные факторы как VEGF, VEGFR1, VEGFR2, uPA, MMP-2, MMP-9, и одновременно ингибируют экспрессию антиангиогенных факторов [367].

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

1.6 Заключение

На сегодняшний день инструментальные методы диагностики РМЖ не позволяют уверенно выявлять РМЖ *in situ* и на I стадии заболевания. В то же время, разрабатываемые молекулярно-биологические методы выявления РМЖ также не обладают достаточной чувствительностью и специфичностью для выявления непластического процесса. Растущее число публикаций 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 внДНК вселяет надежду во внедрение в обозримом будущем метода «жидкостной биопсии» для ранней диагностики РМЖ. «Белыми пятнами» в области молекулярной онкологии остаются биологические функции и диагностическая значимость белков, участвующих в формировании циркулирующих в крови ДНПК и белков в составе экзосом, ассоциированных с поверхностью ФЭ. Вполне вероятно, что выявление таких протеомных маркеров в крови пациентов в комбинации с инструментальными методами диагностики позволит более эффективно выявлять РМЖ на ранних стадиях заболевания.

ГЛАВА 2 МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Данное исследование направлено на комплексный анализ циркулирующих в крови ДНПК и экзосом для выяснения механизмов опухолевой диссеминации и поиска новых маркеров РМЖ методом «жидкостной биопсии». В работе использованы образцы венозной крови условно ЗдЖ ($n = 190$) и первичных больных РМЖ ($n = 194$). Для снижения влияния длительности хранения образцов ДНПК и экзосом на структуру биополимеров в их составе, для каждого этапа исследований использовали образцы, хранившиеся не более одного года. Для достижения порога чувствительности некоторых методов проводили объединение образцов, о чем указано в соответствующих разделах диссертации.

Работа одобрена локальным этическим комитетом ФГБУН ИХБФМ СО РАН (протокол №10 от 30.05.2018 г., протокол №16 от 30.06.2020 и протокол №3 от 24.09.2024) и локальным этическим комитетом НГУ (протокол №2 от 01.03.2023) (Приложения 2-4).

Дизайн исследования ДНПК приведен на рисунке 11, а дизайн исследования экзосом — на рисунке 12.

2.1 Клиническая характеристика больных

Работу проводили с соблюдением принципов добровольности и конфиденциальности в соответствии с Федеральным законом №323 «Основы законодательства РФ об охране здоровья граждан» от 21.11.2011 г. Информированное согласие получено от всех участников исследования (Приложения 2–4).

Образцы крови первичных больных РМЖ получены из Онкологического отделения №2 Новосибирского областного клинического онкологического диспансера.

Группа первичных больных РМЖ ($T_{1-2}N_{0-1}M_0$, $n = 194$, возраст 27–74 года) была сформирована из пациенток с люминальным (78%) и ТН-РМЖ (22%).

Клиническую стадию злокачественного новообразования устанавливали в соответствии с предложенной Международным Противораковым Союзом классификацией TNM (8 издание, 2017 г.). Клиническая характеристика всех пациенток представлена в таблице 2, а пациенток, вовлеченных в определенные эксперименты — в Таблицах соответствующих подразделов Глав 3–5.

Критерии включения в группу больных РМЖ:

- возраст старше 18 лет;
- размер опухоли менее 5 см;

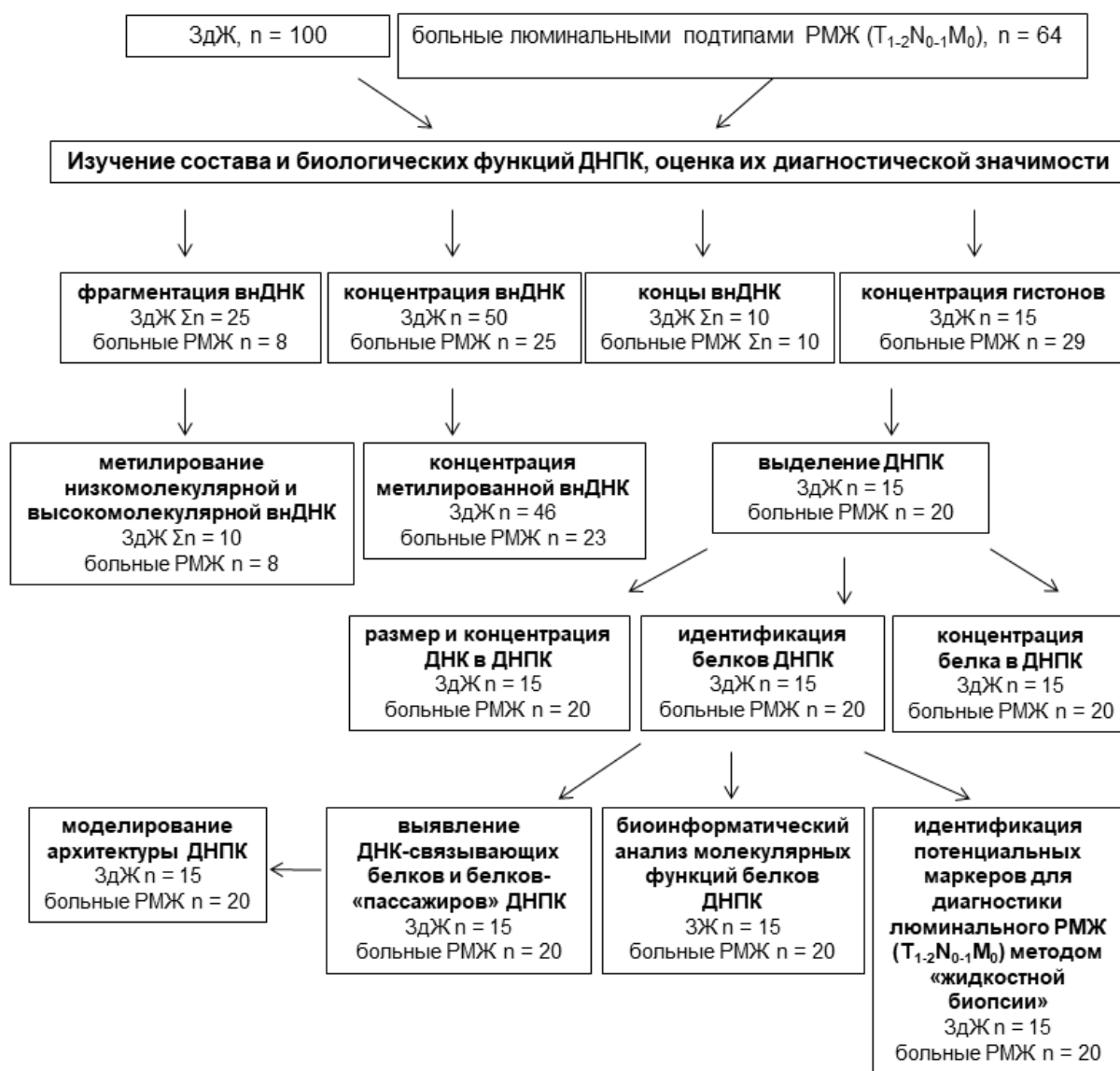


Рисунок 11 — Дизайн исследования циркулирующих в крови ДНПК в норме и при РМЖ.

Объединенные образцы промаркированы символом Σ

- отсутствуют признаки поражения метастазами регионарных лимфатических узлов либо выявлено поражение не более 3 подмышечных и/или во внутригрудных лимфоузлов на стороне поражения;
 - наличие подписанного информированного согласия.
- Критерии исключения из группы больных РМЖ:
- возраст моложе 18 лет;
 - поражение 4 и более подмышечных и/или внутригрудных лимфоузлов на стороне поражения, либо метастазы в спаянных между собой лимфоузлах.
 - наличие отдаленных метастазов на момент взятия крови;
 - получение неoadъювантной противоопухолевой терапии;

— отказ от подписания информированного согласия.



Рисунок 12 — Дизайн исследования экзосом в крови ЗдЖ и больных РМЖ. Объединенные образцы экзосом промаркированы символом Σ, образцы экзосом, проанализированные индивидуально и использованные в пулированном виде промаркированы символом *

Таблица 2 — Клиническая характеристика больных РМЖ

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%)
Отдаленные 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%)

Образцы крови для контрольной группы получены из Медицинского научно-образовательного центра Института медицины и медицинских технологий Новосибирского государственного университета (МНОЦ ИММТ НГУ, г. Новосибирск) и Центра новых медицинских технологий Института химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН (ЦНМТ ИХБФМ СО РАН, г. Новосибирск).

Группа ЗдЖ (n = 190, возраст 22 — 81 год) была сформирована на основе клинического обследования (УЗИ молочной железы, УЗИ органов малого таза, маммография для женщин старше 45 лет, общий анализ крови, биохимия крови) и анкетирования.

Критерии включения в контрольную группу:

- возраст старше 18 лет;
- отсутствие заболеваний репродуктивной системы (например, наличие гиперпластических и воспалительных заболеваний яичников, матки, молочной железы и другие);
- отсутствие в анамнезе онкологических заболеваний;
- отсутствие экзогенных факторов (например, вредное производство и другие);
- наличие подписанного информированного согласия.

Критерии исключения из контрольной группы:

- возраст моложе 18 лет;
- наличие заболеваний репродуктивной системы организма;
- отягощенная онкологическими заболеваниями генетика;
- наличие экзогенных факторов;
- отказ от подписания информированного согласия.

Кровь ЗдЖ и первичных больных РМЖ собирали венепункцией в вакуумные пробирки (Vacuette 455036, Greinerbio-one, Австрия), содержащие К₃ЭДТА и немедленно перемешивали на ротационной мешалке (10 об/мин, 5 мин). Образцы крови хранили при 4°C менее одного часа до дальнейшей обработки.

2.2 Сравнительный анализ ДНК в составе ДНПК крови ЗдЖ и больных РМЖ

2.2.1 Получение внДНК плазмы и асс-ФЭ ДНК

Для анализа внДНК на первом этапе кровь разделяли на плазму и ФЭ как описано [370]. В частности, кровь центрифугировали при 290×g в течение 20 мин при 4°C. Затем плазму крови переносили в новую пробирку и центрифугировали еще раз при 1200×g в

течение 20 мин при 4°C. Супернатант, содержащий внДНК плазмы, хранили в аликвотах при -80°C.

внДНК элюировали с поверхности ФЭ растворами ФБ-ЭДТА (10 мМ фосфатный буфер, 0,15 М NaCl, 5 мМ ЭДТА, pH 7,5) и 0,25 % трипсина в ФБ-ЭДТА, как описано ранее [370]. В частности, ФЭ промывали девятью объемами ФБ-ЭДТА на ротационной мешалке (10 об/мин, 5 мин) и последовательно центрифугировали как плазму при 4°C (290×g, 20 мин, затем 1200×g, 20 мин). Супернатант, содержащий асс-ФЭ ДНК (ФБ-ЭДТА элюат), хранили в аликвотах при -80°C.

Затем к ФЭ добавляли равный объем 0,25 % трипсина (Sigma, T-4799 (Louis, MO, USA)) в ФБ-ЭДТА, инкубировали на ротационной мешалке (10 об/мин, 4,5 мин) при комнатной температуре, с последующей инактивацией фермента путем добавления 1/10 объема образца 10× раствора ингибитора трипсина (Sigma, T-9003, Louis, MO, USA, 3,2 мг/мл в ФБ-ЭДТА). Затем ФЭ последовательно центрифугировали при 4°C (290×g, 20 мин, затем 1200×g, 20 мин). Супернатант, содержащий асс-ФЭ ДНК (трипсиновый элюат), хранили в аликвотах при -80°C.

Полученные образцы проверяли на отсутствие гемолиза путем измерения концентрации гемоглобина при 414 нм. Образцы с признаками гемолиза исключались из исследования.

ВнДНК выделяли из образцов плазмы, образцов ФБ-ЭДТА элюата и образцов трипсинового элюата с помощью коммерческого набора «DNA Isolation Kit» (ООО «БиоСилика», Новосибирск, Россия) в соответствии с протоколом производителя и концентрировали путем осаждения в ацетоне в виде триэтиламмониевых солей [371]. Растворы ДНК в воде хранили при -80°C.

2.2.2 Определение концентрации внДНК

Концентрацию внДНК измеряли с помощью количественной полимеразной цепной реакции, специфичной для повторяющихся элементов long interspersed nuclear element 1 (*LINE-1*). ПЦР проводили на приборе ICycler iQ5 (Bio-Rad, Hercules, CA, США) в общем реакционном объеме 30 мкл, содержащим 5 мкл ДНК, 600 нМ каждого праймера (таблица 3), 300 нМ зонда (таблица 3), 2,5 мМ дезоксинуклеотидтрифосфатов, Taq-полимеразный буфер и 1 U Taq-полимеразы (ООО Биолабмикс, Новосибирск, Россия). ПЦР проводили при следующих условиях: денатурация ДНК при 95°C в течение 4 мин 30 сек, затем 45 циклов амплификации при 95°C в течение 15 с и при 60°C в течение 45 с. Калибровочная кривая была построена с использованием ДНК лейкоцитов человека. В

качестве отрицательного контроля использовали H₂O. Измерение проводили в дублях, данные анализировали при помощи ПО iQ5 (Bio-Rad, США).

Таблица 3 — Последовательности дезоксирибоолигонуклеотидов, использованные в количественной ПЦР*

Ген	Последовательность (5'-3')	
<i>LINE-1</i>	прямой	TTCAACAAGAAGAGCTAACTCC
	обратный	TTGTAGGTCACTCAGGACTTGC
	проба	TAMRA- GCACCCAATACAGGAGCACCCAGATTCA- BHQ2
<i>RARβ2</i> GenBank X56849.1 926–1116, 161 п.н., зависит от метиляции	прямой	AGG ATTGGGATGTCGAGAACGC
	обратный	CTCGACCAATCCAACCGAAACG
<i>RARβ2</i> GenBank X56849.1 931–1116, 186 п.н., не зависит от метилирования	прямой	TTGTTTGAGGATTGGGATG
	обратный	TACCAT TTTCCAAACTTACTC
<i>RARβ2</i> GenBank X56849.1, 924–1117, 194 п.н., дикий тип (контроль)	прямой	ATGCGAGCTGTTTGAGGACT
	обратный	TTACCATTTTCCAGGCTTGC

* Дезоксирибоолигонуклеотиды были синтезированы и очищены обращено-фазовой ВЭЖХ в ИХБФМ СО РАН.

2.2.3 Исследование строения концов внДНК

Для изучения концов внДНК, внДНК плазмы и асс-ФЭ ДНК выделяли из образцов крови Здж (n = 25) и образцов крови больных РМЖ (n = 10) как описано в п. 2.2.1 и объединяли на этапе концентрирования. Объединенные образцы ДНК инкубировали в обменном буфере с полинуклеотидкиназой фага Т4 (Fermentas) в течение 1 ч при 37°C. Фосфорилированную ДНК перевыделяли и лигировали с биотинилированными двухцепочечными дезоксирибоолигонуклеотидными адаптерами, имеющими случайные 3'- и 5'-концы (50 пМ адаптеров на 100 нг ДНК) (таблица 4) в течение 24 ч при 16°C. Затем лигазу (Fermentas) инактивировали нагреванием в течение 10 мин при 65°C, продукты лигирования выделяли с помощью стрептавидиновых сефарозных бусин (GE Healthcare), по

протоколу, рекомендованному производителем. ДНК освобождали от бусин путем гидролиза адаптеров с помощью Sau IIIA (Fermentas) при 37°C в течение 1 ч. Рестриктазу инактивировали нагреванием в течение 10 мин при 65°C, количество ДНК определяли с помощью количественной ПЦР, как описано в п.2.2.2.

Таблица 4 — Последовательности двухцепочечных дезоксирибоолиго-нуклеотидных адаптеров

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

2.2.4 Оценка фрагментации вДНК в крови Здж и больных РМЖ

Размер вДНК плазмы и асс-ФЭ ДНК оценивали с помощью капиллярного электрофореза на приборе Agilent Bioanalyzer 2100TM (Agilent Technologies, Валдбронн, Германия) с использованием коммерческого набора «Agilent High Sensitivity DNA Kit» в соответствии с инструкцией производителя. С учетом чувствительности прибора, для анализа вДНК крови Здж готовили препарат вДНК, объединенный из 25 образцов; вДНК крови больных РМЖ (n = 8) анализировали индивидуально.

2.3 Сравнительный анализ белков в составе ДНПК крови Здж и больных РМЖ

2.3.1 Выделение и анализ нативных ДНПК крови

Для поиска условий эффективной сорбции нативных ДНПК за нуклеиновую кислоту на мелкодисперсном стекле (МДС) [372], формировали комплексы ³²P-меченой геномной ДНК лейкоцитов в концентрации 10, 50 либо 100 мкг/мл с 100 мкг/мл лактоферрином, обладающим ДНК-связывающим свойством, в 100 мкл ДМЕМ в течение 1 ч при 25°C. Затем искусственные ДНПК инкубировали в течение 5 мин при 25°C на качалке с 3,5 мг МДС [373] в буферах, содержащих 10 мМ трис-ацетат, 0 или 2 мМ CaCl₂ (Sigma, США), 0,5 % Tween-20, от 0 до 4,5 М GuSCN (Sigma, США) при pH 4,5-6,5. МДС центрифугировали в течение 30 сек при 1000 g, 5 раз промывали буфером для сорбции и элюировали ДНПК как описано [373].

Для выделения нативных ДНПК сорбцией на МДС из 100 мкл плазмы крови Здж и больных РМЖ использовали 200 мкл буфера, содержащего 15 мМ трис-ацетат, 3 мМ CaCl₂, 0,75 % Tween-20, pH 5,0. Из полученных ДНПК вДНК выделяли с помощью коммерческого набора «DNA Isolation Kit» (ООО «БиоСилика», Новосибирск, Россия) по рекомендованному производителем протоколу, переосаждали ацетоном (как описано в п.2.2.1) и растворяли в 15 мкл воды.

Концентрацию белка в составе ДНПК определяли с помощью коммерческого набора «NanoOrange Protein Quantification Kit» (Molecular Probes, США) по протоколу, рекомендованному производителем. Флюоресценцию оценивали на приборе VersaFluor Fluorometer (Bio-Rad, США) при длине волны возбуждения 480 нм и испускания 580 нм.

Для оценки молекулярной массы белков в составе ДНПК использовали разделение белков при помощи 10–20 % SDS-диск электрофореза с последующим переносом белков на

нитроцеллюлозную мембрану (D-3354, «Schleicher & Schuell», Германия) электроблоттингом. Белки на мембране окрашивали раствором коллоидного серебра [373].

Для определения первичной последовательности белков ДНПК, препаративные количества образцов разделяли при помощи 10–20 % SDS-диск электрофореза и окрашивали при помощи Кумасси R-250 (Sigma, USA). Фрагменты ПААГ, содержащие исследуемые белки, отмывали от красителя и SDS и подвергали трипсинолизу [373]. Пептиды экстрагировали из геля, концентрировали и обессоливали на микроколонках C18 ZipTips («Milipore», Дармштадт, США). Смесь пептидов элюировали с микроколонок на мишень приборной пластины насыщенным раствором матрикса.

Масс-спектры регистрировали вместе с к.б.н. О.С. Тутановым в Центре коллективного пользования «Масс-спектрометрические исследования» СО РАН на масс-спектрометре Ultraflex III MALDI-TOF/TOF (BrukerDaltonics, Бремен, Германия) в позитивном режиме, с диапазоном 700–3000 Да, с 2,5-дигидроксibenзойной кислотой в качестве матрицы. Белки идентифицировали путем поиска подходящих кандидатов в базах данных NCBI и SwissProt с помощью программы Mascot (Matrix Science Ltd., Лондон, Великобритания, www.matrixscience.com/search_form_select.html). При поиске использовали следующие параметры: приемлемое отклонение массы заряженного пептида (50 ppm) — 0,05 Да; приемлемое количество пропущенных сайтов расщепления — 2; в качестве фиксированной модификации выбирали карбамидометилирование остатков цистеина, а в качестве вариабельной модификации — наличие окисленных остатков метионина; надежность идентификации не ниже 95 % [373].

2.3.2 Определение концентрации гистонов в плазме крови

Концентрацию гистонов H2a и H4 в плазме крови ЗдЖ и больных РМЖ проводили с помощью коммерческих наборов «ELISA Kit for Histone H2B» и «ELISA Kit for Histone H4» (Cloud-Clone Corp., Ухань, Хубэй, Китай) по протоколу, рекомендованному производителем. Оптическую плотность регистрировали на длине волны 450 нм. Чувствительность ИФА для гистона H2a составляла 0,156–10 нг/мл; чувствительность ИФА для гистона H4 — 0,078–5 нг/мл. Коэффициенты вариации обоих анализов не превышали 10 %. Все измерения проводились в дублях, результаты выражены в нг/мл крови.

2.3.3 Выделение гистон-содержащих ДНПК аффинной хроматографией

Для выделения лейкоцитов из крови ЗдЖ ($n = 4$) использовали среду Lymphocyte separation medium (MP Biomedicals, Франция) в соответствии с протоколом производителя. Гистоны из лейкоцитов выделяли методом кислотной экстракции [374], концентрацию белка в образцах определяли спектрофотометрически с использованием спектрофотометра Genesys 10UV (Thermoscientific, США). Полученные препараты гистонов характеризовали при помощи электрофореза в 10-20 % ПААГ и пятенного ИФА с использованием моноклональных антител мыши против гистона H1 и поликлональных кроличьих антител против гистонов H2A, H2B и H3 (Abscam, Англия) и кроличьего анти-мышинного либо козьего анти-кроличьего конъюгатов с пероксидазой хрена (ранее получены и охарактеризованы в Лаборатории молекулярной медицины ИХБФМ СО РАН).

Для получения поликлональных антител против гистонов человека проводили подкожную иммунизацию двух кроликов породы «Шиншилла» (весом $1,7 \pm 0,3$ кг) по стандартной схеме [375], используя для каждой иммунизации 0,5 мг гистонов, эмульгированных с полным (для первой иммунизации) и неполным (для всех последующих иммунизаций) адъювантом Фрейнда (Sigma, США). Кровь забирали из краевой ушной вены на 40-й, 47-й и 53-й дни после первой иммунизации. Титр антител в кроличьих антисыворотках определяли с помощью пятенного ИФА с использованием конъюгата пероксидазы хрена с козьими анти-кроличьими антителами.

Суммарную фракцию кроличьих иммуноглобулинов получали путем добавления к объединенной антисыворотке насыщенного раствора $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (0,7 мл сульфата аммония на 1 мл антисыворотки) с последующей инкубацией в течение 30 мин при $+4^\circ\text{C}$. Иммуноглобулины осаждали центрифугированием при 6800 g в течение 10 мин при $+4^\circ\text{C}$, осадок растворяли в 1 мл ФБ. Препарат иммуноглобулинов диализовали против трёх смен 0,15 M NaCl, концентрацию белка определяли спектрофотометрически, хранили при -20°C .

Аффинные сорбенты с иммобилизованными гистонами, с ЧСА и с суммарными иммуноглобулинами неиммунизированного кролика синтезировали на основе активированной бромцианом сефарозы [376]. В частности, к 3 г активированной сефарозы CL-4B (Pharmacia, Швеция) добавляли 2,4 мг гистонов, либо 2,8 мг ЧСА либо 5 мг суммарного кроличьего иммуноглобулина, с помощью 0,5 M бикарбонатного буфера, pH 9,5 доводили pH реакционной смеси до 9,5 и инкубировали в течение 1 ч при медленном перемешивании при 25°C . Реакционные центры блокировали добавлением 1/10 объема 0.5 M глицинового буфера, pH 9.6 и инкубировали в течение 30 мин при тех же условиях.

Аффинные сорбенты (3 мл) последовательно промывали ФБ, глициновым буфером с 0,5 М NaCl, боратным буфером, ФБ, переносили в хроматографическую колонку и повторно последовательно промывали как описано [376]. Хроматографические колонки с аффинными сорбентами хранили при +4°C.

Поликлональные анти-гистоновые антитела выделяли из суммарного препарата иммуноглобулинов иммунизованных кроликов с помощью аффинной хроматографии как описано [376]. В частности, на 3 мл аффинного сорбента наносили 1 мл 64 мг/мл раствора суммарного иммуноглобулина кролика и инкубировали 1 ч при +4°C, затем повторно наносили белок повторяли и инкубацию. Хроматографическую колонку последовательно промывали ФБ с 10 мМ ЭДТА, затем ФБ с 10 мМ ЭДТА и 0,05 % Tween-20, затем ФБ с 10 мМ ЭДТА. Кроличьи антитела против гистонов элюировали с колонки в обратном направлении 0,1 М глициновым буфером, 0,5 М NaCl, pH 2,5 скоростью 1 мл/мин; элюат нейтрализовали 0,5 М боратным буфером, pH 8,6. После выделения антител хроматографическую колонку регенерировали, последовательной промывкой ФБ с 10 мМ ЭДТА, затем ФБ с 10 мМ ЭДТА и 0,05 % Tween-20, затем ФБ с 10 мМ ЭДТА.

Выделенные аффинной хроматографией антитела против гистонов человека пересаждали насыщенным раствором $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ и инкубировали в течение 12 ч при +4°C. Иммуноглобулины осаждали центрифугированием при 10 000 g в течение 15 мин при +4°C, растворяли в 1,8 мл ФБ и диализовали против трёх смен 0,15 М NaCl при +4°C.

Для получения антител со строгой специфичностью к гистонам, полученные аффинной хроматографией иммуноглобулины истощали на сорбенте с иммобилизованным ЧСА и суммарным препаратом иммуноглобулинов неиммунизованного кролика. Для этого на сорбенты с ЧСА или суммарным иммуноглобулином наносили 3 мг анти-гистоновых антител и инкубировали 2 ч при +4°C. Не обладающие перекрестной активностью с ЧСА иммуноглобулины элюировали ФБ с 10 мМ ЭДТА. Сорбенты регенерировали путем последовательной промывки в обратном направлении как описано выше.

Концентрацию анти-гистоновых антител определяли спектрофотометрически, способность связывать соответствующий антиген — пятенным ИФА.

Для синтеза аффинного сорбента с иммобилизованными анти-гистоновыми антителами было использовано 3,2 г активированной бромцианом сефарозы CL-4B (Pharmacia, Швеция) и 4 мг охарактеризованных кроличьих иммуноглобулинов. Все стадии (инкубацию, блокировку реакционных центров и промывание сорбента) выполняли как описано выше.

Гистон-содержащие ДНПК выделяли из 0,6–0,8 мл плазмы крови Здж и больных РМЖ методом аффинной хроматографии. Для этого на колонку наносили плазму и инкубировали 1,5 ч при +4°C, затем повторно наносили образец. Промывание хроматографической колонки и специфическую элюцию ДНПК проводили, как описано выше. Полученные образцы гистон-содержащих ДНПК плазмы крови концентрировали в ~20 раз на фильтрах «Centricon 3 kDa» (Immobilon, Millipore, США) согласно рекомендациям производителя и хранили при -20°C.

2.3.4 Анализ ДНК и белков в составе нативных гистон-содержащих ДНПК

Концентрацию вДНК в составе гистон-содержащих ДНПК Здж и больных РМЖ определяли методом количественной ПЦР, размер вДНК — с помощью капиллярного электрофореза как описано в п.2.2.2 и п.2.2.4.

Для анализа белковой составляющей в составе гистон-содержащих ДНПК крови Здж и больных РМЖ препараты ДНПК сначала концентрировали на фильтрах «Centricon 3 kDa» (Immobilon, Millipore, США) в течение 8 ч при 7500 g, +4°C. Концентрацию и молекулярную массу белков ДНПК крови оценивали как указано в п.2.3.1.

Препаративные количества белков ДНПК Здж и больных РМЖ разделяли при помощи градиентного белкового электрофореза, затем фрагменты геля, содержащие минорные и мажорные белки, вырезали с шагом 3 мм для идентификации белков при помощи MALDI-TOF масс-спектрометрии как описано в п.2.3.1 с модификацией по методу Розенфельд [377]. В частности, до проведения трипсинолиза белки в геле восстанавливали 45 мМ ДТТ в 0,2 М NH_4HCO_3 при 60°C в течение 30 мин с последующим алкилированием белков 100 мМ $\text{C}_2\text{H}_4\text{INO}$ в 0,2 М NH_4HCO_3 при 25°C в течение 30 мин и обезвоживанием фрагментов геля в 100 % CH_3CN .

Для модификации боковых радикалов лизинов к фрагментам геля добавляли по 5 мкл $(\text{CH}_3\text{CO})_2\text{O}$ и 40 мкл 0,1 М NH_4HCO_3 и инкубировали при 37°C в течение 40 минут [378]. Далее проводили трипсинолиз белков в геле, пептиды экстрагировали из геля и обессоливали как описано в п.2.3.1. Смесь пептидов элюировали с микроколонок на мишени приборной пластины насыщенным раствором матрикса. Получение и регистрацию масс-спектров, а также дальнейшую идентификацию белков проводили как описано в п.2.3.1.

Биоинформатический анализ белков в составе ДНПК плазмы крови проводили как описано [379-381]. В частности, анализ универсальности белков, их происхождение, молекулярные функции и вовлечение в биологические процессы и пути проводили с

помощью ПО FunRich (version 3.1.3 software package) и баз данных Reactome (www.reactome.org) и NCI-Nature Pathway Interaction Database (www.ndexbio.org) [382]. Профилирование белков НПК, вовлечённых в миграцию и подвижность клеток, иммунный ответ и ангиогенез выполняли с использованием аннотаций QuickGO, используя термины: клеточная подвижность (GO:0048870), клеточная миграция (GO:0016477) и негативная регуляция клеточной подвижности (GO:2000146); иммунный ответ (GO:0006955) и негативная регуляция иммунного ответа (GO:0050777); ангиогенез (GO:0001944) и негативная регуляция ангиогенеза (GO:1901343) [383]. Вовлечение белков в составе ДНПК в клеточную инвазию и ЭМП анализировали путем поиска в базе данных PubMed публикаций для каждого идентифицированного в работе белка. Профилирование универсальных белков ДНПК крови проводили с помощью ПО STRING (www.string-db.org). Анализ наличия ДНК-связывающих мотивов в составе белков гистон-содержащих ДНПК крови проводили с помощью веб-платформы Interpro и баз данных 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>).

2.4 Онкомаркеры в составе ДНПК крови больных РМЖ

2.4.1 Анализ aberrантно метилированной формы гена *RARβ2*

Для оценки доли низкомолекулярных фрагментов в составе внДНК плазмы и асс-ФЭ ДНК ЗдЖ и больных РМЖ, от 30 до 790 нг внДНК разделяли на 6 % ПААГ и выделяли фрагменты от 100 до 1000 п.н. методом электроэлюции в течение 2 ч при 200 В. ДНК элюировали с ДЭАЭ-целлюлозы (Immobilon, Millipore, США) 3 М LiClO₄ (Sigma, США) и осаждали ацетоном. После центрифугирования при 8 000 g в течение 10 мин при 25°C, осадок ДНК отмывали солей ацетоном, сушили и растворяли в 30 мкл воды. Концентрацию низкомолекулярной внДНК определяли количественной ПЦР как указано в п.2.2.2. Эффективность выделения короткой ДНК была подтверждена выделением из геля 1 нг и 40 пг ПЦР-продукта *RARβ2* (GenBank X56849.1, 924-1117, 194 п.н.).

Бисульфитную обработку ДНК проводили с помощью набора EZ DNA Methylation-Gold™ Kit (ZymoResearch, Ирвин, США) по протоколу, рекомендованному производителем. Выделенную внДНК и низкомолекулярные фрагменты внДНК плазмы и асс-ФЭ ДНК, геномную ДНК, а также ПЦР-продукты промоторной области гена *RARβ2* (независимые от метилирования и специфичные к метилированию, GenBank X56849.1 931-

1116, 186 п.н. и GenBank X56849.1 926-1116, 161 п.н. (Таблица 3), соответственно) обрабатывали бисульфитом одновременно, затем элюировали с колонок ДНК в 40 мкл элюирующего буфера и хранили в аликвотах при -40 °С.

Концентрацию метилированных и независимых от метилирования форм гена *RARβ2* оценивали с помощью количественной ПЦР, специфичной к метилированию. Реакцию проводили на амплификаторе ICycler iQ5 (Bio-Rad, США) в объеме 30 мкл, содержащем 5 мкл ДНК, 300 нМ каждого праймера (Таблица 3), 0,25 мМ дезоксинуклеотидтрифосфатов, Taq-полимеразный буфер с SYBR Green I (Биосан, Новосибирск, Россия) и 1 ед. Taq-полимеразы (Fermentas, Литва). ПЦР проводили в следующих условиях: денатурация при 95°C в течение 3 мин, затем 40 циклов при 95°C в течение 30 сек, 60°C в течение 5 сек и 72°C в течение 30 сек. 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. Полученные данные анализировали при помощи ПО iQ5.

Коэффициент вариации между повторами измерений для *RARβ2* составил 10 %; чувствительность — пять копий гена/мкл ДНК, а эффективность ПЦР была в диапазоне 93-95 %. Стандартные кривые были построены с использованием серийных разведений очищенных метилированных и неметилированных ампликонов. Индекс метилирования рассчитывали как $= 100 \times [\text{количество копий метилированного } RAR\beta2 / (\text{количество копий метилированного } RAR\beta2 + \text{неметилированного } RAR\beta2)]$.

2.4.2 Анализ ассоциированных со злокачественными новообразованиями белков в составе ДНПК

Для поиска белков, ассоциированных со злокачественными новообразованиями, в составе гистон-содержащих ДНПК крови использовали базу данных dbDEPC 3.0 [384], из них прогностические выявляли с использованием базы данных Human Protein Atlas (<http://www.proteinatlas.org/>) [385] (с учетом данных для молочной железы, почек, щитовидной железы, поджелудочной железы, печени, эндометрия, головы и шеи, яичников, желудка, шейки матки, рака легких и рака кишечника, меланомы и глиомы).

2.5 Получение экзосом из плазмы и из крови женщин, и их характеристика в соответствии с требованиями Общества по исследованию ВВ

Экзосомы плазмы и экзосомы крови (содержат экзосомы плазмы и ассоциированные с ФЭ экзосомы) получали из незамороженных образцов, полученных как описано в п. 2.1. В частности, после удаления клеточного дебриса при 17 000 g 4°C в течение 20 мин, супернатанты экзосом плазмы и экзосом крови разводили в 5 и 2,5 раза ФБ и фильтровали через фильтры с диаметром пор 100 нм (Minisart high flow, Sartorius). Экзосомы осаждали ультрацентрифугированием при 100 000g в течение 90 мин, 4, осадок трижды промывали 10 мл ФБ и ресуспендировали в 300 мкл ФБ. Экзосомы аликвотировали, замораживали в жидком азоте и хранили при -80°C.

Гемолиз в супернатантах плазмы и элюате с ФЭ оценивали по уровню активности лактатдегидрогеназы (LDH 1.1.1.27) с использованием коммерческого набора LDH kit (ВекторБест, Россия) по протоколу, рекомендованному производителем. Для построения калибровочной кривой использовали эндотелиоциты пупочной вены человека (любезно предоставлены А.А. Шефер, ИХБФ СО РАН).

Морфологию и размер экзосом оценивали с помощью крио-электронной и трансмиссионной микроскопии. Крио-электронную микроскопию проводили на микроскопе Titan Krios 60-300 TEM/STEM (Thermo Fisher Scientific, США), оснащённом высокочувствительным DED (Direct electron detector) детектором электронов Falcon II (Thermo Fisher Scientific, США) и корректором сферических аберраций (CEOS, Германия) при ускоряющем напряжении 300 кВ как описано [386]. Для проведения трансмиссионной электронной микроскопии использовали микроскоп JEM 1400 (Jeol, Япония) при ускоряющем напряжении 80 кВ. Экзосомы сорбировали на медные сетки с формваровой подложкой, стабилизированной углеродом и контрастировали 0,5 % уранилацетатом или 2 % фосфорно-вольфрамовой кислотой как описано. Изображения получали с помощью цифровой фотокамеры Veleta (Olympus Corporation, Япония), для оценки размеров ВВ использовали программу iTEM (Olympus, SIS, Германия) [387].

Для приготовления ультратонких срезов ФЭ фиксировали 4 % параформальдегидом, затем обрабатывали 1 % OsO₄, обезвоживали в этаноле и ацетоне, и заключали в смесь эпон-аралдит. Ультратонкие срезы готовили на ультратоме Leica EM UC7 (Leica, Германия), контрастировали уранилацетатом и цитратом свинца.

Размер и концентрацию экзосом оценивали при помощи анализатора частиц NanoSight LM10 (Malvern Instruments Ltd, Великобритания). Измерения проводили в трех

повторах как описано [31]. Данные анализировали с помощью ПО NTA analytical software version 2.3 (NanoSight Ltd., Великобритания).

Для подтверждения экзосомальной природы выделенных ВВ использовали проточную цитофлуориметрию. Для этого на поверхности 4 % латексных частиц (A37304, Invitrogen, США) иммобилизовали антитела против CD9 (Abcam, Англия) как описано [387]. К 50 экзосомам (30 мкг по белку) добавляли покрытые антителами частицы, после инкубации, блокировали непрогравировавшие группы и отмывали от глицина как описано ранее [387]. Для оценки комплексов частицы-экзосомы использовали флуоресцентно-меченные антитела против CD63, CD81 и CD24 (BD Bioscience, США). Цитофлуориметрию проводили на проточном цитофлуориметре FACS Canto II (США). В выделенной популяции экзосом анализировали медиану интенсивности флуоресценции в сравнении с изотипическим контролем (BD Bioscience, США) и отрицательными контролями [387].

2.6 Анализ белков в составе экзосом

Концентрацию белка в образцах экзосом определяли с помощью коммерческого набора «NanoOrange Protein Quantitation kit» (Molecular Probes, США) как описано в п. 2.3.1.

2.6.1 Определение уровня 20S протеасом

Иммуноблоттинг проводили с использованием специфических поликлональных кроличьих антител против α - и β -субъединиц протеасомы 20S человека (ab22673, Abcam, Великобритания). К 30 мкл экзосом лизировали добавлением 7 мкл 0,125 М Трис-HCl, 0,750 М NaCl, 0,5 % SDS, 5 % Triton X-100, pH 7,8 и 3 мкл коктейля ингибиторов протеаз (1,3 мМ апротинина (Sigma, США), 0,33 мМ пепстатина А (ICN, США), 1 мкг/мл лейпептина (ICN, США)), и разделяли в 13 % SDS-ПААГ как описано [31]. После электрофореза белки переносили на PVDF-мембрану (0,45 мкм, Immobilon, Millipore, США). Мембрану блокировали раствором 1× iBind и инкубировали в течение 1 ч с первичными антителами к 20S-протеасоме в разведении 1:2000. После промывки мембрану инкубировали с козым анти-кроличьим конъюгатом с пероксидазой хрена (Santa Cruz Biotechnology, Великобритания) в течение 1 ч (разведение 1:5000) с использованием автоматизированного устройства iBind Western Device. После трехкратной промывки визуализацию проводили с помощью Amersham ECL-Plus Western Blotting Detection System (Amersham, США) и системы визуализации ChemiDoc Touch (Bio-Rad, США) в

соответствии с протоколом производителя. Денситометрию изображений проводили с помощью ПО «ImageJ». Уровень 20S-протеасомы нормировали на уровень экзосомального CD9 и выражены в отн. ед. от уровня 20S-протеасом в экзосомах контрольной группы.

2.6.2 Определение уровня ADAM-10 в короне экзосом

Антитела против ADAM-10 (Abcam, Англия) иммобилизовали на латексных частицах (A37304, Invitrogen, США), а затем формировали комплексы экзосомы-антитела-частицы как описано в п. 2.5. Полученные комплексы отмывали и инкубировали с блокирующими антителами как описано [388], а затем инкубировали с флуоресцентно-мечеными антителами против CD9 и CD24 (BD Bioscience, США). Проточную цитофлуориметрию проводили на флуориметре FACS Canto II (США). В выделенной популяции экзосом анализировали медиану интенсивности флуоресценции в сравнении с изотипическим контролем (BD Bioscience, США) и отрицательными контролями [388].

2.6.3 Идентификация белков экзосом методом MALDI-TOF масс-спектрометрии и биоинформатический анализ

Экзосомы лизировали как описано в п. 2.6.1, экзосомальные белки разделяли в 10-20 % геле с помощью электрофореза. Гель фрагментировали и проводили трипсинолиз как описано п. 2.3.1. Пептиды экстрагировали из геля, концентрировали, обессоливали и анализировали с помощью масс-спектрометрии как описано в п. 2.3.1.

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

Диаграммы Венна-Эйлера были построены с использованием ПО FunRich версии 3.1.3 с использованием функции Vesiclepedia и текущих версий БД FunRich и Vesiclepedia [389]. Анализ функционального обогащения GO всех фракций экзосом выполняли с использованием ПО STRING (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. 2.3.4.

2.6.4 Протеомные онкомаркеры в составе экзосом крови больных РМЖ

Профилирование экзосомальных белков, по-разному экспрессируемых при развитии различных злокачественных заболеваний, проводили с использованием БД DEPC 3.0 [384]. 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.

2.7 Анализ роли экзосом крови в диссеминации РМЖ на молекулярном уровне

2.7.1 Анализ ДНК в составе экзосом

Для оценки доли ДНК в составе экзосом от общего содержания вДНК в крови, ДНК выделяли из 100 мкл экзосом и из 1 мл плазмы крови ЗдЖ и больных РМЖ как описано в п.2.2.1. Концентрацию и размер полученной ДНК оценивали как описано в п. 2.2.2 и п.2.2.4.

Для установления локализации ДНК в составе экзосом, 460 мкл ВВ обрабатывали ДНКазой I в течение 30 мин при 37°C (0,08 у.е. фермента без активности РНКазы, Fermentas, Литва) либо ФБ. ДНКазу I ингибировали нагреванием (65°C, 10 мин) с ЭДТА, экзосомы отмывали ФБ. Из супернатантов после ультрацентрифугирования и полученных экзосом выделяли ДНК как описано в п.2.2.1, концентрацию и размер полученной ДНК оценивали как описано в п. 2.2.2 и п.2.2.4.

Наличие комплексов вДНК с гистонами на поверхности экзосом подтверждали с помощью пятненого ИФА. Для этого использовали 0,5 мкл исходных экзосом или экзосом, обработанных ДНКазой I в течение 30 мин при 37°C (без РНКазной активности, Fermentas, Литва), кроличьи поликлональные антитела против гистонов H1, H2A, H2B и H3 (Abcam, Англия) и мышинные моноклональные антитела против CD9 (BD Bioscience, США). Комплексы экзосом с антителами выявляли с помощью козьих антикроличьих антител или кроличьих антимышиных антител, конъюгированных с пероксидазой хрена (данные конъюгаты были ранее получены и охарактеризованы в Лаборатории молекулярной медицины ИХБФМ СО РАН).

Белки экзосом идентифицировали с помощью масс-спектрометрии как описано в п. 2.3.4. 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>).

2.7.2 Стимуляция экзосомами формирования КПС первичными эндотелиоцитами

Первичные эндотелиоциты пупочной вены человека (HUVEC, $n = 3$) были получены из биобанка Института регенеративной медицины МГУ им. М.В. Ломоносова, идентификатор коллекции: MSU_HUVEC (<https://human.depo.msu.ru>). Для экспериментов использовали эндотелиоциты после второго пассажа, пересаживали через 3 дня, а после 5 пассажей размораживали из стоков новые клетки.

Для оценки влияния экзосом на ангиогенез использовали модель формирования КПС на Матригеле, обедненным ростовыми факторами. Для этого клетки HUVEC второго пассажа высаживали из расчета 35000 клеток на покрытую Матригелем (BD Bioscience, США) лунку, добавляли среду EBM-2 (Lonza, США), 100 ед/мл пенициллина, 100 ед/мл стрептомицина и 5×10^8 экзосом. Каждая лунка была в трех повторях. Для отрицательного контроля использовали EBM-2 среду и 100 ед/мл пенициллина, 100 ед/мл стрептомицина, а для положительных контролей — EBM-2 среду, содержащую 10 % БС либо EBM-2 среду без факторов роста с добавлением экзосом культуральной среды линии SKBR-3. Эндотелиоциты культивировали в атмосфере 5 % CO_2 при 37°C в течение 18 ч, затем оценивали формирование КПС с помощью светового микроскопа (Leica, Германия) [370].

Суммарную длину сформированных КПС оценивали в четырех выбранных полях зрения в каждой лунке путем фотографирования лунок на увеличении 10× с последующей оценкой их длины с использованием ПО MetaMorph 5.0 software (Universal Imaging).

2.7.3 Стимуляция экзосомами клеточной подвижности

Линию псевдо-нормальных эпителиоцитов молочной железы MCF10A (ATCC® CRL-10317™) культивировали в среде DMEM/F12 (Sigma, США) 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_3 , 100 ед/мл пенициллина и 100 мкг/мл стрептомицина («ПанЭко», Россия). Линию карциномы молочной железы SKBR-3 (ATCC® HTB-30™) культивировали в DMEM (Sigma, США) с 10 % БС, 100 ед/мл пенициллина, 100 ед/мл стрептомицина («ПанЭко», Россия) в атмосфере 5 % CO_2 при 37°C.

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. После инкубации при 37°C и 5 % CO₂ в течение 24 ч или 48 ч для SKBR-3 и MCF10A, соответственно, 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 10⁸ экзосом/лунку) или без них [370]. 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 ×10 и ×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. Три поля зрения были записаны для каждого условия в трех независимых экспериментах.

2.7.4 Стимуляция экзосомами пролиферативной активности

Для оценки интенсивности пролиферации клеток было рассчитано количество митозов на том же видео живых клеток MCF10A и SKBR3, которое было получено в п. 2.7.3.

2.8 Методы статистической обработки данных

Статистический анализ проводился с использованием ПО Statistica 6.0 и GraphPad. Оценка нормального распределения результатов проводилась с использованием критерия Колмогорова-Смирнова. Значимость различий при негауссовском распределении оценивалась с помощью непараметрического критерия Манна–Уитни. Данные представлены в виде среднего значения и ошибки среднего или медианы, верхнего и нижнего квартилей. Различия считали статистически значимыми при значениях $p \leq 0,05$. Чувствительность и специфичность были рассчитаны на основе характеристических кривых (ROC-кривых), полученных для дифференцирования больных с РМЖ и ЗдЖ.

ГЛАВЫ 3–5 РЕЗУЛЬТАТЫ СОБСТВЕННЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Поскольку внеклеточные нуклеиновые кислоты представлены в крови в виде комплексов с биополимерами, а также упакованы во ВВ, из крови ЗдЖ и первичных больных РМЖ были получены ДНПК и экзосомы, проведен их сравнительный анализ, исследована роль в диссеминации РМЖ на молекулярном уровне и проведена оценка диагностического потенциала биополимеров.

Для проведения исследования были сформированы группы клинически ЗдЖ (n = 190) и первичных больных РМЖ (n = 194, таблица 2). Поскольку длительное хранение образцов крови может приводить к искажению результатов, для каждого блока работ использовали образцы, хранившиеся менее года; количество вовлечённых в исследование доноров и пациентов указано на рисунках 11 и 12 и в таблицах разделов Глав 3–5. Необходимо отметить, что для некоторых экспериментов для достижения достоверных результатов были использованы пулированные образцы (исследование строения концов и фрагментации вДНК, исследование влияния экзосом на клеточную миграцию и т.д.), что отдельно оговаривается при обсуждении полученных результатов.

ГЛАВА 3 ИССЛЕДОВАНИЕ ДНПК КРОВИ В НОРМЕ И ПРИ РМЖ

Известно, что в крови человека в норме и при патологических состояниях присутствует внДНК. Благодаря формированию комплексов с белками, имеющими ДНК-связывающие мотивы, эта эндогенная ДНК защищена от гидролиза нуклеазами и способна длительно циркулировать в кровотоке и, вероятно, участвовать в передаче сигналов между клетками. Например, уже неоспоримым фактом является не только увеличение концентрации внДНК в крови онкологических больных, но и наличие аналогичных изменений, что и в геномной ДНК клеток опухоли. В то же время, до сих пор не установлены механизмы появления внДНК в крови, состав ДНПК, а также не ясны молекулярные функции этих циркулирующих ДНК-белковых комплексов.

Исследование фрагментации и встречаемости вноДНК в составе внДНК плазмы и асс-ФЭ ДНК, идентификация белков в составе ДНПК в крови Здж и больных РМЖ не только расширят фундаментальные знания о механизмах появления и распределения между компонентами крови, а также молекулярных функциях этих комплексов, но и позволят оценить их диагностическую значимость.

3.1 Анализ внДНК в составе ДНПК крови Здж и больных РМЖ

Известно, что вноДНК с генетическими и эпигенетическими изменениями, идентичными опухолевой ДНК, циркулирует в крови пациентов с онкологическими заболеваниями [11, 14, 15, 92, 95, 96, 129]. Эпигенетические ДНК-маркеры, а именно aberrantly метилированная ДНК, входят в список потенциальных циркулирующих опухолевых маркеров, поскольку aberrantное метилирование онкогенов и генов-супрессоров опухолей является одним из самых ранних событий при трансформации опухолевых клеток, оно эффективно обнаруживается на фоне неметилированной ДНК и способствует более длительной циркуляции ДНК в крови [15, 390]. Недавно для клинического использования были одобрены два неинвазивных диагностических теста, основанных на определении опухолеспецифических последовательностей в составе внДНК с помощью количественной ПЦР. В частности, анализ метилирования генов Septin 9 и SHOX2 во внДНК плазмы крови позволяет выявлять колоректальный рак и рак легкого с чувствительностью и специфичностью более 90 % [391, 392]. Тесты Epi proColon® и Epi proLung® одобрены для диагностического использования в Китае и Европейском союзе, а Epi proColon® также одобрен FDA в США (<http://www.epigenomics.com>). К сожалению, для других типов злокачественных новообразований тесты «жидкостной биопсии», основанные

на анализе абберрантно метилированной ДНК, не столь эффективны. На низкую чувствительность (наиболее значимый критерий для практического использования) неинвазивных диагностических тестов влияет низкая концентрация и фрагментация внДНК в кровотоке, усугубляемая дополнительной фрагментацией, вызванной обработкой бисульфитом [393, 394].

Несоответствие литературных данных о размерах фрагментов ДНК [395] затрудняет дизайнирование ПЦР-систем, что приводит к различной эффективности выявления абберрантно-метилованных ДНК-маркеров в образцах плазмы крови онкологических больных с одинаковой клинической картиной [396]. Потенциальная диагностическая ценность неинвазивных тестов может быть усилена за счет использования асс-ФЭ ДНК. Действительно, было показано, что индекс метилирования асс-ФЭ ДНК из крови пациентов с немелкоклеточным раком легкого оказался более диагностически значимым, чем внДНК плазмы крови [397].

Для подтверждения гипотезы о большей репрезентативности эпигенетических маркеров в асс-ФЭ ДНК по сравнению с внДНК плазмы был выбран *RARβ2*, поскольку частота гиперметилования этого гена была значительно выше в опухолях молочной железы по сравнению с нормальными тканями молочной железы, а также в связи с тем, что он обнаруживается в как в составе внДНК плазмы, так и асс-ФЭ ДНК [95, 96, 398].

На первом этапе работы была оценена общая концентрация внДНК в плазме и асс-ФЭ ДНК Здж (n = 50) и первичных больных люминальным РМЖ (n = 25, таблица 5).

Для этого ДНК выделяли из плазмы и элюатов с поверхности ФЭ коммерческим набором «BPD-100», концентрировали и проводили ПЦР в режиме «реального времени». В качестве мишени для оценки общей концентрации внДНК был выбран *LINE-1* элемент, последовательности которого представлены в виде $5,2 \times 10^5$ равномерно распределенных по геному копий [399]. ПЦР-система, специфичная к последовательности *LINE-1*, обладает эффективностью амплификации > 95 %, относительной погрешностью — 10 % и чувствительностью 5 пг ДНК/образец.

Сравнительный анализ концентрации внДНК в плазме крови Здж и больных РМЖ выявил статистически значимое увеличение показателя при злокачественных новообразованиях (медианы составили 10,5 нг/мл и 23,5 нг/мл, соответственно, критерий Манна-Уитни, $p = 0,0056$) (рисунок 12а), что согласуется с опубликованными данными [25], при этом не выявлено отличий для асс-ФЭК внДНК (медианы в норме и при патологии составили 8,5 и 10,3 нг/мл для ФБ-ЭДТА (рисунок 12б) и 66 и 43 нг/мл для трипсинового элюатов (рисунок 12в), соответственно).

Таблица 5 — Клинико-патологическая характеристика больных люминальным РМЖ

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

На следующем этапе анализ фрагментации вДНК плазмы и асс-ФЭ ДНК был проведен с помощью капиллярного электрофореза. Чувствительность анализа на биоанализаторе Agilent 2100TM составила 5 пг ДНК для диапазона фрагментов от 50 до 7 000 п.н. В связи с низкой концентрацией вДНК плазмы в норме, для анализа фрагментации вДНК был использован пулированный образец плазмы ЗдЖ (получен из 225 мл крови от 25 женщин), при этом профиль фрагментации вДНК в крови первичных больных РМЖ был оценен в индивидуальных образцах (n = 8, по 8 мл крови, таблица 6).

Было установлено, что профиль фрагментации вДНК крови в норме и при РМЖ различен. В частности, в норме вДНК в плазме крови представлена преимущественно фрагментами ~171–180 п.н., а высокомолекулярные фрагменты (от 8 до 13,8 т.п.н.) значительно менее представлены; при РМЖ — наоборот. При этом асс-ФЭ ДНК в образцах крови ЗдЖ и больных РМЖ имела сходный профиль распределения по размерам — в обоих случаях короткие фрагменты вДНК являлись минорным компонентом (рисунок 13).

Для оценки доли низкомолекулярных фрагментов в составе вДНК, фрагменты длиной от 100 до 1000 п.н. были выделены из плазмы и элюатов с поверхности ФЭ электроэлюцией после разделения в акриламидном геле и их концентрация оценена с помощью количественной ПЦР на *LINE1*-элемент. В предварительных экспериментах было показано, что такой подход позволяет выделить ПЦР-продукт длиной 161 п.н. с эффективностью 91 % и 80 % для 1 нг и 40 пг ДНК, соответственно. Установлено, что менее 20 % вДНК в плазме крови ЗдЖ представлены фрагментами от 100 до 1000 п.н., в то время как у больных РМЖ менее 3 % вДНК плазмы крови имела аналогичный размер. В

составе асс-ФЭ ДНК как в норме, так и при РМЖ представлена преимущественно (более 97,5 %) фрагментами более 1000 п.н. (таблица 7). Полученные данные по фрагментации вДНК в плазме совпадают с литературными данными [155, 221, 225, 400], а данные о фрагментации асс-ФЭ ДНК получены в работе впервые.

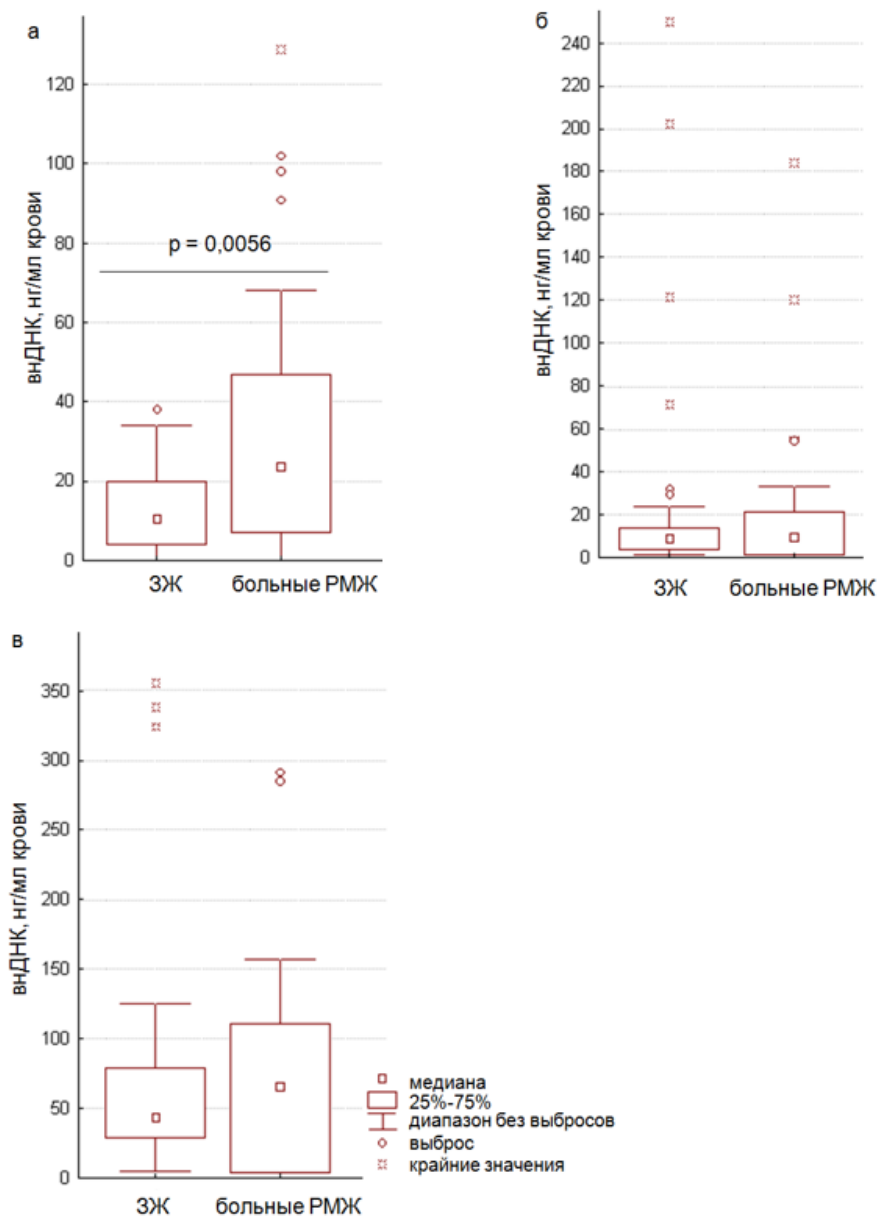


Рисунок 12 — Концентрация вДНК в плазме крови (а), ФБ-ЭДТА элюате (б) и трипсиновом элюате (в) с поверхности ФЭ ЗдЖ (n = 50) и больных РМЖ (n = 25).

Приведены данные концентрации вДНК на 1 мл цельной крови

Наличие в плазме крови фрагментов вДНК, кратных нуклеосоме, указывает на апоптотическое происхождение вДНК, в то время как наличие высокомолекулярных фрагментов в составе вДНК свидетельствует в пользу некротического происхождения, а также активной секреции вДНК живыми клетками. Поскольку в норме доля

некротических клеток крайне мала, вероятно процесс активной секреция вносит основной вклад в появление внДНК в плазме крови. Выявленные преимущественно высокомолекулярные фрагменты ДНК в плазме крови больных РМЖ свидетельствуют о снижении вклада апоптоза в появление внДНК при злокачественном новообразовании. Наличие преимущественно высокомолекулярных фрагментов в составе асс-ФЭ ДНК как в норме, так и при РМЖ может объясняться как устойчивостью ДНК к гидролизу благодаря многоцентровому связыванию с плазматической мембраной, так и специфическому вывязыванию ДНПК благодаря формированию комплексов ДНК-связывающий белок в ДНПК или ДНК в составе ДНПК с соответствующими мембранными рецепторами.

Таблица 6 — Клинико-патологическая характеристика больных люминальным А подтипом РМЖ

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

Наряду с фрагментацией строение концов внДНК может пролить свет на источник происхождения внДНК. Ранее было показано, что ДНК апоптотического происхождения имеет преимущественно «тупые» (не выступающие) концы, а также 5'- и 3'-выступающие концы, при этом в составе некротической ДНК представлены 5'-выступающие концы [401, 402].

Для проведения сравнительного анализа строения концов внДНК были использованы пулированные образцы. Было показано, что в норме концы циркулирующей в крови внДНК гетерогенны — в составе ДНК выявлены 5'-выступающие, 3'-выступающие и «тупые» концы (рисунок 14а). Анализ строения концов внДНК плазмы при РМЖ (таблица 8) выявил преимущественно выступающие на 2 нуклеотида 5'-концы и выступающие на 3 нуклеотида 3'-концы, а асс-ФЭК внДНК — выступающие на 2 нуклеотида 5'-концы (рисунок 14б).

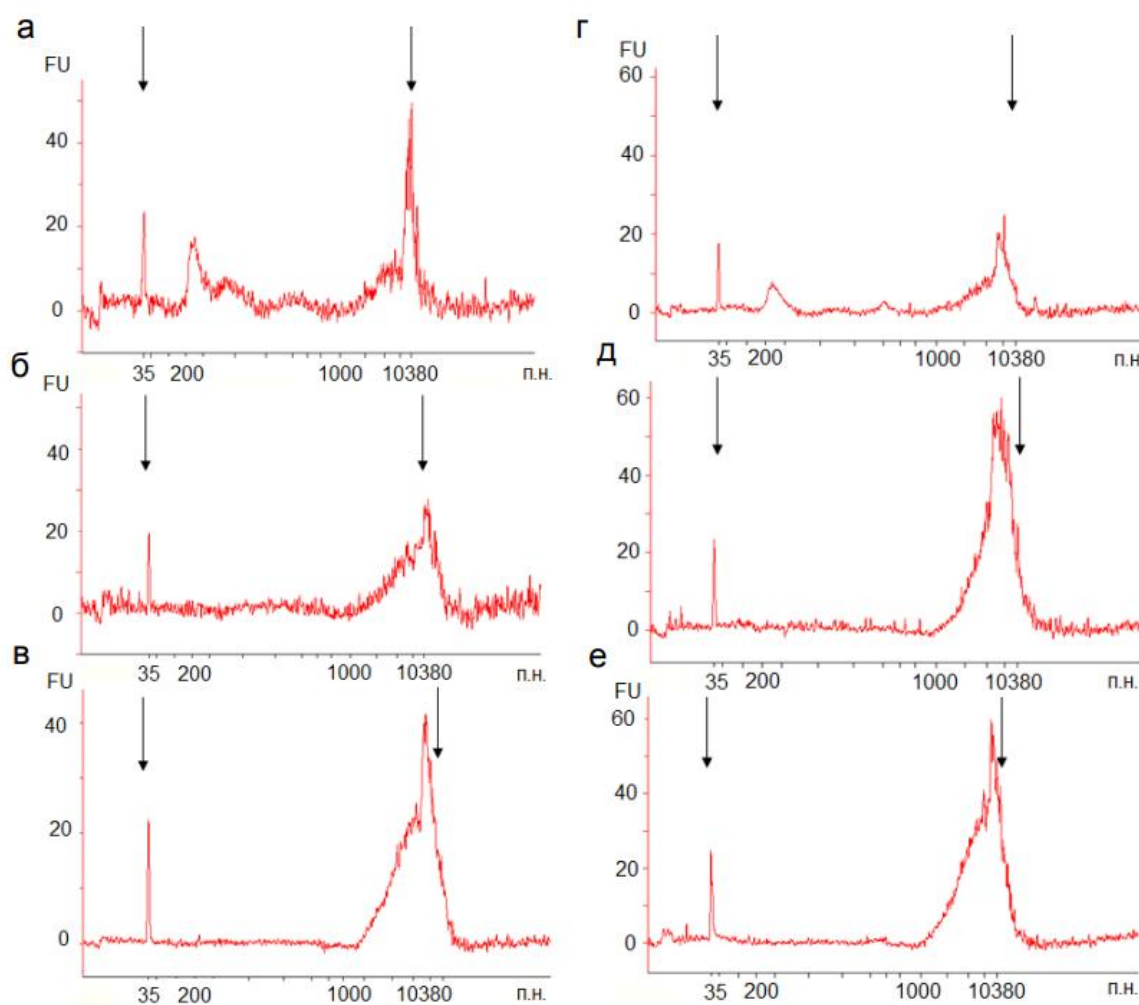


Рисунок 13 — Электрофореграмма внДНК из пулированного образца крови ЗдЖ и электрофореграмма внДНК из индивидуального образца крови больной РМЖ: Σ плазма ЗдЖ (а), Σ ФБ-ЭДТА элюат ЗдЖ (б), Σ трипсиновый элюат ЗдЖ (в), плазма больной РМЖ (г), ФБ-ЭДТА элюат больной РМЖ (д), трипсиновый элюат больной РМЖ (е). Маркерные фрагменты длиной 35 п.н. и 10380 п.н. указаны стрелками

Таблица 7 — Представленность фрагментов от 100 до 1000 п.н. в составе внДНК крови ЗдЖ и больных РМЖ, (%)

ДНК фрагменты	ЗдЖ, объединенный образец ($\Sigma n = 25$)			Больные РМЖ, индивидуальные образцы ($n = 8$)		
	Плазма	ФБ-ЭДТА элюат	Трипсиновый элюат	Плазма	ФБ-ЭДТА элюат	Трипсиновый элюат
100-1000 п.н.	18,7	0,9	0,1	2,6 $\pm$ 1,4	0,3 $\pm$ 0,1	0,2 $\pm$ 0,1
> 1000 п.н.	81,3	99,1	99,9	97,5 $\pm$ 1,4	99,7 $\pm$ 0,1	99,8 $\pm$ 0,1

Таблица 8 — Клинико-патологическая характеристика группы больных люминальным А подтипом РМЖ

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

Таким образом, полученные в работе данные о представленности концов внДНК в норме коррелируют с данными по фрагментации и свидетельствуют, что не более 1/5 фрагментов внДНК плазмы ЗдЖ имеют апоптотическое происхождение. Наличие 5'-выступающих концов в составе высокомолекулярных фрагментов в крови первичных больных РМЖ (T₂N₀M₀) свидетельствуют о том, что при злокачественном новообразовании не менее 1/4 внДНК имеет некротическое происхождение.

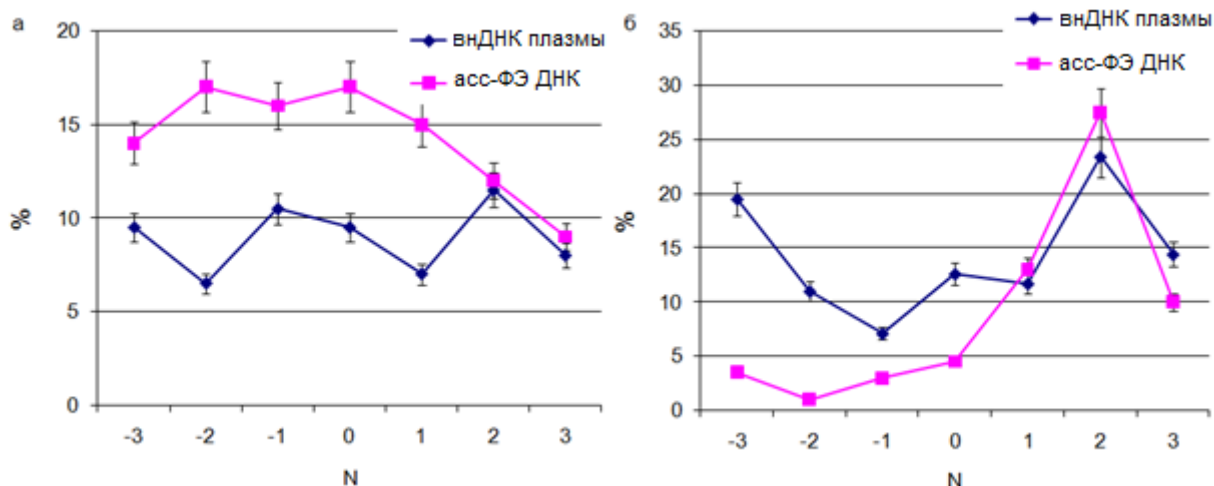


Рисунок 14 — Представленность концов внДНК в Σ крови Здж ($n = 10$) (а) и Σ крови больных РМЖ ($n = 10$) (б)

3.2 Анализ aberrантно-метилованной ДНК в крови Здж и больных РМЖ

Известно, что доля внДНК в составе циркулирующей в крови внДНК не превышает 5 %, что накладывает высокие требования к специфичности количественной ПЦР [25, 403]. Для увеличения количества анализируемой опухолевой ДНК требуется либо увеличение объема венозной крови (что крайне проблематично для пациентов с поздними стадиями заболевания, сопровождающимися анемией, при отсутствии увеличения соотношения метилированных и неметилованных форм), либо использование более высокомолекулярной асс-ФЭ ДНК, имеющей более высокий индекс метилирования. В частности, ранее было показано, что анализа метилирования только внДНК плазмы недостаточно для успешного выявления злокачественных новообразований [404]. Причиной снижения эффективности ПЦР могут быть режим метилирования (в промоторной области метилируются не все CpG) [405], а также аллель-специфическое метилирование [404]. В данной работе был проведен сравнительный анализ индекса метилирования (ИМ) промоторной области опухолевого супрессорного гена *RAR β 2* в составе низкомолекулярных (100-1000 п.н.) фрагментов, полученных из пулированных образцов внДНК плазмы и асс-ФЭ ДНК, а также исходной внДНК крови Здж ($n = 10$) и больных РМЖ ($n = 8$, таблица 6) методом ПЦР. Для этого были использованы две ПЦР-системы — специфичная к метилированию и независимая от метилирования. Обе ПЦР-системы обладали одинаковыми аналитическими характеристиками: чувствительность — 50 копий/образец, точность — 90 %, эффективность амплификации > 75 %.

Было обнаружено, что aberrантно метилированный *RAR β 2* выявляется только в составе исходной ДНК и не выявляется в фрагментах от 100 до 1000 п.н. (таблица 9). Более

того, ИМ *RARβ2* в плазме крови Здж составил 10 %, а у больных РМЖ — 33%, при этом в составе асс-ФЭ ДНК больных РМЖ достигал 61 % (таблица 9).

Полученные данные свидетельствуют о том, что наиболее ценным источником aberrантно метилированной ДНК для «жидкостной биопсии» является асс-ФЭ ДНК, представленная высокомолекулярными фрагментами.

Таким образом, анализ ИМ внДНК и ее фрагментов менее 100 п.н. в плазме и на поверхности ФЭ показал, что опухолеспецифическая ДНК более эффективно выявляется в составе высокомолекулярных фрагментов асс-ФЭК внДНК. Данный феномен объясняется снижением влияния гидролаз на данные ПЦР [395], а также вероятно специфическим связыванием внДНК с поверхностью ФЭ с рецепторами к нуклеиновой или белковой компонентам в составе ДНПК.

Таблица 9 — ИМ* в составе внДНК крови Здж и больных РМЖ, среднее±SD**

Фракция крови	внДНК	Условно Здж (n=10)	Больные РМЖ (n=8)	<i>p</i>
Плазма	Исходная ДНК	10±3	33±11	<0,05
	100-1000 п.н.	НД	НД	
ФБ-ЭДТА элюат	Исходная ДНК	9±4	15±6	
	100-1000 п.н.	НД	НД	
Трипсиновый элюат	Исходная ДНК	7±4	61±12	<0,05
	100-1000 п.н.	НД	НД	
Примечания: 1 *ИМ = (метилированная / неметилированная форма <i>RARβ2</i>)×100%; 2 ** Концентрация внДНК ниже чувствительности метода обозначена как НД.				

Сравнительный анализ концентрации aberrантно метилированной промоторной области гена *RARβ2* в составе внДНК плазмы и асс-ФЭК внДНК Здж и первичных больных РМЖ выявил статистически значимое увеличение концентрации эпигенетического маркера в трипсиновом элюате при наличии злокачественного новообразования (U-критерий Манна-Уитни, $p = 0,000001$, рисунок 15, таблица 10). Таким образом, полученные данные по концентрации эпигенетического маркера подтверждают данные по оценке ИМ *RARβ2* в крови больных РМЖ (таблица 9).

Полученные данные по более эффективному выявлению вноДНК в составе асс-ФЭК вноДНК подтверждают ранее полученные данные для рака легкого [397]. При этом не обнаружено корреляции концентрации вноДНК плазмы и асс-ФЭ вноДНК с размером злокачественного новообразования, а также наличием метастаз в регионарные лимфатические узлы. Наличие статистически значимой корреляции между повышенной концентрацией aberrantly метилированной промоторной области гена *RARβ2* в плазме и возрастом ЗдЖ (коэффициент Спирмана $r = 0,45$, $p = 0,001$, рисунок 16) свидетельствует о чрезвычайной важности сопоставимой по возрасту контрольной группы для оценки диагностической значимости эпигенетических маркеров. К настоящему времени выявлены различные причины возрастных изменений метилирования генов-супрессоров опухолей. В частности, увеличение ИМ вноДНК связывают с изменением активности системы метилирования, а также с влиянием канцерогенов и факторов окружающей среды [406–408].

Таблица 10 — Концентрация в крови aberrantly метилированного *RARβ2* в норме и при РМЖ

Образцы ДНК		Концентрация aberrantly метилированного <i>RARβ2</i> , пг/мл крови		
		медиана	частота выявления	диапазон концентраций
ЗдЖ (n = 46)	плазма	1	37 %	0–261
	ФБ-ЭДТА	0	35 %	0–811
	элюат			
	трипсиновый элюат	151	57 %	0–470
Первичные больные РМЖ (n = 23)	плазма	72	52 %	0–442
	ФБ-ЭДТА	0	26 %	0–594
	элюат			
	трипсиновый элюат	381	96 %	0–1484

Поскольку вноДНК составляет менее 5 % от всей вноДНК [25, 403], дизайн чувствительных и специфичных ПЦР-систем является на сегодняшний день сложной задачей. В данной работе впервые была проведена сравнительная оценка фрагментации и ИМ вноДНК плазмы и асс-ФЭ ДНК и установлено, что несмотря на некоторые неудобства

выделения последней, эта внДНК демонстрирует очевидные преимущества в качестве источника эпигенетических маркеров для разработки «жидкостной биопсии». Кроме того, аналитические характеристики ПЦР-систем можно значительно улучшить путем разработки принципиально новых подходов к обогащению внДНК, например, за белковую компоненту циркулирующих в крови ДНПК.

3.3 Сравнительный анализ ДНПК циркулирующих в крови ЗдЖ и больных РМЖ

Белки в составе ДНПК долгое время являлись «белым пятном» в области исследования природы внДНК. Очевидно, что эти биополимеры не только защищают ДНК в крови от гидролиза, но и могут определять молекулярные функции циркулирующих ДНПК. В связи с этим, в текущей работе были разработаны принципиально разные подходы для выделения из крови нативных ДНПК, в дальнейшем с помощью масс-спектрометрии идентифицированы в составе этих комплексов белки и с помощью биоинформатических подходов предсказаны их молекулярные функции.

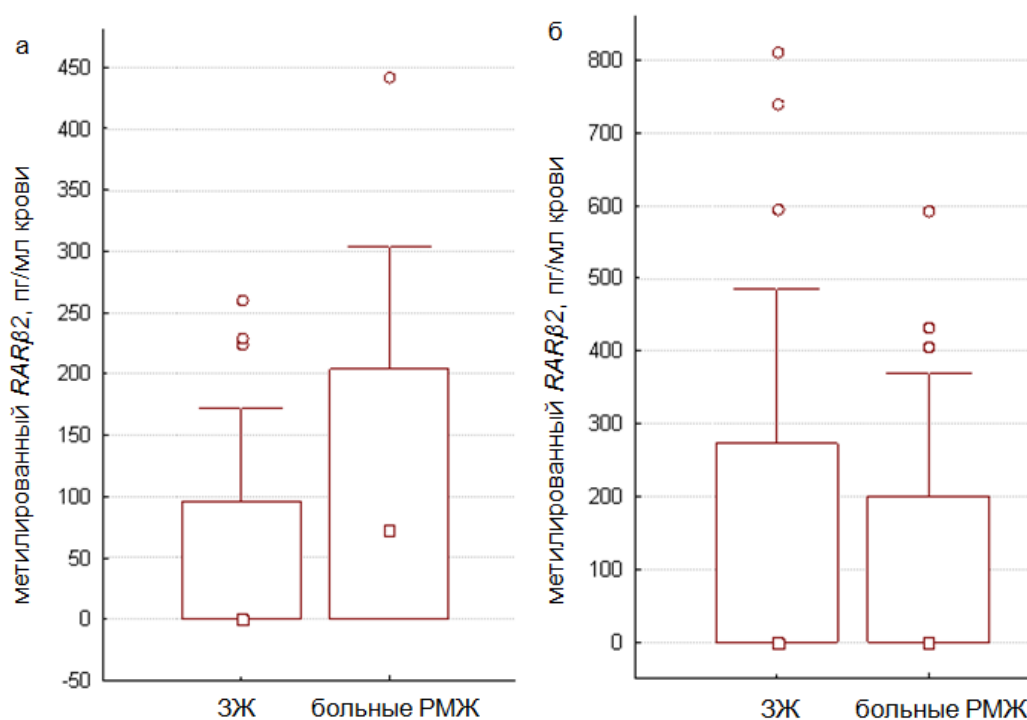


Рисунок 15 — Концентрация aberrантно метилированной промоторной области гена *RARβ2* в крови ЗдЖ (n = 46) и больных РМЖ (n = 23): плазма (а); ФБ-ЭДТА элюат (б)

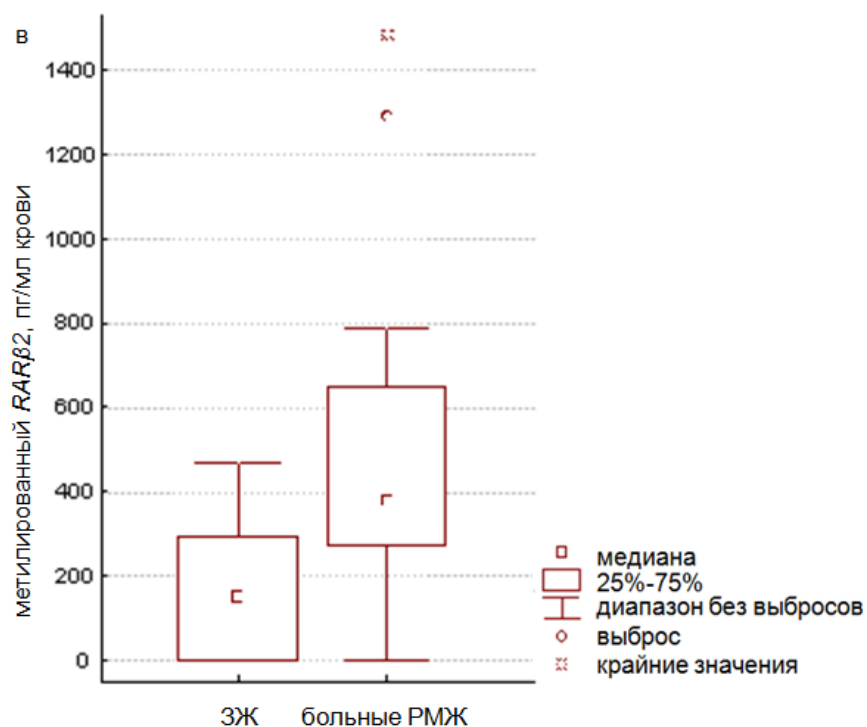


Рисунок 15 — Концентрация aberrантно метилированной промоторной области гена *RARβ2* в крови ЗдЖ (n = 46) и больных РМЖ (n = 23): трипсиновый элюат (в)

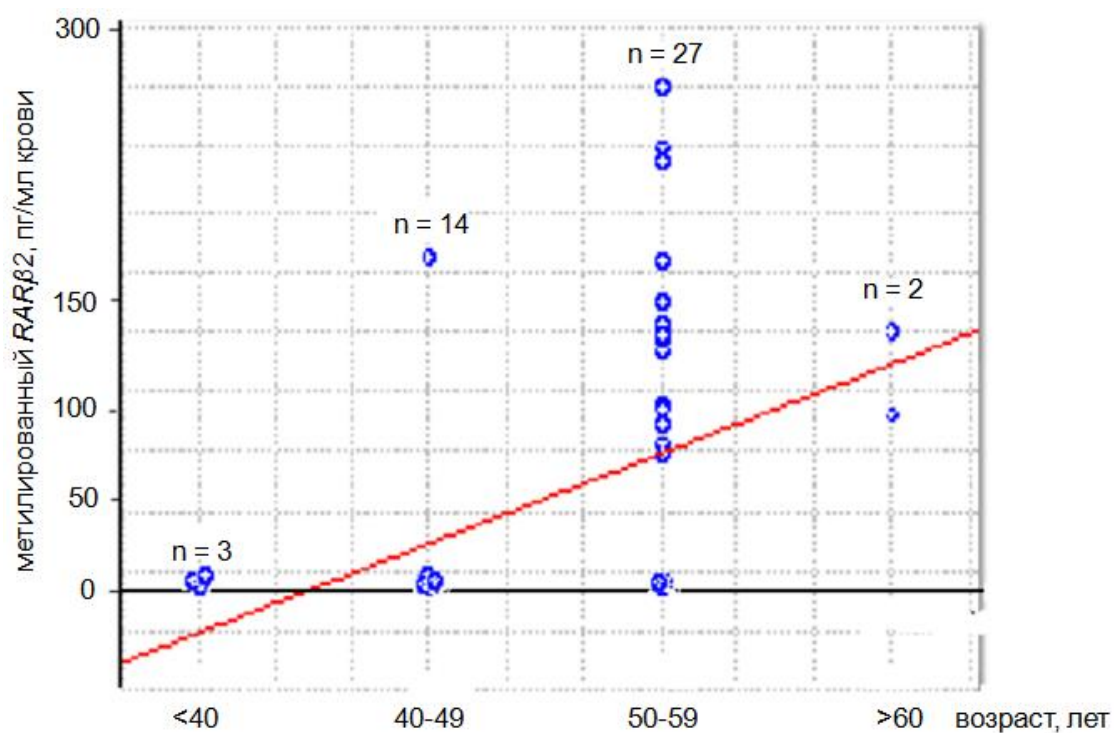


Рисунок 16 — Зависимость концентрации aberrантно метилированной промоторной области гена *RARβ2* в плазме крови от возраста ЗдЖ (n = 46)

3.3.1 Методы выделения нативных ДНПК за нуклеиновую и белковую компоненту

Для выделения нативных ДНПК из плазмы крови была использована способность ДНК связываться с поверхностью МДС. Ранее было показано, что данный метод в присутствии солей тиоцианата гуанидина позволяет выделять ДНК более 100 п.н. с эффективностью более 90 % [372]. Для подбора условий связывания ДНПК с МДС и отмывок без хаотропных солей были сформированы модельные комплексы, содержащие ДНК и ДНК-связывающий белок лактоферрин, обладающий $K_d \sim 5 \times 10^{-7} \text{ М}$ [176]. Эффективность выделения модельных комплексов оценивали по лактоферрину и по ДНК.

Было показано, что в буфере, содержащем 10 мМ трис-ацетат, 2 мМ CaCl_2 , 0,5 % Tween-20, pH 5 модельные комплексы связываются с МДС, а лактоферрин без ДНК — нет (рисунок 17а). В тоже время эффективность элюции данных комплексов с поверхности МДС составляла $48 \pm 7 \%$ (среднее $\pm$ ошибка среднего) (рисунок 17б).

На следующем этапе работы в подобранных условиях были выделены нативные ДНПК, наличие в них ДНК подтверждали капиллярным электрофорезом, белков — диск-электрофорезом, с последующим переносом на нитроцеллюлозную мембрану и окрашиванием коллоидным серебром.

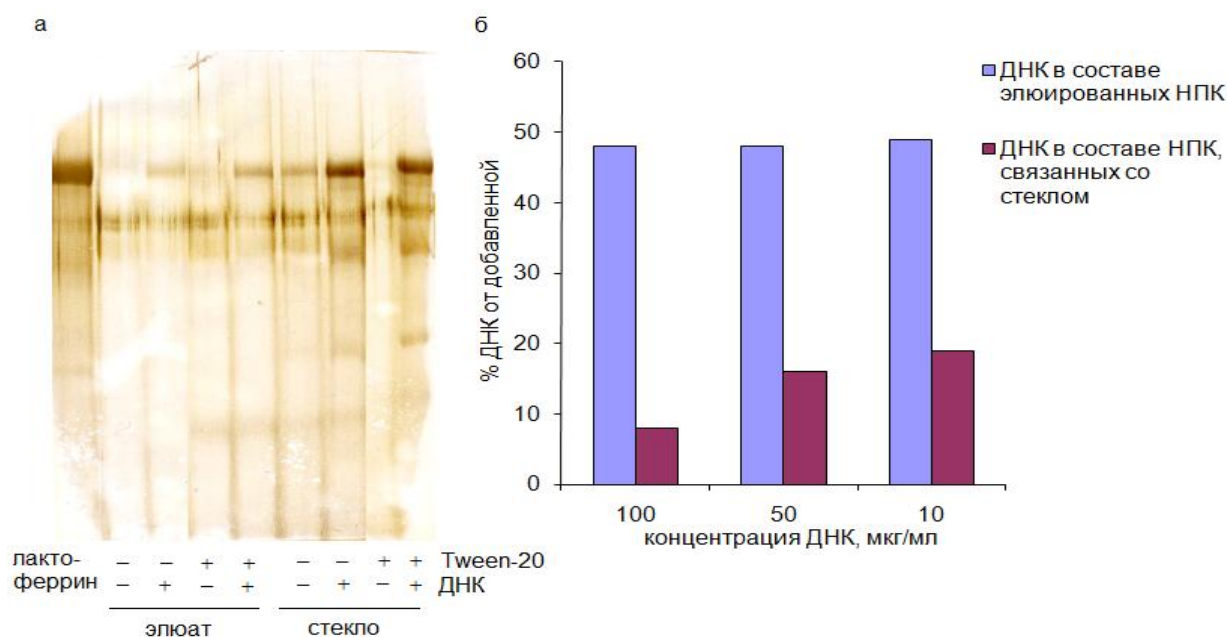


Рисунок 17 — Выделение модельных комплексов сорбцией на МДС

Прмечания:

1 (а) Анализ лактоферрина в составе ДНПК, выделенных с использованием буфера, содержащего 10 мМ трис-ацетат, 2 мМ CaCl_2 , Tween-20, pH 5,0. Лактоферрин элюированных и связанных с МДС ДНПК разделяли с помощью диск-электрофореза, переносили на нитроцеллюлозную мембрану и окрашивали коллоидным серебром.

2 (б) Эффективности элюции ^{32}P -меченной ДНК в составе ДНПК. Данные трех независимых экспериментов представлены как среднее значение [373].

Было показано, что в составе выделенных ДНПК преобладает дцДНК размером более 4 т.п.н., причем асс-ФЭ ДНК более высокомолекулярная, чем внДНК плазмы (рисунок 18) [373]. Полученные результаты согласуются с полученными ранее результатами по характеристике внДНК плазмы и асс-ФЭ ДНК в разделе 3.1.

Установлено, что в состав ДНПК, циркулирующих в крови Здж и больных РМЖ, входят белки с молекулярной массой от 12 до 200 кДа, с преобладающими мажорными компонентами 40-70 кДа (рисунок 19) [373]. Различный спектр белков в составе ДНПК в норме и при РМЖ может указывать на различные механизмы формирования данных комплексов, что в свою очередь демонстрирует, что на концентрацию внДНК и в том числе внДНК в крови онкологических больных влияет не только активность гидролаз, но и репертуар белков ДНПК [409].

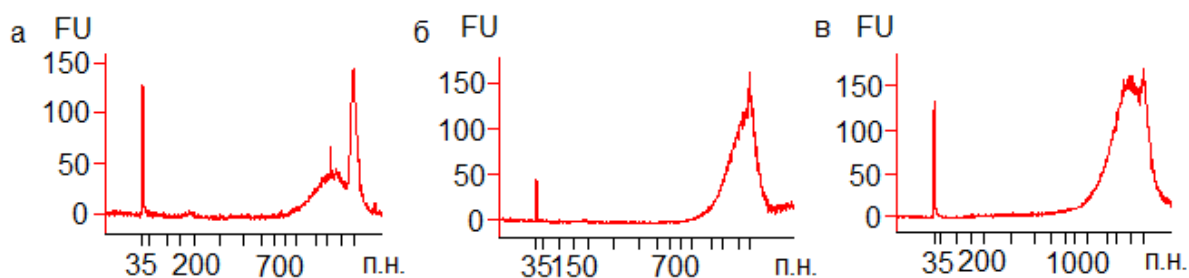


Рисунок 18 — Электрофореграмма ДНК в составе ДНПК, полученных из пулированных образцов крови (n = 15)

Примечания: Для оценки размера ДНК использован коммерческий набор High Sensitivity DNA Kit и прибор «Agilent 2100 Bioanalyzer»:

- 1 (А) ДНК из ДНПК плазмы; (Б) ДНК из ДНПК ФБ-ЭДТА элюата;
- 2 (В) ДНК из ДНПК трипсинового элюата [373].

В пилотном эксперименте была проведена идентификация белков в составе ДНПК, связанных с поверхностью ФЭ крови Здж. Идентифицированные с высокой достоверностью методом MALDI-TOF масс-спектрометрии мажорные белки в составе ДНПК представлены в таблице 11. Выявленный в составе ДНПК ЧСА подтверждает литературные данные [181]. В частности, для данного белка ранее была определена Kd комплекса олигонуклеотид-ЧСА, которая составила 2×10^{-5} М [170, 410]. Поскольку ЧСА не

является мембранным белком, вполне вероятно, что он взаимодействует с клеткой через экспонированные на ее поверхности рецепторы к альбумину [411, 412].

Полученные данные показали, что разработанный метод выделения нативных ДНПК крови сорбцией на МДС может быть использован для исследования репертуара белков в составе ДНПК, изучения транспорта внДНК в кровотоке и поиска новых протеомных маркеров заболеваний, характеризующихся повышенным уровнем внДНК в крови. Однако поскольку половина нативных ДНПК оставалась необратимо связанной с поверхностью МДС, был разработан принципиально другой метод выделения подобных комплексов — за белковую составляющую.

Известно, что клеточная интернализация внДНК и последующее инициирование биологических путей происходят благодаря участию нескольких ДНК-связывающих белков, включая гистоны [26, 413]. Показано, что HMGB1 и RAGE, связывающие нуклеосомы, влияют на иммуностимулирующие эффекты как внДНК, так и нуклеосом [414-415]. В 2005 г. была выдвинута гипотеза, что внДНК, содержащая онкоген, может вести себя как онковирус и трансфицировать нормальные клетки, что приводит к метастазированию [205].

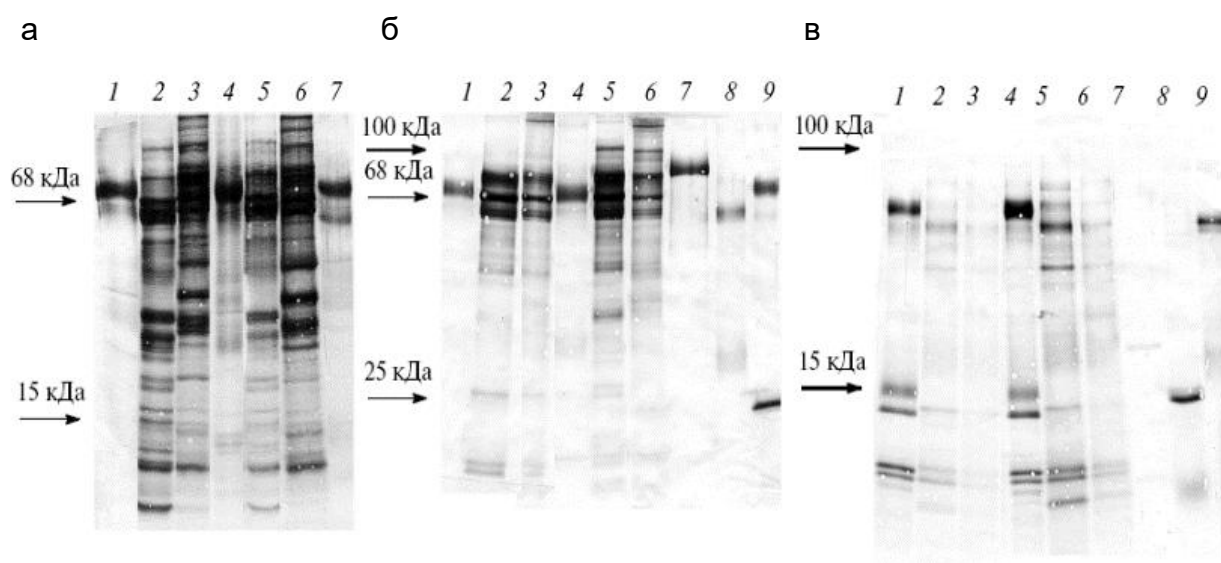


Рисунок 19 — Анализ белков ДНПК плазмы крови и асс-ФЭ ДНПК ЗдЖ и больной РМЖ

Примечания: Белки разделяли с помощью 10–20% SDS-электрофореза, переносили на нитроцеллюлозную мембрану и окрашивали коллоидным серебром.

1 (а) Плазма: 1 — исходные белки ЗдЖ (разведение 1 : 500); 2 —элюированные с МДС ДНПК ЗдЖ; 3 — связанные с МДС ДНПК ЗдЖ; 4 — исходные белки больной РМЖ

(разведение 1 : 500); 5 — элюированные с МДС ДНПК больной РМЖ; 6 — связанные с МДС ДНПК больной РМЖ; 7 — БСА;

2 (б) ФБ-ЭДТА элюат: 1 — исходные белки ЗдЖ (разведение 1 : 50); 2 — элюированные с МДС ДНПК ЗдЖ; 3 — связанные с МДС ДНПК ЗдЖ; 4 — исходные белки больной РМЖ (разведение 1 : 50); 5 — элюированные с МДС ДНПК больной РМЖ; 6 — связанные с МДС ДНПК больной РМЖ; 7 — лактоферрин; 8 — человеческие суммарные иммуноглобулины класса G; 9 — БСА и миоглобин.

3 (в) Трипсиновый элюат: 1 — исходные белки ЗдЖ (разведение 1 : 10); 2 — элюированные с МДС ДНПК ЗдЖ; 3 — связанные с МДС ДНПК ЗдЖ; 4 — исходные белки больной РМЖ (разведение 1 : 10); 5 — элюированные с МДС ДНПК больной РМЖ; 6 — связанные с МДС ДНПК больной РМЖ; 7 — трипсин; 8 — ингибитор трипсина; 9 — суммарные иммуноглобулины класса G человека [373].

Через 13 лет было показано, что клетки рака легких в ответ на химиотерапию секретируют нуклеосомы, содержащие в своем составе HMGB1, которые в свою очередь опосредуют инвазию опухоли и метастазирование через TLR4 и TLR9 [235]. Кроме того, было продемонстрировано способность нуклеосом образовывать комплексы с гепарин-связывающими ангиогенными факторами (FGF-1, FGF-2, VEGF и TGF β -1), что приводило к стимуляции ангиогенеза как *in vitro*, так и *in vivo* [417]. Также было показано, что добавление нуклеосом способствует усилению экспрессии IL-8 — одного из участников ранних стадий ангиогенеза [418]. Эти данные могут объяснить, почему гипоксические и гиперваскуляризированные области часто обнаруживаются в непосредственной близости в опухолевых тканях, и указывают на потенциальную роль нуклеосом в развитии прогрессирования заболевания [18].

Таблица 11 — Мажорные белки в составе асс-ФЭ ДНПК ЗдЖ

№	Название белка	score	Мол. вес, кДа
1	Гистидин-богатый гликопротеин	90	59,541
2	Гаптоглобин	74	45,177
3	Комплемент C3	72	187,030
4	Сывороточный альбумин	72	69,321
5	Комплемент C3	70	188,948
6	Комплемент C3	70	187,030
7	Гемоглобин	70	16,130
8	Аполипопротеин	60	30,759
9	Фибриноген	57	51,479

В то же время до сих пор неясно, какие белки, кроме гистонов, входят в состав циркулирующих ДНПК. В связи с вышеизложенным, для выделения из крови нативных гистон-содержащих ДНПК использовали аффинную хроматографию с иммобилизованными антителами против суммарных гистонов.

На первом этапе с помощью коммерческих наборов ELISA Kit for Histone H2B и ELISA Kit for Histone H4 была определена концентрация гистонов H2B и H4 в крови ЗдЖ ($n = 15$) и больных РМЖ ($n = 29$, таблица 12).

Оба набора обладали точностью более 90 % и чувствительностью 0,124 нг/мл при определении концентрации гистона H2B, 0,056 нг/мл — при определении концентрации гистона H4. Показано, что концентрация гистона H4 в проанализированных образцах плазмы крови была ниже чувствительности метода, что может объясняться тем, что данный гистон в структуре ДНПК недоступен для связывания антителами. При этом гистон H2a выявлен в 60% образцов плазмы крови ЗдЖ и 80 % образцов больных РМЖ. Сравнительный анализ показал, что в плазме крови онкологических больных концентрация данного гистона статистически значимо выше, чем в контрольной группе (медианы 498 и 149,2 пг/мл, соответственно, U-критерий Манна-Уитни, $p = 0,039$, рисунок 20а), что согласуется с литературными данными [419-421]. Поскольку гистон H2a является частью циркулирующих ДНПК и известно, что концентрация вДНК в крови онкологических больных достоверно возрастает по сравнению со здоровыми донорами, теоретически предсказанное повышение концентрации гистона H2a как компонента ДНПК подтверждено методом ИФА.

Таблица 12 — Клинико-патологическая характеристика больных люминальным РМЖ

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

У первичных больных РМЖ и ЗдЖ также была оценена концентрация вДНК в плазме крови методом ПЦР (с использованием последовательности *LINE-1*). Было

выявлено статистически значимое увеличение концентрации у онкологических больных по сравнению со Здж (медианы 29 и 8 нг/мл, соответственно, U-критерий Манна-Уитни, $p = 0,00008$, рисунок 20б), что согласуется с литературными данными [394, 422].

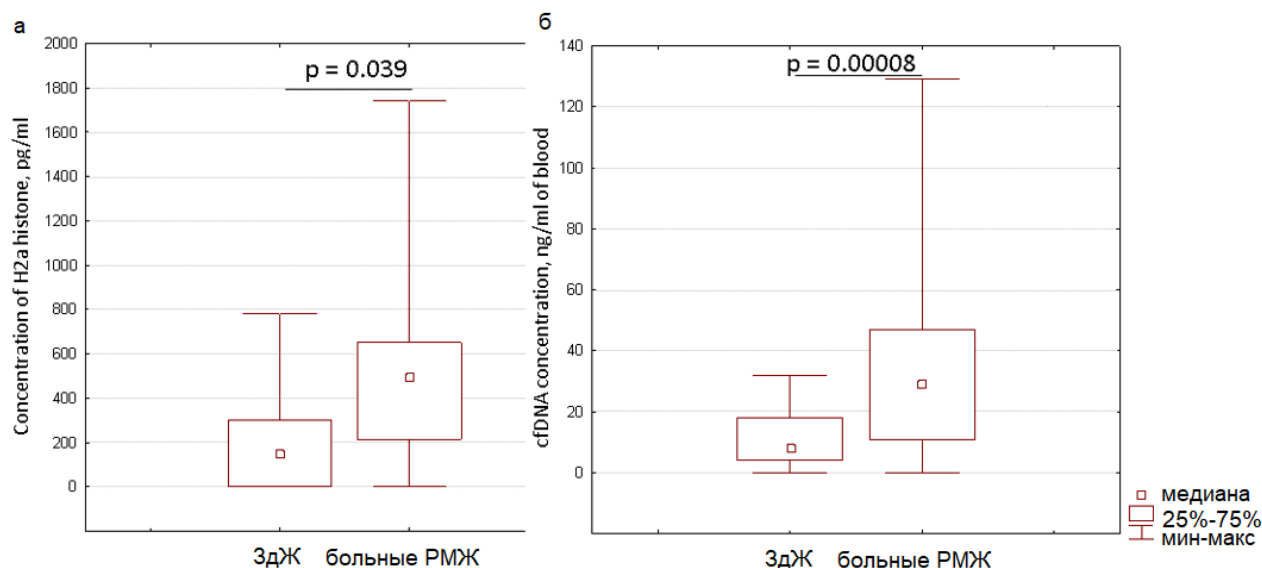


Рисунок 20 — Концентрация гистона H2a (а) и вДНК (б) в плазме крови Здж и больных РМЖ

Таким образом, гистон H2a входит в состав ДНПК крови и в данной работе было показано, что в крови больных РМЖ повышается как концентрация вДНК, так и концентрация гистона H2a. Полученные результаты подтверждают литературные данные о корреляции концентрации вДНК в сыворотке крови больных РМЖ с концентрацией в крови нуклеосом ($r = 0,327$, $p = 0,001$) [24]. Помимо онкологических заболеваний, повышенная концентрация нуклеосом и вДНК в плазме и сыворотке крови наблюдается при травмах и сепсисе [423]. Поскольку белки в составе ДНПК в крови могут участвовать в опсонизации/десопсонизации вДНК и быть частью регуляторного механизма поддержания вДНК в циркуляции, сравнительный анализ белков в нуклеосомах, циркулирующих в крови здоровых доноров и онкологических больных, может позволить расширить фундаментальные знания о механизмах пролиферации опухолей и выявить перспективные протеомные маркеры для «жидкостной биопсии».

В полученном препаративном препарате гистонов из лейкоцитов человека с помощью ИФА было подтверждено наличие гистонов H1, H2a, H2в и H3, а с помощью диск-электрофореза — их характерный молекулярный вес (от 11 до 23 кДа, рисунок 21).

В результате иммунизации суммарным препаратом гистонов кроликов породы Шиншилла по стандартной схеме были получены антисыворотки и в них определен титр

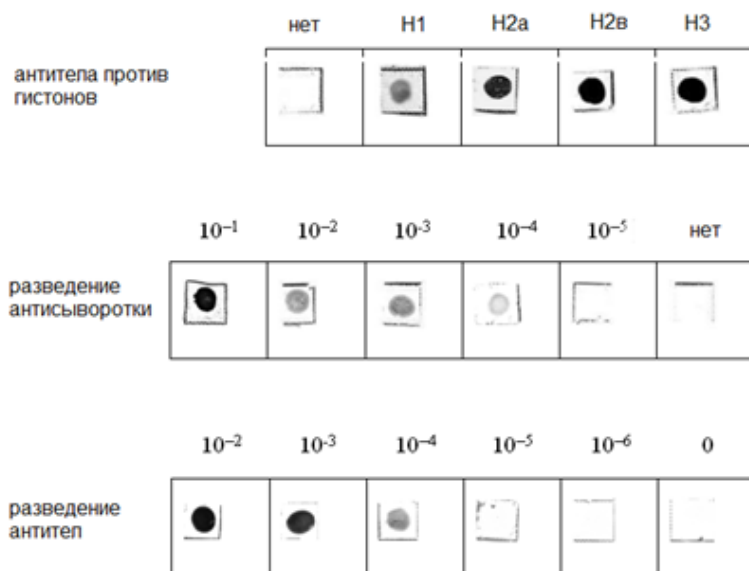
кроличьих антител против гистонов человека (рисунок 21). Препарат гистонов также был использован для синтеза аффинного сорбента с целью очистки анти-гистоновых антител (рисунок 21).

Для выделения нативных ДНПК за гистоновый компонент был синтезирован сорбент с иммобилизованными кроличьими анти-гистоновыми антителами и с помощью аффинной хроматографии из плазмы крови ЗДЖ (n=15; 30–65 лет) и первичных больных люминальным РМЖ (n=20; T1-2N0M0; 46–60 лет, таблица 12) получены ДНК-белковые комплексы.

Наличие ДНК в составе выделенных данным методом ДНПК, подтверждали с помощью капиллярного электрофореза. Было установлено, что в составе гистон-содержащие ДНПК плазмы крови ЗДЖ содержали больше коротких фрагментов (170-180 п.н.), чем ДНПК больных РМЖ (рисунок 22).

Было показано, что доля ДНК в ДНПК от вДНК в плазме крови ЗДЖ и больных РМЖ существенно не различалась (медиана составила 26 % и 30 %, соответственно, $p = 0,655$, U-тест Манна-Уитни) (рисунок 23а), как и доля белка в гистон-содержащих ДНПК от общего белка плазмы крови (медиана составила 3,00 % и 3,05 %, соответственно, $p = 0,521$, U-тест Манна-Уитни) (рисунок 23б).

а



б

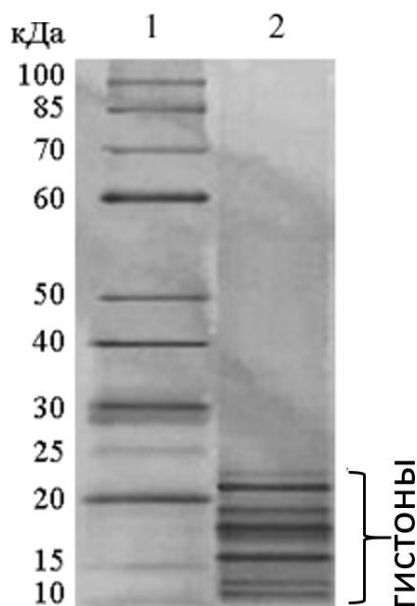


Рисунок 21 — Характеризация суммарного препарата гистонов и кроличьих антител против гистонов

Примечания:

1 (а) ИФА: На нитроцеллюлозу сорбировали 0,25 мкг гистонов, инкубировали с антителами против гистонов, кроличьей антисывороткой либо аффинно-очищенными антителами и

затем инкубировали с конъюгатом козьих антикроличьих антител, конъюгированных с пероксидазой хрена. Образующиеся комплексы антиген-антитело визуализировали с помощью 4-хлор-1-нафтола;

2 (б) После разделения гистонов диск-электрофорезом и переноса на нитроцеллюлозную мембрану, белки окрашены коллоидным серебром. 1 — белковый маркер молекулярной массы PageRulerSM-0661; 2 — препарат гистонов.

Сравнительный анализ репертуара мажорных белков в составе гистон-содержащих ДНПК плазмы крови Здж и больных РМЖ методом диск-электрофореза не выявил различий в белковом спектре (рисунок 24). Для оценки неспецифического выделения ДНПК методом аффинной хроматографии на сорбенте с иммобилизованными суммарными антителами кролика были получены препараты белков из плазмы крови Здж. С помощью диск-электрофореза было показано, что количество белка в таком образце значительно ниже, чем в ДНПК и содержит мажорные белки с молекулярными массами, соответствующими ЧСА (67 кДа), тяжёлым (~ 53 кДа) и лёгким (~ 23 кДа) цепям иммуноглобулинов (рисунок 24).

Таким образом, выделение нативных ДНК-белковых комплексов на аффинном сорбенте с иммобилизованными гистонами может быть использовано для получения информации об изменении белкового репертуара ДНПК при развитии злокачественных новообразований.

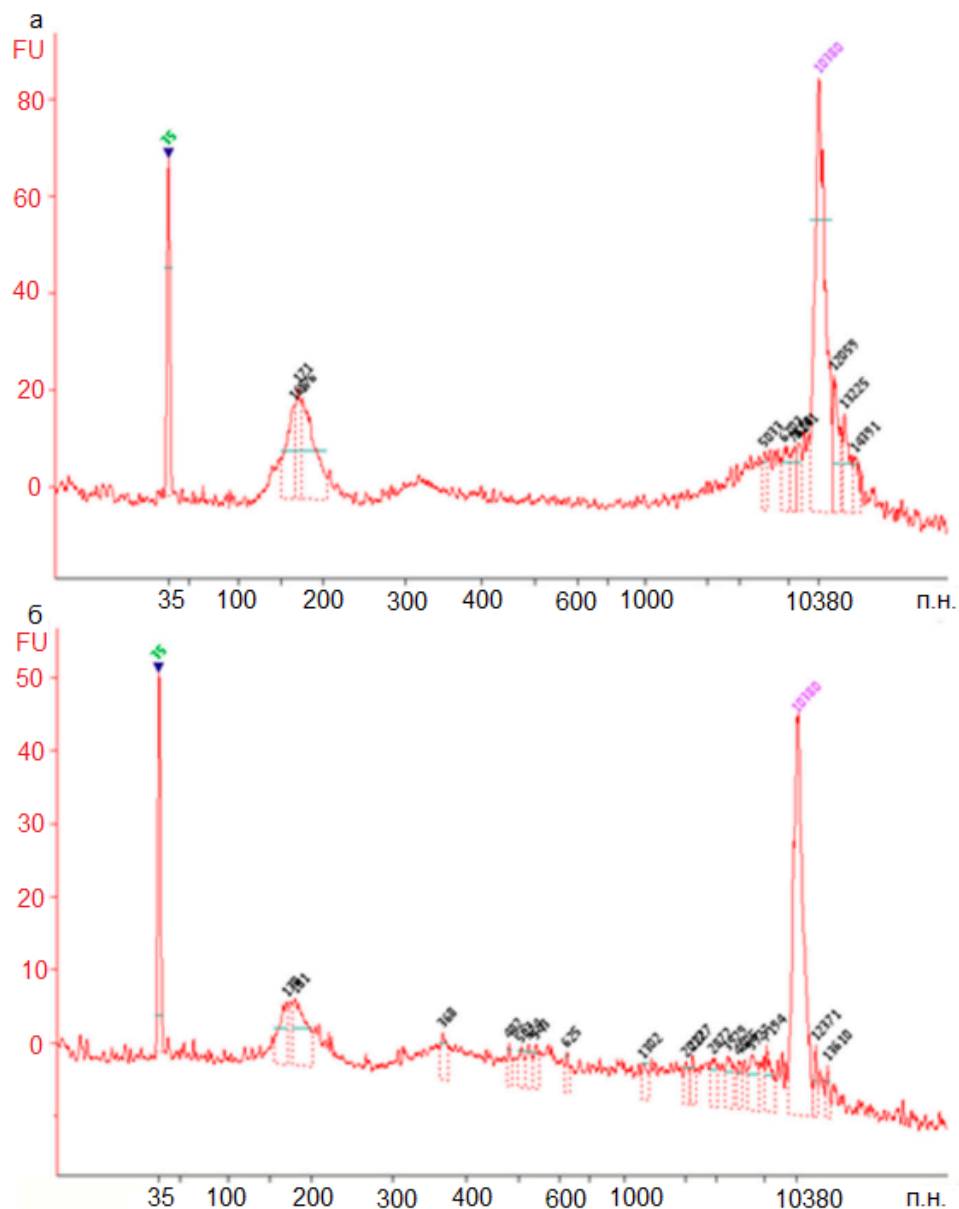


Рисунок 22 — Электрофореграммы ДНК в составе ДНПК, полученных из пулированных образцов крови ЗдЖ и индивидуального образца больной РМЖ. Для оценки размера ДНК использован коммерческий набор High Sensitivity DNA Kit и прибор «Agilent 2100 Bioanalyzer»: (а) ДНК из ДНПК плазмы ЗдЖ; (б) ДНК из ДНПК плазмы больной РМЖ. Стрелками указаны положения маркеров длиной 35 и 10380 п.н.

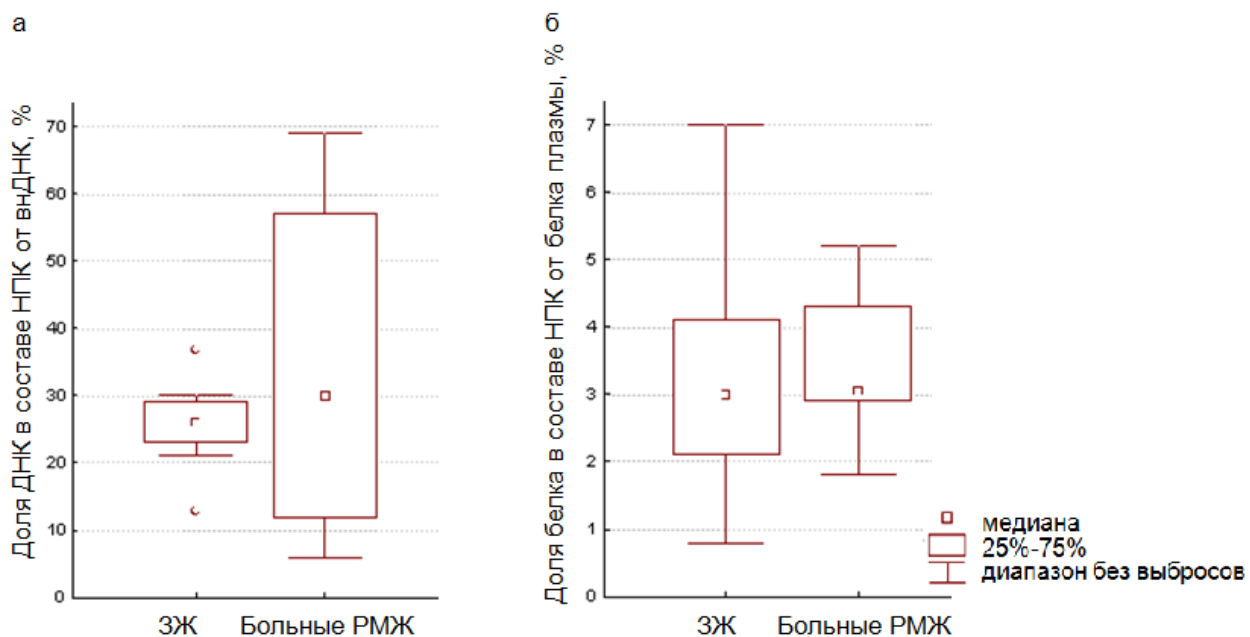


Рисунок 23 — Характеризация ДНПК плазмы крови Здж (n = 15) и больных РМЖ (n = 20) по нуклеиновой и белковой компонентам: доля ДНК в составе ДНПК от содержания внДНК (а); доля белка в составе ДНПК от содержания общего белка (б)

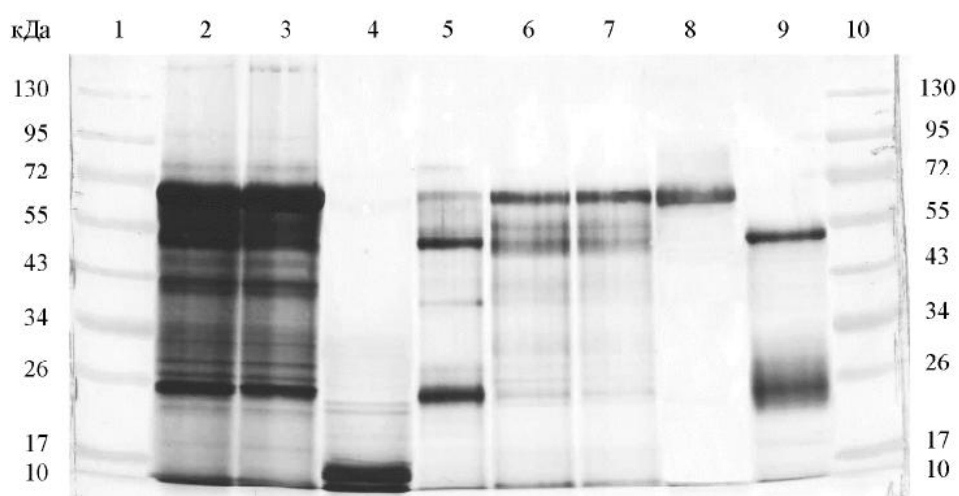


Рисунок 24 — Анализ нативных ДНПК из плазмы крови методом диск-электрофореза в 10–20% ПААГ

Примечания:

1 Перенесенные на нитроцеллюлозную мембрану белки окрашены коллоидным серебром.
 1, 10 – белковый маркер молекулярной массы PageRulerSM-0671; 2 – гистон-содержащие ДНПК Здж; 3 – гистон-содержащие ДНПК больной РМЖ; 4 — суммарный препарат гистонов; 5 – неспецифически связывающиеся с кроличьим суммарным иммуноглобулином

белки плазмы ЗдЖ; 6 – белки плазмы крови ЗдЖ (разведение 1:500); 7 – белки плазмы крови ЗдЖ (разведение 1:700); 8 — ЧСА; 9 – суммарный иммуноглобулин кролика.

3.3.2 Идентификация и анализ белков в составе нативных ДНПК крови ЗдЖ и первичных больных РМЖ

Для идентификации белков в составе нативных ДНПК в норме и при РМЖ, полученных аффинной хроматографией, ДНК-белковые комплексы наносили в пяти повторях и разделяли SDS-диск-электрофорезом. После гидролиза белков в геле трипсином и обессоливания, пептиды идентифицировали методом MALDI-TOF масс-спектрометрии. В дальнейший анализ брали белки, идентифицированные со score не менее 56 и наличием не менее трех пептидов в последовательности. Также из протеомного анализа гистон-содержащих ДНПК были исключены гиперпредставленные гистоны (H1t; H1.0; H2A типы: 1A, 1C, 2C, H2A.J; H2B типы: 1B, 1L, 1N, 3B, WT; Core histone macroH2A.1) (в связи высокий содержание в гистонах лизина тринсинолиз приводил к слишком коротким пептидам), а также ЧСА (альбумин присутствует в плазме крови в высокой концентрации и образует неспецифические комплексы с иммуноглобулинами [424]). В результате с высокой достоверностью ($p < 0,05$) было в составе ДНПК было идентифицировано 177 белков у ЗдЖ ($n = 15$) и 169 белков у первичных больных РМЖ ($n = 20$, таблица 12) (Приложения 1, 2).

Количество белков, выявленных как в составе ДНПК плазмы крови ЗдЖ, так и больных РМЖ, составило 38 (Приложения 1, 2), из них 12 — идентифицированы в $\frac{3}{4}$ образцов (Приложение 3). Из 308 идентифицированных в ДНПК белков поиск в базе данных ExoCarta выявил четыре белка (MIL1 (UniProt ID Q9BXK5), COPS9 (UniProt ID Q9BX79), HAND1 (UniProt ID O96004) и TCP1 (UniProt ID Q99832)), что косвенно подтверждает отсутствие примесных белков в образцах аффинно-очищенных ДНПК.

Затем с помощью веб-инструмента STRING была построена сеть белок-белковых взаимодействий для 38 универсальных белков ДНПК (рисунок 25). Было обнаружено, что GUCY1A3, MYL12A, MYL9, KRIT1, APBB1P, RALA, MAP3K14 и SPG7 демонстрируют наибольшее число белок-белковых взаимодействий.

Среди идентифицированных белков ДНПК плазмы крови впервые был выявлен CFHR2 (Complement factor H-related protein 1). Данный белок встречался как в норме, так и при РМЖ и, связываясь с вДНК, увеличивал длительность циркуляции ДНПК по механизму конкурентного ингибирования, не позволяя связаться с вДНК фактору Н, который с нейтральной ДНКазой участвует в гидролизе нуклеиновой кислоты [425-428].

Помимо CFHR2, в составе ДНПК плазмы крови ЗдЖ методом масс-спектрометрии были выявлены белки H2AJ и HAT1. Известно, что эти белки также увеличивают время жизни вДНК путем снижения скорости поглощения ДНПК гепатоцитами [429].

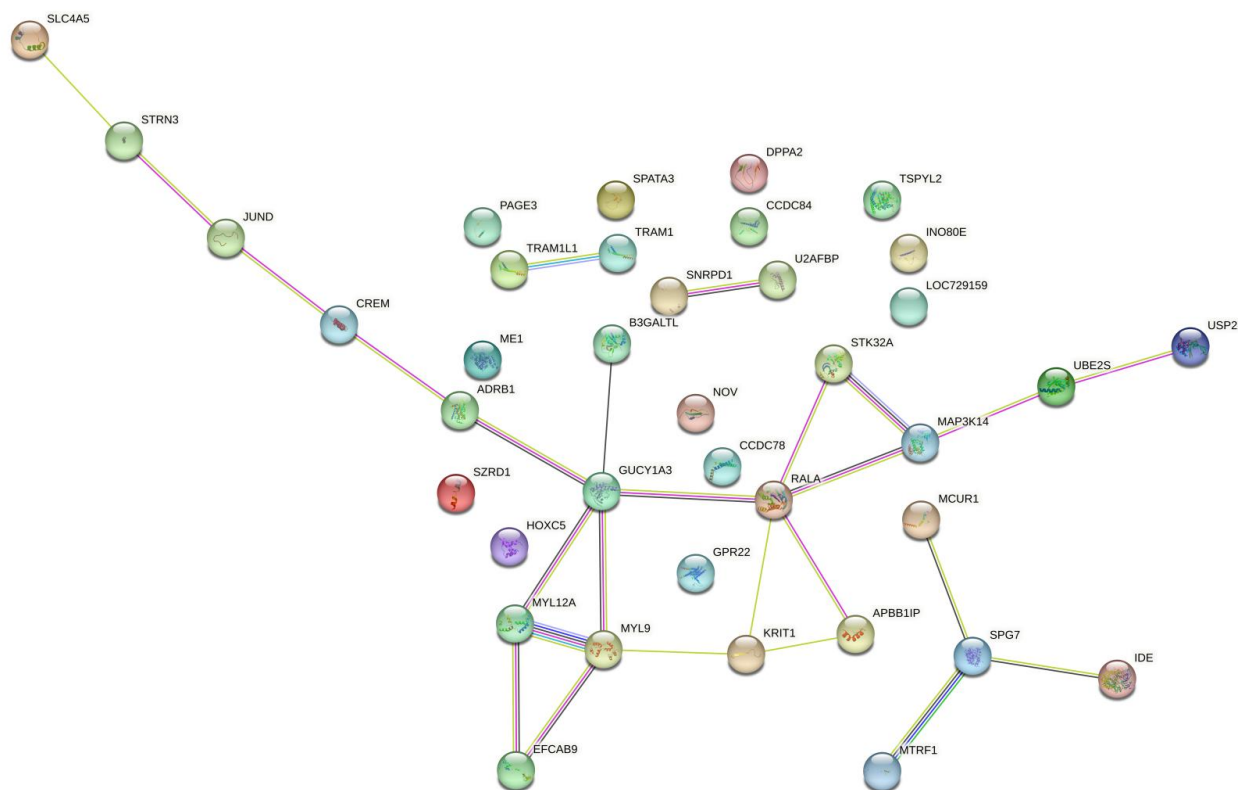


Рисунок 25 — Сеть белок-белковых взаимодействий 38 белков в составе ДНПК, универсальных как для ЗдЖ, так и для больных РМЖ. Сеть построена с помощью ПО STRING (<http://string-db.org/>, дата обращения: 1 марта 2023 г.) со следующими настройками: минимальная оценка взаимодействия: высокая достоверность (0,700); источники активных взаимодействий: эксперименты, базы данных, коэкспрессия, геновое функционирование, совместная встречаемость

Для идентификации категории IPR и GO идентифицированных белков в составе ДНПК использовали базы данных InterPro и InterProScan версий 5.15-58 и 5.15-54 [430, 431] (Приложения 4, 5, изоформы не приведены). В результате биоинформатического анализа были получены списки терминов в Генной онтологии для «Клеточных компонентов» (Cellular Components, $n = 36$), «Молекулярных функций» (Molecular Functions, $n = 125$) и «Биологических процессов» (Biological Processes, $n = 106$) (Приложения 6-8). Белки с неустановленными терминами приведены в Приложении 9.

Биоинформатический анализ универсальных белков для нормы и РМЖ в составе ДНПК в GO «Клеточные компоненты» выявил, что мембранные белки составляют более половины (57,8 %), что косвенно свидетельствует о связывании ДНПК с плазматической

мембраной через белковую составляющую, что, вероятно является необходимым условием для проникновения вДНК в клетку. Поскольку внеклеточные белки в составе ДНПК составляет менее 5 %, можно предположить, что в циркуляцию попадают уже сформированные ДНК-белковые комплексы (рисунок 26а).

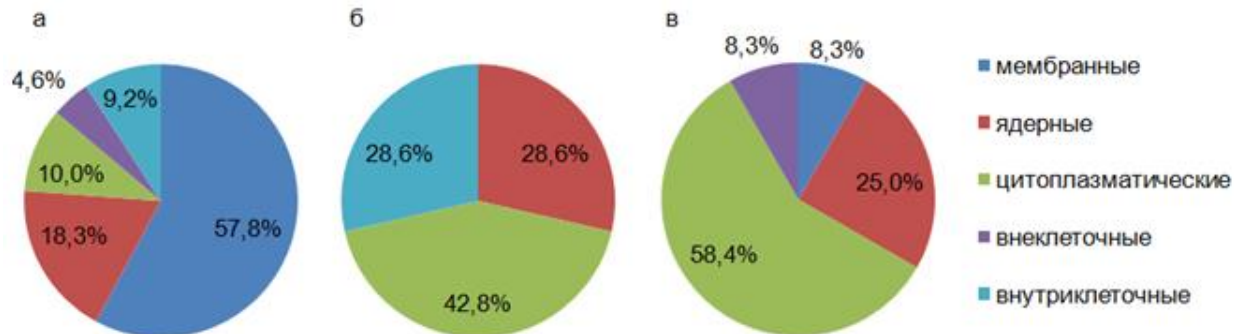


Рисунок 26 — Биоинформатический анализ белков в составе ДНПК в категории Генной онтологии «Клеточные компоненты»: универсальные белки (а), уникальные белки ЗдЖ (б), уникальные белки больных РМЖ (в)

Среди уникальных для ЗдЖ белков в составе ДНПК преобладали цитоплазматические белки (42,8 %), а внутриклеточные и ядерные белки были равно представлены (по 28,6 %) (рисунок 26б). Среди уникальных для РМЖ белков в составе ДНПК возрастает по сравнению с нормой доля цитоплазматических белков (до 58,4 %), при этом сопоставимо представлены ядерные белки (25 %) и отсутствуют внутриклеточные белки (рисунок 26в).

Биоинформатический анализ универсальных белков для нормы и РМЖ в составе ДНПК в GO «Молекулярные функции» выявил, что наиболее представленными являются белки, связывающие нуклеиновые кислоты и нуклеотиды (22,4 %). Кроме того, представлены белки, связывающие белки (16,8 %) и ионы металлов (16 %) (рисунок 27а). Полученные данные позволяют предположить наличие мотива «цинковые пальцы» в составе ДНК-связывающих белков. Более того, наличие в составе ДНПК белков, не способных связывать ДНК и способных связывать белки указывает на факт наличия «пассажира» в нативных ДНК-белковых комплексах, циркулирующих в крови.

Среди уникальных как для ЗдЖ, так и для больных РМЖ белков в составе ДНПК преобладали белки, обладающие каталитической активностью (52,2 % и 48,7 %, соответственно), ДНК/РНК/нуклеотид-связывающие белки (21,7 % и 10,3 %, соответственно), а также белки, регулирующие активность рецепторов (10,9 % и 10,3 %, соответственно) (рисунки 27 б, в). Кроме того, при РМЖ в составе ДНПК значительно

возрастает доля белков-участников ионных каналов и белков, связывающих белки (рисунок 27в).

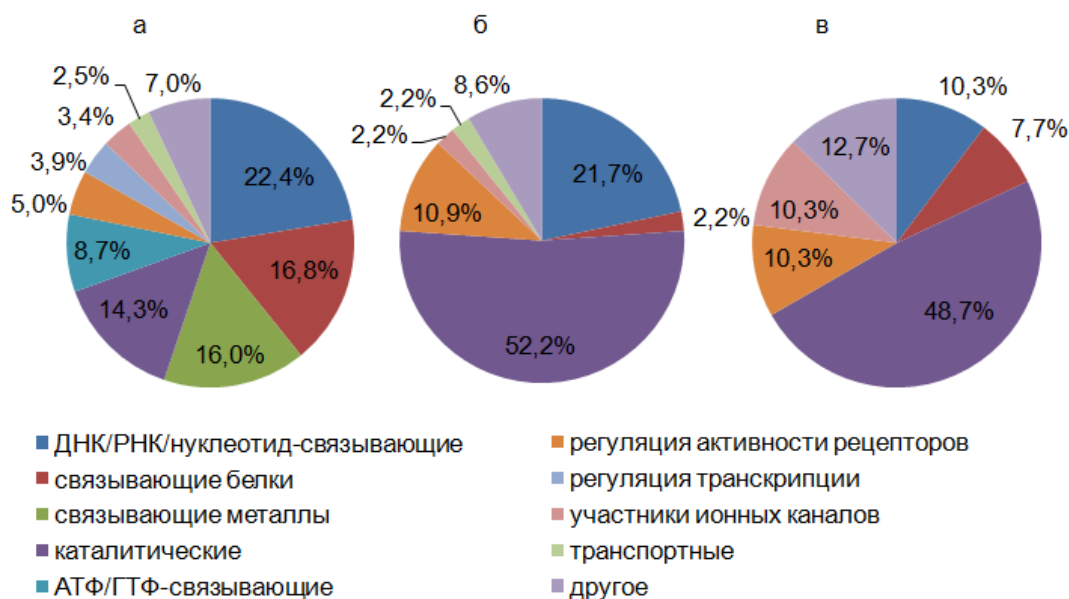


Рисунок 27 — Биоинформатический анализ белков в составе ДНПК в категории Генной онтологии «Молекулярные функции»: универсальные белки (а), уникальные белки ЗдЖ (б), уникальные белки больных РМЖ (в)

Биоинформатический анализ универсальных белков для нормы и РМЖ в составе ДНПК в GO «Биологический процесс» выявил, что наиболее представленными являются белки, вовлеченные в передачу сигналов (22,6 %). Кроме того, достаточно представлены белки, вовлеченные в транспорт (18,9 %), катализ реакций (17,1 %), а также регуляцию транскрипции (14,6 %) (рисунок 28а). У больных РМЖ по сравнению со ЗдЖ в составе ДНПК возростала доля белков, участвующих в транспорте (с 6,4 % до 14,8 %) и передаче сигналов (с 4,3 % до 14,8 %), (рисунки 28б, в), что может косвенно объяснять причину повышения концентрации вДНК в крови при развитии злокачественных новообразований [380].

Для разделения белков в составе ДНПК на непосредственно связывающие нуклеиновую кислоту и белки-«пассажиры», был проведен биоинформатический анализ с использованием QuickGO 2.0 по GO «связывание нуклеиновых кислот» (nucleic acid binding, GO:0003676) и «связывание нуклеотидов» (nucleotide binding, GO:0000166). Было показано, что 118 белков (37 %) ассоциированы со связыванием нуклеиновых кислот и нуклеотидов, из них 20 были универсальными (47 % от всех универсальных белков ДНПК). Доля белков, связывающих нуклеиновые кислоты в составе ДНПК крови ЗдЖ составила 41 %, в составе белков ДНПК крови больных РМЖ — 36 % (рисунок 29).

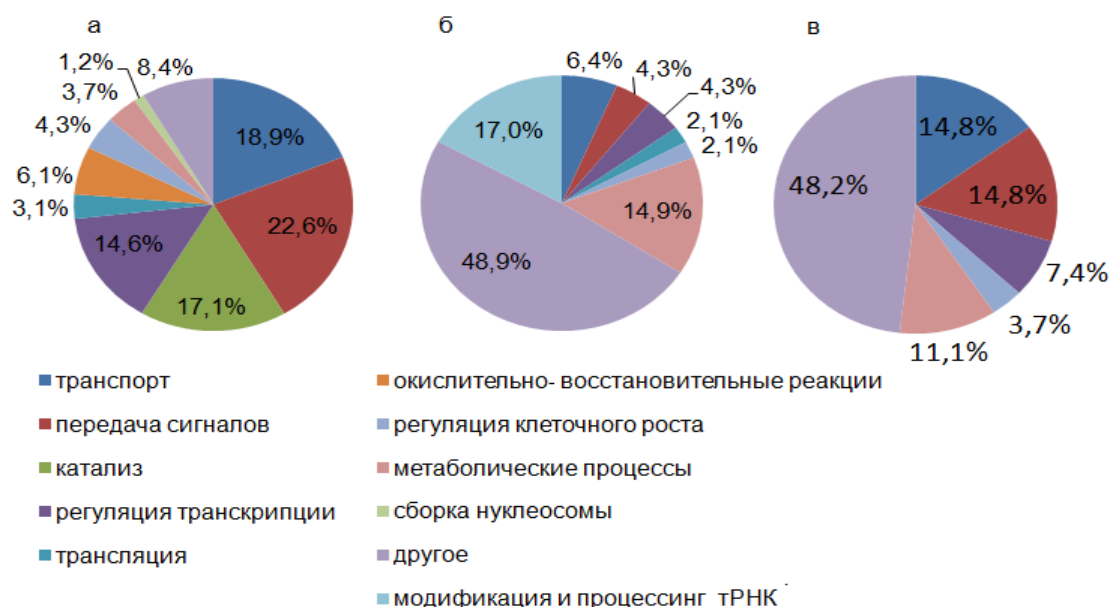


Рисунок 28 — Биоинформатический анализ белков в составе ДНПК в категории «Биологические процессы»: универсальные белки (а), уникальные белки ЗдЖ (б), уникальные белки больных РМЖ (в)

Для идентификации ДНК-связывающих доменов в выявленных белках связывающих нуклеиновые кислоты в составе ДНПК крови, полученные протеомы исследовали с помощью веб-платформы Interpro и БД Interpro (<https://www.ebi.ac.uk/interpro/>), PROSITE, Pfam (<http://pfam.xfam.org/>, обращение 20 марта 2024), SMART (<http://smart.embl-heidelberg.de/>, обращение 20 марта 2024) и CDD (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/cdd.shtml>, обращение 20 марта 2024) (таблица 13).



Рисунок 29 — Распределение белков, связывающих нуклеиновые кислоты в составе ДНПК плазмы крови ЗдЖ и больных РМЖ (диаграмма Венна-Эйлера получена с помощью QuickGO 2.0 и FunRich 3.13)

Таблица 13 — Мотивы, связывающие нуклеиновые кислоты в составе белков ДНПК плазмы крови ЗдЖ и больных РМЖ

Мотив, связывающий нуклеиновую кислоту	ДНПК плазмы крови (Gene Name)		
	Универсальные белки	Уникальные белки ЗдЖ	Уникальные белки 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/Z RSR1	ENOX2 MYEF2 REXO5
Homeobox domain	HOXC5	HOXA13 HOXB4 HOXC8	CDX2 HOXB9 POU5F1B UNCX
Zinc finger, CCCH-type	U2AF1	MKRN2 TRMT1 ZRSR2P1/Z RSR1	
Basic-leucine zipper (bZIP)	CREM JUND		CHST7 JUN
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

Продолжение Таблицы 13

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/H2AF J	
(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

Продолжение Таблицы 13

HTH CenpB-type DNA-binding domain			POGK
THAP-type zinc finger			THAP7
(Armadillo-type fold) Uncharacterised domain NUC173			RRP12
Zinc finger C4-type			LMCD1 TRIM68

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), мотив узнавания РНК, домены Гомеобокса, KRAB, петля-поворот-петля и лейциновые застёжки.

В составе белков ДНПК крови Здж было обнаружено 17 уникальных ДНК-связывающих мотивов, а у больных РМЖ — 9 уникальных ДНК-связывающих мотивов.

На основе базы данных парных белковых взаимодействий «Human Integrated Protein-Protein Interaction rEference» (HIPPIE version 2.3) [432] было проведено моделирование архитектуры возможных ДНПК на основе анализа белков, обнаруженных в крови Здж и больных РМЖ. Моделировались возможные цепочки, начинающиеся с ДНК-связывающего белка, за которым следовали один или несколько «пассажирских» белков. Учитывались только «линейные» структуры, где каждый последующий белок присоединяется к предыдущему: то есть первый белок-«пассажир» присоединяется к ДНК-связывающему белку, второй белок-«пассажир» присоединяется к первому белку-«пассажиру» и так далее. В результате было построено 23 модели возможных ДНПК, циркулирующих в крови Здж, и 25 моделей возможных ДНПК, циркулирующих в крови больных РМЖ (таблица 14). Следует отметить, что смоделированная цепочка, например, из 4 белков подразумевает возможность существования соответствующих подцепочек из 2 и из 3 белков, начиная с ДНК-связывающего белка, например, последовательность ALBU — NECD — RL5 — M3K14 подразумевает возможность существования подпоследовательностей ALBU — NECD — RL5 и ALBU — NECD. Таким образом, указаны только цепи максимальной длины, а 23 и 25 — это количество цепей максимальной длины.

Таблица 14 — Возможные ДНПК в крови ЗДЖ и больных РМЖ. Символические названия генов соответствуют смоделированным цепочкам. Цифрами обозначены Entrez Gene ID генов

ДНПК крови ЗДЖ		ДНПК крови больных РМЖ	
U2AF1 – SMD1	7307 – 6632	JUN – GOGA2 - STRN3	3725 – 2801 – 29966
UBP22 – MDM4	23326 – 4194	U2AF1 – SMD1	7307 – 6632
FCF1 – MAOX	51077 – 4199	PLAL2 – CTSR1 – VINEX	5326 – 117144 – 10174
U1SBP – RAB6A	11066 – 5870	GAS2L3 – BIRC5	283431 – 332
U1SBP – SERPH	11066 – 871	B2R5B3 – RM35	3014 – 51318
B2R5B3 – HAT1	3014 – 8520	B2R5B3 – RANG	3014 – 5905
SRSF5 – M3K14 – DNJB6	6430 – 9020 – 10049	B2R5B3 – BIRC5	3014 – 332
SRSF5 – RM47 – RU5D4	6430 – 57129 – 84881	H2BC21 – UBPI2	8349 – 219333
H2BC21 – RHG30	8349 – 257106	H32 – BIRC5	126961 – 332
H2BC21 – PRR12	8349 – 57479	H4 – NOL9	8370 – 79707
H4 – GLYC	8370 – 6470	H4 – SMD1	8370 – 6632
H4 – HAT1	8370 – 8520	H4 – CL043	8370 – 64897
H4 – SMD1	8370 – 6632	H4 – NAIF1	8370 – 203245
H4 – IN80E	8370 – 283899	H4 – SPAT5	8370 – 166378
H4 – PRR12	8370 – 57479	H4 – IN80E	8370 – 283899
H4 – LMNB2	8370 – 84823	H4 – RL5 – M3K14	8370 – 6125 – 9020
H4 – LC7L2	8370 – 51631	H4 – RL5 – NECD	8370 – 6125 – 4692
H4 – FKB11	8370 – 51303	H4 – NECD – RL5 – M3K14	8370 – 4692 – 6125 – 9020
H4 – INT9	8370 – 55756	H4 – RANG	8370 – 5905
ALBU – MDM4	213 – 4194	H4 – CSN2	8370 – 9318

Продолжение Таблицы 14

ALBU – THRB	213 – 2147	H4 – TRAM1	8370 – 23471
ALBU – QTRD1	213 – 79691	H4 – PNISR	8370 – 25957
ALBU – LC7L2	213 – 51631	H4 – ESYT2 – DJC25	8370 – 57488 – 548645
		ALBU – VINEX – CTSR1	213 – 10174 – 117144
		ALBU – NECD – RL5 – M3K14	213 – 4692 – 6125 – 9020

Для характеристики ДНК-связывающих белков и белков-«пассажилов», идентифицированных в составе циркулирующих в крови ДНПК, был проведен биоинформатический анализ с использованием баз данных InterPro и In-terProScan версий 5.15-58 и 5.15-54,24,25, позволивший определить категории GO для белков ДНПК ЗдЖ и больных РМЖ (изоформы не учитывались). Во избежание потерь информации и полного учета полученных данных, в анализ были включены все идентифицированные белки (даже если белок встречался только в одном образце). Были получены списки GO-терминов для 36 «клеточных компонентов» и 106 «биологических процессов». Для 12 белков термины GO не были определены для обеих категорий (клеточные компоненты и биологические процессы).

Путем сравнительного анализа функционального обогащения с помощью FunRich было показано, что как в норме, так и при злокачественных новообразованиях в ДНК-связывающих белках ДНПК наиболее представлены ядерные (61 % и 69 %, соответственно) и цитоплазматические белки (по 45 % и 48 %, соответственно) (рисунок 30).

Установлено, что представленность ДНК-связывающих белков в составе ДНПК, вовлеченных в процессы регуляции метаболизма нуклеиновых кислот, при РМЖ увеличивается (43 % у больных РМЖ и 34 % у ЗдЖ), а белков, вовлеченных в процессы межклеточной коммуникации и передачи сигналов — снижается (25 % и 27 % у ЗдЖ и по 17 % у больных РМЖ, соответственно) (рисунок 31).

В состав ДНПК кроме ДНК-связывающих белков также входят белки-«пассажиры» — не обладающие ДНК-связывающими свойствами. Тем не менее, информация о белках-«пассажирах» может быть полезна для понимания процессов формирования и строения ДНПК, а также их функций и особенностей циркуляции. С помощью биоинформатического анализа было установлено, что среди белков-«пассажилов» ДНПК как в норме, так и при злокачественных новообразованиях преобладали белки цитоплазмы (по 35 %),

плазматической мембраны и ядра (27 % и 28 %, и 25 % и 26 %, у ЗдЖ и больных РМЖ, соответственно) (рисунок 32).

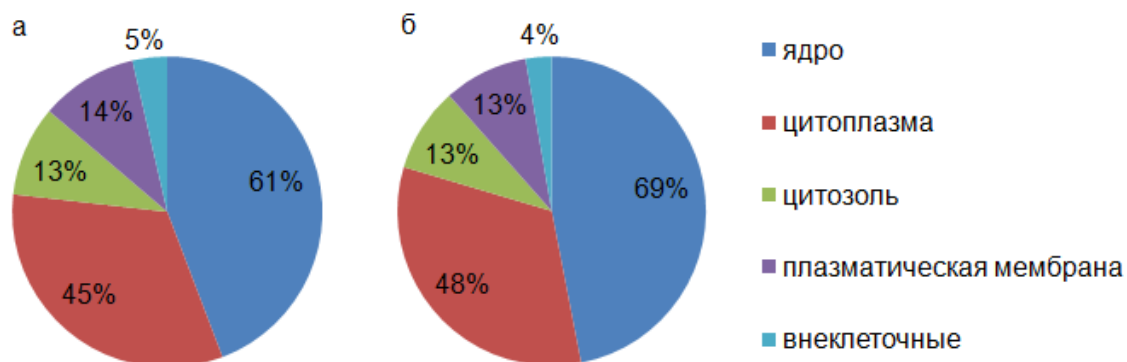


Рисунок 30 — Биоинформатический анализ ДНК-связывающих белков в составе ДНПК крови по клеточным компонентам: (а) ЗдЖ и (б) больные РМЖ

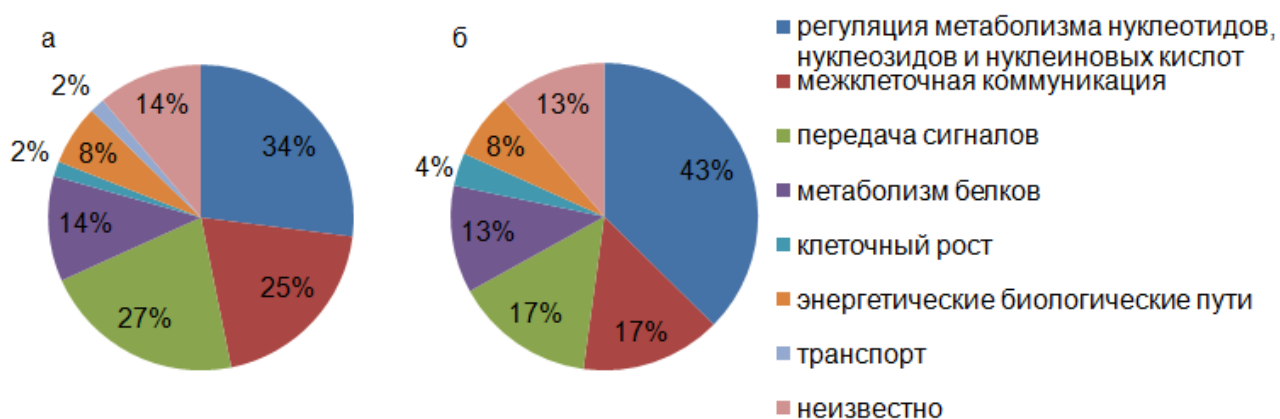


Рисунок 31 — Биоинформатический анализ ДНК-связывающих белков в составе ДНПК крови по биологическим процессам: (а) ЗдЖ и (б) больные РМЖ

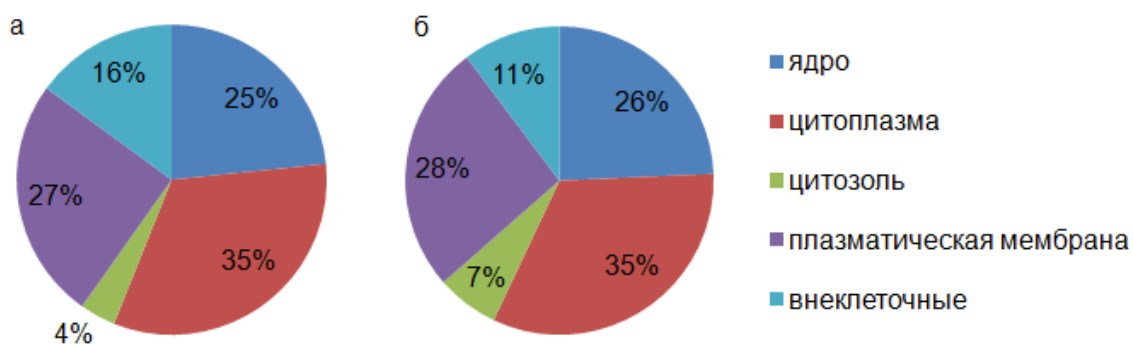


Рисунок 32 — Биоинформатический анализ белков-«пассажира» в составе ДНПК крови по клеточным компонентам: (а) ЗдЖ и (б) больные РМЖ

В составе белков-«пассажиров» ДНПК крови Здж и больных РМЖ белки, регулирующие межклеточную коммуникацию (20 % и 22 %, соответственно) и передачу сигналов (23 % и 24 %, соответственно) были представлены сопоставимо (рисунок 33).



Рисунок 33 — Биоинформатический анализ белков-«пассажиров» в составе ДНПК крови по биологическим процессам: (а) Здж и (б) больные РМЖ

В тоже время, при злокачественных новообразованиях представленность белков-«пассажиров», опосредующих энергетические пути, снижалась (16 % и 5 %, соответственно), а вовлеченных в процессы транспорта — увеличивалась (7 % и 12 %, соответственно).

Таким образом, в составе ДНПК помимо нуклеиновой кислоты присутствуют ДНК-связывающие белки, преимущественно ядерного и цитоплазматического происхождения, а также белки-«пассажиры», преимущественно ядерного и цитоплазматического происхождения, а также плазматической мембраны. Впервые показано, что в процессы регуляции метаболизма нуклеиновых кислот вовлечены преимущественно ДНК-связывающие белки ДНПК, а в процессы межклеточной коммуникации и передачи сигнала — белки-«пассажиры» ДНПК. Увеличение представленности белков-«пассажиров», вовлеченных в неизвестные биологические процессы, в составе ДНПК крови онкологических больных вероятно важно для транспорта и защиты вноДНК от действия нуклеаз, узнавания ДНПК иммунной системой, интернализации и клиренсе ДНПК.

Использование ДНК-связывающих белков в составе ДНПК крови больных с злокачественными новообразованиями позволит разработать подходы для обогащения вноДНК, что может увеличить чувствительность диагностических систем, разрабатываемых для «жидкостной биопсии», а выявление белков-«пассажиров» в

комбинации с анализом вноДНК позволит в дальнейшем улучшить мультимаркерные системы неинвазивной диагностики.

Анализ литературы и аннотаций QuickGO выявил участие как нормальных, так и опухоль-ассоциированных белков ДНПК в таких процессах, как ЭМП, клеточная пролиферация, инвазия, клеточная миграция, ангиогенез и иммунный ответ (рисунок 34, Приложение 10). Однако после разделения белков ДНПК на ДНК-связывающие и белки-«пассажиры» было обнаружено, что преимущественно последние являются участниками этих процессов.

Сравнительный анализ белков ДНПК, циркулирующих в крови Здж и больных РМЖ по отдельным процессам, выявил следующие закономерности:

- в ДНПК отсутствуют белки, ингибирующие ЭМП, однако при РМЖ выявлено увеличение количества белков, стимулирующих ЭМП (рисунок 34а);
- регулирующие ангиогенез белки выявлены только в составе белков-«пассажиров» ДНПК, причем в норме и при злокачественном новообразовании они представлены сопоставимо (рисунок 34б);
- регулирующие клеточную пролиферацию белки более представлены в составе белков-«пассажиров» ДНПК как в норме, так и при злокачественном новообразовании, при этом среди белков-«пассажиров» ДНПК крови Здж выявлено больше белков, ингибирующих этот процесс (рисунок 34в);
- ингибирующие клеточную миграцию белки сопоставимо представлены в составе ДНПК в норме и при злокачественном новообразовании, при этом стимулирующие этот процесс белки более представлены среди белков-«пассажиров» ДНПК крови больных РМЖ (рисунок 34г);
- в составе ДНПК отсутствуют ингибирующие инвазию белки, при этом стимулирующие этот процесс белки более представлены в составе белков-«пассажиров» ДНПК крови больных РМЖ (рисунок 34д);
- в составе пассажирских белков-«пассажиров» ДНПК крови больных РМЖ выявлено больше белков, участвующих в регуляции иммунного ответа, чем у Здж (рисунок 34е).

Таким образом, если представленность ДНК-связывающих белков в составе ДНПК крови в норме и при РМЖ сопоставима (за исключением ЭМП), то при патологии увеличивается представленность белков-«пассажиров», стимулирующих ангиогенез, пролиферацию, инвазию, миграцию клеток и регулирующих иммунный надзор. Полученные результаты косвенно свидетельствуют о том, что вноДНК обладает биологической активностью в норме и при патологии только в комплексе с белками.

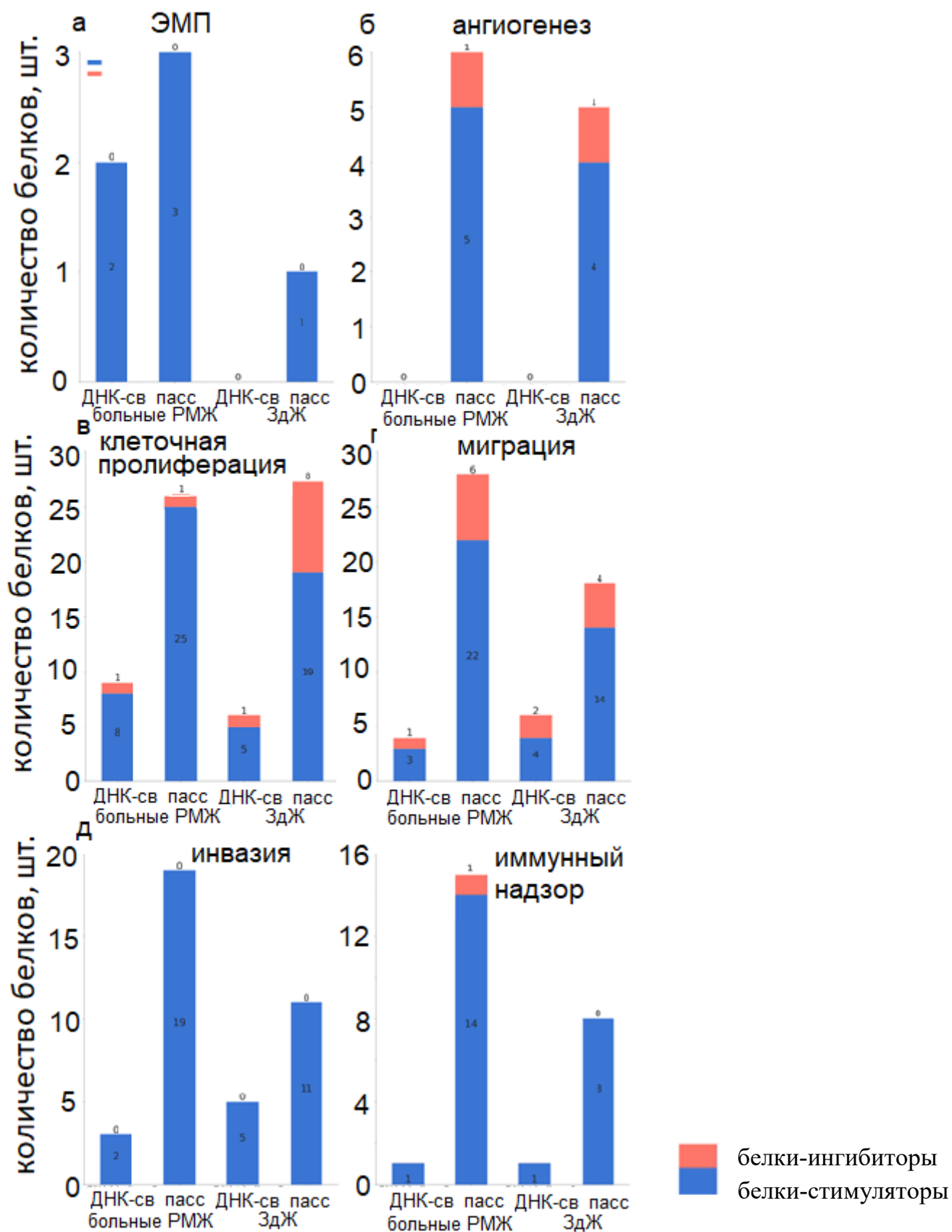


Рисунок 34 — Ассоциированные с канцерогенезом белки в составе ДНПК крови ЗДЖ и больных РМЖ: (а) ЭМП; (б) ангиогенез; (в) клеточная пролиферация; (г) миграция; (д) инвазия; (е) иммунный надзор

На следующем этапе для выявления белков, участвующих в механизмах появления внДНК в кровотоке (апоптоз, некроз, активная секреция), белки ДНПК из крови ЗдЖ и больных РМЖ были проанализированы с помощью QuickGO с использованием GO:00006915 (апоптотический процесс, GO:00006915) и GO:0070266 (некротический процесс, GO:0070266) и GO:0046903 (секреция, GO:0046903). Было показано, что 6 (RALB, RPS6KB1, OXTR, NOXA13, TRAF3, MAP3K5) и 3 (NAIF1, BIRC5, CASP1) уникальных белка в ДНПК связаны с апоптозом в крови ЗдЖ и больных РМЖ, соответственно (рисунок 35). Кроме того, в составе ДНПК ЗдЖ обнаружен один белок, связанный с некрозом (MLKL), и три белка, связанных с секрецией (SYT3, RALA, SLC4A5), что косвенно указывает на то, что в норме внДНК появляется в циркуляции преимущественно в результате запрограммированной гибели клеток. В составе ДНПК крови больных РМЖ не выявлены белки, участвующие в некротических процессах, однако 5 белков были связаны с активной секрецией (RALA, SLC4A5, VEGFA, SYT10, NEUROD1). Эти данные косвенно указывают на преобладание секретируемой ДНК над апоптотической ДНК в крови онкологических больных (рисунок 35).

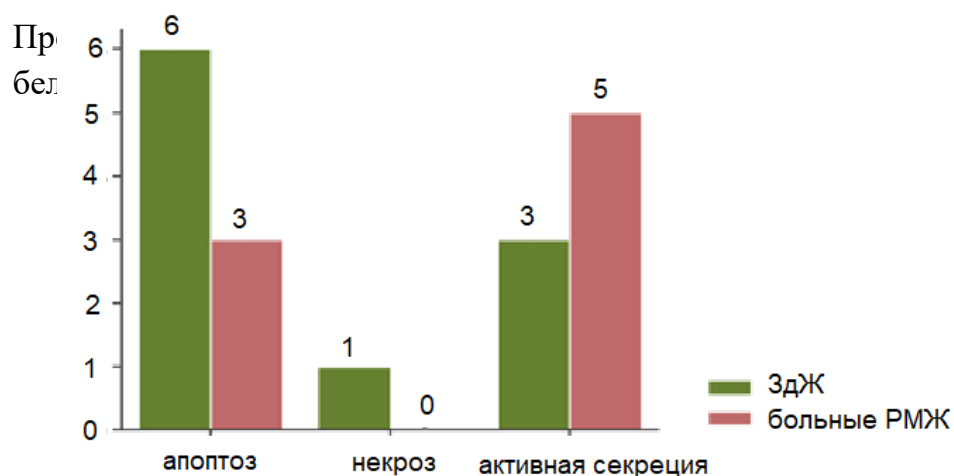


Рисунок 35 — Белки в составе ДНПК, циркулирующих в крови ЗдЖ и больных РМЖ, участвующие в апоптозе, некрозе и активной секреции

Из 16 белков в составе ДНПК, ассоциированных с апоптозом, некрозом или активной секрецией, только два белка были ДНК-связывающими (NOXA13 и NEUROD1), что еще раз указывает на высокую значимость белков-«пассажира» в ДНК-белковых комплексах.

Полученные данные косвенно указывают на направленную сортировку белков в ДНПК, которые, наряду с внеклеточными везикулами, могут осуществлять направленный перенос генетического материала от донорских клеток к клеткам-реципиентам.

3.4 Опухоль-ассоциированные белки ДНПК крови больных РМЖ

Путем перебора было показано, что комбинация белков SPG7, ADRB1, SMCO4, PHF1, PSMG1, входящих в ДНПК позволяет отличать первичных больных РМЖ ($T_{1-2}N_0M_0$) от контрольной группы с чувствительностью 100% и специфичностью 80 % (AUC 0,900, 95 % доверительный интервал 0,751 до 0,975, рисунок 36). В таблице 15 приведена информация по выявленным потенциальным протеомным опухолевым маркерам РМЖ в ДНПК. Поскольку из них только PHF1 является ДНК-связывающим белком, вероятно, что именно белки-«пассажиры» обуславливают формирование и структуру ДНПК, их транспорт и последующую передачу сигналов клеткам-реципиентам.

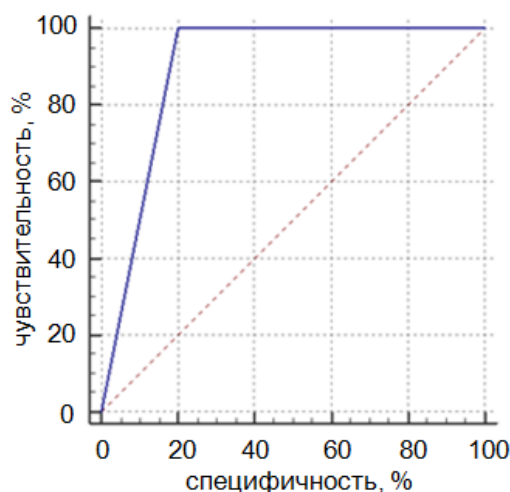


Рисунок 36 — ROC-кривая для определения белков SPG7, ADRB1, SMCO4, PHF1, PSMG1 в ДНПК плазмы крови. Синяя линия — аппроксимированная кривая ROC

На следующем этапе диагностически значимые белки ДНПК (PHF1, SPG7, ADRB1, SMCO4, PSMG1) были проанализированы с использованием данных, доступных в Human Protein Atlas (HPA) (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.

Таблица 15 — Потенциальные протеомные маркеры РМЖ в ДНПК

Роль в ДНПК	Название белка	Название гена	Описание белка
ДНК-связывающие белки	PHD finger protein 1	<i>PHF1</i>	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	<i>ADRB1</i>	Интегральный мембранный белок, опосредующий индуцированную катехоламинами активацию аденилат-циклазы посредством действия G-белков. Этот рецептор связывает адреналин и норадреналин примерно с одинаковым сродством. Опосредует активацию Ras посредством G(s)- α - и цАМФ-опосредованной передачи сигналов. Также присутствует в ранней эндосоме.
	Proteasome assembly chaperone 1	<i>PSMG1</i>	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 α -субъединиц протеасомы в гетерогептамерное α -кольцо и предотвращает димеризацию α -кольца.

Продолжение Таблицы 15

Белки-«пассажиры»	Single-pass membrane and coiled-coil domain-containing protein 4	<i>SMCO4</i>	Трансmemбранный белок, 17-β-эстрадиол снижает, а цисплатин увеличивает экспрессию мРНК <i>SMCO4</i> .
	Paraplegin	<i>SPG7</i>	Трансmemбранная АТФ-зависимая цинковая металлопротеаза, вовлечена в фолдинг белков и протеолиз.

В дальнейшем выявленные уникальные для опухоль-специфических белков ДНК-связывающие мотивы (Nascent polypeptide-associated complex NAC domain, Brinker DNA-binding domain, Bromodomain, POU domain, HSPH1 nucleotide-binding domain, HTH 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*, *RNF1*, *PSMG1*) ДНПК необходимо в дальнейшем верифицировать на обширных группах пациентов. В комбинации с анализом последовательностей опухолевой вДНК данные опухоль-ассоциированные белки ДНПК могут служить потенциальными мишенями для разработки мультимаркерных подходов для ранней неинвазивной диагностики злокачественных новообразований.

ГЛАВА 4 СРАВНИТЕЛЬНЫЙ АНАЛИЗ СОСТАВА ЭКЗОСОМ ПЛАЗМЫ И ЭКЗОСОМ КРОВИ ЗДЖ И БОЛЬНЫХ РМЖ

За последние 13 лет наблюдается экспоненциальный рост числа публикаций в области исследования молекулярного груза, биологических функций и клинического использования экзосом. Экзосомы являются крайне перспективными объектами исследования в связи с уникальностью их молекулярного груза: с одной стороны, он отражает состав родительских клеток, с другой — в эти везикулы идет направленный сортинг биологически-активных молекул, доставка которых способна перепрограммировать клетки-реципиенты [433]. Кроме того, благодаря транспорту экзосом с током крови по всему организму, эти везикулы можно использовать как для доставки терапевтически-значимых молекул, так и для выявления различных заболеваний путем анализа экзосомального груза. В тоже время пока отсутствует информация о составе и биологической роли недавно обнаруженных экзосом, ассоциированных с ФЭ крови. Исследования в этом направлении позволят не только расширить фундаментальные знания о распределении экзосом между плазмой и ФЭ, но и заложит базу для создания более эффективной диагностики, в том числе злокачественных новообразований.

4.1 Характеризация экзосом

Известно, что в крови циркулируют экзосомы, секретируются всеми клетками организма [434, 435]. Учитывая, что в короне экзосом присутствуют белки для адресной доставки молекулярного груза этих везикул к клеткам-мишеням, можно предположить, что экзосомы аналогичным образом могут взаимодействовать с плазматическими мембранами ФЭ. Действительно, независимыми группами исследователей было обнаружено присутствие экзосом на мембранах эритроцитов, тромбоцитов и лейкоцитов, что свидетельствует в пользу того, что часть экзосом не подвергается слиянию с мембраной, а циркулирует, будучи ассоциированными с ФЭ [436-438].

Для характеристики экзосом, ассоциированных с ФЭ, данные ВВ были выделены из ФБ-ЭДТА элюата и трипсинового элюата с поверхности ФЭ Здж ($n = 21$) и больных РМЖ (таблица 16).

Отсутствие гемолиза в образцах подтверждали путем измерения концентрации гемоглобина при 414 нм и активности ЛДГ. Показано, что обработка ФЭ не приводит к нарушению целостности мембран: доля разрушенных клеток в образцах крови Здж

составляет в среднем $2,4 \times 10^{-4} \%$ (диапазон значений $(0,84-4) \times 10^{-4} \%$), а у больных РМЖ — $1,13 \times 10^{-3} \%$ (диапазон значений $(0,86-1,4) \times 10^{-3} \%$). Таким образом, предложенная в данной работе элюция ВВ с поверхности ФЭ может быть использована для получения экзосом, ассоциированных с ФЭ.

Таблица 16 — Характеристика группы больных РМЖ

Клинико-патологические характеристики		Частота встречаемости
Стадия	T1-T2	20 (100%)
Метастазы в регионарных лимфоузлах	N0	14 (70%)
	N1	6 (30%)
Отдаленные 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%)

Для подтверждения экзосомальной природы ВВ, полученных из плазмы и из элюатов с поверхности ФЭ крови ЗдЖ ($n = 21$) и больных РМЖ (таблица 16) в соответствии с рекомендациями Общества по исследованию ВВ была проведена ТЭМ и крио-электронная микроскопия, трековый анализ, а также проточная цитометрия.

С помощью ТЭМ было показано, что предложенный подход, основанный на последовательной ультрафильтрации и двойном ультрацентрифугировании, позволяет получить препараты ВВ плазмы и ВВ крови (образцы включали ВВ из плазмы, из ФБ-ЭДТА элюата и из трипсинового элюата) без примесей ВВ более 100 нм. Доля ВВ с поврежденной мембраной не превышала 10 %, доля ВВ менее 30 нм составила не более 15 %. Во всех образцах большинство ВВ имели размеры 40-100 нм и характерную для экзосом чашеобразную форму с двойной мембраной, что соответствует общепринятым характеристикам экзосом [439, 440] (рисунок 37).

С помощью крио-электронной микроскопии описана морфология ВВ крови ЗдЖ и больных РМЖ. Для оценки строения и размеров ВВ были проанализированы 100 и 116 изображений ВВ из плазмы и из крови ЗдЖ, соответственно (рисунок 38 а,б), а также 121 и 117 изображений ВВ из плазмы и из крови больных РМЖ, соответственно (рисунок 38 в,г). Установлено, что более 90 % выделенных ВВ по наличию липидной мембраны можно отнести к экзосомо-подобным ВВ. Как в норме, так и при РМЖ большинство экзосомо-

подобных ВВ были одиночными и имели округлую или немного овальную форму. Помимо одинарных (рисунок 38 а–е), в образцах были представлены двойные (рисунок 38 а–г, ж, з), с двойной мембраной (рисунок 38 а–г, и–л), и многослойные экзосомо-подобные ВВ (рисунок 37 а–г, и, к).

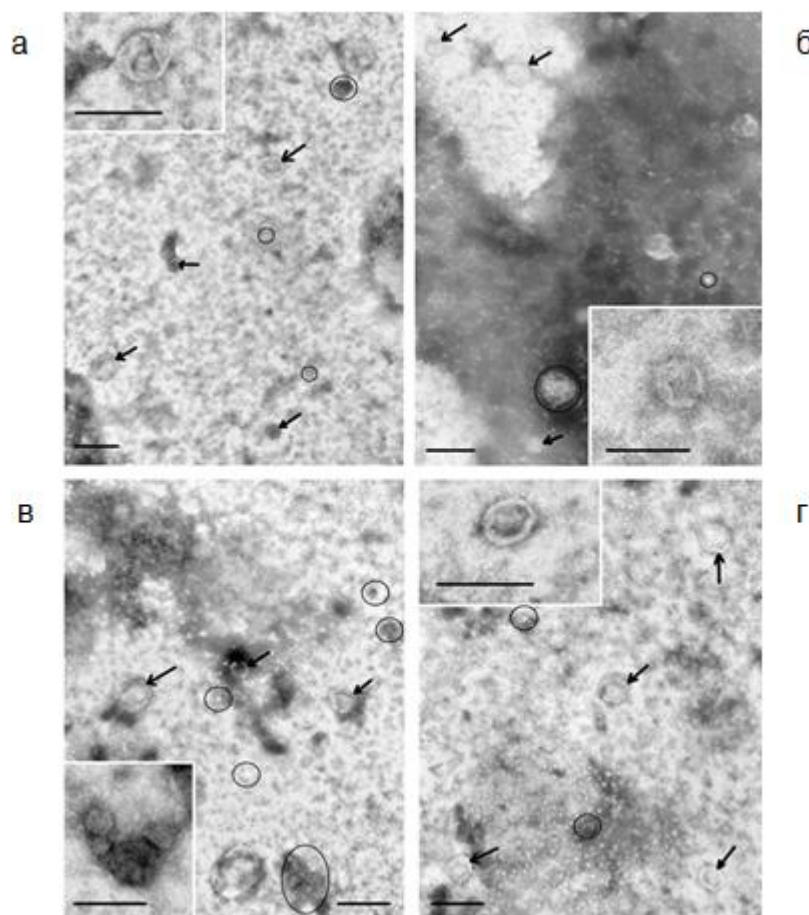


Рисунок 37 — ТЭМ: ВВ плазмы ЗдЖ (а) и больных РМЖ (б), ВВ крови ЗдЖ (в) и больных РМЖ (г). Овалом обозначены микрочастицы, стрелками — экзосомы, на врезках — экзосомы. Длина масштабной линии соответствует 100 нм

Показано, что в плазме ЗдЖ преобладают одинарные ВВ, а в крови их содержание снижается (с 91 % до 37 %), при этом возрастает содержание двойных (с 3 % до 20 %) и двухмембранных ВВ (с 0 до 22 %) (рисунок 38н). Морфология выделенных ВВ из плазмы и из крови больных РМЖ были сопоставимы с преобладанием одиночных ВВ (81 % и 70 %, соответственно; рисунок 38н). Таким образом, в плазме в норме и при РМЖ преобладают одиночные экзосомо-подобные ВВ, при этом доля такой субпопуляции ВВ на поверхности ФЭ больных РМЖ в 2 раза выше, чем у ЗдЖ (70 % и 37 %, соответственно). Кроме того, у больных РМЖ в составе ассоциированных с ФЭ экзосомо-подобных ВВ по сравнению со ЗдЖ значительно снижается представленность других субпопуляций — электроно-

плотных, с двойной мембраной, двойных и многослойных ВВ. Полученные данные позволяют предположить, что как в норме, так и при патологии ФЭ являются носителями экзосомо-подобных ВВ, а изменение представленности ВВ на их поверхности при злокачественном новообразовании может объясняться увеличением в короне одиночных ВВ белков к рецепторам плазматической мембраны.

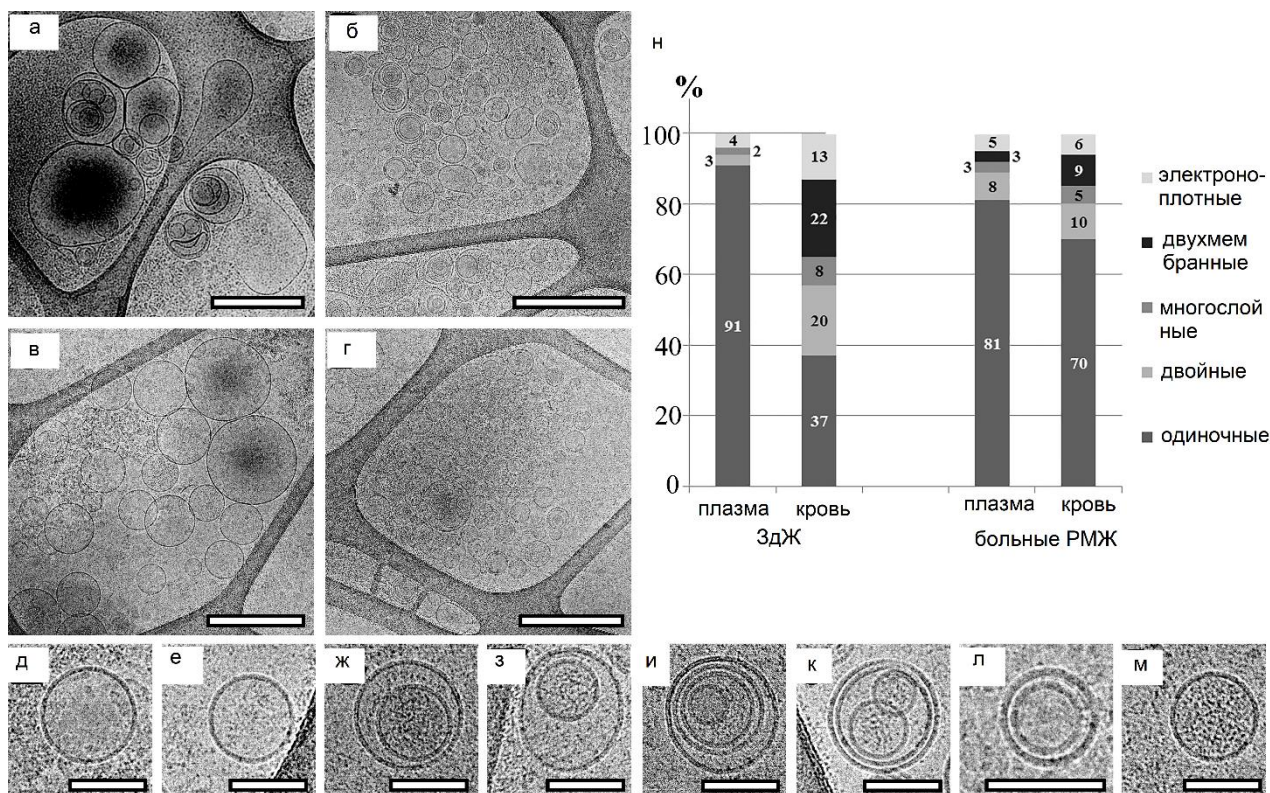


Рисунок 38 — Крио-электронная микроскопия: представленность экзосомо-подобных ВВ с различной морфологией в объединенных образцах. ВВ плазмы ЗдЖ (а), крови ЗдЖ (б), плазмы больных РМЖ (в), крови больных РМЖ (г), одинарные ВВ (д, е), двойные ВВ (ж, з), многослойные ВВ (и, к), двухмембранные ВВ (и-л), электронно-плотные ВВ (ж, м). Масштабные линейки составляют 500 нм для микрофотографий (а–г) и 100 нм для микрофотографий (д–м). Процентное соотношение одно-, двойных, двухмембранных, многослойных и электронно-плотных экзосомо-подобных ВВ, визуализированных в образцах плазмы и крови ЗдЖ и больных РМЖ (н)

Ранее в литературе были описаны данные о представленности различных по морфологии ВВ в эякуляте и спинномозговой жидкости [441, 442]. Полученные в работе данные существенно дополняют представление о субпопуляциях экзосом крови и их перераспределении между плазмой и ФЭ при наличии злокачественного новообразования.

С помощью анализа траектории частиц установлено, что у больных РМЖ как в плазме, так и в крови концентрация экзосомо-подобных ВВ статистически значимо ($p < 0,05$) выше, чем у ЗдЖ — медианы в плазме составили $31,9 \times 10^7$ и $7,9 \times 10^7$ везикул/мл крови, соответственно, а в крови — $57,4 \times 10^7$ и $18,4 \times 10^7$ везикул/мл крови, соответственно (рисунок 39).

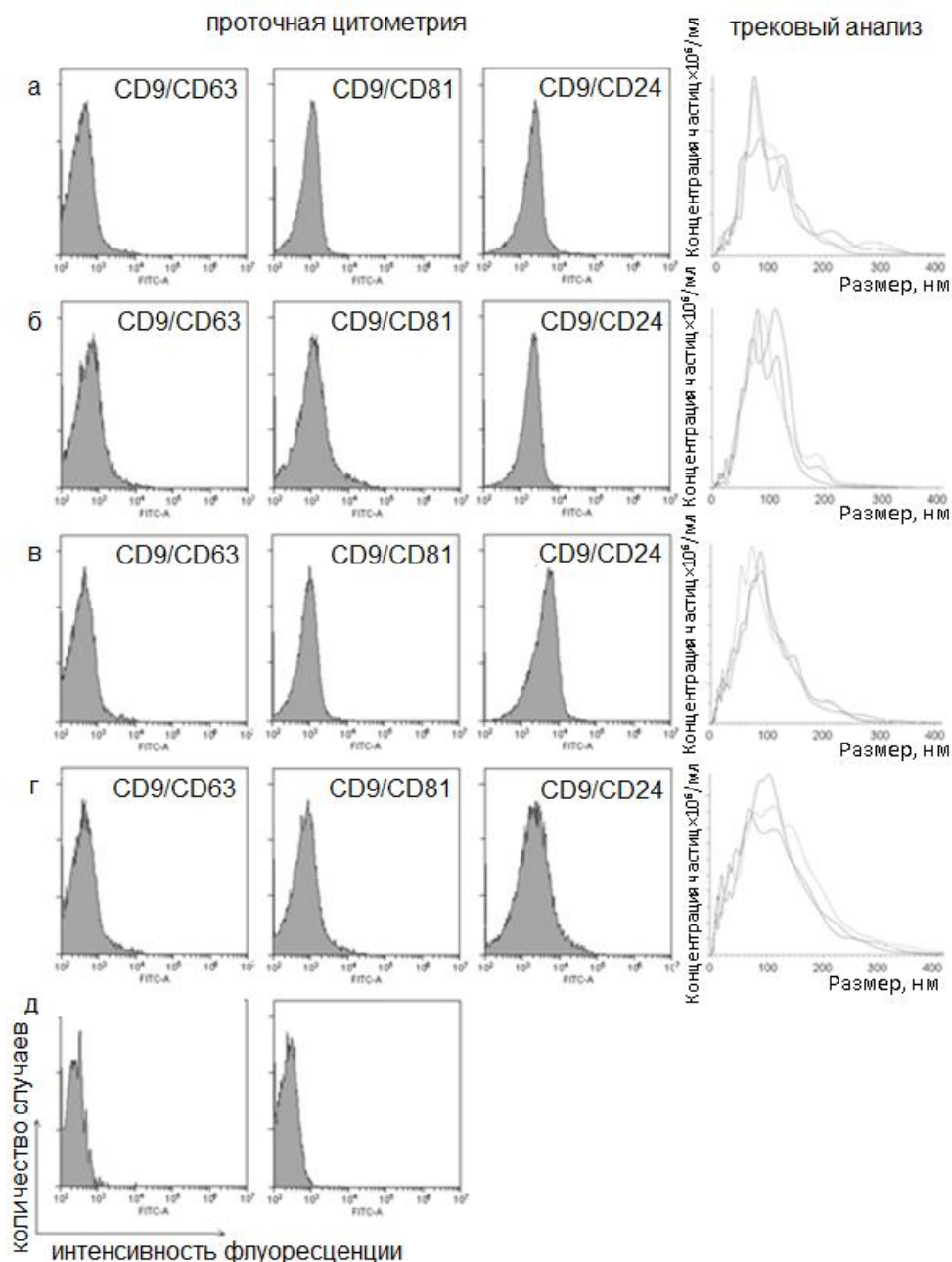


Рисунок 39 — Данные проточной цитометрии и трекового анализа частиц ВВ. Для проточной цитометрии приведены средние значения медианы интенсивности флуоресценции. Плазма ЗдЖ (а), кровь ЗдЖ (б), плазма больных РМЖ (в), кровь больных РМЖ (г), изотипический контроль и отрицательный контроль (покрытые анти-CD9 антителами латексные частицы, окрашены антителами против CD81-FITC) (д)

Данные по увеличению концентрации ВВ в плазме крови при злокачественном новообразовании подтверждают литературные данные [31, 57], а данные по концентрации ВВ в крови в данной работе получены впервые. Кроме того, впервые было установлено, что у Здж и у больных РМЖ около половины экзосомо-подобных везикул крови ассоциированы с поверхностью ФЭ (медианы количества ВВ в плазме от общего количества ВВ в крови составили 43 % и 55 %, соответственно).

Для подтверждения экзосомальной природы выделенных экзосомо-подобных ВВ была проведена проточная цитометрия. Общепринятые экзосомальные маркеры CD9, CD24, CD63 и CD81 были выявлены во всех образцах (рисунок 39). Таким образом, полученные в работе препараты экзосомо-подобных ВВ можно отнести к экзосомам. По убыванию медианы интенсивности флуоресценции как в плазме, так и в крови Здж и больных РМЖ были идентифицированы следующие субпопуляции экзосом: $CD9/CD24 > CD9/CD81 > CD9/CD63$ (таблица 17). Таким образом, как в норме, так и при РМЖ, наиболее представлена в крови CD9/CD24-позитивная субпопуляция экзосом, вероятно секретированная клетками эндотелия и ФЭ. Показано, что наименьшая представленность на поверхности экзосом тетраспанина CD63 характера не только для Здж, и больных РМЖ, но и для больных раком яичников [31], при этом данный маркер повышается у больных колоректальным раком.

Таблица 17 — Представленность экзосомальных маркеров в короне CD9-положительных экзосом крови Здж и больных РМЖ*

Источник экзосом		CD 24	CD 63	CD 81
Здж	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

Примечание - * — медиана интенсивности флуоресценции ± SEM.

В совокупности полученные данные свидетельствуют, что ВВ, полученные путем последовательной ультрафильтрации и двойного ультрацентрифугирования из плазмы и из крови, по общепринятым критериям можно отнести к экзосомам (размер, морфология, наличие характерных маркеров) [382]. Увеличение концентрации и изменение морфологии ассоциированных с ФЭ экзосом у больных РМЖ при T₁₋₂N₀₋₁M₀ по сравнению со Здж

указывает на значимость таких экзосом в развитии данного злокачественного новообразования.

4.2 Протеазы в составе экзосом крови ЗдЖ и больных РМЖ

Известно, что экзосомы служат активными регуляторами не только патологических процессов, но и таких физиологических процессов как эмбриональное развитие, иммунные реакции, регенерация тканей, свертывание крови и ангиогенез [337]. Несмотря на стремительный рост числа исследований, посвященных экзосомам, многие аспекты межклеточной коммуникации с их помощью остаются недостаточно изученными. На сегодняшний день получено ограниченное число доказательств, что белки короны экзосом имеют решающее значение для межклеточной коммуникации как в первичном микроокружении опухоли, так и в отдаленных метастатических очагах.

Протеомный анализ наиболее часто идентифицируемых белков короны экзосом, проведенный с помощью платформы базы данных STRING (<https://string-db.org/>), выявил сложную сеть функциональных ассоциаций между 14 из 16 запрашиваемых белков (рисунок 40).

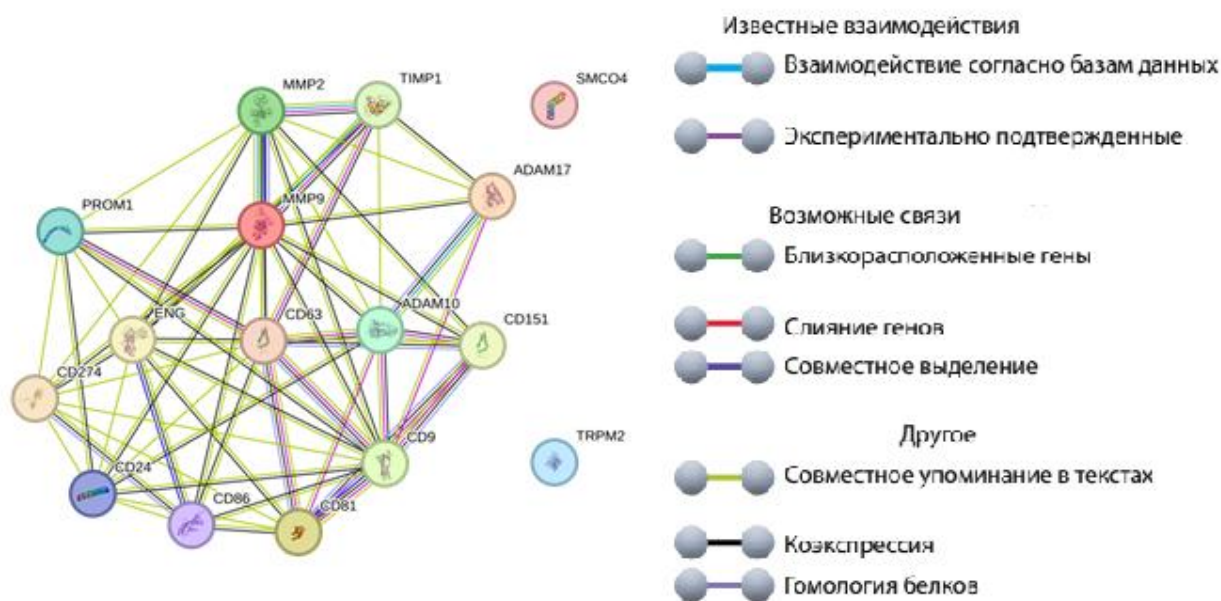


Рисунок 40 — Белок-белковые взаимодействия в короне экзосом при различных злокачественных новообразованиях

Такая высокая степень взаимосвязи позволяет предположить, что большинство этих белков участвуют в общих молекулярных путях, связанных с прогрессией опухоли, иммунной модуляцией или клеточной адгезией. Таким образом, с помощью

биоинформатического анализа была подтверждена биологическая значимость экзосом опухолевого происхождения, однако не установлено прямых связей белок-белковое взаимодействие для двух трансмембранных белков: TRPM2 и SMC04. Отсутствие сетевых связей не отрицает биологической значимости данных белков, а скорее предполагает наличие недостаточно изученной или независимой функциональной оси.

Наиболее известными тетраспанин-ассоциированными протеазами в короне экзосом являются представители семейств ADAM и MMP.

ADAM представляют собой семейство трансмембранных и секретируемых белков, состоящих примерно из 750 аминокислот. Эти протеазы функционируют как шеддазы, расщепляя эктодомены поверхностных рецепторов и сигнальных молекул. ADAM участвуют во многих физиологических процессах, однако в раке эти протеазы повышают агрессивность опухоли, стимулируя пролиферацию через активацию EGFR и способствуя ЭМП путем расщепления E-кадгерина [305]. В составе экзосом наиболее изученной является ADAM-10. С помощью биоинформатического анализа (рисунок 40) показано, что эта шеддаза ассоциирована с CD9, CD24, CD63, CD81 и CD151 и способна гидролизовать мембраносвязанные предшественники цитокинов, хемокинов и факторов роста (например, CXCL16, EGF), молекулы адгезии (например, N-кадгерин, E-кадгерин, VE-кадгерин и CD44) и рецепторы Notch [307], что в результате индуцирует подвижность и увеличивает метастатический потенциал злокачественных клеток.

Для оценки уровня ADAM-10 в составе экзосом плазмы и экзосом крови ЗдЖ ($n = 30$) и первичных больных РМЖ ($n = 30$, таблица 18), на поверхности латексных частиц были иммобилизованы антитела против CD9 и CD24, после формирования комплексов антитело-экзосома проводили окрашивание с использованием флуоресцентно-меченных антител против ADAM-10 методом проточной цитометрии.

Сравнительный анализ уровня ADAM-10 в субпопуляции CD9-положительных экзосом плазмы и экзосом крови ЗдЖ и больных люминальным РМЖ выявил статистически значимое ($p < 0,05$) возрастание шеддазы при злокачественном новообразовании — в 1,8 и 1,3 раза, соответственно (таблица 19). Отсутствие статистически значимых отличий уровня ADAM-10 в составе CD24-позитивных экзосом плазмы и экзосом крови в норме и при РМЖ может объясняться тем, что включение в экзосомы зрелой формы данной шеддазы и ее протеолитическая активность регулируются тетраспанинами CD9, CD81, CD82 [306].

Отличия в уровнях ADAM-10 в короне экзосом плазмы и экзосом крови больных с люминальным и ТН-РМЖ косвенно указывают на различные молекулярные механизмы развития патологии. Показано, что ингибирование ADAM-10 снижает миграцию клеток,

имитирующих ТН-РМЖ, в то время как реэкспрессия ADAM-10 восстанавливает их пролиферацию и усиливает миграцию [310]. Кроме того, различные уровни ADAM-10 в короне экзосом крови больных с люминальным и ТН-РМЖ позволяет выдвинуть гипотезу о вкладе шеддаз экзосом в метастазирование данных подтипов РМЖ. В частности, экзосомальные интегрины $\alpha\beta4$ и $\alpha\beta1$ ассоциированы с метастазами в легкие, а экзосомальный интегрин $\alpha\nu\beta5$ — с метастазами в печень. Показано, что воздействие на интегрины $\alpha\beta4$ и $\alpha\nu\beta5$ снижало поглощение экзосом, а также метастазирование в легкие и печень, соответственно [443]. Поскольку ADAM-10 взаимодействуют с вышеперечисленными интегринными, можно предположить, что связь шеддаза-интегрины подтверждает органотропный характер метастазов.

Таблица 18 — Клинико-патологическая характеристика первичных больных РМЖ

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)
Отдаленные метастазы	M0	30 (100)
Степень злокачественности	II	28 (93)
	III	2 (7)
Общее количество пациенток		30 (100%)

Помимо тетраспанин-ассоциированных ферментов в короне экзосом, существенный вклад в опухолевую прогрессию вносят неассоциированные с тетраспанинами протеазы, в частности 20S протеасомы в составе внутривезикулярного молекулярного груза. Известно, что 20S протеасомы осуществляют специфический внутриклеточный протеолиз, обеспечивающей деградацию белков в широком спектре клеточных путей благодаря трипсин-, химотрипсин- и каспаза-подобным активностям [444]. Дисфункция этого белкового комплекса может привести к стабилизации регуляторных белков за счет снижения их деградации или к их потере за счет ускоренной деградации [445]. Таким образом, протеасомы участвуют в регуляции пролиферации, апоптоза, миграции клеток и иммунного надзора [328, 446]. Ранее было показано, что уровень 20S протеасом повышен в тканях рака яичников и коррелирует с повышенным уровнем в составе экзосом плазмы крови и асцита этих больных [31].

Таблица 19 — Уровень ADAM-10 на поверхности CD 9 и CD 24-положительных экзосом в плазме и в крови Здж и первичных больных РМЖ*

Источник экзосом		CD9- положительная субпопуляция	CD24- положительная субпопуляция
Здж	Плазма	844±99	884±124
	Кровь	804±79	920±91
Больные люминальным РМЖ	Плазма	1531±162**	926±94
	Кровь	1026±100**	1103±99
Больные ТН-РМЖ	Плазма	962±88	908±109
	Кровь	862±69	969±106
Примечания: 1 * медиана интенсивности флуоресценции ± SEM; 2 **статистически значимые отклонения по сравнению со Здж.			

Для оценки уровня 20S протеасом в составе экзосом плазмы и экзосом крови Здж (n = 39) и первичных больных РМЖ (n = 80, таблица 20) использовали вестерн-блоттинг с нанесением калибровочного тетраспанина CD9. Показано, что уровень 20S протеасом статистически значимо выше как в экзосомах плазмы, так и экзосомах крови больных РМЖ по сравнению со Здж (в 1,6 и 2,8 раза, соответственно, $p < 0,05$, таблица 21, рисунок 41а).

Таблица 20 — Клинико-патологическая характеристика первичных больных РМЖ

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%)
Отдаленные метастазы	M0	61 (100%)	19 (100%)	80 (100%)
Степень злокачественности	II	61 (100%)	19 (100%)	80 (100%)

Установлено, что уровень 20S протеасом в экзосомах крови пациенток ассоциирован с молекулярным подтипом РМЖ: при ТН-РМЖ он статистически значимо выше, чем при менее агрессивных люминальных подтипах (таблица 22, рисунок 41б).



Рисунок 41 — Уровень 20S протеасом в экзосомах плазмы и экзосомах крови ЗдЖ и больных РМЖ. Вестерн-блоттинг с использованием антител против α и β -субъединиц протеасомы 20S и CD9 в качестве внутреннего контроля. Экзосомы плазмы и экзосомы крови ЗдЖ и больных РМЖ(а); экзосомы больных с люминальным РМЖ и с ТН-РМЖ (б)

Таблица 21 — Уровень 20S протеасомы в составе экзосом плазмы и экзосом крови ЗдЖ и больных РМЖ, отн. ед.

Источник экзосом		Медиана и диапазон [25;75%], отн. ед.
ЗдЖ	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]*

Примечание -* статистически значимые различия между ЗдЖ и больными РМЖ, $p < 0,05$.

Таблица 22 — Уровень 20S протеасом в составе экзосом плазмы ЗдЖ и больных с различными подтипами РМЖ, отн. ед.

Источник экзосом		Медиана и диапазон [25;75%], отн. ед.
ЗдЖ		1,00 [0,90; 1,12]
Больные РМЖ	Люминальный РМЖ	1,57 [1,22; 1,73]*
	ТН-РМЖ	1,94 [1,58; 2,67]***
Примечания:		
1 * статистически значимые различия между ЗдЖ и онкологическими больными, $p < 0,05$;		
2 ** статистически значимые различия между люминальным РМЖ и ТН-РМЖ, $p < 0,05$.		

Известно, что убиквитин-протеасомная позволяет быстро удалять рецептор эстрогенов с клеточной поверхности [447], обеспечивая его необходимый уровень в ответ на гормональную стимуляцию. Полученные результаты косвенно свидетельствуют, что не количество ВВ, а состав молекулярного груза экзосом играет основную роль в развитии резистентности к противоопухолевой терапии [448].

Таким образом, в крови Здж и больных РМЖ различаются как субпопуляционный состав экзосом, так и представленность в них протеаз. Выявленное перераспределение тетраспанин-ассоциированных ADAM-10 и тетраспанин-неассоциированных 20S протеасом при разных подтипах РМЖ свидетельствует о различных механизмах сортировки биологически активных молекул в экзосомы, а также о значимой роли ассоциированных с ФЭ экзосом в развитии злокачественного новообразования.

Оценка уровня протеаз экзосом позволит в дальнейшем разработать тест-системы для своевременного выявления рецидива, а понимание роли различных субпопуляций экзосом в метастазировании РМЖ — опухоль-специфические терапевтические агенты, что приведет к снижению инвалидизации и увеличению качества и длительности жизни женщин трудоспособного возраста.

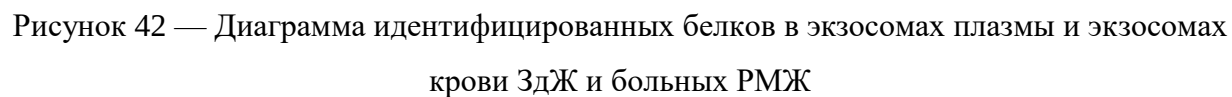
4.3 Протеом экзосом плазмы и экзосом крови первичных больных РМЖ

Известно, что с одной стороны экзосомы отражают молекулярный состав родительских клеток, с другой — в эти ВВ осуществляется упаковка определенных биологически-активных биополимеров. Поскольку протеомный портрет экзосом, ассоциированных с ФЭ до сих пор не известен, в данной работе были проведены идентификация с последующим биоинформатическим анализом белков экзосом плазмы и экзосом крови Здж и больных РМЖ.

С помощью MALDI-TOF масс-спектрометрии с высокой достоверностью ($p < 0,05$) в образцах экзосом плазмы и экзосом крови Здж ($n = 18$) и больных РМЖ ($n = 17$, таблица 23) идентифицированы 111 и 146 белков, соответственно (Приложения 11-14), из них 34 (15 %) белка — универсальные (Приложение 15); доли уникальных белков для нормы и РМЖ составили 27 % и 49 %, соответственно (рисунок 42).

Биоинформатический анализ идентифицированных белков экзосом плазмы показал, что 105 (80 %) белков аннотированы в базе данных Vesiclepedia как белки ВВ и 71 (54 %) белок — в базе данных ExoCarta как белки экзосом (рисунок 43). Аналогичный анализ белков экзосом крови показал, что 163 (73 %) из идентифицированных белков аннотированы в базе данных Vesiclepedia и 100 (45 %) белков — в базе данных ExoCarta

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



а Vesiclepedia

условно ЗЖ

28 49

3 31

29 83

13105

больные РМЖ

б ExoCarta

условно ЗЖ

49 28

3 31

71 41

9699

больные РМЖ

Рисунок 44 — Представленность идентифицированных белков экзосом крови Здж и больных РМЖ в базах данных Vesiclepedia (а) и Exocarta (б)

Анализ функционального обогащения по наиболее представленным генным онтологиям белков экзосом проводили с помощью ПО FunRich. Было установлено, что по клеточным компонентам белки экзосом плазмы и экзосом крови Здж и больных РМЖ представлены сопоставимо: преобладают ядерные, цитоплазматические и экзосомальные белки (таблица 24).

Сравнительный анализ молекулярных функций белков показал, что при РМЖ по сравнению с нормой в экзосомах плазмы возрастает доля транспортных белков (с 11 % до 19 %), белков, обладающих каталитической активностью (с 1 % до 10 %) и белков, стимулирующих клеточное движение (с 0 % до 3 %), при этом снижается доля ДНК-связывающих (с 9 % до 3 %) белков и белков, регулирующих транскрипцию (с 4 % до 2 %) (таблица 24). Необходимо отметить, что доля белков в экзосомах плазмы и экзосомах крови с неизвестной молекулярной функцией достаточно высока — в норме 19 % и 25 %, при РМЖ — по 20 % и 25 %, соответственно.

Сравнительный анализ белков, вовлеченных в различные биологические процессы показал, что при РМЖ по сравнению с нормой в экзосомах плазмы возрастает доля белков, вовлеченных в транспорт (с 11 % до 19 %), метаболизм белков (с 7 % до 13 %) и снижается доля белков, вовлеченных в передачу сигналов (с 24 % до 16 %), межклеточную коммуникацию (с 21 % до 16 %) и регуляцию метаболизма нуклеотидов (с 14 % до 5 %). Впервые выявленные изменения в представленности белков, вовлечённых в различные биологические процессы, в составе экзосом крови ЗДЖ и больных РМЖ повторяют закономерности для белков экзосом плазмы (таблица 24). Необходимо отметить, что доля белков в экзосомах плазмы и экзосомах крови, вовлеченных в неизвестные биологические процессы также достаточно высока — в норме 11 % и 14 %, при РМЖ — по 17 % и 20 %, соответственно.

Таблица 24 — Биоинформатический анализ белков экзосом плазмы и экзосом крови Здж и больных РМЖ по клеточным компонентам, молекулярным функциям и биологическим процессам. Гены, %

GO		Здж		Больные РМЖ	
		плазма	кровь	плазма	кровь
клеточные компоненты	цитоплазма	55	47	59	55
	экзосомы	42	35	45	34
	ядро	55	47	44	46
	внеклеточные	35	31	36	29
	лизосомы	32	30	32	22
	плазматическая мембрана	33	28	27	25
молекулярные функции	неизвестно	19	20	25	25
	транспортная	11	10	19	12
	каталитическая	1	4	10	7
	ДНК-связывающая	9	6	3	5
	регулирующая транскрипцию	4	4	2	4
	структурная	-	4	-	7
	защитная	3	-	3	-
	двигательная	0	-	3	-
биологические процессы	транспорт	11	9	19	12
	неизвестно	11	14	17	20
	передача сигналов	24	22	16	17
	межклеточная коммуникация	21	20	16	16
	метаболизм белков	7	6	13	14
	регуляция метаболизма нуклеотидов	14	15	5	10
	иммунный ответ	13	-	12	-
	метаболизм	-	15	-	8

Выявленные распределения белков в составе экзосом плазмы и экзосом крови в норме и при РМЖ по клеточным локализациям, биологическим процессам и молекулярным функциям коррелирует с опубликованными ранее данными для экзосом культуры клеток [449, 450]. Поскольку большинство GO представлено в белках экзосом, можно

предположить, что эти белки необходимы для формирования, секреции и интернализации ВВ. В то же время, доли ряда молекулярных функций и биологических процессов изменяются при злокачественном новообразовании, что указывает на изменение белкового состава молекулярного груза экзосом при развитии онкопатологии.

Для подтверждения гипотезы о том, что экзосомы крови онкологических больных по сравнению с экзосомами плазмы обогащены белками, стимулирующими опухолевую диссеминацию, был проведен анализ литературы и аннотаций QuickGO и выделены в составе идентифицированных белков белки, принимающие активное участие в ЭМП, клеточной пролиферации, миграции и инвазии, ангиогенезе и регуляции иммунного ответа (таблицы 25 и 26).

Показано, что в регуляцию ЭМП вовлечено 7 (9 %) белков в составе экзосом плазмы и 25 (23 %) – в составе экзосом крови Здж. В крови больных РМЖ белки экзосом крови сопоставимо вовлечены в регуляцию ЭМП: 9 (12 %) и 27 (18 %), соответственно, при этом доля белков, ответственных за негативную регуляцию ЭМП, была в 2,5 раза выше в составе экзосом условно Здж по сравнению с онкологическими больными (7 % против 3 %) (таблицы 25 и 26).

В регуляцию клеточной пролиферации вовлечены 14 (10 %) белков экзосом крови Здж, из них только 5 (6 %) белков экзосом плазмы, у больных РМЖ – 1 (1,4 %) и 6 (4 %) 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 Здж по сравнению с онкологическими больными (7 % против 4 %).

В регуляцию клеточной инвазии в составе экзосом плазмы Здж и больных РМЖ вовлечено сопоставимое количество белков: 14 (17 %) и 18 (24 %), а в экзосомах крови – 49 (44 %) и 53 (36 %) белков в норме и при онкологии, соответственно. В составе экзосом крови больных РМЖ доля белков-ингибиторов данного процесса была в 4 раза ниже, чем в экзосомах крови условно Здж (5 % против 1,4 %).

Таблица 25 — Уникальные белки экзосом плазмы Здж и больных РМЖ, ассоциированные с опухолевой прогрессией

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						
FXVD5						
GTSE1						
HAND1						
HBB						
HIF1AN						
IGF2R						
IGHA1						
IGHG1						
IGKC						
IGKV3-20						
KIF20B						
KIF3B						
KIFC3						
MIA						
MTHFD1						
NANOS3						
NAP1L1						
PIBF1						
PIK3CD						
PLEKHA7						
RAB22A						
RAB24						
RASGRP4						
RASSF2						
RFC3						
TNFSF14						
TTR						
VPS13A						
ZAP70						

Таблица 26 — Уникальные белки экзосом крови ЗДЖ и больных РМЖ, ассоциированные с опухолевой прогрессией

Блок	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						
FXRD5						
GCLC						
GDF2						
GRSE1						
GSN						
GTSE1						
HAND1						
HBB						
HIG1AN						
HMOX1						
HP						
IGF2R						
IGHA1						
IGHG1						
IGHG2						
IGHM						
IGHV3-74						
IGKC						
IGKV3-20						
IGLC7						
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						

 Норма
 РМЖ
 Универсальные (встречаются у ЗЖ и больных РМЖ)
 Негативная регуляция

В регуляцию клеточной миграции вовлечены 25 (23 %) белков экзосом крови ЗдЖ, из них 8 (10 %) – в составе экзосом плазмы, у больных РМЖ – 21 (14 %) и 10 (14 %), соответственно, при этом при онкологии в составе экзосом крови отсутствовали белки, ингибирующие клеточную миграцию.

В стимуляцию ангиогенеза вовлечено значительно меньше белков экзосом – 10 (9 %) у ЗдЖ и 4 (3 %) у больных РМЖ, а ингибирующие ангиогенез белки выявлены всего по одному в каждом случае.

В регуляцию иммунного ответа вовлечено одинаковое количество белков: в норме 30 (27 %) белков, из них 7 (9 %) в составе экзосом плазмы; при онкологии – 30 (21 %) и 8 (11 %) белков, соответственно. При этом с негативной регуляцией данного процесса связано по 3 белка в составе экзосом крови в норме и при РМЖ.

Таким образом, половина идентифицированных белков экзосом участвует в ЭМП, клеточной пролиферации, инвазии, клеточной миграции, стимуляции ангиогенеза и регуляции иммунного ответа. Протеомные профили экзосом крови ЗдЖ обогащены белками, ингибирующими ЭМП, клеточную пролиферацию, миграцию и инвазию. Таким образом, анализ протеомного состава экзосом крови значительно дополняет информацию о биогенезе и функциональной роли в канцерогенезе данного типа ВВ.

4.4 Опухоль-ассоциированные белки экзосом больных РМЖ

На сегодняшний день ведется активный поиск эффективных протеомных маркеров в составе экзосом для разработки «жидкостной биопсии» злокачественных новообразований, в том числе РМЖ, как для первичной диагностики, так и для предсказания течения заболевания и своевременного выявления рецидива [138, 451, 452]. В литературе активно обсуждаются достоинства использования белков экзосом плазмы по сравнению с белками плазмы [129], однако диагностический потенциал экзосом, ассоциированных с ФЭ до сих пор не исследован [436]. Поскольку в составе экзосом представлены специфические белки, обеспечивающие взаимодействие ВВ с клетками-реципиентами, а также известно, что большинство клеток могут связывать и интернализировать циркулирующие экзосомы [437, 438, 453, 454], в работе выдвинута гипотеза о более эффективном использовании суммарных экзосом крови, без разделения на подфракции (экзосом плазмы и экзосом, ассоциированных с поверхностью ФЭ). Предполагается, что анализ суммарных экзосом крови позволит более эффективно выявлять опухоль-ассоциированные белки, сократить время- и трудозатраты при пробоподготовке образца перед анализом, а также увеличить

количество анализируемого материала, что является крайне важными аспектами для дальнейшего введения выявленных протеомных маркеров экзосом в практику.

Для выявления диагностически-значимых белков среди уникальных белков экзосом плазмы и экзосом крови первичных больных РМЖ был проведен поиск среди прогностических белков для всех типов злокачественных новообразований, аннотированных в базе данных HPA [385, 455]. В результате анализа в составе экзосом плазмы было выявлено 29 прогностических белка, а в экзосомах крови — 64, из них 4 белка были ассоциированы с РМЖ. Показано, что экспрессия в ткани молочной железы трех белков-маркеров благоприятного (α 1-антитрипсин, кератин 6В и белка супрессора передачи цитокинового сигнала 3) и одного белка-маркера неблагоприятного (IGF2R) прогноза статистически значимо ($p < 0,001$) связана с более высокой и низкой общей выживаемостью, соответственно [456, 457].

α 1-антитрипсин кодируется геном *SERPINA1* и является ингибитором сериновых протеаз, а именно эластазы, трипсина, химотрипсина и активатора плазминогена. Известна связь данного белка с регуляцией инвазии и иммунного ответа [458]. Установлено, что уровень этого белка в сыворотке крови больных РМЖ статистически значимо выше, чем у Здж, однако не коррелирует со стадией заболевания. Более того, при люминальном А РМЖ уровень α 1-антитрипсина выше, чем при ТН-РМЖ, а гиперэкспрессия мРНК *SERPINA1* в ткани молочной железы ассоциирована с лучшим прогнозом и более общей выживаемостью [459, 460]. В составе экзосом больных РМЖ α 1-антитрипсин выявлен в данной работе впервые, хотя ранее его обнаруживали в составе ВВ при глиобластоме [461].

Кератин 6В кодируется геном *KRT6B* и представляет собой белок цитоскелета [462]. При анализе выживаемости при РМЖ *in silico* была выявлена ассоциация экспрессии *KRT6B* с узловым метастазированием и общей выживаемостью у онкологических больных [463]. Ранее кератин 6В был обнаружен в составе экзосом при раке мочевого пузыря, причём экспрессия *KRT6B* статистически значимо коррелировала с выживаемостью онкологических больных. Кроме того, клинический корреляционный анализ показал, что повышенный уровень кератина 6В коррелирует со стадией рака, его классом и наличием метастаз. С помощью биоинформатического анализа было установлено, что *KRT6B* вовлечен не только в пути, связанные с эпителиально-мезенхимальным переходом, но и в иммунный ответ при раке мочевого пузыря [464].

Белок супрессор передачи цитокинового сигнала 3 кодируется геном *SOCS3* и локализуется в цитозоле и плазматической мембране. Известно, что данный белок участвует в ЭМП, инвазии и стимуляции ангиогенеза [465, 466]. *SOCS3* является прямой мишенью miR-455-5p, а эта микроРНК в свою очередь регулирует пролиферацию,

миграцию и инвазию клеток при ТН-РМЖ. Вмешательство в *SOCS3* отменяло ингибирующий эффект ингибитора *miR-455-5p* на злокачественный потенциал клеток РМЖ [467]. В другой работе было показано, что экзосомальная *miR-191-5p* напрямую ингибировала экспрессию белка передачи цитокинового сигнала 3 в макрофагах; макрофаги, трансфицированные *si-SOCS3*, усиливали миграцию и инвазию клеток РМЖ по принципу положительной обратной связи [468].

Рецептор инсулиноподобного фактора роста 2 кодируется геном *IGF2R* и осуществляет транспорт фосфорилированных ферментов из комплекса Гольджи и от клеточной поверхности в лизосомы. Данный белок помимо комплекса Гольджи выявлен в составе ВВ и вовлечен в регуляцию иммунного ответа и инвазии [469]. В результате анализа с помощью *scRNA-seq* 86 генов, связанных с опухоль-ассоциированными нейтрофилами и модульных генов, определенных с помощью анализа взвешенной сети коэкспрессии генов (WGCNA), с использованием регрессии Кокса и оператора наименьшего абсолютного сокращения и выбора (LASSO) создана панель, включающая 9 генов — *TAGLN2*, *IGF2R*, *LAMP2*, *TBL1X*, *ASAP1*, *DENND5A*, *SNRK*, *BCL3* и *CEBPD*. Данная панель эффективно предсказывала прогноз выживаемости и клинко-патологическое прогрессирование больных РМЖ в различных когортах [470]. В другой работе было показано, что уровень экспрессии *IGF2R* значительно отличался у больных с РМЖ с высоким и низким риском в The Cancer Genome Atlas ($p = 0,008$) и в METABRIC ($p < 0,001$). Экспрессия *IGF2R* была значительно связана с такими клиническими факторами риска, как ТН-РМЖ, отрицательная экспрессия рецептора эстрогена, положительная экспрессия *HER2* и возраст ≤ 60 лет. Кроме того, пациентки с положительной экспрессией *IGF2R* имели более низкую выживаемость без болезни, чем пациентки с отрицательной экспрессией *IGF2R* в когорте ТН-РМЖ (67,8 % против 78,5 %, $p = 0,023$). Авторы предполагают, что *IGF2R* может быть использован в качестве маркера плохого прогноза у больных с ТН-РМЖ [471].

Показано, что комбинация белков $\alpha 1$ -антитрипсина, кератина 6В и белка супрессора передачи цитокинового сигнала 3 в составе экзосом крови позволяет дифференцировать первичных больных РМЖ от ЗдЖ с чувствительностью 65 % и специфичностью 100 %, при этом анализ этих белков в составе экзосом плазмы снижает чувствительность до 29 % при специфичности 100 %. Расширение диагностической панели до пяти белков (белок, связывающий белок-предшественник амилоида $\beta 2$, цитокератин 1, кератин 6В, $\alpha 1$ -антитрипсин, белок супрессор передачи цитокинового сигнала 3) в составе экзосом крови

повышает чувствительность до 71 % при 100 % специфичности (AUC = 0,853, 95 % доверительный интервал 0,692–0,949, рисунок 45).

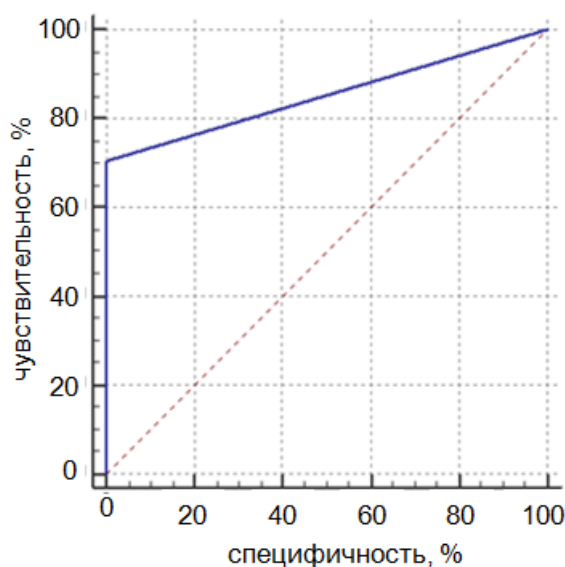


Рисунок 45 — ROC-кривая при использовании панели из 5 белков в составе экзосом крови.

Синяя линия — аппроксимированная кривая ROC

Цитокератин 1 кодируется геном *KRT1* и регулирует активность киназ, таких как PKC и SRC путем связывания с интегрином β -1 и рецептором активированной киназы протеина C1. В комплексе с C1QBP является высокоаффинным рецептором кининогена-1/HMWK. Известно, что данный белок ассоциирован с агрессивным течением РМЖ [472], однако в составе экзосом был выявлен только в одной работе [473].

Белок, связывающий белок-предшественник амилоида β 2 кодируется геном *APPBP2* и участвует во внутриклеточном транспорте белка [474]. Данный белок является неблагоприятным маркером прогноза рака печени. Показано, что ген этого белка амплифицирован и гиперэкспрессирован у больных РМЖ с плохим прогнозом [475], однако в составе экзосом больных РМЖ белок, связывающий белок-предшественник амилоида β 2 выявлен в данной работе впервые.

Таким образом, в составе экзосом крови первичных больных РМЖ было идентифицировано больше опухоль-ассоциированных белков, чем в составе экзосом плазмы. Для успешного применения выявленных потенциальных белковых онкомаркеров методом «жидкостной биопсии», без сомнения, требуется дальнейшая валидация. При подтверждении диагностической значимости предлагаемой диагностической панели на РМЖ, ее внедрение в практику позволит благодаря своевременному выявлению заболевания улучшить качество жизни пациенток, снизить инвалидизацию и смертность женщин от данного злокачественного новообразования.

ГЛАВА 5 ВЛИЯНИЕ МОЛЕКУЛЯРНОГО ГРУЗА ЭКЗОСОМ КРОВИ НА ДИССЕМИНАЦИЮ РМЖ

Участие экзосом в регуляции физиологических и патологических процессов не вызывает сомнений. В частности, при злокачественном новообразовании экзосомы переносят биологически-активные белки и РНК от клеток-доноров к клеткам-реципиентам, индуцируя в последних ЭМП и пролиферацию, усиливая миграцию и инвазивный потенциал, стимулируя ангиогенез и ускользание от иммунного надзора [475–479]. Более того, в некоторых работах в составе экзосом было показано наличие опухолевой ДНК [480]. Поскольку пул циркулирующих в крови экзосом формируется из экзосом, имеющих различное происхождение [434, 435], для упрощения анализа большинство работ, посвященных биологической роли этого типа ВВ, выполнено на культурах клеток. Ограниченное количество работ, посвященных роли экзосом в канцерогенезе, проведено с использованием экзосом плазмы, однако необходимо учитывать, что межклеточный транспорт обеспечивается не только жидкой фракцией крови, но и фракцией экзосом, ассоциированной с ФЭ. Выявленные в текущей работе различия в морфологии и в белковом составе экзосом плазмы и экзосом крови (содержат экзосомы плазмы и экзосомы, ассоциированные с поверхностью ФЭ) указывает на то, что эти субпопуляции экзосом различны, а ФЭ являются их переносчиками.

В литературе появляется все больше убедительных данных, что эффекты экзосом, секретлируемых клетками нормальной ткани на раковые клетки имеют не менее важное значение для патогенеза заболевания, чем эффекты экзосом опухолевого происхождения на нормальные клетки. В частности, с ЦОК в крови взаимодействуют различного происхождения экзосомы плазмы, а секретлируемые стромальными клетками экзосомы взаимодействуют с опухолевыми клетками [476]. Для оценки роли экзосом крови в диссеминации РМЖ был проведен сравнительный анализ влияния экзосом плазмы и экзосом, ассоциированных с ФЭ, на пролиферацию и миграцию клеток, имитирующих РМЖ, а также на стимуляцию ангиогенеза и транспорт ДНК в составе экзосом.

5.1 Транспорт ДНК в составе экзосом

Известно, что внДНК циркулирует в крови в комплексе с белками, которые защищают ее от гидролиза нуклеазами [161], а также в составе ДНПК способна связываться с различными клетками, в том числе с ФЭ крови [21]. Поскольку мембрана экзосом отчасти отражает состав мембраны родительских клеток, можно предположить наличие белков,

связывающих ДНПК и на поверхности ВВ. Поскольку при некоторых заболеваниях, в том числе онкологических, в плазме крови пациентов возрастает как концентрация внДНК [25, 481], так и концентрация экзосом [482], была выдвинута гипотеза о возможности транспорта внДНК в составе ДНПК на поверхности экзосом, что позволит осуществить адресную доставку внДНК в клетки-реципиенты.

Сравнительный анализ концентрации внДНК с помощью ПЦР в режиме «реального времени» в плазме крови Здж (n = 7) и первичных больных РМЖ (n = 7, таблица 27) выявил статистически значимое увеличение внДНК при злокачественном новообразовании (медиана 46 и с 4 нг/мл, соответственно, $p = 0,0026$, U-критерий Манна-Уитни, рисунок 46а), что согласуется с литературными данными [264]. Показано, что ДНК в составе плазмы больных люминальным РМЖ выявлялась в 71 % (5/7) случаев в диапазоне 0 — 7 пг/мл, а у Здж — в 57 % (4/7) в диапазоне 0 — 29 пг/мл, медианы составили 2 и 1 пг/мл крови, соответственно (рисунок 46б). Таким образом, доля внДНК в составе экзосом плазмы крови не превышает 0,025 % в норме и 0,004 % при РМЖ.

Таблица 27 — Клинико-патологическая характеристика больных люминальным РМЖ

Клинико-патологическая характеристика		No (%)
Стадия опухоли	T1	4 (57%)
	T2	3 (43%)
Регионарные и отдаленные метастазы	N0	7 (100%)
	M0	7 (100%)
Инфильтративная протоковая карцинома		7 (100%)
Количество больных		7 (100%)

Инкубация экзосом плазмы с ДНКазой I и дальнейший ИФА показали, что гистоны H2a, H2b и H3 являются частью ДНПК, связанного с экзосомальной мембраной путем взаимодействия с ДНК-связывающими белками, либо с гистон-связывающими белками (рисунок 47). Отсутствие гистона H1 на поверхности мембраны экзосом вероятно связано с заменой H1 на амилоид Р, что увеличивает растворимость в плазме гистон-содержащих ДНПК [19].

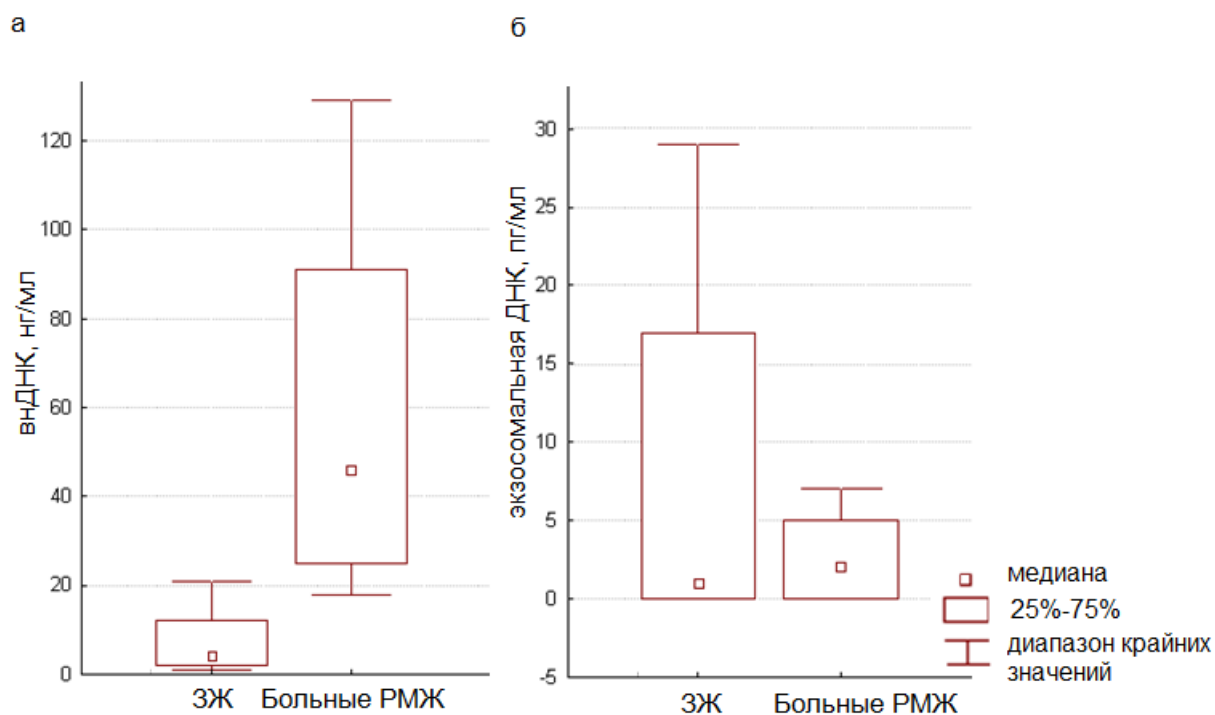


Рисунок 46 — Концентрация внДНК в плазме (а) и в составе экзосом плазмы (б) крови ЗдЖ (n = 7) и первичных больных люминальным РМЖ (n = 7)

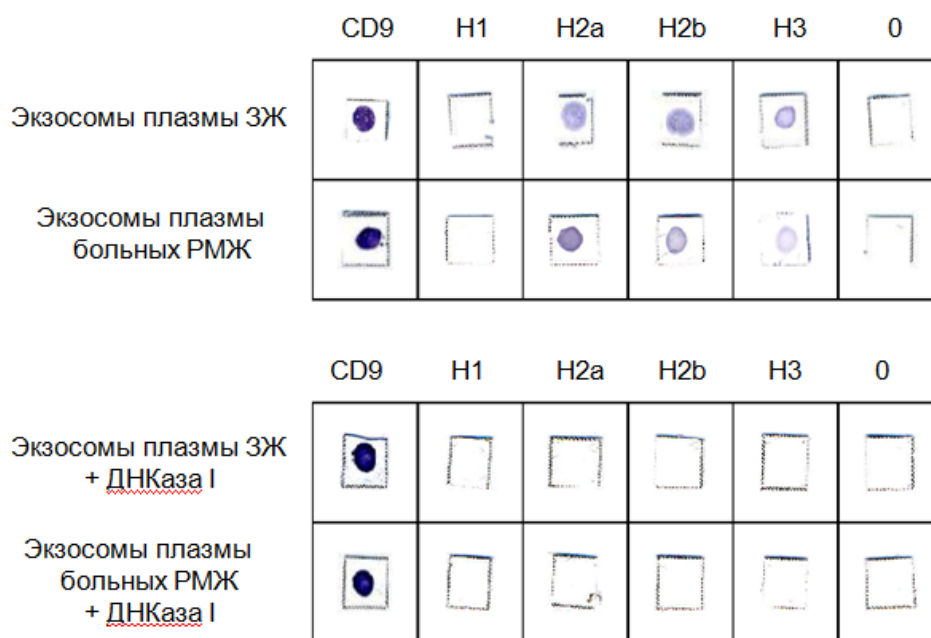


Рисунок 47 — ИФА. Экзосомы из плазмы ЗдЖ и первичных больных РМЖ инкубировали с антителами против гистонов или против CD9, а затем — с конъюгатом козьих антикроличьих антител или кроличьих антимышиных антител, конъюгированных с пероксидазой хрена. Комплексы антиген-антитело визуализировали 4-хлор-1-нафтолом

На следующем этапе работы с помощью масс-спектрометрии и биоинформатического анализа в составе экзосом были идентифицированы 16 ДНК-связывающих белков (рисунок 48), а в них — ДНК-связывающие домены (таблица 28). С помощью QuickGO было показано, что 4 из 16 белков являются кандидатами на связывание внДНК на внешней мембране экзосом: апоптоз-индуцирующий фактор 1 (выявлен с помощью GO:0016020 «мембрана»), регион цепи С IgM (выявлен с помощью GO:0016020 «мембрана», GO:0016021 «интегральный компонент мембраны», GO:0005886 «плазматическая мембрана»), хромодомен-хеликазы-ДНК-связывающий белок 5 (выявлен с помощью GO:0016020 «мембрана») и кальценилин (выявлен с помощью GO:0016020 «мембрана», GO:0005886 «плазматическая мембрана», GO:0008076 «комплекс потенциал-зависимых калиевых каналов»).

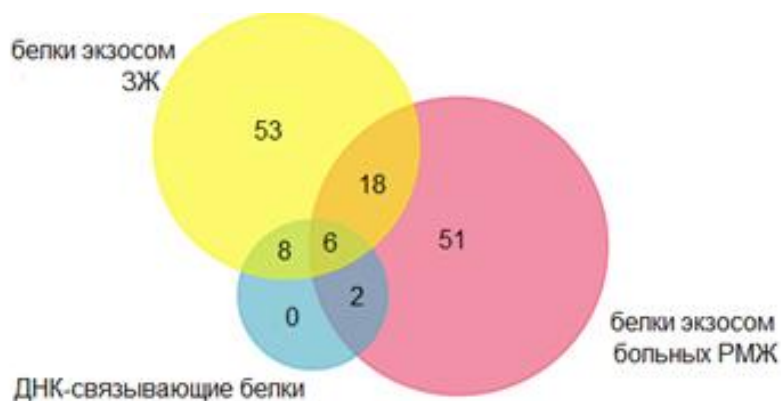


Рисунок 48 — ДНК-связывающие белки в экзосомах плазмы крови ЗдЖ и первичных больных РМЖ. Диаграмма Венна-Эйлера, составленная с использованием ПО QuickGO и FunRich

Установлено, что корона экзосом плазмы крови может включать пять ДНК-связывающих белков: гистоны H2a, H2b, H3, и регион цепи С IgM и сывороточный альбумин. Следует отметить, что гистоны H2a, H2b, H3 и сывороточный альбумин являются универсальными белками короны экзосом, а белки апоптоз-индуцирующий фактор 1, регион цепи С IgM и хромодомен-хеликазы-ДНК-связывающий белок 5 выявлены только в экзосомах плазмы ЗдЖ, кальценилин — только в экзосомах плазмы больных РМЖ (таблица 28).

Таблица 28 — ДНК-связывающие домены в белках экзосом плазмы крови

Uniprot ID	Ген	Название белка	ДНК-связывающий домен	Источник экзосом	Score
O95831	AIFM1	Apoptosis-inducing factor 1, mitochondrial	FAD/NAD(P)-binding domain	ЗдЖ	59
O14862	AIM2	Interferon-inducible protein AIM2	N/A	ЗдЖ	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	ЗдЖ	47
O96004	HAND1	Heart- and neural crest derivatives-expressed protein 1	basic helix-loop-helix (bHLH) domain	ЗдЖ	61
P01871	IGHM	Ig mu chain C region	Immunoglobulin-like domain	ЗдЖ	75
P40938	RFC3	Replication factor C subunit 3	N/A	ЗдЖ	64
Q9Y2P0	ZNF835	Zinc finger protein 835	Zinc finger C2H2-type	ЗдЖ	110
O43309	ZSCAN12	Zinc finger and SCAN domain-containing protein 12	Zinc finger C2H2-type	ЗдЖ	57
P02768	ALB	Serum albumin	N/A	ЗдЖ, больные РМЖ	62
O75531	BANF1	Barrier-to-autointegration factor	2 non-specific dsDNA-binding sites	ЗдЖ, больные РМЖ	60
Q15776	ZKSCAN8	Zinc finger protein with KRAB and SCAN domains 8	Zinc finger C2H2-type	ЗдЖ, больные РМЖ	55
Q9Y2W7	KCNIP3	Calsenilin	EF-hand domain	больные РМЖ	58
Q14966	ZNF638	Zinc finger protein 638	Matrin/U1-C, C2H2-type zinc finger; RNA recognition motif domain	больные РМЖ	65

Помимо связывания внДНК с ДНК-связывающими белками мембраны экзосом, внДНК может присоединяться к экзосомам за счет связывания гистонов в составе ДНПК с гистон-связывающими белками короны экзосом. Поскольку только два гистон-связывающих белка были обнаружены в экзосомах плазмы ЗдЖ, вероятно внДНК связывается с мембраной экзосом благодаря ДНК-связывающим белкам. Необходимо

отметить, что для некоторых ДНК-связывающих белков еще не присвоены соответствующие GO-термины. Например, известно, что с внДНК связывается фибриноген, который локализуется в короне ВВ и образует комплексы с интегринами [175]. Таким образом, можно предположить образование комплексов внДНК-фибриноген-интегрин-экзосома [483].

Помимо ДНК-связывающих внеклеточных и мембранных белков в составе экзосом, в работе были идентифицированы 13 и 8 ДНК-связывающих белков ядерного и цитоплазматического происхождения, соответственно. Установлено, что эти белки выполняют множество молекулярных функций и участвуют различных биологических процессах [484-487].

Таким образом, выявленные крайне малые количества внДНК на поверхности экзосом не имеет диагностической значимости и, вероятно, биологического значения. В тоже время, транспортируемые в составе экзосом ДНК-связывающие белки, вероятно, являются крайне ценным молекулярным грузом экзосом, приводящим к изменениям в клетках-реципиентах.

5.2 Роль экзосом крови в формировании КПС

Одним из ключевых патогенетических факторов канцерогенеза является способность опухоли индуцировать ангиогенез. Известно, что опухоли более 1 мм³ уже морфологически гетерогенны из-за различий в концентрациях питательных веществ, гормонов и факторов роста в отдельных участках новообразования; как следствие, гипоксия и закисление pH индуцируют экспрессию ангиогенных факторов роста. На модели мышей с химически индуцированным канцерогенезом индукция ангиогенеза была зафиксирована уже на прединвазивной стадии внутрипротоковой карциномы *in situ*. Сравнительный анализ нормальной ткани молочной железы и карциномы молочной железы выявил прямую зависимость между интенсивностью васкуляризации опухоли и степенью ее озлокачествления [488].

Известно, что секретируемые раковыми клетками экзосомы вовлечены в стимуляцию ангиогенеза путем переноса биологически-активных молекул. В частности, было показано, что инкубация мезенхимальных клеток жировой ткани с экзосомами, секретируемыми клетками MCF-7 и MDA-MB-231, имитирующими РМЖ, приводит к индукции экспрессии и значительному повышению уровней белков VEGF, TGFβ, SDF-1 и CCL5, способствующих ангиогенезу и метастазированию опухоли [489].

Сравнительная оценка способности экзосом плазмы и экзосом крови стимулировать ангиогенез проведена с помощью методики образования КПС первичными эндотелиоцитами на Матригеле, обедненном ростовыми факторами [490]. Анализ образования КПС при использовании объединенных образцов экзосом плазмы и экзосом крови от 50 ЗдЖ и 50 первичных больных РМЖ (таблица 20) показал, что наибольшим ангиогенным потенциалом обладают экзосомы больных РМЖ (по сравнению с отрицательным контролем $p = 0,0027$ и $p = 0,0030$, соответственно). Установлено, что экзосомы плазмы онкологических больных стимулируют КПС статистически значимо больше, чем экзосомы крови больных РМЖ и экзосомы плазмы ЗдЖ ($p = 0,0206$ и $p = 0,0439$, соответственно) (рисунок 49).

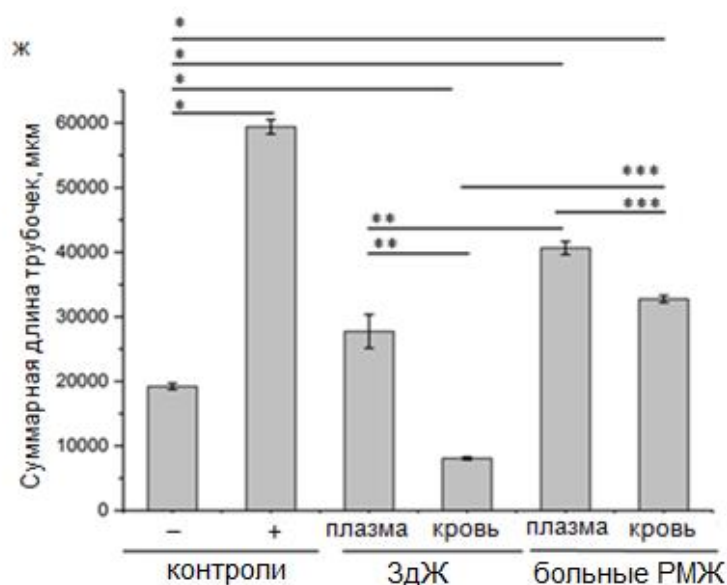
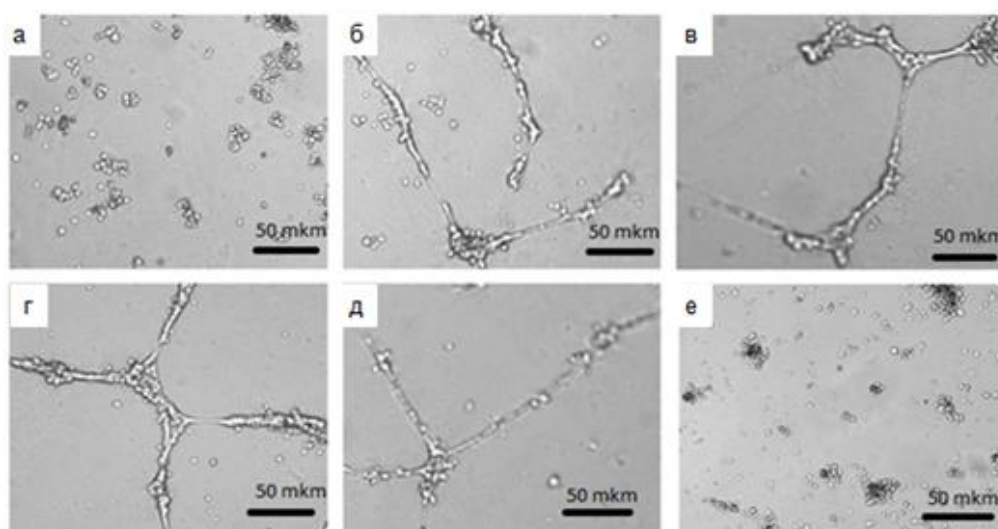


Рисунок 49 — Влияние экзосом плазмы и экзосом крови на формирование КПС первичными эндотелиоцитами

Примечания:

- 1 отрицательный контроль (ФБ) (а);
- 2 экзосомы плазмы больных РМЖ (б);
- 3 экзосомы крови больных РМЖ (в);
- 4 положительный контроль (10% БС) (г);
- 5 экзосомы плазмы ЗдЖ (д);
- 6 экзосомы крови ЗдЖ (е);
- 7 суммарная длина КПС при обработке экзосомами (ж);
- 8 Шкала соответствует 250 мкм. Суммарная длина КПС (среднее $\pm$ SEM, $*p < 0,05$ по сравнению с отрицательным контролем, $**p < 0,05$ по сравнению с экзосомами плазмы ЗдЖ, $***p < 0,05$ по сравнению с экзосомами крови больных РМЖ) [370].

Показано, что экзосомы крови ЗдЖ ингибируют формирование КПС (по сравнению с отрицательным контролем $p = 0,0024$, по сравнению с экзосомами плазмы ЗдЖ и экзосомами крови онкологических больных — $p = 0,0173$ и $p = 0,0006$, соответственно) (рисунок 49) [370]. Сравнительный анализ длины сформированных КПС в результате обработки HUVEC показал, что экзосомы плазмы и экзосомы крови больных РМЖ обладают сопоставимым ангиогенным потенциалом, а то время как у экзосом плазмы ЗдЖ он статистически значимо ниже (рисунок 49) [370].

Известно, что экзосомы дозо-зависимо стимулируют прорастание эндотелия и влияют на морфологию эндотелиальных трубочек [491]. Также в литературе представлено множество доказательств ангиогенез-стимулирующей активности экзосом, в том числе опухолевого происхождения. В частности, было показано, что экзосомы, секретлируемые клетками рака почки (786-0), стимулируют пролиферацию и формирование КПС из HUVEC, в которых после обработки экзосомами повышается экспрессия мРНК VEGF [492]. В тоже время, информация об ангиогенез-стимулирующем потенциале экзосом из нетрансформированных клеток крайне противоречива. В частности, было показано, что секретлируемые тромбоцитами экзосомы, индуцируют ангиогенез и метастазирование при РМЖ и раке лёгких путем переноса в своем составе интегринов (таких как CD 41) [368]. В другой работе было показано, что экзосомы, секретированные MSC, обогащены miR-16, которая является отрицательным регулятором экспрессии VEGF. Добавление таких экзосом к клеткам линии 4T1 (имитируют РМЖ) понижало в них уровень мРНК VEGF, уменьшало секрецию VEGF, и образование КПС по сравнению с необработанными экзосомами клетками [493].

Недавно было показано, что часть экзосом циркулирует в кровотоке, будучи ассоциированными с поверхностью ФЭ [494], однако биологическая роль таких экзосом была не ясна. Полученные в текущей работе данные о сопоставимой активности экзосом плазмы и ассоциированных с ФЭ экзосом при РМЖ дополняют представление о природе ангиогенеза в опухолевой ткани, а выявленная ангиогенез-ингибирующая активность экзосом крови ЗдЖ открывает возможности разработки новых методик противоопухолевой терапии.

5.3 Влияние экзосом на клеточную подвижность

Сравнительную оценку способности экзосом стимулировать подвижность клеток MCF10A и SKBR-3 проводили, используя объединенные образцы экзосом плазмы и экзосом крови от 50 ЗдЖ и 50 первичных больных РМЖ (таблица 20).

MCF10A — иммортализованная, незлокачественная линия клеток молочной железы, полученная от пациентки с доброкачественной фиброкистозной болезнью, и является основополагающей клеточной линией более агрессивного семейства линий РМЖ [495]. Неопухолевые эпителиальные клетки MCF10A на 2D-поверхности располагаются поодиночке или объединяются в клеточные островки разного размера. В условиях отсутствия сыворотки и EGF клетки были практически неподвижны и устанавливали хорошие межклеточные контакты. Добавление лошадиной сыворотки и/или EGF к этим клеткам вызывает стимуляцию подвижности (таблица 29), причем количество мигрирующих клеток и скорость их перемещения значительно увеличивались как для отдельных клеток MCF10A, так и для клеток в составе островков (рисунок 50, таблица 29).

Таблица 29 — Доля подвижных клеток в результате добавления экзосом*

Источник экзосом	Доля подвижных клеток, Медиана и 25–75%	
	MCF10A клетки	SKBR-3 клетки
Отрицательный контроль	6,5 3,0–7,3 —	2,0 0,5–3 —
Положительный контроль	96,5 95,8–100 $p < 0,0001$	15,0 14,0–16,0 $p = 0,0024$
Экзосомы плазмы ЗдЖ	9,0 7,3–11,5 $p = 0,0399$	6,5 3,3–9,8 не значимо
Экзосомы крови ЗдЖ	12,0 4,3–13,5 не значимо	5,0 1,5–6,5 не значимо
Экзосомы плазмы больных РМЖ	17,0 4,3–17,8 $p = 0,0179$	6,0 4,5–8,0 не значимо
Экзосомы крови больных РМЖ	24,0 13,8–26,3 $p = 0,0097$	5,0 1,0–6,0 не значимо

Примечание - *Отрицательные контроли включали клетки без сыворотки и EGF для MCF10A и без сыворотки для SKBR-3. Положительные контроли включали клетки с сывороткой и с EGF для MCF10A и с сывороткой для SKBR-3. Каждый эксперимент повторяли от 4 до 7 раз. Стимуляцию клеточной подвижности оценивали по сравнению с соответствующим отрицательным контролем [370].

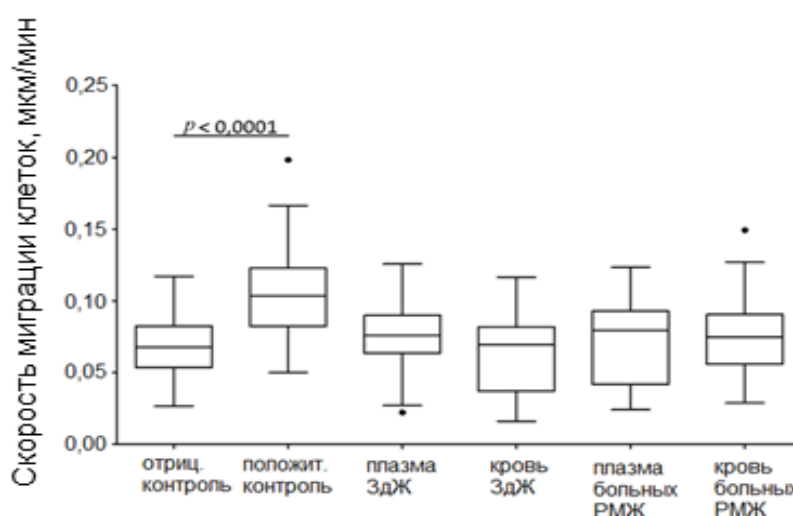


Рисунок 50 — Скорость миграции клеток MCF10A в указанных условиях. Результаты представлены в виде бокс-диаграмм Тьюки. Указана медиана (—) скорости с интервалом 25–75% (□) и интервалы

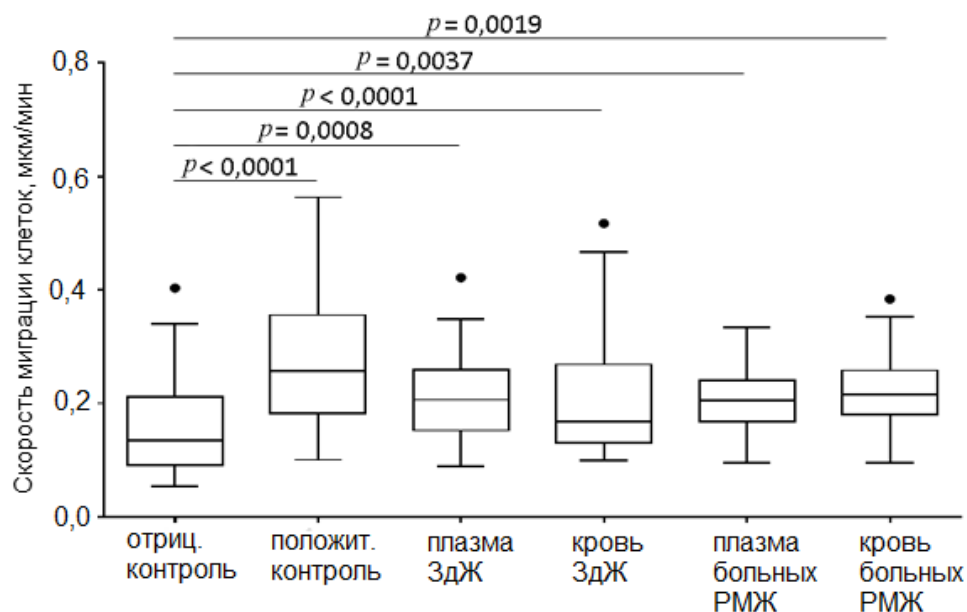


Рисунок 51 — Скорость миграции клеток SKBR-3 в указанных условиях. Результаты представлены в виде бокс-диаграмм Тьюки. Указана медиана (-) скорости с интервалом 25-75% (□) и интервалы

Добавление экзосом плазмы ЗдЖ, а также экзосом плазмы и экзосом крови больных РМЖ приводило к статистически значимому увеличению числа подвижных клеток в отсутствие сыворотки и EGF ($p = 0,0399$, $p = 0,0179$ и $p = 0,0097$, соответственно, таблица 29); аналогичным образом наблюдалось движение нескольких островков целых клеток навстречу друг другу. Необходимо отметить, что экзосомы крови ЗдЖ не вызывали подобного эффекта: миграция наблюдалась только для нескольких клеток на периферии островка. В целом, добавление экзосом не влияет на скорость миграции клеток MCF10A (рисунок 50) [370].

Культивируемые в DMEM с 10 % БС опухолевые клетки SKBR-3 имели фибробласто-подобную форму. Эти клетки, даже в плотной культуре и внутри групп, активно двигались. Максимальное увеличение числа подвижных клеток и самые высокие скорости миграции наблюдались в клетках, с 10 % БС, без экзосом (таблица 29). Удаление сыворотки привело к значительному ослаблению миграции клеток, что свидетельствует о наибольшем влиянии БС на подвижность клеток SKBR-3. Добавление экзосом ЗдЖ и больных РМЖ к контрольным клеткам без БС способствовало увеличению количества одиночных опухолевых клеток, способных к миграции, в 2,5-3 раза, однако статистически значимых различий не наблюдалось (таблица 29). Более того, было показано, что любые экзосомы (из плазмы и из крови ЗдЖ или больных РМЖ), значительно стимулировали скорость перемещения раковых клеток. Меньший эффект на увеличение скорости

движения клеток оказывало добавление экзосом из крови ЗдЖ (рисунок 51). В частности, медианы скорости миграции клеток SKBR-3 после добавления экзосом плазмы ЗдЖ, экзосом плазмы и экзосом крови больных РМЖ составили: 0,2062 мкм/мин, 0,2045 мкм/мин и 0,2162 мкм/мин (рисунок 51) [370].

Таким образом, экзосомы крови первичных больных РМЖ значительно стимулировали миграцию неопухолевых клеток, что проявлялось в увеличении числа подвижных клеток, в тоже время отсутствовало влияние экзосом на скорость клеточной миграции. Экзосомы плазмы и экзосомы крови как ЗдЖ, так и онкологических больных стимулировали скорость миграции опухолевых клеток, но не влияли на количество мигрирующих клеток. Экзосомы крови ЗдЖ оказывали наименьшее влияние на скорость миграции.

5.4 Влияние экзосом на клеточную пролиферацию

Сравнительную оценку способности экзосом стимулировать пролиферацию клеток MCF10A и SKBR-3 проводили, используя объединенные образцы экзосом плазмы и экзосом крови от 50 ЗдЖ и 50 первичных больных РМЖ (таблица 20).

Псевдо-нормальные клетки молочной железы MCF10A были чувствительны к наличию сыворотки и/или EGF (по сравнению с отрицательным контролем $p = 0,006$). Показано, что добавление экзосом крови как ЗдЖ, так и онкологических больных в два раза увеличивало число митотических событий ($p = 0,016$ в обоих случаях), в то время как добавление экзосом плазмы не оказывало существенного влияния на клеточную пролиферацию (таблица 30).

Таблица 30 — Влияние экзосом на пролиферацию клеток молочной железы*

Источник экзосом	Среднее $\pm$ SEM	
	MCF10A клетки	SKBR-3 клетки
Отрицательный контроль	3,65 $\pm$ 0,25	31,40 $\pm$ 6,21
Положительный контроль	20,75 $\pm$ 1,25; $p = 0,006$	24,10 $\pm$ 5,87
Экзосомы плазмы ЗдЖ	4,40 $\pm$ 0,80	30,30 $\pm$ 2,20
Экзосомы крови ЗдЖ	7,30 $\pm$ 0,40 $p = 0,016$	22,60 $\pm$ 6,53
Экзосомы плазмы больных РМЖ	4,25 $\pm$ 0,55	27,20 $\pm$ 5,17
Экзосомы крови больных РМЖ	7,65 $\pm$ 0,45 $p = 0,016$	24,50 $\pm$ 3,23
Примечание - *% событий митоза в течение 15 ч наблюдения.		

На пролиферацию клеток карциномы молочной железы SKBR-3 не влияло отсутствие сыворотки и добавление экзосом из любых источников (таблица 29).

Таким образом, сравнительный анализ влияния экзосом на клетки показал, что экзосомы плазмы первичных больных РМЖ усиливают формирование КПС первичными эндотелиоцитами лучше, чем экзосомы из других источников. Кроме того, экзосомы плазмы онкологических больных статистически значимо увеличивают количество подвижных неопухолевых эпителиоцитов молочной железы и скорость миграции злокачественных клеток SKBR-3. Наблюдаемые биологические эффекты экзосом плазмы онкологических больных могут быть связаны с пониженным содержанием белков, ингибирующих клеточную пролиферацию, миграцию и инвазию. Полученные результаты о способности экзосом плазмы онкологических больных потенцировать злокачественные свойства опухоли согласуются с литературными данными [496–498].

Исследование способности экзосом плазмы ЗдЖ влиять на эндотелиоциты и эпителиоциты молочной железы показано, что эти ВВ не стимулируют формирование КПС и не влияют на скорость миграции псевдо-нормальных, однако повышают подвижность MCF10A и скорость миграции клеток карциномы молочной железы. Ранее аналогичные результаты были показаны с использованием экзосом плазмы здоровых доноров и клеток MDA-MB-231 и MCF-7 [476], иммитирующих РМЖ: экзосомы плазмы стимулировали адгезивные свойства, двумерную случайную миграцию и инвазию злокачественных клеток *in vitro*, а также их метастатическую диссеминацию *in vivo* дозозависимым образом.

Впервые описаны биологические эффекты экзосом крови. Показано, что экзосомы крови сопоставимо с экзосомами плазмы больных РМЖ стимулируют формирование КПС. Более того, обработка экзосомами крови онкологических больных неопухолевых клеток MCF10A статистически значимо увеличивает количество подвижных и пролиферирующих клеток, а обработка клеток карциномы молочной железы — скорость миграции. Таким образом, экзосомы плазмы и экзосомы крови больных РМЖ имеют различия в составе белков, влияющих на стимуляцию ангиогенеза, пролиферацию и миграцию, а также вызывают сходные (но не идентичные) биологические эффекты.

Биологические эффекты экзосом крови ЗдЖ отличаются от эффектов экзосом крови больных РМЖ. В частности, в норме экзосомы крови подавляют формирование КПС, при этом статистически значимо стимулируют пролиферацию незлокачественных клеток и миграцию клеток карциномы молочной железы. Принимая во внимание, что основная часть экзосом крови онкологических больных секретируется нормальными клетками, вполне вероятно, что такие экзосомы играют не менее важную роль в диссеминации опухоли.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Злокачественные новообразования молочной железы представляют собой наиболее распространенную онкологическую патологию среди женщин. По данным ВОЗ, в 2022 году в мире было зарегистрировано 2 308 897 новых случаев РМЖ и 666 000 смертей, связанных с этим заболеванием [1]. За последнее десятилетие отмечается рост заболеваемости на 13,75 % (с 45,75 на 100 000 населения в 2010 году до 47,39 в 2020 году) [499], при этом 24 % первично выявленных больных с РМЖ имеют III-IV стадии заболевания [500]. Данное обстоятельство связано с бессимптомным развитием заболевания, несвоевременным обращением пациенток к специалистам, тенденцией к более раннему старту злокачественного новообразования, а также недостатками инструментальных методов анализа и отсутствием чувствительных биомаркеров.

Современная диагностика РМЖ основывается на комплексном подходе, включающем визуализирующие методы, такие как маммография, УЗИ с доплерографией, МРТ, ПЭК/КТ, сцинтимаммография, и биопсию первичного опухолевого узла и регионарных лимфоузлов. Поскольку каждая из методик имеет свои преимущества и недостатки, для диагностики РМЖ всегда используется комбинация методов.

Маммография является «золотым стандартом» для скрининга популяции женщин, а также для уточняющей диагностики РМЖ. Несмотря на доступность данного инструментального анализа, у четверти больных со злокачественным новообразованием определяется на поздних стадиях заболевания [2, 501], что может быть связано с высокой долей ложноотрицательных результатов при маммографии [502]. В связи с низкой специфичностью (34 % при раннем РМЖ) и высоким влиянием фактора оператора-зависимого метода, УЗИ молочных желез используется для повышения информативности полученных при маммографии данных и крайне редко — как самостоятельный метод [502]. Недостатками МРТ при выявлении раннего РМЖ являются низкая специфичность (26,4 %), высокая стоимость исследования, а также наличие ряда медицинских ограничений (наличие водителя ритма, клаустрофобия, избыточный вес больной и т.д.) [502]. Ограничениями ПЭТ/КТ для выявления раннего РМЖ являются гистологический тип и степень злокачественности опухолевых клеток. В частности, клетки дольковой карциномы и медленно растущих видов рака, таких как тубулярная карцинома (выявляется в 20 % случаев) имеют более низкую метаболическую активность, а значит меньше поглощают радиофармпрепарат (чаще всего ^{18}F -фтордезоксиглюкозу) [502]. Поскольку при размере новообразования менее 1 см специфичность ПЭТ/КТ составляет 59 %, использование данного метода для выявления раннего РМЖ является предметом дискуссии [502].

Маммосцинтиграфия имеет ряд преимуществ по сравнению с вышеперечисленными методами выявления РМЖ. В частности, степень накопления радиофарм-препарата (^{99m}Tc -«MIBI», ^{99m}Tc -«Технетрил» и др.) в опухолевом очаге не зависит от плотности железистой ткани, позволяет выявлять злокачественное новообразование размером от 6 мм, в том числе имеющий мультицентричный рост [72, 73]. Чувствительность анализа зависит от биологического подтипа РМЖ и составляет в целом 82 % для пальпируемых (76 % при люминальном А и 100 % при трижды-негативном и HER2-позитивном подтипах) [72] и 52 % для непальпируемых новообразований [73].

Патоморфологическое исследование также имеет некоторые ограничения при выявлении раннего РМЖ. Достоверность трепан-биопсии с определением гистологического типа, степени злокачественности, статуса рецепторов ЭР, ПР, HER2 и Ki-67 составляет около 70 % [39, 74, 75], однако может быть неинформативна при недостаточном количестве забранного материала во время биопсии. Необходимо отметить, что проблема выявления больных на ранних стадиях РМЖ связана не только с чувствительностью и специфичностью современных методов анализа, но дополнительно осложняется гетерогенностью молекулярного профиля самой опухоли.

На сегодняшний день прогноз и течение РМЖ определяются стадией и биологическими характеристиками опухоли, при этом подтипы РМЖ отличаются различной чувствительностью к лекарственным препаратам и исходом заболевания. На выбор тактики лечения РМЖ влияет экспрессия рецепторов к эстрогену, прогестерону и эпидермальному фактору роста человека 2, а также индекс пролиферативной активности Ki67 в первичной опухоли.

В соответствии с последними рекомендациями ESMO (European Society of Medical Oncology) и Российского общества онкомаммологов, выделяют 4 основных молекулярных подтипа РМЖ: люминальный А, люминальный В (HER-2 положительный и HER-2 отрицательный), трижды-негативный и HER-2 положительный нелюминальный.

Люминальные подтипы РМЖ составляют большинство карцином молочной железы, составляя 60–70 % всех опухолей [503]. Прогноз у них более благоприятный, чем у гормон-рецептор-отрицательных опухолей молочной железы, и зачастую они менее чувствительны к химиотерапии. Опухоли молочной железы, классифицируемые как люминальный подтип А, на которые приходится 40 % всех случаев РМЖ, демонстрируют повышенную экспрессию рецепторов стероидных гормонов, в то время как экспрессия генов HER2 и пролиферации снижена. Показано, что люминальный А РМЖ чувствителен к гормонотерапии [503].

Люминальный В подтип составляет ~20 % всех случаев РМЖ и характеризуется повышенным риском рецидива по сравнению с люминальным А подтипом, положительной экспрессией рецепторов стероидных гормонов, вариабельной экспрессией HER2 и повышенной экспрессией генов пролиферации. Для больных люминальным В HER2-отрицательным подтипом РМЖ показана как гормоно-, так и химиотерапия, а с HER2-положительным подтипом — анти-HER2-терапия и гормоно- или химиотерапия [64].

Трижды-негативный подтип характеризуется отсутствием рецепторов к эстрогену, прогестерону и эпидермальному фактору роста и составляет около 15 % всех случаев инвазивного РМЖ. Для ТН-РМЖ характерно агрессивное течение и неблагоприятный прогноз заболевания; пациентам рекомендована химиотерапия [64].

HER-2 положительный нелюминальный подтип РМЖ составляет ~10 % всех случаев РМЖ и характеризуется гиперэкспрессией HER2, отсутствием рецепторов стероидных гормонов и наиболее неблагоприятным прогнозом. Для больных с данным молекулярным подтипом показана анти-HER2- и химиотерапия [64].

Поскольку вовремя диагностированное злокачественное новообразование молочной железы лучше поддается лечению и имеет большую вероятность ремиссии, одной из актуальных задач молекулярной онкологии является идентификация высокоточных биомаркеров, позволяющих выявить РМЖ на начальных стадиях заболевания. Принимая во внимание, что 39 % больных РМЖ в России являются женщинами трудоспособного возраста и из них более 50 % впервые выявленных в течение первого года получают инвалидность [504, 505], ранняя диагностика РМЖ снизит социально-экономическое бремя в РФ путем уменьшения затрат на оказание медицинской помощи, выплату пенсий по инвалидности и пособий по временной утрате трудоспособности.

Диагностика злокачественных новообразований с использованием «жидкостной биопсии» имеет такие преимущества перед тканевой биопсией, как минимальная инвазивность, возможность серийного взятия крови, более полное отражение гетерогенности опухоли [506], а также способность выявлять новообразования в анатомически недоступных областях [104]. Биомаркеры, которые можно обнаружить с помощью «жидкостной биопсии», включают циркулирующие опухолевые клетки [507], ВВ, включая экзосомы [508, 509], и нуклеиновые кислоты, циркулирующие в крови в составе белковых комплексов, такие как опухолевая ДНК [25], РНК (включая микроРНК [33], днкРНК [510], кольцевую РНК и мРНК [511] и белки опухолевого происхождения [511].

Одной из проблем при внедрении «жидкостной биопсии» в клиническую практику является превалирование в анализируемом образце биополимеров неопухолевого происхождения. В частности, доля вноДНК в крови онкологических больных не превышает

1 %, что требует разработки подходов для ее обогащения, например, за счет белковой составляющей циркулирующих в крови ДНПК. Улучшить аналитические характеристики диагностических систем на основе вноДНК также позволит информация о фрагментации и распределении ДНК-фрагментов между компонентами крови онкологических больных. Информация о фрагментации вноДНК и ее распределении между компонентами крови, а также информация о белках в составе ДНПК также могут пролить свет на происхождение вноДНК в циркуляции и ее биологическую роль в канцерогенезе. К сожалению, в связи со сложностью получения нативных ДНПК особенности их циркуляции и состава до сих пор не исследованы.

Другим перспективным направлением в области «жидкостной биопсии» является анализ молекулярного груза ВВ и в частности, экзосом. Известно, что в процессе созревания в экзосомы идет направленный сортинг биологически-активных молекул, влияющих на метаболизм клеток-реципиентов путем переноса ВВ током крови и лимфы. Как и в случае в вноДНК, для внедрения диагностических тестов на основе анализа экзосом остаются невыясненные вопросы связывания ВВ с компонентами крови, биологическая роль и диагностическая значимость ассоциированных с ФЭ крови ВВ.

Целью настоящей работы было комплексное изучение молекулярно-биологических особенностей дезоксирибонуклеопротеиновых комплексов и экзосом крови, установление их патогенетической значимости и диагностической ценности у больных раком молочной железы.

Для этого в проспективном исследовании, включающем от 190 лиц контрольной группы (практически здоровых женщин) и 194 первичных больных РМЖ (T1-2N0-1M0), с учетом данных молекулярно-биологических исследований, был проведен анализ особенностей циркуляции и состава ДНПК и экзосом.

Критериями включения больных РМЖ в исследование явились: возраст старше 18 лет; первично выявленный РМЖ; размер злокачественного новообразования менее 5 см; отсутствуют признаки поражения метастазами регионарных лимфатических узлов либо выявлено поражение не более 3 подмышечных и/или во внутригрудных лимфоузлов на стороне поражения; наличие подписанного информированного согласия.

Критериями включения в контрольную группу являлись: возраст женщин старше 18 лет; отсутствие заболеваний репродуктивной системы; отсутствие в анамнезе онкологических заболеваний; наличие подписанного информированного согласия.

Критериями исключения онкологических больных из исследования явились: возраст моложе 18 лет; поражение 4 и более подмышечных и/или внутригрудных лимфоузлов на стороне поражения, либо метастазы в спящих между собой лимфоузлах; наличие

отдаленных метастазов на момент взятия крови; получение неоадьювантной противоопухолевой терапии; отказ от подписания информированного согласия.

Критериями исключения из контрольной группы явились: возраст женщин моложе 18 лет; наличие заболеваний репродуктивной системы; отсутствие в анамнезе онкологических заболеваний; отказ от подписания информированного согласия.

Методологически, данное исследование было разделено на четыре блока. Первый блок работы посвящен фундаментальным аспектам молекулярной онкологии и посвящен анализу строения концов, фрагментации и оценке индекса метилирования внДНК плазмы крови и асс-ФЭ ДНК больных РМЖ.

При изучении строения концов внДНК было установлено, что в норме они гетерогенны, а при РМЖ в составе внДНК плазмы представлены преимущественно выступающие 3'- и 5'-концы, в ассоциированной с ФЭ ДНК — только 5'-концы. Сравнительный анализ фрагментации внДНК в плазме крови контрольной группы и больных РМЖ выявил снижение доли низкомолекулярных фрагментов (100-1000 п.н.) в ~10 раз при злокачественном новообразовании (~ 20 % и ~ 2 %, соответственно), при этом не было выявлено отличий во фрагментации асс-ФЭ ДНК — в обоих случаях преобладали высокомолекулярные фрагменты (ДНК более 1000 п.н. составляет более 99 %). Полученные результаты о репертуаре концов и профилю фрагментации циркулирующей в крови ДНК демонстрируют, что в норме не менее 1/5 ДНК плазмы имеет апоптотическое происхождение, а при злокачественном новообразовании не менее 1/3 ДНК — некротическое происхождение. Таким образом, основную часть ДНК в крови представляет ДНК, секретированная клетками.

Сравнительный анализ концентрации внДНК в плазме и асс-ФЭ ДНК крови контрольной группы и больных РМЖ показал статистически значимые отличия только в образцах плазмы (10,5 нг/мл в норме и 23,5 нг/мл при злокачественном новообразовании, $p = 0,0056$). Оценка ИМ с помощью ПЦР в режиме «реального времени» после бисульфитной конверсии показала, что наибольший ИМ характерен для внДНК, ассоциированной с ФЭ крови больных РМЖ (61 %). Кроме того, было установлено, что аберрантно метилированные последовательности промоторной области гена опухолевой супрессии *RARβ2* выявляются только в составе высокомолекулярной внДНК (более 1000 п.н.) как в норме, так и при РМЖ, хотя известно, что для данного гена характерна высокая частота метилирования [397, 512, 513].

В настоящее время большинство исследователей сходятся во мнении, что белки, формирующие комплексы с внДНК не только защищают в крови нуклеиновую кислоту от гидролиза нуклеазами, но и определяют ее молекулярные функции в организме. Поэтому

второй блок работы был посвящен установлению роли внДНК в канцерогенезе. Для этого были разработаны принципиально разные подходы для выделения из крови нативных ДНПК, в дальнейшем с помощью масс-спектрометрии идентифицированы в составе этих комплексов белки и с помощью биоинформатических подходов предсказаны их молекулярные функции.

Первый метод выделения нативных ДНПК из плазмы крови основывался на способности ДНК связываться с поверхностью МДС. Ранее было показано, что ДНК длиной более 100 п.н. связывается с поверхностью МДС с эффективностью не менее 90 % [372], а лактоферрин является ДНК-связывающим белком [176]. Для разработки выделения нативных ДНПК были сформированы модельные ДНПК, содержащие ^{32}P -меченную ДНК и лактоферрин и подобраны условия связывания таких комплексов с МДС. В дальнейшем в работе была подтверждена возможность выделения нативных ДНПК из плазмы крови с последующей идентификацией белков в их составе методом масс-спектрометрии. Поскольку эффективность элюции ДНПК с поверхности МДС составляла $48 \pm 7 \%$ (среднее $\pm$ ошибка среднего), был разработан альтернативный метод выделения нативных ДНПК — за белковую составляющую.

К белкам, являющимися обязательным компонентом ДНПК, все исследователи единогласно относят гистоны [414-416]. В связи с этим, для идентификации белкового репертуара циркулирующих в крови ДНПК, нативные ДНК-белковые комплексы были выделены из плазмы крови методом аффинной хроматографии с использованием анти-гистоновых антител. С помощью масс-спектрометрии в составе ДНПК крови контрольной группы и первичных больных РМЖ идентифицированы 177 и 169 белков, соответственно, из них 38 белков являлись универсальными. Дальнейший биоинформатический анализ показал, что мембранные белки составляют более половины белков ДНПК, что косвенно свидетельствует о связывании ДНК-белковых комплексов с клеточной мембраной через белковую составляющую, что, вероятно является необходимым условием для проникновения внДНК в клетку. Поскольку внеклеточные белки в составе ДНПК составляет менее 5 %, можно предположить, что в циркуляцию попадают уже сформированные ДНК-белковые комплексы. Также впервые было установлено, что при РМЖ в составе ДНПК возрастает доля белков, участвующих в транспорте и передаче сигналов, что может косвенно объяснять причину повышения концентрации внДНК в крови при развитии злокачественного заболевания.

Также с помощью биоинформатического анализа впервые в составе белков ДНПК выявлены 38 типов ДНК-связывающих мотивов, что позволило условно разделить белки ДНПК на связывающие нуклеиновые кислоты и белки-«пассажиры», на долю которых

приходится более половины белков в комплексах. На следующем этапе работы было проведено моделирование архитектуры возможных ДНПК на основе анализа идентифицированных белков в их составе и построено 23 модели возможных ДНПК, циркулирующих в крови контрольной группы, и 25 моделей возможных ДНПК, циркулирующих в крови больных РМЖ.

Проведенное нами исследование показало, что в процессы регуляции метаболизма нуклеиновых кислот вовлечены преимущественно ДНК-связывающие белки ДНПК, а в процессы межклеточной коммуникации и передачи сигнала — белки-«пассажиры» ДНПК. Увеличение представленности белков-«пассажиров», вовлеченных в неизвестные биологические процессы, в составе ДНПК крови онкологических больных вероятно важно для транспорта и защиты внДНК от действия нуклеаз, узнавания ДНПК иммунной системой, интернализации и клиренсе ДНПК.

Также было установлено, что представленность ДНК-связывающих белков в составе ДНПК крови в норме и при РМЖ сопоставима. Следует подчеркнуть, что при злокачественном новообразовании увеличивается представленность белков-«пассажиров», стимулирующих ангиогенез, пролиферацию, инвазию, миграцию клеток и регулирующих иммунный надзор. Полученные в работе результаты косвенно свидетельствуют о том, что внДНК обладает биологической активностью только в комплексе с белками.

Для выяснения механизмов появления внДНК в кровотоке с помощью биоинформатического анализа белков в составе ДНПК было показано, что в норме ассоциированы с апоптозом 6 белков, с некрозом — 1 и 3 — с активной секрецией, а при РМЖ 3 белка ассоциированы с апоптозом и 5 — с активной секрецией. Полученные данные свидетельствуют, что в крови больных со злокачественным новообразованием секретируемая внДНК преобладает над апоптотической. Таким образом, результаты анализа белков в составе ДНПК согласуются с результатами по репертуару концов и фрагментации внДНК в крови контрольной группы и первичных больных РМЖ.

Третий блок работы был посвящен исследованию морфологии и репертуара белков экзосом крови онкологических больных. Наличие экзосом на поверхности ФЭ является уже общепризнанным фактом [514, 515], однако состав, биологическая роль и диагностическая ценность экзосом крови до начала этой работы были не известны.

Оценка концентрации экзосом показала, что у клинически здоровых женщин и у первичных больных РМЖ $\sim 1/2$ экзосом крови ассоциированы с поверхностью ФЭ (медианы долей экзосом в плазме от экзосом крови составили 43 % и 55 %, соответственно). Установлено, что концентрация экзосом в плазме и в крови у больных РМЖ статистически значимо повышается по сравнению со здоровыми женщинами ($p < 0,05$). Установленные

нами факты будут иметь важное значение в диагностике злокачественных новообразований, в частности РМЖ на ранних этапах.

С помощью крио-электронной микроскопии впервые описана морфология экзосом крови в норме и при РМЖ. Установлены отличия в репертуаре экзосом плазмы и экзосом крови контрольной группы женщин: в плазме преобладают одинарные ВВ (91 %), а в крови — одинарные (37 %), двойные (20 %) и двухмембранные ВВ (22 %). У больных РМЖ в составе экзосом плазмы и экзосом крови преобладали одиночные ВВ — 81 % и 70 %, соответственно. Таким образом, при РМЖ по сравнению с нормой возрастает концентрация и изменяется морфология как экзосом плазмы, так и экзосом крови, что свидетельствует о вовлечении этого типа ВВ в развитие РМЖ.

Одним из компонентов молекулярного груза экзосом, индуцирующим клеточную подвижность и метастатический потенциал опухолевых клеток, являются тетраспанин-ассоциированные шеддазы, в том числе ADAM-10 [516-518]. Известно, что эти ферменты осуществляет эктодоменный шеддинг таких субстратов, как рецепторы факторов роста, рецепторы адгезии и кадгерины. Помимо значимости и понимания функции ММР в короне экзосом, в литературе накапливаются данные в роли неассоциированных с тетраспанинами протеаз экзосом — 20S протеасомы. Эти ферментативные комплексы путем гидролиза активируют или ингибируют белки, участвующие в регуляции пролиферации, апоптоза, миграции клеток, транскрипции генов и иммунного ответа [328, 446]. В данной работе была выдвинута и подтверждена гипотеза о вовлечении в канцерогенез как ферментов в короне экзосом, как и с внутривезикулярной локализацией. В частности, было показано, что у больных РМЖ по сравнению с контрольной группой статистически значимо повышаются уровни 20S протеасом и ADAM-10 в CD9+субпопуляции экзосом плазмы, а также экзосом крови.

Известно, что молекулярный груз экзосом лишь отчасти отражает состав родительских клеток [257]. Для подтверждения гипотезы о значимости экзосом крови в канцерогенезе, методом масс-спектрометрии были идентифицированы 111 и 146 белков в составе экзосом крови у лиц контрольной группы и первичных больных РМЖ, соответственно, при этом 34 белка являлись универсальными.

С помощью биоинформатического анализа установлено, что наиболее значимые изменения в представленности белков при РМЖ выявлено в составе экзосом плазмы. В частности, при злокачественном новообразовании по сравнению с нормой в экзосомах плазмы возрастает доля транспортных белков, белков, обладающих каталитической активностью и белков, стимулирующих клеточное движение. Полученные в работе результаты по протеомному портрету экзосом плазмы подтверждают ранее

опубликованные данные [475, 482, 519], тогда как данные по белкам экзосом крови получены впервые.

С помощью биоинформатического анализа идентифицированных в составе экзосом белков было установлено, что при РМЖ экзосомы крови по сравнению с экзосомами плазмы обогащены белками, стимулирующими ЭМП, ангиогенез, клеточную пролиферацию, миграцию и инвазию. Также в проведенном исследовании было продемонстрировано, что экзосомы крови контрольной группы обогащены белками, ингибирующими эти процессы, что значительно дополняет информацию об функциональной роли экзосом, ассоциированных с ФЭ, в канцерогенезе.

Для подтверждения гипотезы о различной роли экзосом плазмы и экзосом, ассоциированных с форменными элементами крови в стимуляции роста новообразования, на объединенных образцах было исследовано влияние экзосом плазмы и экзосом крови контрольной группы и первичных больных РМЖ на ключевые этапы опухолевой прогрессии *in vitro*, а также оценена возможность транспорта ДНК в составе экзосом.

С помощью количественной ПЦР было показано, что доля вДНК в короне экзосом как в норме, так и при злокачественном новообразовании не превышает 0,03 % от вДНК в плазме крови, что свидетельствует о том, что вДНК транспортируется в составе ДНПК, а не экзосом. Дальнейший анализ показал, что из 16 ДНК-связывающих белков в составе экзосом плазмы 4 белка входят в состав внешней мембраны и 5 располагаются в везикулярной короне. Теоретически, вДНК также может связываться с экзосомами через формирование комплексов гистоны в составе ДНПК — гистон-связывающие белки короны. Действительно, в составе экзосом было идентифицировано 2 гистон-связывающих белка. Полученные данные свидетельствуют о том, что вДНК преимущественно связывается с внешней поверхностью экзосом за счет ассоциации с ДНК-связывающими белками.

Способность экзосом стимулировать формирование КПС оценивали с помощью первичных эндотелиоцитов. Было установлено, что экзосомы плазмы и экзосомы крови больных РМЖ сопоставимо стимулируют ангиогенез, а экзосомы крови контрольной группы ингибируют этот процесс. Влияние экзосом плазмы и экзосом крови здоровых женщин и больных РМЖ на клеточную пролиферацию и миграцию оценивали на линиях псевдо-нормальных эпителиоцитов (MCF10A) и клетках карциномы молочной железы (SKBR-3). Установлено, что экзосомы крови контрольной группы и больных РМЖ сопоставимо стимулируют пролиферацию незлокачественных эпителиоцитов молочной железы, при этом только экзосомы крови онкологических больных статистически значимо увеличивают долю подвижных MCF10A. Клеточную подвижность псевдо-нормальных клеток в меньшей степени также стимулируют экзосомы плазмы здоровых женщин и

больных РМЖ. Оценка скорости клеточной миграции показала, что экзосомы из всех источников стимулируют злокачественные клетки SKBR-3 и не влияют на MCF10A. Способность экзосом плазмы потенцировать злокачественные свойства опухоли ранее была показана и в других работах [476, 496-498], данные о влиянии экзосом крови на ключевые процессы опухолевой диссеминации получены в настоящей работе впервые. Данное обстоятельство является уникальной информацией не только для молекулярной онкологии, но имеет важное значение для практической медицины.

Четвертый блок работы включает анализ онкомаркеров в составе экзосом и ДНПК крови больных РМЖ. В частности, исследовано распределение aberrантно метилированной формы гена *RARβ2* во вДНК, а также опухоль-ассоциированных белков в ДНПК и экзосомах крови пациенток. Сравнительный анализ концентрации aberrантно метилированной вДНК плазмы и вДНК, ассоциированной с ФЭ в крови контрольной группы и первичных больных РМЖ выявил статистически значимое увеличение концентрации эпигенетического маркера в трипсиновом элюате при наличии злокачественного новообразования (151 пг/мл против 381 пг/мл, $p = 0,000001$, при этом в норме маркер был выявлен в 52 %, а при РМЖ — в 96 % случаев). Полученные данные свидетельствуют, что асс-ФЭ ДНК является наиболее перспективным источником диагностического материала для разработки тест-систем для «жидкостной биопсии». Необходимо отметить, что концентрация aberrантно метилированной промоторной области гена *RARβ2* в плазме контрольной группы коррелирует с возрастом (коэффициент Спирмана $r = 0,45$, $p = 0,001$), что накладывает дополнительные требования при разработке тест-систем.

Путем подбора было показано, что комбинация пяти белков (PHD finger protein 1, β -1 adrenergic receptor, Proteasome assembly chaperone 1, Paraplegin и Single-pass membrane and coiled-coil domain-containing protein 4) в составе ДНПК крови позволяет дифференцировать первичных больных РМЖ от клинически здоровых женщин с чувствительностью 100 % и специфичностью 80 %. В комбинации с анализом последовательностей вноДНК данные протеомные маркеры могут служить потенциальными мишенями для разработки мультимаркерных подходов для диагностики злокачественного новообразования методом «жидкостной биопсии».

Для выявления диагностически-значимых белков среди уникальных белков экзосом плазмы и экзосом крови первичных больных РМЖ был проведен поиск среди прогностических белков для всех типов злокачественных новообразований, аннотированных в базе данных HPA [385, 455]. Было обнаружено, что в составе экзосом плазмы присутствует 29 прогностических белка, а в экзосомах крови — 64, из них 4 белка

ассоциированы с РМЖ. Полученные данные свидетельствуют, что белки экзосом крови могут быть более перспективным источником маркеров для выявления РМЖ методом «жидкостной биопсии» по сравнению с экзосомами плазмы. Действительно, комбинация пяти белков в составе экзосом крови (белок, связывающий белок-предшественник амилоида $\beta 2$, цитokerатин 1, кератин 6В, $\alpha 1$ -антитрипсин, белок супрессор передачи цитокинового сигнала 3) позволяет дифференцировать больных РМЖ от ЗДЖ с чувствительностью 71 % и специфичностью 100 %.

Обобщая представленные в диссертации результаты, можно заключить, что данная работа представляет собой первое комплексное исследование циркулирующих в крови ДНПК и экзосом крови в норме и при РМЖ. Использованные современные методологические подходы к исследованию нуклеиновых кислот и белков, включающих молекулярно-биологические, химические и физические методы, а также биоинформатический анализ к обработке данных, дали возможность впервые описать состав ДНПК и экзосом и наметить перспективные протеомные маркеры для диагностики РМЖ методом «жидкостной биопсии». Предсказанные биоинформатическими подходами эффекты экзосом крови клинически здоровых женщин и больных РМЖ подтверждены в экспериментах *in vitro*. Информация о строении концов, фрагментации и ИМ вДНК плазмы и асс-ФЭ ДНК существенно расширяет знания о феномене циркулирующей ДНК при злокачественных новообразованиях, а также может быть использована для разработки ПЦР-систем для «жидкостной биопсии».

Таким образом, проведенное исследование, направленное на оценку функциональной значимости секрета опухоли в виде ДНПК и экзосом при РМЖ, значительно расширило представления о патогенезе злокачественного процесса. Выявленный в работе высокий диагностический потенциал ДНК-белковых комплексов и экзосом позволит повысить эффективность ранней диагностики РМЖ методом «жидкостной биопсии», что в свою очередь снизит процент инвалидизации и смертность от самого распространенного злокачественного новообразования среди женщин.

ВЫВОДЫ

1. В плазме крови больных РМЖ доля низкомолекулярной внеклеточной ДНК (100-1000 п.н.) составляет около 2 %, что в ~7 раз ниже по сравнению с контрольной группой, при этом ассоциированная с форменными элементами ДНК как в норме, так и при злокачественном заболевании представлена высокомолекулярными фрагментами (более 1000 п.н.). У больных РМЖ, по сравнению со здоровыми женщинами, внеклеточная ДНК плазмы крови имеет преимущественно выступающие 3'- и 5'-концы, а ассоциированная с форменными элементами ДНК – только выступающие 5'-концы.
2. Для больных РМЖ характерно статистически значимое ($p < 0,05$) увеличение концентрации экзосом как в плазме, так и в цельной крови по сравнению с контрольной группой (в плазме $31,9 \times 10^9$ против $7,9 \times 10^9$ везикул/мл крови, в крови — $57,4 \times 10^9$ против $18,4 \times 10^9$ везикул/мл крови).
3. При РМЖ уровень тетраспанин-неассоциированной 20S протеасомы в экзосомах плазмы и экзосомах крови статистически значимо ($p < 0,05$) повышен по сравнению с контрольной группой (в 1,6 и в 2 раза, соответственно), причем при трижды-негативном РМЖ он выше, чем при люминальных подтипах. При люминальном РМЖ, по сравнению с трижды-негативным РМЖ, уровень тетраспанин-ассоциированной шеддазы ADAM-10 в короне CD-9-положительных экзосом плазмы и экзосом крови статистически значимо ($p < 0,05$) повышен (в 1,8 и 1,2 раза, соответственно).
4. Выявлено 112 уникальных для РМЖ белков экзосом. У больных РМЖ по сравнению со здоровыми женщинами в составе экзосом плазмы и экзосом крови возрастает доля транспортных (в 1,7 и 1,2 раза, соответственно) и каталитических белков (в 10 и 1,8 раз, соответственно), а также вовлеченных в метаболизм белков (в 1,9 и 2,3 раза, соответственно), при этом снижается доля белков, вовлеченных в межклеточную коммуникацию (в 1,3 раза в обоих случаях) и передачу сигнала (в 1,5 и 1,3 раза, соответственно), а также белков, регулирующих метаболизм нуклеотидов (в 2,8 и 1,5 раза, соответственно). У больных РМЖ экзосомы крови по сравнению с экзосомами плазмы обогащены белками, стимулирующими эпителиально-мезенхимальный переход (в 3 раза), клеточную пролиферацию (в 4 раза), инвазию (в 3 раза) и подвижность (в 2 раза), при этом протеом экзосом крови здоровых женщин обогащен белками, ингибирующими эти процессы.
5. Выявлен 131 уникальный для РМЖ белок дезоксирибонуклеопротеиновых комплексов, из которых треть имеют мотивы, связывающие нуклеиновые кислоты. Введено понятие о белках-«пассажирах», входящих в состав таких комплексов, но не связывающих

внеклеточную ДНК. При РМЖ, по сравнению со здоровыми женщинами, в составе циркулирующих дезоксирибонуклеопротеиновых комплексов увеличивается представленность белков-«пассажира», стимулирующих эпителиально-мезенхимальный переход (в 5 раз), клеточную пролиферацию (в 1,8 раза), инвазию (в 1,7 раза) и миграцию (в 1,6 раза), а также регулирующих иммунный надзор (в 1,8 раза).

6. Как в норме, так и при РМЖ в составе дезоксирибонуклеопротеиновых комплексов мембранные белки составляют 58 %, а внеклеточные – 5 %. В процессы регуляции метаболизма нуклеиновых кислот вовлечены преимущественно ДНК-связывающие белки комплексов, а в процессы межклеточной коммуникации и передачи сигнала – белки-«пассажиры». При РМЖ в составе ДНК-связывающих белков комплексов в 1,3 раза возрастает доля белков, регулирующих метаболизм нуклеиновых кислот и снижается доля белков, вовлеченных в процессы межклеточной коммуникации и передачи сигналов (в 1,5 и 1,6 раз, соответственно). В составе белков-«пассажира» возрастает доля транспортных белков и снижается доля белков, опосредующих энергетические пути (в 1,7 и 3,2 раза, соответственно).

7. Для больных РМЖ характерно перераспределение субпопуляций экзосом с различной морфологией как в плазме, так и в крови по сравнению со здоровыми женщинами: в плазме и в норме, и при РМЖ преобладают одиночные экзосомы (91 % и 81 %, соответственно), при этом доля такой субпопуляции внеклеточных везикул на поверхности форменных элементов при раке в 1,9 раза выше, чем в норме. В составе ассоциированных с форменными элементами экзосом при РМЖ по сравнению с нормой значительно снижается представленность других субпопуляций внеклеточных везикул – электронно-плотных (в 2,2 раза), с двойной мембраной (в 2,4 раза), двойных (в 2 раза) и многослойных внеклеточных везикул (в 1,6 раза) по сравнению с нормой.

8. Аберрантно метилированные последовательности промоторной области гена опухолевой супрессии *RARβ2* выявлены только в составе высокомолекулярной внеклеточной ДНК. Наибольший индекс метилирования (61 %) имеет ассоциированная с форменными элементами ДНК крови больных РМЖ. Концентрация данного эпигенетического маркера в крови больных РМЖ статистически значимо выше в составе ассоциированной с форменными элементами ДНК по сравнению с внеклеточной ДНК плазмы (медиана 381 против 72 пг/мл, $p < 0,01$, соответственно).

9. Экзосомы не являются основными транспортерами ДНК – доля внеклеточной ДНК в короне экзосом не превышает 0,03 %. Экзосомы крови больных РМЖ способны влиять на ключевые этапы опухолевой прогрессии: стимулируют формирование капилляро-подобных структур и пролиферацию незлокачественных эпителиоцитов молочной железы, а также

статистически значимо увеличивают долю подвижных клеток линии MCF10A и скорость миграции клеток карциномы SKBR-3. Экзосомы плазмы обладают менее выраженными биологическими эффектами на клетки по сравнению с экзосомами крови больных РМЖ: они стимулируют формирование капилляро-подобных структур и клеточную подвижность псевдо-нормальных, а также скорость миграции злокачественных клеток. Экзосомы крови здоровых женщин ингибируют формирование капилляро-подобных структур, при этом стимулируют пролиферацию незлокачественных эпителиоцитов молочной железы и увеличивают скорость миграции клеток SKBR-3 *in vitro*.

10. Дифференцировать группы первичных больных РМЖ (T1-2N0-1M0) от здоровых женщин методом «жидкостной биопсии» возможно на основании наличия белков APPBP2, KRT1, KRT6B, SERPINA1, SOCS3 в составе экзосом крови с чувствительностью 71 % и специфичностью 100 % (AUC 0,853), а также белков SPG7, ADRB1, SMCO4, PHF1, PSMG1 в составе дезоксирибонуклеопротеиновых комплексов с чувствительностью 100 % и специфичностью 80 % (AUC 0,900).

ПРИМЕНЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ И НАУЧНЫХ ВЫВОДОВ

1. Представленные в диссертации результаты исследования могут быть использованы для разработки систем диагностики РМЖ методом «жидкостной биопсии»:
 - анализ высокомолекулярной асс-ФЭ ДНК, обладающей более высоким ИМ, улучшит аналитические характеристики ПЦР-систем, специфичных к метилированию промоторных областей генов опухолевой супрессии;
 - использование выявленных уникальных для РМЖ ДНК-связывающих белков в составе циркулирующих в крови ДНПК позволит создать методы обогащения/выделения вноДНК.
2. Для повышения эффективности выявления опухоль-ассоциированных белков разработан способ получения экзосом крови (патент РФ №2556825 от 18 июня 2015 г. «Способ получения экзосом из крови»). Установлено, что экзосомы плазмы составляют менее половины экзосом крови, причем у больных РМЖ экзосомы крови обогащены белками, стимулирующими канцерогенез.
3. Сформированные в работе панели протеомных маркеров в составе ДНПК и экзосом крови могут быть использованы в качестве дополнительного критерия дифференцирования Здж и больных РМЖ (патент РФ №2571507 от 24 ноября 2015 г. «Способ диагностики и мониторинга онкологических заболеваний с использованием экзосом крови»).

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

БД — база данных

БС — бычья сыворотка

ВВ — внеклеточные везикулы

внДНК — внеклеточная ДНК

вноДНК- внеклеточная опухолевая ДНК

вноРНК- внеклеточная опухолевая РНК

ВОЗ — Всемирная Организация Здравоохранения

ВЭЖХ — высокоэффективная жидкостная хроматография

ДНПК — нуклеопротеиновые комплексы

днРНК — длинные некодирующие РНК

ЗдЖ — здоровые женщины

ИЛВ — интралюминальные везикулы

ИМ — индекс метилирования

ИФА — иммуно-ферментный анализ

КПС — капилляро-подобные структуры

ЛДГ — лактатдегидрогеназа

ЛПВП — липопротеины высокой плотности

МВТ — мультивезикулярное тельце

МДС — мелкодисперсное стекло

мРНК — матричная РНК

МРТ — магнитно-резонансная томография

ПААГ — полиакриламидный гель

ПО — программное обеспечение

ПЦР — полимеразная цепная реакция

ПЭТ — позитронно-эмиссионная томография

РМЖ — рак молочной железы

РЭА — раковый эмбриональный антиген

СА 15.3 — Cancer Antigen 15.3 — раковый антиген 15.3

СПИД — синдром приобретенного иммунодефицита

ТН-РМЖ — трижды-негативный подтип рака молочной железы

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

ТЭМ — трансмиссионная электронная микроскопия

УЗИ — ультразвуковое исследование

ФБ — фосфатно-солевой буфер (10 мМ фосфатный буфер, pH 7,5; 0,15 М NaCl)
 ФЭ — форменные элементы
 ЦОК — циркулирующие опухолевые клетки
 ЧСА — человеческий сывороточный альбумин
 ЭДТА — 2,2',2'',2'''-(этан-1,2-дидинитрило)тетрауксусная кислота
 ЭМП — эпителиально-мезенхимальный переход
 ADAMs — A Disintegrin And Metalloproteinases — протеазы семейства ADAM
 BRCA — белок восприимчивости к РМЖ
 EGF — эпидермальный фактор роста
 EGFR — (Epidermal Growth Factor Receptor) ген рецептора эпидермального фактора роста
 ESCRT — Endosomal Sorting Complex Required for Transport — комплекс эндосомальной сортировки, необходимый для транспорта
 FDA — Food and Drug Administration — управление по санитарному надзору за качеством пищевых продуктов и медикаментов
 GO — Gene Ontology terms — термины генных онтологий
 HER-2 — рецептор человеческого эпидермального фактора роста 2 типа
 HPA — Human Protein Atlas
 HUVEC — Human Umbilical Vein Endothelial Cells — первичные клетки пупочной вены человека
 LOH — Loss Of Heterozygosity — феномен потери гетерозиготности
 MALDI-TOF масс-спектрометрия — матрично-активированная лазерная десорбция/ионизация
 MES — 2-(N-морфолино)этансульфоновая кислота
 MMPs — Matrix metalloproteinases — матриксные металлопротеазы
 NETs — neutrophilic extracellular traps — нейтрофильные внеклеточные ловушки
 NK-клетки — Natural Killer cells — натуральные киллеры
 RAR β 2 — (retinoic acid receptors) рецептор ретиноевой кислоты
 SDS — лаурилсульфат натрия
 uPA — Plasminogen Activator, Urokinase — урокиназный активатор плазминогена
 VEGF — Vascular Endothelial Growth Factor — фактор роста эндотелия сосудов
 асс-ФЭ ДНК — ДНК, ассоциированная с форменными элементами

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Bray, F. Global cancer statistics 2022: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries / F. Bray, M. Laversanne, H. Sung [et al.] // *CACancer J Clin.* — 2024. — Vol. 74, № 3. — P. 229–263. — doi:10.3322/caac.21834.
2. Злокачественные новообразования в России в 2023 году: Статистический сборник / под ред. А.Д. Каприна, В.В. Старинского, А.О. Шахзадовой. — М.: МНИОИ им. П.А. Герцена — филиал ФГБУ «НМИЦ радиологии» Минздрава России, 2024. — 276 с. — ISBN 978-5-85502-298-8.
3. Пятницкий И. Скрининг рака молочной железы: текущие достижения, перспективы и новые технологии / И. Пятницкий, О. Пучкова, В. Гомболевский [и др.] // *Вопросы онкологии.* — 2019. — V.65, № 5. — P.664–671. — doi:10.37469/0507-3758-2019-65-5-664-671.
4. Hong, H. Circulating Tumor DNA in Primary and Secondary Liver Cancers: A Comprehensive Review / H. Hong, C.J. Wehrle, O.F. Karakaya [et al.] // *Front Biosci (Schol Ed).* — 2025. — Vol. 17, № 2. — P. 26972. — doi: 10.31083/FBS26972.
5. Venkataraman, J., Crook, T., Mokbel, K. Liquid biopsy in breast cancer: a practical guide for surgeons // *Gland Surg.* — 2025. — Vol. 14, № 4. — P. 754–760. — doi: 10.21037/gs-2025-11.
6. Alum, E.U. RNA-based diagnostic innovations: A new frontier in diabetes diagnosis and management / E.U. Alum, E.N. Ikpozu, C.E. Offor [et al.] // *Diab Vasc Dis Res.* — 2025. — Vol. 22, № 2. — P. 14791641251334726. — doi: 10.1177/14791641251334726.
7. Karaca Dogan, B. Circulating non-coding RNAs as a tool for liquid biopsy in solid tumors / B. Karaca Dogan, S. Salman Yilmaz, G.N. Izgi [et al.] // *Epigenomics.* — 2025. — Vol. 17, № 5. — P. 335–358. — doi: 10.1080/17501911.2025.2467021.
8. Chen, Q. Liquid Biopsy Combined with Multi-Omics Approaches in Diagnosis, Management, and Progression of Diabetic Retinopathy / Q. Chen, Y. Chen, K. Mou [et al.] // *Biomedicines.* — 2025. — Vol. 13, № 6. — P. 1306. — doi: 10.3390/biomedicines13061306.
9. Hao, X. Exosome-Based Liquid Biopsy in Early Screening and Diagnosis of Cancers / X. Hao, Z. Liu, F. Ma [et al.] // *Dose Response.* — 2025. — Vol. 23, № 2. — P. 15593258251344480. — doi: 10.1177/15593258251344480.
10. Aggarwal, S.K. Further evidence in support of cell-surface-associated deoxyribonucleic acid in tumor cells: an autoradiographic study // *J Histochem Cytochem.* — 1977. — Vol. 25. — P. 359–370.

11. Jung, K., Fleischhacker, M., Rabien, A. // Clin. Chem. Acta. — 2010. — Vol. 411. — P. 1611-1624.
12. de Vargas Wolfgramm, E. / E. de Vargas Wolfgramm, L.N.R. Alves, E. Stur [et al.] // Mol. Biol. Rep. — 2013. — Vol. 40. — P. 2139–2144.
13. Chen, Y., Olopade, O.I. // Expert Rev. Anticancer Ther. — 2008. — Vol. 8, № 10. — P. 1689–1698.
14. Duque, G. Clinical utility of liquid biopsy in breast cancer: A systematic review / G. Duque, C. Manterola, T. Otzen [et al.] // Clin. Genet. — 2022. — Vol. 101. — P. 285–295.
15. Palanca-Ballester, C. Cancer Epigenetic Biomarkers in Liquid Biopsy for High Incidence Malignancies / C. Palanca-Ballester, A. Rodriguez-Casanova, S. Torres [et al.] // Cancers. — 2021. — Vol. 13. — P. 3016.
16. Naik, S.H., Schumacher, T.N., Perie, L. Cellular barcoding: A technical appraisal // Exp. Hematol. — 2014. — V.42. — P.598–608.
17. 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/ijo.19.1.143.
18. Holdenrieder, S., Stieber, P. Clinical use of circulating nucleosomes // Crit. Rev. Clin. Lab. Sci. — 2009. — V.46. — P.1–24.
19. 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.
20. Егорова В., Блинов М. ДНК-связывающие белки сыворотки крови при гемобластозах // Вопр. мед. хим. — 1993. — Т.39, № 3. — С.36–38.
21. Kononova, I.V. Simultaneous detection of the HPV L1 gene and the human β -globin gene in the blood components of cervical cancer patients living in Yakutia / I.V. Kononova, S.N. Mamaeva, V.A. Alekseev [et al.] // Int. J. Biomed. — 2022. — V.12, № 1. — P.109–114. doi:10.21103/Article12(1)_OA10.
22. Liang, N. Mature red blood cells contain long DNA fragments and could acquire DNA from lung cancer tissue / N. Liang, Z. Jiao, C. Zhang [et al.] // Adv. Sci (Weinh). — 2023. — V.e2206361. doi: 10.1002/advs.202206361.
23. Spandidos, D.A. Serum deoxyribonucleases in patients with breast cancer / D.A. Spandidos, G. Ramandanis [et al.] // Eur. J. Cancer. — 1980. — Vol. 16. — P. 1615–1619.
24. Roth, C. Apoptosis-related degradation of proteolytic activities and high serum levels of circulating nucleosomes and DNA in blood correlate with breast cancer progression / C. Roth, K. Pantel, V. Muller [et al.] // BMC Cancer. — 2011. — Vol. 11. — P. 4.

25. 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.
26. 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.
27. Garcia-Olmo, D. Tumor DNA circulating in the plasma might play a role in metastasis. The hypothesis of the genomestasis / D. Garcia-Olmo, D.C. Garcia-Olmo, J. Ontanon [et al.] // *Histol. Histopathol.* — 1999. — V.14. — P.1159–1164.
28. 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.
29. 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.
30. Baietti, M.F. Syndecan-syntenin-ALIX regulates the biogenesis of exosomes / M.F. Baietti, Z. Zhang, E. Mortier [et al.] // *Nat Cell Biol.* — 2012. — V.14, № 7. — P.677–685. doi:10.1038/ncb2502.
31. Yunusova, N. Plasma Exosomes of Patients with Breast and Ovarian Tumors Contain an Inactive 20S Proteasome / N. Yunusova, E. Kolegova, E. Sereda [et al.] // *Molecules.* — 2021. — Vol. 26, № 22. — P. 6965. doi: 10.3390/molecules26226965.
32. 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.
33. Lin, B. Recent advances in exosomal miRNA biosensing for liquid biopsy / B. Lin, J. Jiang, J. Jia [et al.] // *Molecules.* — 2022. — V.27, № 21. — P.7145. doi: 10.3390/molecules27217145.
34. Wang, L.L. Mesenchymal stem cells-derived exosomes alleviate radiation induced pulmonary fibrosis by inhibiting the protein kinase B/nuclear factor kappa B pathway / L.L. Wang, M.Y. Ouyang, Z.E. Yang [et al.] // *World J Stem Cells.* — 2025. — Vol. 17, № 6. — P. 106488. doi: 10.4252/wjsc.v17.i6.106488.
35. Feng, C.Z. Tumor-derived exosomal miR-425-5p and miR-135b-3p enhance colorectal cancer progression through immune suppression and vascular permeability promotion / C.Z. Feng, S.Q. Zhong, S.W. Ye [et al.] // *World J Gastrointest Oncol.* — 2025. — Vol. 17, № 6. — P. 106161. doi: 10.4251/wjgo.v17.i6.106161.

36. Ye, Y. Cancer-associated fibroblasts-derived exosomal piR-35462 promotes the progression of oral squamous cell carcinoma via FTO/Twist1 pathway / Y. Ye, F. Wu, B. Li [et al.] // BMC Oral Health. — 2025. — Vol. 25, № 1. — P. 840. doi: 10.1186/s12903-025-06082-3.
37. Song, X. CAF-derived exosomal miR-196b-5p after androgen deprivation therapy promotes epithelial-mesenchymal transition in prostate cancer cells through HOXC8/NF-κB signaling pathway / X. Song, T. Li, W. Zhou [et al.] // Biol Direct. — 2025. — Vol. 20, № 1. — P. 80. doi: 10.1186/s13062-025-00667-2.
38. Yanshina, D.D. 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 / D.D. Yanshina, O.A. Kossinova, A.V. Gopanenko [и др.] // Biochimie. — 2018. — V.144. — P.134–143. doi: 10.1016/j.biochi.2017.11.007.
39. 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.
40. Qiu, P. Advancements in liquid biopsy for breast Cancer: Molecular biomarkers and clinical applications / P. Qiu, X. Yu, F. Zheng [et al.] // Cancer Treat Rev. — 2025. — Vol. 139. — P. 102979. doi: 10.1016/j.ctrv.2025.102979.
41. Zhong, H.J. Advances in CTC and ctDNA detection techniques: opportunities for improving breast cancer care / H.J. Zhong, Y. Zhen, S. Chen [et al.] // Breast Cancer Res. — 2025. — Vol. 27, № 1. — P. 97. doi: 10.1186/s13058-025-02024-7.
42. Chung, D.C. A Cell-free DNA Blood-Based Test for Colorectal Cancer Screening / D.C. Chung, D.M. Gray, H. Singh [et al.] // N. Engl. J. Med. — 2024. — Vol. 390. — P. 973–983.
43. Xu, Z. The performance of the SHOX2/PTGER4 methylation assay is influenced by cancer stage, age, type and differentiation / Z. Xu, Y. Wang, L. Wang [et al.] // Biomark Med. — 2020. — Vol. 14, № 5. — P. 341–351. doi: 10.2217/bmm-2019-0325.
44. Zhang, J. Comparative analysis of SDC2 and SEPT9 methylation tests in the early detection of colorectal cancer: a systematic review and meta-analysis / J. Zhang, C. Li, Y. An [et al.] // Front Med (Lausanne). — 2024. — Vol. 11. — P. 1460233. doi: 10.3389/fmed.2024.1460233.
45. Guo, Y. Association of DNA methylation of RASSF1A and SHOX2 with lung cancer risk: A systematic review and meta-analysis / Y. Guo, P. Wu, Q. Liao [et al.] // Medicine (Baltimore). — 2024. — Vol. 103, № 50. — P. e40042. doi: 10.1097/MD.00000000000040042.
46. Bennett, R.M., Davis, J., Merritt, M. Anti-DNA antibodies react with DNA expressed on the surface of monocytes and B lymphocytes // J Rheumatol. — 1986. — Vol. 13. — P. 679–685.

47. Laktionov, P. Free and cell surface bound nucleic acids in blood of healthy donors and breast cancer patients / P. Laktionov, S. Tamkovich, E. Rykova [et al.] // *Ann. N. Y. Acad. Sci.* — 2004. — Vol. 1022. — P. 221–227.
48. Garrido, M.M., Ribeiro, R.M., Krüger, K., Pinheiro, L.C., Guimarães, J.T., Holdenrieder, S. Relevance of circulating nucleosomes, HMGB1 and sRAGE for prostate cancer diagnosis // *In Vivo*. — 2021. — Vol. 35, № 4. — P. 2207–2212. doi: 10.21873/invivo.12492.
49. 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.
50. Паутова Л.В. Исследование взаимодействия полиреактивных антител с нуклеиновыми кислотами с помощью алкилирующих производных олигонуклеотидов / Л.В. Паутова, Е.Ю. Рыкова, П.П. Лактионов [и др.] // *Молекуляр. биология*. — 1996. — Т.30. — С.941–950.
51. Garcia-Olmo, D.C., Picazo, M.G., Garcia-Olmo, D. Transformation of non-tumor host cells during tumor progression: Theories and evidence // *Expert Opin. Biol. Ther.* — 2012. — Vol. 12. — P. 199–207.
52. Garcia-Olmo, D.C. Cell-free nucleic acids circulating in the plasma of colorectal cancer patients induce the oncogenic transformation of susceptible cultured cells / D.C. Garcia-Olmo, C. Dominguez, M. Garcia-Arranz [et al.] // *Cancer Res.* — 2010. — Vol. 70. — P. 560–567.
53. Mathieu, M. / M. Mathieu, V. Ségura-Fourcade, F. Mailhes [et al.] // *Nat. Cell Biol.* — 2019. — Vol. 21. — P. 9–17.
54. Koumangoye, R.B. / R.B. Koumangoye, M.M. Sakwe, A.V. Ziyad [et al.] // *PLoS One*. — 2011. — Vol. 6, № 9. — P. e24234.
55. Mamaeva, S.N. / S.N. Mamaeva, V.A. Alekseev, I.V. Kononova [et al.] // *Int. J. Biomedicine*. — 2020. — Vol. 10, № 1. — P. 70–75.
56. Pu, Q., Gao, H. The Role of the Tumor Microenvironment in Triple-Positive Breast Cancer Progression and Therapeutic Resistance // *Cancers*. — 2023. — Vol. 15. — P. 5493. doi:10.3390/cancers15225493.
57. Shefer, A., Yalovaya, A., Tamkovich, S. Exosomes in breast cancer: involvement in tumor dissemination and prospects for liquid biopsy // *Int. J. Mol. Sci.* — 2022. — Vol. 23. — P. 8845. doi:10.3390/ijms23168845.
58. Bandini, E. Early Detection and Investigation of Extracellular Vesicles Biomarkers in Breast Cancer / E. Bandini, T. Rossi, E. Scarpi [et al.] // *Front. Mol. Biosci.* — 2021. — Vol. 8. — P. 732900. doi: 10.3389/fmolb.2021.732900.

59. Кудайбергенова А.Г. Особые гистологические типы рака молочной железы. Благоприятный прогноз / А.Г. Кудайбергенова, Т.Ю. Семиглазова, О.И. Понасенко [и др.] // Вопросы онкологии. — 2025. — Vol. 71, № 3. — P. 653–670. doi: 10.37469/0507-3758-2025-71-3-OF-2397.
60. Кудайбергенова А.Г. Особые гистологические типы рака молочной железы. Неблагоприятный прогноз / А.Г. Кудайбергенова, Т.Ю. Семиглазова, О.И. Понасенко [и др.] // Вопросы онкологии. — 2025. — Т. 71, № 3. — P. 671-685. doi: 10.37469/0507-3758-2025-71-3-OF-2408.
61. Johnson, K.S., Conant, E.F., Soo, M.S. Molecular Subtypes of Breast Cancer: A Review for Breast Radiologists // J. Breast Imaging. — 2021. — Vol. 3, № 1. — P. 12–24. doi: 10.1093/jbi/wbaa110.
62. Bilous, M. Breast core needle biopsy: issues and controversies // Mod. Pathol. — 2010. — Vol. 23, Suppl 2. — P. S36–45. doi: 10.1038/modpathol.2010.34.
63. Bandini, E. Early Detection and Investigation of Extracellular Vesicles Biomarkers in Breast Cancer / E. Bandini, T. Rossi, E. Scarpi [et al.] // Front. Mol. Biosci. — 2021. — Vol. 8. — P. 732900. doi: 10.3389/fmolb.2021.732900.
64. Семиглазов В.Ф. Руководство по лечению раннего рака молочной железы / В.Ф. Семиглазов, В.В. Семиглазов, П.В. Криворотько [и др.] — Санкт-Петербург: ПАО «Т8 Издательские Технологии», 2016. — 154 с. — ISBN 978-5-519-49460-1.
65. Комарова Л.Е. Роль и место скрининговой маммографии в диагностике рака in situ // Опухоли женской репродуктивной системы. — 2008. — Т.3. — С.20–23.
66. Кушлинский Н.Е., Портный С.М., Лактионов К.П. Рак молочной железы. — М.: РАМН, 2005.
67. Popiel, M. Mammary carcinoma — current diagnostic methods and symptomatology in imaging studies / M. Popiel, D. Mroz-Klimas, R. Kasprzak [et al.] // Pol. J. Radiol. — 2012. — V.77, № 4. — P.35–44. doi: 10.12659/pjr.883627.
68. Серебрякова С.В., Труфанов Г.Е., Юхно Е.А. Магнитно-резонансная семиотика рака молочной железы // Опухоли женской репродуктивной системы. — 2009. — Т.4. — С.20–25.
69. Popiela, T.J. The use of magnetic resonance mammography in women at increased risk for developing breast cancer / T.J. Popiela, W. Kibil, I. Herman-Sucharska [et al.] // Wideochir. Inne. Tech. Maloinwazyjne. — 2013. — V.8, № 1. — P.55–62. doi: 10.5114/wiitm.2011.31534.
70. Усов В.Ю. Применение низкопольной контрастированной МРТ грудной клетки в диагностике и оценке распространенности рака молочной железы / В.Ю. Усов, М.Л. Беянин, Н.А. Красулина [и др.] // Радиология-практика. — 2009. — V.6. — P.19–29.

71. Чиссов В.И., Дарьялова С.Л. Избранные лекции по клинической онкологии. — М.: Фонд паллиативной медицины, 2000.
72. Попова Н.С. Диагностические возможности маммосцинтиграфии при выявлении мультицентричных и минимальных форм рака молочной железы различных молекулярнобиологических подтипов / Н.С. Попова, С.Н. Новиков, П.И. Крживицкий [и др.] // Вопросы онкологии. — 2023. — Т. 69, № 4. — С. 708–714.
73. Басова Т.С. Маммосцинтиграфия и эффект с ^{99m}Tc-миби в диагностике новообразований молочной железы / Т.С. Басова, Н.М. Федоров, А.И. Фадеева [и др.] // Академический журнал Западной Сибири. — 2019. — Т.15, № 4. — С. 55–57.
74. Козлов А.О. Прогностическая ценность тонкоигольной аспирационной биопсии и биопсии режущей иглой при подозрении на рак молочной железы / А.О. Козлов, В.Г. Сапожников, Д.В. Халеев [и др.] // Вестник новых медицинских технологий. — 2007. — V.14, № 4. — Р. 95–98.
75. Игнатова Н.В., Важенин А.В., Шкута М.В. // Уральский медицинский журнал. — 2009. — V.4, № 58. — Р.57–60.
76. Zavarykina, T.M. Circulating Tumor DNA Is a Variant of Liquid Biopsy with Predictive and Prognostic Clinical Value in Breast Cancer Patients / T.M. Zavarykina, P.K. Lomskova, I.V. Pronina [et al.] // Int. J. Mol. Sci. — 2023. — Vol. 24. — P. 17073. doi: 10.3390/ijms242317073.
77. Kunihiro, H., Kornelia, P. Intratumoral Heterogeneity: More Than Just Mutations // Trends Cell Biol. — 2019. — Vol. 29, № 7. — P. 569–579.
78. Oakman, C. Uncovering the metabolomic fingerprint of breast cancer / C. Oakman, L. Tenori, L. Biganzoli [et al.] // Int. J. Biochem. Cell Biol. — 2011. — V.43, № 7. — P.1010–1020. doi: 10.1016/j.biocel.2010.05.001.
79. Jobard, E. A serum nuclear magnetic resonance-based metabolomic signature of advanced metastatic human breast cancer / E. Jobard, C. Pontoizeau, B.J. Blaise [et al.] // Cancer Lett. — 2013. — V.343, № 1. — P.33–41. doi: 10.1016/j.canlet.2013.09.011.
80. 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.
81. Mathelin, C. Serum biomarkers for detection of breast cancers: A prospective study / C. Mathelin, A. Cromer, C. Wendling [et al.] // Breast Cancer Res. Treat. — 2006. — V.96, № 1. — P.83–90. doi: 10.1007/s10549-005-9046-2.
82. Lescuyer, P., Hochstrasser, D., Rabilloud, T. How shall we use the proteomics toolbox for biomarker discovery? // J Proteome Res. — 2007. — Vol. 6. — P. 3371–3376. doi: 10.1021/pr0702060.

83. Good, D.M. Body fluid proteomics for biomarker discovery: lessons from the past hold the key to success in the future / D.M. Good, V. Thongboonkerd, J. Novak [et al.] // *J Proteome Res.* — 2007. — Vol. 6. — P. 4549–4555. doi: 10.1021/pr070529w.
84. Hori, S.S., Gambhir, S.S. Mathematical model identifies blood biomarker-based early cancer detection strategies and limitations // *Sci Transl Med.* — 2011. — Vol. 3. — P. 109ra116. doi: 10.1126/scitranslmed.3003110.
85. Magagnotti, C. Comparison of different depletion strategies for improving resolution of the human urine proteome / C. Magagnotti, I. Fermo, R.M. Carletti [et al.] // *Clin Chem Lab Med.* — 2010. — Vol. 48. — P. 531–535. doi: 10.1515/CCLM.2010.109.
86. Bandow, J.E. Comparison of protein enrichment strategies for proteome analysis of plasma // *Proteomics.* — 2010. — Vol. 10. — P. 1416–1425. doi: 10.1002/pmic.200900431.
87. Ahmed, N. An approach to remove albumin for the proteomic analysis of low abundance biomarkers in human serum / N. Ahmed, G. Barker, K. Oliva [et al.] // *Proteomics.* — 2003. — Vol. 3. — P. 1980–1987. doi: 10.1002/pmic.200300465.
88. Bjorhall, K. Comparison of different depletion strategies for improved resolution in proteomic analysis of human serum samples / K. Bjorhall, T. Miliotis, P. Davidsson [et al.] // *Proteomics.* — 2005. — Vol. 5. — P. 307–317. doi: 10.1002/pmic.200400900.
89. Yocum, A.K. Effect of immunoaffinity depletion of human serum during proteomic investigations / A.K. Yocum, K. Yu, T. Oe [et al.] // *J Proteome Res.* — 2005. — Vol. 4. — P. 1722–1731. doi: 10.1021/pr0501721.
90. Mathivanan, S. Quest for Cancer Biomarkers: Assaying Mutant Proteins and RNA that Provides the Much Needed Specificity // *J Proteomics Bioinform.* — 2012. — Vol. 5. — P. xiii–xvii.
91. Brooks, J.D. Translational genomics: the challenge of developing cancer biomarkers // *Genome Res.* — 2012. — Vol. 22. — P. 183–187. doi: 10.1101/gr.124347.111.
92. Duque, G. Clinical utility of liquid biopsy in breast cancer: A systematic review / G. Duque, C. Manterola, T. Otzen [et al.] // *Clin Genet.* — 2022. — V.101, № 3. — P.285–295. doi: 10.1111/cge.14077.
93. Sharhan, N. Utility of circulating cell-free DNA in assessing microsatellite instability and loss of heterozygosity in breast cancer using human identification approach / N. Sharhan, S.A. Messaoudi, S.R. Babu [et al.] // *Genes (Basel).* — 2022. — V.13, № 4. — P.590. doi: 10.3390/genes13040590.
94. Guan, X. Longitudinal HER2 amplification tracked in circulating tumor DNA for therapeutic effect monitoring and prognostic evaluation in patients with breast cancer / X. Guan,

- B. Liu, Y. Niu [et al.] // *Breast*. — 2020. — V.49. — P.261–266. doi: 10.1016/j.breast.2019.12.010.
95. Kougioumtsidou, N. DNA methylation patterns of RAR-beta2 and RASSF1A gene promoters in FNAB samples from greek population with benign or malignant breast lesions / N. Kougioumtsidou, E. Vavoulidis, M. Nasioutziki [et al.] // *Diagn. Cytopathol.* — 2021. — V.49. — P.153–164.
96. 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.
97. Pantel, K., Alix-Panabieres, C. Liquid biopsy and minimal residual disease—Latest advances and implications for cure // *Nat. Rev. Clin. Oncol.* — 2019. — Vol. 16. — P. 409–424.
98. Kuroi, K., Tanaka, C., Toi, M. Plasma nucleosome levels in node-negative breast cancer patients // *Breast Cancer*. — 1999. — V.6, № 4. — P.361–364.
99. Holdenrieder, S. Nucleosomes in serum of patients with benign and malignant diseases / S. Holdenrieder, P. Stieber, H. Bodenmüller [et al.] // *Int. J. Cancer*. — 2001. — V.95, № 2. — P.114–120.
100. Goessl, C. Fluorescent methylation-specific polymerase chain reaction for DNA-based detection of prostate cancer in bodily fluids / C. Goessl, H. Krause, M. Muller [et al.] // *Cancer Res*. — 2000. — Vol. 60. — P. 5941–5945.
101. 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.
102. Silva, J.M. Tumor DNA in plasma at diagnosis of breast cancer patients is a valuable predictor of disease-free survival / J.M. Silva, J. Silva, A. Sanchez [et al.] // *Clin. Cancer. Res.* — 2002. — V.8. — P. 3761–3766.
103. 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.
104. Cohen, J.D. Detection and localization of surgically resectable cancers with a multi-analyte blood test / J.D. Cohen, L. Li, Y. Wang [et al.] // *Science*. — 2018. — V.359. — P.926–930.
105. 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.
106. Imyanitov, E.N. Evidence for microsatellite instability in bilateral breast carcinomas / E.N. Imyanitov, A.V. Togo, E.N. Suspitsin [и др.] // *Cancer Letters*. — 2000. — V.154(1). — P. 9–17.

107. 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.
108. 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.
109. Silva, J.M. Persistence of tumor DNA in plasma of breast cancer patients after mastectomy / J.M. Silva, J.M. Garcia, G. Dominguez [et al.] // *Ann. Surg. Oncol.* — 2002. — V.9. — P.71–76.
110. Shaw, J.A. Genomic analysis of circulating cell-free DNA infers breast cancer dormancy / J.A. Shaw, K. Page, K. Blighe [et al.] // *Genome Res.* — 2012. — V.22(2). — P.220–231. doi: 10.1101/gr.123497.111.
111. Parrella, P. Epigenetic signatures in breast cancer: clinical perspective // *Breast Care (Basel).* — 2010. — V.5(2). — P.66–73. doi: 10.1159/000309138.
112. 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.
113. 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.
114. Пальцев М.А., Залетов Д.В. Системы генетических и эпигенетических маркеров в диагностике онкологических заболеваний. — М.: Медицина, 2009.
115. Van De Voorde, L. DNA methylation-based biomarkers in serum of patients with breast cancer / L. Van De Voorde, R. Speeckaert, D. Van Gestel [et al.] // *Mutat Res.* — 2012. — V.751(2). — P.304–325. doi: 10.1016/j.mrrev.2012.06.001.
116. Hoque, M.O. Detection of aberrant methylation of four genes in plasma DNA for the detection of breast cancer / M.O. Hoque, Q. Feng, P. Toure [et al.] // *J. Clin. Oncol.* — 2006. — V.24(26). — P.4262–4269. doi: 10.1200/JCO.2005.01.3516.
117. Bae, Y.K. Gene promoter hypermethylation in tumors and plasma of breast cancer patients / Y.K. Bae, Y.R. Shim, J.H. Choi [et al.] // *Cancer Res. Treat.* — 2005. — V.37(4). — P.233–240. doi: 10.4143/crt.2005.37.4.233.
118. Ponomaryova, A.A. RAR β 2 gene methylation level in the circulating DNA from blood of patients with lung cancer / A.A. Ponomaryova, E.Y. Rykova, N.V. Cherdyntseva [и др.] // *Eur. J. Cancer Prev.* — 2011. — V.20(6). — P.453–455. doi: 10.1097/CEJ.0b013e3283498eb4.
119. Vietri, M.T. DNA methylation and breast cancer: A way forward (Review) / M.T. Vietri, G. D'Elia, G. Benincasa [et al.] // *Int J Oncol.* — 2021. — V.59(5). — P.98. doi: 10.3892/ijo.2021.5278.
120. Ekstrom, K. Exosomal Shuttle RNA. — Goteborg: Intellecta Docuys AB, 2008.

121. 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.
122. 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.
123. He, L. A microRNA polycistron as a potential human oncogene / L. He, M.J. Thomson, M.T. Hemann [et al.] // *Nature.* — 2005. — V.35(7043). — P.828–833. doi: 10.1038/nature03552.
124. Li, D. Identification of serum exosomal miR-148a as a novel prognostic biomarker for breast cancer / D. Li, J. Wang, L.J. Ma [et al.] // *Eur. Rev. Med. Pharmacol. Sci.* — 2020. — V.24. — P.7303–7309. doi:10.26355/eurrev_202007_21889.
125. Kleivi Sahlberg, K. A serum microRNA signature predicts tumor relapse and survival in triple-negative breast cancer patients / K. Kleivi Sahlberg, G. Bottai, B. Naume [et al.] // *Clin Cancer Res.* — 2015. — V.21(5). — P.1207–1214. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-14-2011.
126. Rodríguez-Martínez, A. Exosomal miRNA profile as complementary tool in the diagnostic and prediction of treatment response in localized breast cancer under neoadjuvant chemotherapy / A. Rodríguez-Martínez, D. de Miguel-Pérez, F.G. Ortega [и др.] // *Breast Cancer Res.* — 2019. — V.21. — P.21. doi:10.1186/s13058-019-1109-0.
127. Lee, Y. Comparison Study of Small Extracellular Vesicle Isolation Methods for Profiling Protein Biomarkers in Breast Cancer Liquid Biopsies / Y. Lee, J. Ni, V.C. Wasinger [et al.] // *Int. J. Mol. Sci.* — 2023. — V.24. — P.15462. doi:10.3390/ijms242015462.
128. Kugeratski, F.G. Quantitative proteomics identifies the core proteome of exosomes with syntenin-1 as the highest abundant protein and a putative universal biomarker / F.G. Kugeratski, K. Hodge, S. Lilla [и др.] // *Nat. Cell Biol.* — 2021. — V.23(6). — P.631–641. doi: 10.1038/s41556-021-00693-y.
129. Boukouris, S., Mathivanan, S. Exosomes in bodily fluids are a highly stable resource of disease biomarkers // *Proteomics Clin. Appl.* — 2015. — V.9(3-4). — P.358–367. doi: 10.1002/prca.201400114.
130. Triantafyllou, A. Exosomes in breast cancer management: where do we stand? A literature review / A. Triantafyllou, M. Gazouli, C. Theodoropoulos [и др.] // *Biol Cell.* — 2022. — V.114(4). — P.109–122. DOI: 10.1111/boc.202100081.
131. Risha, Y. The proteomic analysis of breast cell line exosomes reveals disease patterns and potential biomarkers / Y. Risha, Z. Minic, S.M. Ghobadloo [и др.] // *Sci. Rep.* — 2020. — V.10(1). — P.13572. doi: 10.1038/s41598-020-70393-4.
132. Gangoda, L. Proteomic Profiling of Exosomes Secreted by Breast Cancer Cells with Varying Metastatic Potential / L. Gangoda, M. Liem, C.S. Ang [et al.] // *Proteomics.* — 2017. — V.17(23–24). doi: 10.1002/pmic.201600370.

133. Eguchi, T., Sheta, M., Fujii, M., Calderwood, S.K. Cancer extracellular vesicles, tumoroid models, and tumor microenvironment // *Semin. Cancer Biol.* — 2022. — V.86(Pt 1). — P.112–126. doi: 10.1016/j.semcancer.2022.01.003.
134. Bastos-Amador, P. Proteomic analysis of microvesicles from plasma of healthy donors reveals high individual variability / P. Bastos-Amador, F. Royo, E. Gonzalez [и др.] // *J. Proteomics.* — 2012. — V.75(12). — P.3574–3584. doi: 10.1016/j.jprot.2012.03.054.
135. Rontogianni, S. Proteomic profiling of extracellular vesicles allows for human breast cancer subtyping / S. Rontogianni, E. Synadaki, B. Li [и др.] // *Commun. Biol.* — 2019. — V.2. — P.325. doi: 10.1038/s42003-019-0570-8.
136. Hoshino, A. Extracellular Vesicle and Particle Biomarkers Define Multiple Human Cancers / A. Hoshino, H.S. Kim, L. Bojmar [et al.] // *Cell.* — 2020. — V.182(4). — P.1044–1061.e18. doi: 10.1016/j.cell.2020.07.009.
137. Gerashchenko, T.S. Intratumoral Morphological Heterogeneity of Breast Cancer as an Indicator of the Metastatic Potential and Tumor Chemosensitivity / T.S. Gerashchenko, M.V. Zavyalova, E.V. Denisov [и др.] // *Acta Naturae.* — 2017. — V.9(1). — P.56-67.
138. Шефер А.А., Фрик Я.А., Тамкович С.Н. Диагностический и терапевтический потенциал белков экзосом при раке молочной железы. Обзор // *Успехи молекулярной онкологии.* — 2023. — Т.10, № 2. — С. 58–69. DOI: 10.17650/2313-805X-2023-10-2-58-69.
139. Tutanov, O. 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 / O. Tutanov, E. Orlova, K. Proskura [et al.] // *Biomolecules.* — 2020. — V.10(4). — P.495. DOI: 10.3390/biom10040495.
140. Vardaki, I. Periostin is identified as a putative metastatic marker in breast cancer-derived exosomes / I. Vardaki, S. Ceder, D. Rutishauser [et al.] // *Oncotarget.* — 2016. — V.7(46). — P.74966–74978. DOI: 10.18632/oncotarget.11663.
141. Hoshino, A. Extracellular vesicle and particle biomarkers define multiple human cancers / A. Hoshino, S.H. Kim, L. Bojman [et al.] // *Cell.* — 2020. — V.182(4). — P.1044–1061.e18. DOI: 10.1016/j.cell.2020.07.009.
142. Andreeva, O.E. Towards unravelling the role of ER α -targeting miRNAs in the exosome-mediated transferring of the hormone resistance / O.E. Andreeva, D.V. Sorokin, E.I. Mikhaevich [et al.] // *Molecules.* — 2021. — V.26(21). — P.6661. DOI: 10.3390/molecules26216661.
143. Rupp, A.-K. Loss of EpCAM expression in breast cancer derived serum exosomes: Role of proteolytic cleavage / A.-K. Rupp, C. Rupp, S. Keller [и др.] // *Gynecol Oncol.* — 2011. — V.122(2). — P.437–446. DOI: 10.1016/j.ygyno.2011.04.035.

144. Chanteloup, G. Monitoring HSP70 exosomes in cancer patients' follow up: a clinical prospective pilot study / G. Chanteloup, M. Cordonnier, N. Isambert [et al.] // *J Extracell Vesicles*. — 2020. — V.9(1). — P.1766192. DOI: 10.1080/20013078.2020.1766192.
145. Melo, S.A. Glypican-1 identifies cancer exosomes and detects early pancreatic cancer / S.A. Melo, L.B. Luecke, C. Kahlert [et al.] // *Nature*. — 2015. — V.523(7559). — P.177–182. DOI: 10.1038/nature14581.
146. Wang, X. Exosomal protein CD82 as a diagnostic biomarker for precision medicine for breast cancer / X. Wang, W. Zhong, J. Bu [et al.] // *Mol Carcinog*. — 2019. — V.58(5). — P.674–685. DOI: 10.1002/mc.22960.
147. Toth, B., Nieuwland, R., Liebhardt, S. Circulating microparticles in breast cancer patients: a comparative analysis with established biomarkers / B. Toth, R. Nieuwland, S. Liebhardt [et al.] // *Anticancer Res*. — 2008. — V.28(2A). — P.1107–1112.
148. Gelsomino, L. Proteomic Profiling of Extracellular Vesicles Released by Leptin-Treated Breast Cancer Cells: A Potential Role in Cancer Metabolism / L. Gelsomino, I. Barone, A. Caruso [et al.] // *Int. J. Mol. Sci*. — 2022. — V.23. — P.12941. doi:10.3390/ijms232112941.
149. 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. — P.12–23.
150. 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.
151. 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.
152. Heitzer, E. Establishment of tumor-specific copy number alterations from plasma DNA of patients with cancer / E. Heitzer, M. Auer, E.M. Hoffmann [et al.] // *Int. J. Cancer*. — 2013. — V.133(2). — P.346–356.
153. Ellinger, J. Apoptotic DNA fragments in serum of patients with muscle invasive bladder cancer: A prognostic entity / J. Ellinger, P.J. Bastian, N. Ellinger [et al.] // *Cancer Lett*. — 2008. — V.264. — P.274–280.
154. Beck, J. Profile of the circulating DNA in apparently healthy individuals / J. Beck, H.B. Urnovitz, J. Riggert [и др.] // *Clin. Chem*. — 2009. — V.55(4). — P.730–738. doi: 10.1373/clinchem.2008.113597.

155. Jahr, S. DNA fragments in the blood plasma of cancer patients: quantitations and evidence for their origin from apoptotic and necrotic cells / S. Jahr, H. Hentze, S. Englisch [et al.] // *Cancer Res.* — 2001. — V.61(4). — P.1659–1665.
156. Cheng, C. Quantification of circulating cell-free DNA in the plasma of cancer patients during radiation therapy / C. Cheng, M. Omura-Minamisawa, Y. Kang [et al.] // *Cancer Sci.* — 2009. — V.100(2). — P.303–309.
157. Tsai, N.W. The value of serial plasma nuclear and mitochondrial DNA levels in patients with acute ischemic stroke / N.W. Tsai, T.K. Lin, S.D. Chen [и др.] // *Clin. Chim. Acta.* — 2011. — V.412(5–6). — P.476–479.
158. 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.
159. Aucamp, J. Kinetic analysis, size profiling, and bioenergetic association of DNA released by selected cell lines in vitro / J. Aucamp, A.J. Bronkhorst, D.L. Peters [et al.] // *Cell. Mol. Life Sci.* — 2017. — V.74(14). — P.2689–2707.
160. 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.
161. Holdenrieder, S. Nature and dynamics of nucleosome release from neoplastic and non-neoplastic cells / S. Holdenrieder, F.T. Kolligs, J. Braess [et al.] // *Anticancer Res.* — 2012. — V.32(5). — P.2179–2183.
162. Morozkin, E.S. The effect of protein transport inhibitors on the production of extracellular DNA / E.S. Morozkin, T.I. Babochkina, V.V. Vlassov [и др.] // *Ann. N. Y. Acad. Sci.* — 2008. — V.1137. — P.31–35.
163. Karres, I. Chloroquine inhibits proinflammatory cytokine release into human whole blood / I. Karres, J.P. Kremer, I. Dietl [et al.] // *Am. J. Physiol.* — 1998. — V.274(4). — P.1058–1064.
164. Shaw, J.-P. Modified deoxyoligonucleotides stable to exonuclease degradation in serum / J.-P. Shaw, K. Kent, J. Bird [et al.] // *Nucleic Acids Res.* — 1991. — V.19. — P.747–750.
165. Kahlert, C. Identification of double-stranded genomic DNA spanning all chromosomes with mutated KRAS and p53 DNA in the serum exosomes of patients with pancreatic cancer / C. Kahlert, S.A. Melo, A. Protopopov [et al.] // *J. Biol. Chem.* — 2014. — V.289(7). — P.3869–3875.

166. Ng, E.K. Presence of filterable and nonfilterable mRNA in the plasma of cancer patients and healthy individuals / E.K. Ng, N.B. Tsui, N.Y. Lam [et al.] // *Clin. Chem.* — 2002. — V.48(8). — P.1212–1217.
167. Deligezer, U. Frequent copresence of methylated DNA and fragmented nucleosomal DNA in plasma of lymphoma patients / U. Deligezer, F. Yaman, N. Erten [и др.] // *Clin. Chim. Acta.* — 2003. — V.335(1–2). — P. 89–94.
168. Wu, T.L. Cell-free DNA: measurement in various carcinomas and establishment of normal reference range / T.L. Wu, D. Zhang, J.H. Chia [et al.] // *Clin. Chim. Acta.* — 2002. — V.321. — P.77–87.
169. 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.
170. 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.
171. Gerasimova, Y.V. Affinity separation of polyribonucleotide-binding human blood proteins / Y.V. Gerasimova, I.V. Alekseyeva, T.G. Bogdanova [et al.] // *Bioorg. Med. Chem. Lett.* — 2006. — V.16. — P.5526–5529.
172. Novikova, T.S. Hydrolysis of oligodeoxyribonucleotides on the microarray surface and in solution by catalytic anti-DNA antibodies in systemic lupus erythematosus / T.S. Novikova, E.A. Ermakov, E.V. Kostina [et al.] // *Current Issues in Molecular Biology.* — 2023. — V.45(12). — P. 9887–9903.
173. Van Schravendijk, M.R., Dwek, R.A. Interaction of C1q with DNA // *Mol. Immunol.* — 1982. — V.19. — P.1179–1187.
174. Paidassi, H. How phagocytes track down and respond to apoptotic cells / H. Paidassi, P. Tacnet-Delorme, G.J. Arlaud [и др.] // *Crit. Rev. Immunol.* — 2009. — V.29(2). — P.111–130. doi: 10.1615/critrevimmunol.v29.i2.20.
175. Hoch, S.O. DNA-binding domains of fibronectin probed using Western blots // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* — 1982. — V.106. — P.1353–1358.
176. Лактионов П.П., Рыкова Е., Крепкий Д.В. Взаимодействие олигонуклеотидов с белками барьерных жидкостей / П.П. Лактионов, Е. Рыкова, Д.В. Крепкий [и др.] // *Биохимия.* — 1997. — Т.62. — С.613–618.
177. 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.

178. 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.
179. Van Berkel, P.H. N-terminal stretch Arg2, Arg3, Arg4 and Arg5 of human lactoferrin is essential for binding to heparin, bacterial lipopolysaccharide, human lysozyme and DNA / P.H. Van Berkel, M.E. Geerts, H.A. Van Veen [et al.] // *Biochem. J.* — 1997. — V.328. — P.145–151.
180. Gasparro, F.P. Cell membrane DNA: a new target for psoralen photoadduct formation / F.P. Gasparro, R. Dall'Amico, M. O'Malley [et al.] // *Photochem. Photobiol.* — 1990. — V.52(2). — P.315–321.
181. 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.
182. Yakubov, L.A. Mechanism of oligonucleotide uptake by cells: involvement of specific receptors? / L.A. Yakubov, E.A. Deeva, V.F. Zarytova [et al.] // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* — 1989. — V.86. — P.6454–6458.
183. Bennett, R.M. DNA binding to human leukocytes. Evidence for a receptor-mediated association, internalization, and degradation of DNA / R.M. Bennett, G.T. Gabor, M.M. Merritt [и др.] // *J. Clin. Invest.* — 1985. — V.76(6). — P.2182–2190.
184. Bennett, R.M. The production and characterization of murine monoclonal antibodies to a DNA receptor on human leukocyte / R.M. Bennett, S.H. Hefeneider, A. Bakke [et al.] // *J. Immunol.* — 1988. — V.140(9). — P.2937–2942.
185. 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.
186. Benimetskaya, L. Mac-1 (CD11b/CD18) is an oligodeoxynucleotide-binding protein / L. Benimetskaya, J.D. Loike, Z. Khaled [et al.] // *Nat. Med.* — 1997. — V.3. — P.414–420.
187. Cherepanova, A.V. Ku protein as the main cellular target of cell-surface-bound circulating DNA / A.V. Cherepanova, A.V. Bushuev, T.G. Duzhak [et al.] // *Expert Opin. Biol. Ther.* — 2012. — V.12. — P.S35–S41.
188. Dorsch, C.A. Binding of single-strand DNA to human platelets // *Thromb. Res.* — 1981. — V.24. — P.119–129.
189. Hefeneider, S.H. Nucleosomes and DNA bind to specific cell-surface molecules on murine cells and induce cytokine production / S.H. Hefeneider, K.A. Cornell, L.E. Brown [et al.] // *Clin. Immunol. Immunopathol.* — 1992. — V.63(3). — P.245–251.
190. Jacob, L. A monoclonal anti-double-stranded DNA autoantibody binds to a 94 kDa cell surface protein on various cell types via nucleosomes or a DNA-histone complex / L. Jacob, J.P. Viard, B. Allenet [et al.] // *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* — 1989. — V.86(12). — P.4669–4673.

191. Koutouzov, S. Binding of nucleosomes to a cell surface receptor: redistribution and endocytosis in the presence of lupus antibodies / S. Koutouzov, A. Cabrespines, Z. Amoura [et al.] // *Eur. J. Immunol.* — 1996. — V.26(2). — P.472–486.
192. Беляев Н.Д., Будкер В.Г., Горохова О.Е., Соколов А.В. Mg^{2+} -зависимое взаимодействие ДНК с эукариотическими клетками // *Молекуляр. Биология.* — 1988. — Т.22. — С.1667–1672.
193. 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.
194. Черепанова А.В., Тамкович С.Н., Власов В.В., Лактионов П.П. Активность дезоксирибонуклеаз крови в норме и при патологии. Обзор // *Биомедицинская химия.* — 2007. — V.53. — P.488–496.
195. De Oliveira, M. Improvement of in vivo stability of phosphodiester oligonucleotide using anionic liposomes in mice / M. De Oliveira, V. Boutet, E. Fattal [et al.] // *Life Sci.* — 2000. — V.67(13). — P.1625–1637.
196. 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.
197. Lo, Y.M. Rapid clearance of fetal DNA from maternal plasma / Y.M. Lo, J. Zhang, T.N. Leung [et al.] // *Am. J. Hum. Genet.* — 1999. — V.64(1). — P.218–224.
198. Han, D.S.C. The biology of cell-free DNA fragmentation and the roles of DNASE1, DNASE1L3, and DFFB / D.S.C. Han, M. Ni, R.W.Y. Chan [et al.] // *Am. J. Hum. Genet.* — 2020. — V.106(2). — P.202–214. doi: 10.1016/j.ajhg.2020.01.008.
199. 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.
200. 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.
201. Prince, W.S. Pharmacodynamics of recombinant human DNase I in serum / W.S. Prince, D.L. Baker, A.H. Dodge [et al.] // *Clin. Exp. Immunol.* — 1998. — V.113(2). — P.289–296. doi: 10.1046/j.1365-2249.1998.00647.x.
202. Miyauchi, K. Development of a radioimmunoassay for human deoxyribonuclease I / K. Miyauchi, M. Ogawa, T. Shibata [et al.] // *Clin. Chim. Acta.* — 1986. — V.154. — P.115–123. doi: 10.1016/0009-8981(86)90003-3.

203. 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.
204. Dewez, B. Serum alkaline deoxyribonuclease activity, a sensitive marker for the therapeutic monitoring of cancer patients: methodological aspects / B. Dewez, M. Lans, V. Allaeyns [et al.] // *Eur. J. Clin. Chem. Clin. Biochem.* — 1993. — V.31(11). — P.793–797.
205. Pan, C.Q. Improved potency of hyperactive and actin-resistant human DNase I variants for treatment of cystic fibrosis and systemic lupus erythematosus / C.Q. Pan, T.H. Dodge, D.L. Baker [et al.] // *J. Biol. Chem.* — 1998. — V.273(29). — P.18374–18381. doi: 10.1074/jbc.273.29.18374.
206. Тамкович С.Н. Активность дезоксирибонуклеаз в биологических жидкостях здоровых доноров и онкологических больных / С.Н. Тамкович, А.В. Черепанова, О.Е. Брызгунова [и др.] // *Бюллетень экспериментальной биологии и медицины.* — 2008. — № 7. — С. 97–100.
207. Harosh, I. Mechanism of action of deoxyribonuclease II from human lymphoblasts / I. Harosh, D.M. Bininnger, P.V. Harris [et al.] // *Eur. J. Biochem.* — 1991. — V.202(2). — P.479–484. doi: 10.1111/j.1432-1033.1991.tb16397.x.
208. Эндакова Э.А., Новгородцева Т.Е. Исследование активности кислых нуклеаз // *Лаб. Дело.* — 1991. — Т.8. — P.16–19.
209. 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.
210. Eder, P.S. Substrate specificity and kinetics of degradation of antisense oligonucleotides by a 3' exonuclease in plasma / P.S. Eder, R.J. DeVine, J.M. Dagle [et al.] // *Antisense Res. Dev.* — 1991. — V.1. — P.141–151. doi: 10.1089/ard.1991.1.141.
211. Барановский А.Г., Бунева В.Н., Невинский Г.А. Дезоксирибонуклеазы человека // *Биохимия.* — 2004. — V.69(6). — P.725–742.
212. Frittitta, L. A soluble PC-1 circulates in human plasma: relationship with insulin resistance and associated abnormalities / L. Frittitta, S. Camastra, R. Baratta [et al.] // *J. Clin. Endocrinol.* — 1999. — V.84(10). — P.3620–3625. doi: 10.1210/jcem.84.10.6050.
213. 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.

214. Kanyshkova, T.G. Multiple enzymic activities of human milk lactoferrin / T.G. Kanyshkova, S.E. Babina, D.V. Semenov [et al.] // *Eur. J. Biochem.* — 2003. — V.270(16). — P.3353–3361. doi: 10.1046/j.1432-1033.2003.03715.x.
215. Baranovskii, A.G. Comparison of enzymatic properties of DNA-abzymes and human DNAses / A.G. Baranovskii, E.S. Odintsova, V.N. Buneva [et al.] // *Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids.* — 2004. — V.23. — P.1053–1056.
216. Bryzgunova, O.E. Redistribution of free- and cell-surface-bound DNA in blood of benign and malignant prostate tumor patients / O.E. Bryzgunova, S.N. Tamkovich, A.V. Cherepanova [et al.] // *Acta Naturae.* — 2015. — V.7(2). — P.115–118.
217. Cherepanova, A.V. Deoxyribonuclease activity and circulating DNA concentration in blood plasma of prostate tumor patients / A.V. Cherepanova, S.N. Tamkovich, O.E. Bryzgunova [et al.] // *Ann NY Acad Sci.* — 2008. — V.1137(1). — P.218–221.
218. 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.
219. Tamkovich, S., Bryzgunova, O. Protease activity and cell-free DNA in blood of healthy donors and breast cancer patients // *J. Immunoassay and Immunochemistry.* — 2016. — V.37(2). — P.141–153. DOI: 10.1080/15321819.2015.1069745.
220. 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.
221. Suzuki, N. Characterization of circulating DNA in healthy human plasma / N. Suzuki, A. Kamataki, J. Yamaki [et al.] // *Clin. Chim. Acta.* — 2008. — V.387(1–2). — P.55–58.
222. Krieg, A. CpG still rocks! Update on an accidental drug // *Nucleic Acid Ther.* — 2012. — V.22. — P.77–89.
223. Морозкин Е.С. Исследование состава внеклеточной ДНК в культуре клеток человека с помощью FISH / Е.С. Морозкин, Е.М. Лосева, К.С. Задесенец [и др.] // *Вестник НГУ. Серия: Биология, клиническая медицина.* — 2010. — Т.(1). — С.3–10.
224. Wang, B.G. Increased plasma DNA integrity in cancer patients / B.G. Wang, H.Y. Huang, Y.C. Chen [et al.] // *Cancer Res.* — 2003. — V.63(14). — P.3966–3968.
225. Jiang, W.W. Increased plasma DNA integrity index in head and neck cancer patients / W.W. Jiang, M. Zahurak, D. Goldenberg [et al.] // *Int. J. Cancer.* — 2006. — V.119(11). — P.2673–2676.

226. Umetani, N. Prediction of breast tumor progression by integrity of free circulating DNA in serum / N. Umetani, A.E. Giuliano, S.H. Hiramatsu [et al.] // *J. Clin. Oncol.* — 2006. — V.24(26). — P.4270–4276.
227. Шкода О.С. Взаимосвязь циркулирующих ДНК крови с особенностями и характером иммунного ответа у больных иксодовым клещевым боррелиозом на ранних стадиях / О.С. Шкода, Е.Д. Чикова, Н.В. Фоменко [и др.] // *Сибирский медицинский журнал.* — 2012. — Т.111(4). — С.39–41.
228. Rykova, E. Circulating DNA in rheumatoid arthritis: pathological changes and association with clinically used serological markers / E. Rykova, A. Sizikov, D. Roggenbuck [et al.] // *Arthritis Res Ther.* — 2017. — V.9(1). — P.85. doi: 10.1186/s13075-017-1295-z.
229. Пономарева А.А. Определение количества внеклеточных ДНК крови методом ПЦР, специфичной к б-актину и LINE-1 последовательностям при раке легкого / А.А. Пономарева, Е.Ю. Рыкова, Т.Э. Скворцова [и др.] // *Сиб. Онкол. Журн.* — 2009. — V.S2. — P.160–161.
230. Sozzi, G. Analysis of circulating tumor DNA in plasma at diagnosis and during follow-up of lung cancer patients / G. Sozzi, D. Conte, L. Mariani [et al.] // *Cancer Res.* — 2001. — V.61. — P.4675–4678.
231. Lo, Y.M. Kinetics of plasma Epstein-Barr virus DNA during radiation therapy for nasopharyngeal carcinoma / Y.M. Lo, S.F. Leung, L.Y. Chan [et al.] // *Cancer Res.* — 2000. — V.60. — P.2351–2355.
232. Fiegl, H. Circulating tumor-specific DNA: a marker for monitoring efficacy of adjuvant therapy in cancer patients / H. Fiegl, S. Millinger, E. Mueller-Holzner [et al.] // *Cancer Res.* — 2005. — V.65. — P.1141–1145.
233. Pisetsky, D.S. The origin and properties of extracellular DNA: from PAMP to DAMP // *Clin. Immunol.* — 2012. — V.144(1). — P.32–40.
234. Holdenrieder, S. Circulating nucleosomes in serum / S. Holdenrieder, P. Stieber, H. Bodenmüller [et al.] // *Ann. N.Y. Acad. Sci.* — 2001. — V.945(1). — P.93–102. doi:10.1111/j.1749—6632.2001.tb03869.x52.
235. Wang, K. HMGB1-containing nucleosome mediates chemotherapy-induced metastasis of human lung cancer / K. Wang, S. Shan, S. Wang [et al.] // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* — 2018. — V.500(3). — P.758–764. doi: 10.1016/j.bbrc.2018.04.150.
236. 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.

237. García Moreira, V. Increase in and clearance of cell-free plasma DNA in hemodialysis quantified by real-time PCR / V. García Moreira, D.L.T. Martínez, G.E. Gonzalez [et al.] // *Clin. Chem. Lab. Med.* — 2006. — V.44(12). — P.1410–1415. doi:10.1515/ CCLM.2006.252.
238. Приходько А.С. Праймирование нейтрофилов человека необходимо для их активации внеклеточной ДНК / А.С. Приходько, М.В. Витушкина, Л.А. Зиновкина [и др.] // *Биохимия.* — 2016. — Т.81(6). — С.795–801.
239. Berger-Achituv, S. A Proposed Role for Neutrophil Extracellular Traps in Cancer Immunoediting / S. Berger-Achituv, V. Brinkmann, U.A. Abed [et al.] // *Front. Immunol.* — 2013. — V.4. — P.48.
240. Sounbuli, K., Mironova, N., Alekseeva, L. Diverse Neutrophil Functions in Cancer and Promising Neutrophil-Based Cancer Therapies // *Int J Mol Sci.* — 2022. — V.23(24). — P.15827. doi: 10.3390/ijms232415827.
241. Alekseeva, L., Mironova, N. Role of Cell-Free DNA and Deoxyribonucleases in Tumor Progression // *Int. J. Mol. Sci.* — 2021. — V.22. — P.12246.
242. Albregues, J. Neutrophil Extracellular Traps Produced during Inflammation Awaken Cancer Cells in Mice / J. Albregues, M.A. Shields, D. Ng [et al.] // *Science.* — 2018. — V.361. — P.eaao4227.
243. Gould, T.J. Neutrophil Extracellular Traps Promote Thrombin Generation through Platelet-Dependent and Platelet-Independent Mechanisms / T.J. Gould, T.T. Vu, L.L. Swystun [et al.] // *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* — 2014. — V.34. — P.1977–1984.
244. Holmgren, L. Horizontal transfer of DNA by the uptake of apoptotic bodies / L. Holmgren, A. Szeles, E. Rajnavolgyi [et al.] // *Blood.* — 1999. — V.93. — P.3956–3963.
245. Bergsmedh, A. Horizontal transfer of oncogenes by uptake of apoptotic bodies / A. Bergsmedh, A. Szeles, M. Henriksson [et al.] // *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* — 2001. — V.98. — P.6407–6411.
246. 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.
247. Chen, Z. Circulation DNA: Biological implications for cancer metastasis and immunology / Z. Chen, A. Fadiel, F. Naftolin [et al.] // *Med. Hypoth.* — 2005. — V.65. — P.956–961.
248. 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.
249. Hariton-Gazal, E. Direct translocation of histone molecules across cell membranes / E. Hariton-Gazal, J. Rosenbluh, A. Graessmann [et al.] // *J. Cell. Sci.* — 2003. — V.116(Pt 22). — P.4577–4586. doi: 10.1242/jcs.00757.

250. Rogers, J.C., Kerstiens, J.W. Capping of DNA on phytohem agglutinin stimulated human lymphoblasts // *J. Immunol.* — 1981. — V.126. — P.703–705.
251. 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.
252. Burlingame, R.W. The central role of chromatin in autoimmune responses to histones and DNA in systemic lupus erythematosus / R.W. Burlingame, M.L. Boey, G. Starkebaum [et al.] // *J. Clin. Invest.* — 1994. — V.94(1). — P.184–192.
253. Andreu, Z., Yáñez-Mó, M. Tetraspanins in extracellular vesicle formation and function // *Front. Immunol.* — 2014. — V.16. — P.442.
254. 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.
255. Spang, A., Shiba, Y., Randazzo, P.A. Arf GAPs: gatekeepers of vesicle generation // *FEBS Lett.* — 2010. — V.584(12). — P.2646–2651.
256. Hurley, J.H. The ESCRT complexes // *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* — 2010. — V.45(6). — P.463–487.
257. 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.
258. Sonbhadra, S. Biogenesis, Isolation, and Detection of Exosomes and Their Potential in Therapeutics and Diagnostics / S. Sonbhadra, Mehak, L.M. Pandey // *Biosensors.* — 2023. — V.13. — P.802; Raposo, G., Stoorvogel, W. Extracellular vesicles: Exosomes, microvesicles, and friends // *J. Cell Biol.* — 2013. — V.200. — P.373–383.
259. Ostrowski, M. Rab27a and Rab27b control different steps of the exosome secretion pathway / M. Ostrowski, N.B. Carmo, S. Krumeich [et al.] // *Nat. Cell. Biol.* — 2010. — V.12(1). — P.19–30.
260. Clayton, A. Induction of heat shock proteins in B-cell exosomes / A. Clayton, A. Turkes, H. Navabi [et al.] // *J. Cell. Sci.* — 2005. — V.118(16). — P.3631–3638.
261. Parolini, I. Microenvironmental pH is a key factor for exosome traffic in tumor cells / I. Parolini, C. Federici, C. Raggi [et al.] // *J. Biol. Chem.* — 2009. — V.284(49). — P.34211–34222.
262. 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.

263. 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.
264. Li, M. Analysis of the RNA content of the exosomes derived from blood serum and urine and its potential as biomarkers / M. Li, E. Zeringer, T. Barta [et al.] // *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci. M*. — 2014. — V.369(1652). — P.20130502. doi: 10.1098/rstb.2013.0502.
265. Ghadami, S., Dellinger, K. The lipid composition of extracellular vesicles: applications in diagnostics and therapeutic delivery // *Front Mol Biosci*. — 2023. — V.10. — P.1198044. doi: 10.3389/fmolb.2023.1198044.
266. Zhang, H. Identification of distinct nanoparticles and subsets of extracellular vesicles by asymmetric flow field-flow fractionation / H. Zhang, D. Freitas, H. S. Kim [et al.] // *Nat. Cell. Biol.* — 2018. — V.20(3). — P.332–343. 10.1038/s41556-018-0040-4.
267. Skotland, T., Hessvik, N. P., Sandvig, K., Llorente, A. Exosomal lipid composition and the role of ether lipids and phosphoinositides in exosome biology // *J. Lipid Res*. — 2019. — V.60(1). — P.9–18. 10.1194/jlr.R084343.
268. Llorente, A. Molecular lipidomics of exosomes released by PC-3 prostate cancer cells / A. Llorente, T. Skotland, T. Sylvänne [et al.] // *Biochimica Biophysica Acta (BBA) — Mol. Cell. Biol. Lipids*. — 2013. — V.1831(7). — P.1302–1309. 10.1016/j.bbalip.2013.04.01.
269. Yoon, Y.J., Kim, O.Y., Gho, Y.S. Extracellular vesicles as emerging intercellular communicasome // *BMB Reports*. — 2014. — V.47(10). — P.531–539.
270. Kim, C.W. Extracellular membrane vesicles from tumor cells promote angiogenesis via sphingomyelin / C.W. Kim, H.M. Lee, T.H. Lee [et al.] // *Cancer Res*. — 2002. — V.62. — P.6312–6317.
271. Yoshioka, Y. Comparative marker analysis of extracellular vesicles in different human cancer types / Y. Yoshioka, Y. Konishi, N. Kosaka [et al.] // *J. Extracell. Vesicles*. — 2013. — V.2. — P.20424. doi: 10.3402/jev.v2i0.20424.
272. Cordonnier, M. Exosomes in cancer theranostic: Diamonds in the rough / M. Cordonnier, G. Chanteloup, N. Isambert [et al.] // *Cell. Adhes. Migr*. — 2017. — V.11(2). — P.151–163. doi: 10.1080/19336918.2016.1250999.
273. Jankovičová, J. Tetraspanins, More than Markers of Extracellular Vesicles in Reproduction / J. Jankovičová, P. Sečová, K. Michalková [et al.] // *Int J Mol Sci*. — 2020. — V.21(20). — P.7568. doi: 10.3390/ijms21207568.
274. Charrin, S. Lateral organization of membrane proteins: Tetraspanins spin their web / S. Charrin, F. le Naour, O. Silvie [et al.] // *Biochem. J*. — 2009. — V.420. — P.133–154.

275. Winterwood, N.E. A Critical Role for Tetraspanin CD151 in $\alpha 3\beta 1$ and $\alpha 6\beta 4$ Integrin-dependent Tumor Cell Functions on Laminin-5 / N.E. Winterwood, A. Varzavand, M.N. Meland [et al.] // *Mol. Biol Cell*. — 2006. — V.17. — P.2707–2721.
276. Hemler, M.E. Targeting of tetraspanin proteins—Potential benefits and strategies // *Nat. Rev. Drug Discov*. — 2008. — V.7. — P.747–758.
277. Simpson, R.J., Kalra, H., Mathivanan, S. ExoCarta as a resource for exosomal research // *J. Extracell. Vesicles*. — 2012. — V.1. — P.18374.
278. Willms, E. Extracellular Vesicle Heterogeneity: Subpopulations, Isolation Techniques, and Diverse Functions in Cancer Progression / E. Willms, C. Cabañas, I. Mäger [et al.] // *Front. Immunol*. — 2018. — V.9. — P.738.
279. Rana, S. Toward tailored exosomes: The exosomal tetraspanin web contributes to target cell selection / S. Rana, S. Yue, D. Stadel [et al.] // *Int. J. Biochem. Cell Biol*. — 2012. — V.44. — P.1574–1584.
280. Fanaei, M., Monk, P.N., Partridge, L.J. The role of tetraspanins in fusion // *Biochem. Soc. Trans*. — 2011. — V.39. — P.524–528.
281. Zech, D. Tumor-exosomes and leukocyte activation: An ambivalent crosstalk / D. Zech, S. Rana, M.W. Büchler [et al.] // *Cell Commun. Signal*. — 2012. — V.10. — P.37.
282. Christianson, H.C. Cancer cell exosomes depend on cell-surface heparan sulfate proteoglycans for their internalization and functional activity / H.C. Christianson, K.J. Svensson, T.H. van Kuppevelt [et al.] // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. — 2013. — V.110. — P.17380–17385.
283. Menck, K. Induction and transport of Wnt 5a during macrophage-induced malignant invasion is mediated by two types of extracellular vesicles / K. Menck, F. Klemm, J.C. Gross [et al.] // *Oncotarget*. — 2013. — V.4. — P.2057–2066.
284. Шевченко В. Е. Экзосомальные протеины — потенциальные маркеры для диагностики множественной миеломы / В. Е. Шевченко, А. С. Брюховецкий, М. В. Филатов [и др.] // *Успехи молекулярной онкологии*. — 2018. — Т.5, № 1. — С. 60–69.
285. Lorico, A. CD9, a tetraspanin target for cancer therapy? / A. Lorico, M. Lorico-Rappa, J. Karbanová [et al.] // *Exp Biol Med (Maywood)*. — 2021. — V.246(9). — P.1121–1138. doi: 10.1177/1535370220981855.
286. Reyes, R. Tetraspanin CD9: A Key Regulator of Cell Adhesion in the Immune System / R. Reyes, B. Cardenes, Y. Machado-Pineda [et al.] // *Front Immunol*. — 2018. — V.9. — P.863. doi: 10.3389/fimmu.2018.00863.
287. Zöller, M. Tetraspanins: push and pull in suppressing and promoting metastasis // *Nat Rev Cancer*. — 2009. — V.9. — P.40–55.

288. Hemler, M.E. Tetraspanin proteins promote multiple cancer stages // *Nat Rev Cancer*. — 2014. — V.14. — P.49–60.
289. Mazurov, D. Tetraspanin protein CD9 interacts with metalloprotease CD10 and enhances its release via exosomes / D. Mazurov, L. Barbashova, A. Filatov // *FEBS J*. — 2013. — V.280. — P.1200–1213.
290. Pfistershammer, K. / K. Pfistershammer, O. Majdic, J. Stöckl // *J. Immunol*. — 2004. — V.173. — P.6000.
291. Duffield, A. / A. Duffield, E.J. Kamsteeg, A.N. Brown // *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A*. — 2003. — V.100. — P.15560.
292. Pols, M.S., Klumperman, J. // *Exp. Cell Res*. — 2009. — V.315. — P.1584.
293. Justo, B.L., Jasiulionis M.G. // *Int. J. Mol. Sci*. — 2021. — V.22. — P.9319; Florin, L., Lang, T. // *Front. Immunol*. — 2018. — V.9. — P.1140; Liu, W.H. [и др.] // *Oncol. Lett*. — 2018. — V.15. — P.9033.
294. Dey, S., Basu, S., Ranjan, A. Revisiting the Role of CD63 as Pro-Tumorigenic or Anti-Tumorigenic Tetraspanin in Cancers and its Theragnostic Implications // *Adv Biol (Weinh)*. — 2023. — V.7(7). — P.e2300078. doi: 10.1002/adbi.202300078.
295. Najy, A.J. / A.J. Najy, Y. S. Jung, S. Kim // *Cells*. — 2021. — V.10. — P.2721.
296. Iwabuchi, E. / E. Iwabuchi, Y. Miki, A. Kanai // *Cancer Res*. — 2021. — V.81. — P.2903.
297. Gao, Y. / Y. Gao, X. Li, C. Zeng // *Adv. Sci*. — 2020. — V.7. — P.2002518.
298. Tominaga, N. / N. Tominaga, K. Hagiwara, N. Kosaka // *Mol. Cancer*. — 2014. — V.13. — P.134.
299. Piao, Y.J. / Y.J. Piao, H. S. Kim, E. H. Hwang // *OncoTargets Ther*. — 2017. — V.9. — P.7398.
300. Nishida-Aoki, N. / N. Nishida-Aoki, N. Tominaga, F. Takeshita // *Mol. Ther*. — 2017. — V.25. — P.181.
301. Levy, S. CD81 (TAPA-1): A Molecule Involved in Signal Transduction and Cell Adhesion in the Immune System / S. Levy, S.C. Todd, H.T. Maecker // *Annu Rev Immunol*. — 1998. — V.16. — P.89–109. doi: 10.1146/annurev.immunol.16.1.89.
302. Vences-Catalán, F. CD81 as a tumor target / F. Vences-Catalán, C. Duault, C.C. Kuo [et al.] // *Biochem Soc Trans*. — 2017. — V.45(2). — P.531–535. doi: 10.1042/BST20160478.
303. Luga, V. Exosomes mediate stromal mobilization of autocrine Wnt-PCP signaling in breast cancer cell migration / V. Luga, L. Zhang, A.M. Vilorio-Petit [et al.] // *Cell*. — 2012. — V.151(7). — P.1542–1556. doi: 10.1016/j.cell.2012.11.024.

304. Юнусова Н.В. Роль тетраспанинов и протеаз экзосом в опухолевой прогрессии / Н.В. Юнусова, Е.А. Тугутова, С.Н. Тамкович, И.В. Кондакова // Биомедицинская химия. — 2018. — Т.64, вып. 2. — С. 123–133.
305. Edwards, D.R., Handsley, M.M., Pennington, C.J. The ADAM metalloproteinases // *Mol Aspects Med.* — 2008. — V.29(5). — P.258–289. doi: 10.1016/j.mam.2008.08.001.
306. Arduise, C. Tetraspanins regulate ADAM10-mediated cleavage of TNF-alpha and epidermal growth factor / C. Arduise, T. Abache, L. Li [et al.] // *J Immunol.* — 2008. — V.181. — P.7002–7013.
307. Saint-Pol, J. Regulation of the trafficking and the function of the metalloprotease ADAM10 by tetraspanins / J. Saint-Pol, E. Eschenbrenner, E. Dornier [et al.] // *Biochem Soc Trans.* — 2017. — V.45(4). — P.937–944. doi: 10.1042/BST20160296.
308. Liu, J. A new mechanism of trastuzumab resistance in gastric cancer: MACC1 promotes the warburg effect via activation of the PI3K/AKT signaling pathway / J. Liu, C. Pan, L. Guo [et al.] // *J Hematol Oncol.* — 2016. — V.9. — P.76. doi: 10.1186/s13045-016-0302-1.
309. Zheng, H. Elevated serum HER-2 predicts poor prognosis in breast cancer and is correlated to ADAM10 expression / H. Zheng, A. Zhong, S. Xie [et al.] // *Cancer Med.* — 2019. — V.8. — P.679–685. doi: 10.1002/cam4.1859.
310. Mullooly, M. ADAMs as new therapeutic targets for triple-negative breast cancer / M. Mullooly, P.M. McGowan, S.U. Sukor [et al.] // *J Clin Oncol.* — 2011. — V.29. — P.1062. doi: 10.1200/jco.2011.29.15_suppl.1062.
311. Mullooly, M. ADAM10: a new player in breast cancer progression? / M. Mullooly, P.M. McGowan, S.A. Kennedy [et al.] // *Br J Cancer.* — 2015. — V.113. — P.945–951. doi: 10.1038/bjc.2015.288.
312. Liu, F., Zhuang, L., Wu, R., Li, D. miR-365 inhibits cell invasion and migration of triple negative breast cancer through ADAM10 // *J BUON.* — 2019. — V.24. — P.1905–1912.
313. Miller, M.A. Molecular Pathways: Receptor Ectodomain Shedding in Treatment, Resistance, and Monitoring of Cancer / M.A. Miller, R.J. Sullivan, D.A. Lauffenburger // *Clin Cancer Res.* — 2017. — V.23(3). — P.623–629. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-16-0869.
314. Shen, H. The role of ADAM17 in tumorigenesis and progression of breast cancer / H. Shen, L. Li, S. Zhou [et al.] // *Tumour Biol.* — 2016. doi: 10.1007/s13277-016-5418-y.
315. Shoari, A. Structure and computation-guided yeast surface display for the evolution of TIMP-based matrix metalloproteinase inhibitors / A. Shoari, G. Khalili-Tanha, M.A. Coban, E.S. Radisky // *Front. Mol. Biosci.* — 2023. — V.10. — P.1321956. doi: 10.3389/fmolb.2023.1321956.

316. Niland, S., Riscanevo, A.X., Eble, J.A. Matrix Metalloproteinases Shape the Tumor Microenvironment in Cancer Progression // *Int. J. Mol. Sci.* — 2021. — V.23. — P.146. doi: 10.3390/ijms23010146.
317. Henke, E., Nandigama, R., Ergun, S. Extracellular Matrix in the Tumor Microenvironment and Its Impact on Cancer Therapy // *Front. Mol. Biosci.* — 2019. — V.6. — P.160. doi: 10.3389/fmolb.2019.00160.
318. Shimoda, M. Extracellular vesicle-associated MMPs: A modulator of the tissue microenvironment // *Adv Clin Chem.* — 2019. — V.88. — P.35–66. doi: 10.1016/bs.acc.2018.10.006.
319. Urciuoli, E. Osteosarcoma-derived extracellular vesicles induce a tumor-like phenotype in normal recipient cells / E. Urciuoli, E. Giorda, M. Scarsella [et al.] // *J Cell Physiol.* — 2018. — V.233(8). — P.6158–6172. doi: 10.1002/jcp.26464.
320. Cook, L. ADAM8-Dependent Extracellular Signaling in the Tumor Microenvironment Involves Regulated Release of Lipocalin 2 and MMP-9 / L. Cook, M. Sengelmann, B. Winkler [et al.] // *Int J Mol Sci.* — 2022. — V.23(4). — P.1976. doi: 10.3390/ijms23041976.
321. Ramírez-Ricardo, J. Circulating extracellular vesicles from patients with breast cancer enhance migration and invasion via a Src-dependent pathway in MDA-MB-231 breast cancer cells / J. Ramírez-Ricardo, E. Leal-Orta, E. Martínez-Baeza [et al.] // *Mol Med Rep.* — 2020. — V.22(3). — P.1932–1948. doi: 10.3892/mmr.2020.11259.
322. Jouida, A. Exosomes from EGFR-Mutated Adenocarcinoma Induce a Hybrid EMT and MMP9-Dependant Tumor Invasion / A. Jouida, M. O'Callaghan, C. Mc Carthy [et al.] // *Cancers (Basel).* — 2022. — V.14(15). — P.3776. doi: 10.3390/cancers14153776.
323. Sixt, S.U., Dahlmann, B. Extracellular, circulating proteasomes and ubiquitin—incidence and relevance // *Biochim. Biophys. Acta.* — 2008. — V.1782. — P.817–823.
324. Romaniuk, W. High chymotrypsin-like activity in the plasma of patients with newly diagnosed multiple myeloma treated with bortezomib is predictive of a better response and longer PFS / W. Romaniuk, L. Bolkun, J. Kalita [et al.] // *Ann. Hematol.* — 2018. — V.97. — P.1879–1887.
325. Mueller, O. Circulating extracellular proteasome in the cerebrospinal fluid: A study on concentration and proteolytic activity / O. Mueller, T. Anlasik, J. Wiedemann [et al.] // *J. Mol. Neurosci.* — 2012. — V.46. — P.509–515.
326. Kulichkova, V.A. Proteomic analysis of affinity-purified extracellular proteasomes reveals exclusively 20S complexes / V.A. Kulichkova, T.O. Artamonova, O.G. Lyublinskaya [et al.] // *Oncotarget.* — 2017. — V.8. — P.102134–102149.

327. Шашова Е.Е. Внутриклеточный и циркулирующий пулы протеасом: значение при злокачественных новообразованиях различных локализаций / Е.Е. Шашова, Е.С. Колегова, И.В. Кондакова, А.А. Завьялов // Сибирский онкологический журнал. — 2015. — Т.6. — С.76–82.
328. Shashova, E.E. Proteasome functioning in breast cancer: connection with clinical-pathological factors / E.E. Shashova, Yu.V. Lyupina, S.A. Glushchenko [et al.] // Plos One. — 2014. — V.9(10). — P.11. doi: 10.1371/journal.pone.0109933.
329. Volovat, S.R. MiRNA and LncRNA as potential biomarkers in triple-negative breast cancer: a review / S.R. Volovat, C. Volovat, I. Hordila [et al.] // Front. Oncol. — 2020. — V.10. — P.526850. doi: 10.3389/fonc.2020.526850.
330. Yi, Y. Tumor-derived exosomal non-coding RNAs: the emerging mechanisms and potential clinical applications in breast cancer / Y. Yi, M. Wu, H. Zeng [et al.] // Front. Oncol. — 2021. — V.11. — P.738945. doi: 10.3389/fonc.2021.738945.
331. Chen, X. Exosomal long non-coding RNA HOTTIP increases resistance of colorectal cancer cells to mitomycin via impairing miR-214-mediated degradation of KPNA3 / X. Chen, Y. Liu, Q. Zhang [et al.] // Front. Cell. Dev. Biol. — 2021. — V.8. — P.582723. doi: 10.3389/fcell.2020.582723.
332. Сорокин Д.В. Эффект негативной регуляции эстрогенового сигналинга под действием экзосом: роль в развитии резистентности клеток рака молочной железы / Д.В. Сорокин, О.Е. Андреева, Е.И. Михаевич [и др.] // Успехи молекулярной онкологии. — 2020. — Т.7(3). — С. 58–62.
333. Dong, Y. MALAT1 promotes the proliferation and metastasis of osteosarcoma cells by activating the PI3K/Akt pathway / Y. Dong, G. Liang, B. Yuan [et al.] // Tumour Biol. — 2015. — V.36(3). — P.1477–1486. doi: 10.1007/s13277-014-2631-4.
334. Alhajlah, S. Exploring the role of exosomal lncRNA in cancer immunopathogenesis: Unraveling the immune response and EMT pathways / S. Alhajlah, S.A. Jasim, F.M.A. Altalbawy [et al.] // Exp Cell Res. — 2025. — V.445(1). — P.114401. doi: 10.1016/j.yexcr.2024.114401.
335. Welsh, J.A. Minimal information for studies of extracellular vesicles (MISEV2023): From basic to advanced approaches / J.A. Welsh, D.C.I. Goberdhan, L. O'Driscoll [et al.] // J. Extracell. Vesicles. — 2024. — V.13(2). — P.e12404. doi: 10.1002/jev2.12404.
336. Stefańska, K. The role of exosomes in human carcinogenesis and cancer therapy-recent findings from molecular and clinical research / K. Stefańska, M. Józkowiak, A. Angelova Volponi [et al.] // Cells. — 2023. — V.12(3). — P.356. doi: 10.3390/cells12030356.

337. Vyas, K.S. Exosomes: the latest in regenerative aesthetics / K.S. Vyas, J. Kaufman, G.S. Munavalli [et al.] // *Regen. Med.* — 2023. — V.18(2). — P.181–194. doi: 10.2217/rme-2022-0134.
338. Jia, Y. Exosome: emerging biomarker in breast cancer / Y. Jia, Y. Chen, Q. Wang [et al.] // *Oncotarget.* — 2017. — V.8(25). — P.41717–41733. doi: 10.18632/oncotarget.16684.
339. Yuan, J. Decoding tumor microenvironment: EMT modulation in breast cancer metastasis and therapeutic resistance, and implications of novel immune checkpoint blockers / J. Yuan, L. Yang, H. Zhang [et al.] // *Biomed Pharmacother.* — 2024. — V.181. — P.117714. doi: 10.1016/j.biopha.2024.117714.
340. Ab Razak, N.S. Impact of Chemotherapy on Extracellular Vesicles: Understanding the Chemo-EVs / N.S. Ab Razak, N.S. Ab Mutalib, M.A. Mohtar, N. Abu // *Front Oncol.* — 2019. — V.9. — P.1113.
341. Shen, M. Chemotherapy-induced extracellular vesicle mirnas promote breast cancer stemness by targeting ONECUT2 / M. Shen, C. Dong, X. Ruan [et al.] // *Cancer Res.* — 2019. — V.79(14). — P.3608–3621.
342. Sansone, P. Packaging and transfer of mitochondrial DNA via exosomes regulate escape from dormancy in hormonal therapy-resistant breast cancer / P. Sansone, C. Savini, I. Kurelac [et al.] // *Proc. Natl. Acad. Sci.* — 2017. — V.114(43). — P.E9066–E9075.
343. Rodrigues, C.F.D. Stroma-derived IL-6, G-CSF and Activin-a mediated dedifferentiation of lung carcinoma cells into cancer stem cells / C.F.D. Rodrigues, E. Serrano, M.I. Patricio [et al.] // *Sci. Rep.* — 2018. — V.8(1). — P.11573.
344. Ozawa, P.M.M. Extracellular vesicles from triple-negative breast cancer cells promote proliferation and drug resistance in non-tumorigenic breast cells / P.M.M. Ozawa, F. Alkhilaiwi, I.J. Cavalli [et al.] // *Breast Cancer Res. Treat.* — 2018. — V.172. — P.713–723. doi:10.1007/s10549-018-4925-5.
345. Ding, J. Exosome-mediated miR-222 transferring: An insight into NF- κ B-mediated breast cancer metastasis / J. Ding, Z. Xu, Y. Zhang [et al.] // *Exp. Cell. Res.* — 2018. — V.369. — P.129–138. doi:10.1016/j.yexcr.2018.05.014.
346. Le, M.T. MiR-200-containing extracellular vesicles promote breast cancer cell metastasis / M.T. Le, P. Hamar, C. Guo [et al.] // *J. Clin. Invest.* — 2014. — V.124(12). — P.5109–5128.
347. Fong, M.Y. Breast-cancer-secreted miR-122 reprograms glucose metabolism in premetastatic niche to promote metastasis / M.Y. Fong, W. Zhou, L. Liu [et al.] // *Nat. Cell. Biol.* — 2015. — V.124(12). — P.183–194.

348. Deng, Z. Tumor cell cross talk with tumor-associated leukocytes leads to induction of tumor exosomal fibronectin and promotes tumor progression / Z. Deng, Z. Cheng, X. Xiang [et al.] // *Am. J. Pathol.* — 2012. — V.180. — P.390–398. doi: 10.1016/j.ajpath.2011.09.023.
349. Wang, B. Exosomal miR-1910-3p promotes proliferation, metastasis, and autophagy of breast cancer cells by targeting MTMR3 and activating the NF- κ B signaling pathway / B. Wang, J.-H. Mao, B.-Y. Wang [et al.] // *Cancer Lett.* — 2020. — V.489. — P.87–99. doi: 10.1016/j.canlet.2020.05.038.
350. Singh, R. Exosome-mediated transfer of miR-10b promotes cell invasion in breast cancer / R. Singh, R. Pochampally, K. Watabe, Y.Y. Mo // *Mol. Cancer.* — 2014. — V.13. — P.256.
351. Zhou, W. Cancer-secreted miR-105 destroys vascular endothelial barriers to promote metastasis / W. Zhou, M.Y. Fong, Y. Min [et al.] // *Cancer Cell.* — 2014. — V.25. — P.501–515.
352. Wang, J. Microenvironment-induced TIMP2 loss by cancer-secreted exosomal miR-4443 promotes liver metastasis of breast cancer / J. Wang, Q. Zhang, D. Wang [et al.] // *J. Cell. Physiol.* — 2020. — V.235. — P.5722–5735. doi: 10.1002/jcp.29507.
353. Guo, J. Mouse 4T1 breast cancer cell-derived exosomes induce proinflammatory cytokine production in macrophages via miR-183 / J. Guo, Z. Duan, C. Zhang [et al.] // *J. Immunol.* — 2020. — V.205. — P.2916–2925. doi: 10.4049/jimmunol.1901104.
354. Kia, V. Evaluation of exosomal miR-9 and miR-155 targeting PTEN and DUSP14 in highly metastatic breast cancer and their effect on low metastatic cells / V. Kia, M. Paryan, Y. Mortazavi [et al.] // *J. Cell. Biochem.* — 2019. — V.120. — P.5666–5676. doi:10.1002/jcb.27850.
355. Guo, L. Breast cancer cell-derived exosomal miR-20a-5p promotes the proliferation and differentiation of osteoclasts by targeting SRCIN1 / L. Guo, Y. Zhu, L. Li [et al.] // *Cancer Med.* — 2019. — V.8. — P.5687–5701. doi:10.1002/cam4.2454.
356. Kosaka, N. Neutral sphingomyelinase 2 (nSMase2) dependent exosomal transfer of angiogenic microRNAs regulate cancer cell metastasis / N. Kosaka, H. Iguchi, K. Hagiwara [et al.] // *J. Biol. Chem.* — 2013. — V.288. — P.10849–10859.
357. Camacho, L., Guerrero, P., Marchetti, D. MicroRNA and protein profiling of brain metastasis competent cell-derived exosomes // *PLoS One.* — 2013. — V.8. — P.e73790.
358. Hong, L. High expression of miR-210 predicts poor survival in patients with breast cancer: a meta-analysis / L. Hong, J. Yang, Y. Han [et al.] // *Gene.* — 2012. — V.507. — P.135–138.
359. Olejarz, W. Exosomes in Angiogenesis and anti-angiogenic therapy in cancers // *Int J Mol Sci.* — 2020. — V.21(16).
360. Khanicheragh, P. Exosomes and breast cancer angiogenesis; Highlights in intercellular communication / P. Khanicheragh, Z. Abbasi-Malati, S. Saghebasl [et al.] // *Cancer Cell Int.* — 2024. — V.24(1). — P.402. doi: 10.1186/s12935-024-03606-9.

361. Zou, X. Human mesenchymal stromal cell-derived extracellular vesicles alleviate renal ischemic reperfusion injury and enhance angiogenesis in rats / X. Zou, D. Gu, X. Xing [et al.] // *Am. J. Transl. Res.* — 2016. — V.8(10). — P.4289–4299.
362. Mezentsev, A. Endothelial microparticles affect angiogenesis in vitro: role of oxidative stress / A. Mezentsev, R.M. Merks, E. O’Riordan [et al.] // *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* — 2005. — V.289(3). — P.1106–1114. doi: 10.1152/ajpheart.00265.2005.
363. Ramakrishnan, D.P. Extracellular vesicles activate a CD36-dependent signaling pathway to inhibit microvascular endothelial cell migration and tube formation / D.P. Ramakrishnan, R.A. Hajj—Ali, Y. Chen, R.L. Silverstein // *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* — 2016. — V.36(3). — P.534–544. doi: 10.1161/ATVBAHA.115.307085.
364. Yang, C. Lymphocytic microparticles inhibit angiogenesis by stimulating oxidative stress and negatively regulating VEGF-induced pathways / C. Yang, B.R. Mwaikambo, T. Zhu [et al.] // *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* — 2008. — V.294(2). — P.467–476. doi: 10.1152/ajpregu.00432.2007.
365. Brill, A. Platelet-derived microparticles induce angiogenesis and stimulate post-ischemic revascularization / A. Brill, O. Dashevsky, J. Rivo [et al.] // *Cardiovasc. Res.* — 2005. — V.67(1). — P.30–38. doi: 10.1016/j.cardiores.2005.04.007.
366. Brodsky, S.V. Endothelium derived microparticles impair endothelial function in vitro / S.V. Brodsky, F. Zhang, A. Nasjletti, M.S. Goligorsky // *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* — 2004. — V.286(5). — P.1910–1915. doi: 10.1152/ajpheart.01172.2003.
367. Gesierich, S. Systemic induction of the angiogenesis switch by the tetraspanin D6.1A/ CO-029 / S. Gesierich, I. Berezovskiy, E. Ryschich, M. Zöller // *Cancer Res.* — 2006. — V.66. — P.7083–7094.
368. Janowska-Wieczorek, A. Microvesicles derived from activated platelets induce metastasis and angiogenesis in lung cancer / A. Janowska-Wieczorek, M. Wysoczynski, J. Kijowski [et al.] // *Int. J. Cancer.* — 2005. — V.113(5). — P.752–760.
369. Kuriyama, N. Extracellular vesicles are key regulators of Tumor Neovasculature / N. Kuriyama [et al.] // *Front Cell Dev Biology.* — 2020. — V.8.
370. Konoshenko, M. Total Blood Exosomes in Breast Cancer: Potential Role in Crucial Steps of Tumorigenesis / M. Konoshenko, G. Sagaradze, E. Orlova [et al.] // *Int. J. Mol. Sci.* — 2020. — V.21(19). — P.7341. doi:10.3390/ijms21197341.
371. Bryzgunova, O. A reliable method to concentrate circulating DNA / O. Bryzgunova, A. Bondar, E. Morozkin [et al.] // *Anal. Biochem.* — 2011. — V.408. — P.354–356.
372. Tamkovich, S.N. Simple and rapid procedure suitable for quantitative isolation of low and high molecular weight extracellular nucleic acids / S.N. Tamkovich, P.P. Laktionov, E.Y. Rykova,

- V.V. Vlassov // Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids. — 2004. — V.23(6-7). — P.873–877. doi: 10.1081/NCN-200026034.
373. Тамкович С.Н., Челобанов Б.П., Дужак Т.Г. Метод выделения циркулирующих в крови нуклеопротеиновых комплексов // Известия академии наук. Серия химическая. — 2015. — Т.6. — С. 1458–1463.
374. Shechter, D. Extraction, purification and analysis of histones / D. Shechter, H.L. Dormann, C.D. Allis, S.B. Hake // Nature protocols. — 2007. — V.2(6). — P.1145–1457.
375. Фримель Г. Иммунологические методы. — М.: Медицина, 1987.
376. Тамкович С.Н. Идентификация белков в составе циркулирующих в крови нуклеопротеиновых комплексов / С.Н. Тамкович, Д.С. Сердюков, О.С. Тутанов [и др.] // Биоорганическая химия. — 2015. — Т.41, № 6. — С. 686–695.
377. Rosenfeld, J. In-gel digestion of proteins for internal sequence analysis after one- or two-dimensional gel electrophoresis / J. Rosenfeld, J. Capdevielle, J.C. Guillemot, P. Ferrara // Anal. Biochem. — 1992. — V.203. — P.173–179.
378. Villar-Garea, A., Israel, L., Imhof, A. Analysis of histone modifications by mass spectrometry // Curr. Protoc. Protein Sci. — 2008. — V.14. — Unit 14.10.
379. Tutanov, O. 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 / O. Tutanov, A. Shefer, Y. Tsentalovich, S. Tamkovich // International Journal of Molecular Sciences. — 2023. — V.24(8). — P.7279. <https://doi.org/10.3390/ijms24087279>.
380. Shefer, A. Blood Plasma Circulating DNA Protein Complexes: Involvement in Carcinogenesis and Prospects for Liquid Biopsy of Breast Cancer / A. Shefer, O. Tutanov, M. Belenikin [et al.] // Journal of Personalized Medicine. — 2023. — V.13. — P.1691. <https://doi.org/10.3390/jpm13121691>.
381. Tutanov, O. DNA-Binding Proteins and Passenger Proteins in Plasma DNA-Protein Complexes: Imprint of Parental Cells or Key Mediators of Carcinogenesis Processes? / O. Tutanov, A. Shefer, E. Shefer [et al.] // Int. J. Mol. Sci. — 2024. — V.25(10). — P.5165. doi: 10.3390/ijms25105165.
382. Pathan, M. A novel community driven software for functional enrichment analysis of extracellular vesicles data / M. Pathan, S. Keerthikumar, D. Chisanga [et al.] // J. Extracell. Vesicles. — 2017. — V.6. — P.e1321455. doi 10.1080/20013078.2017.1321455.
383. Binns, D. QuickGO: a web-based tool for Gene Ontology searching / D. Binns, E. Dimmer, R. Huntley [et al.] // Bioinformatics. — 2009. — V.25. — P.3045–3046. doi 10.1093/bioinformatics/btp536.

384. Yang, Q. dbDEPC 3.0: the database of differentially expressed proteins in human cancer with multi—level annotation and drug indication / Q. Yang, Y. Zhang, H. Cui [et al.] // Database (Oxford). — 2018. — V.2018. — P.bay015. doi: 10.1093/database/bay015.
385. Thul, P.J. A subcellular map of the human proteome / P.J. Thul, L. Akesson, M. Wiking [et al.] // Science. — 2017. — V.356(6340). — P.eaal3321. doi: 10.1126/science.aal3321.
386. Emelyanov, A. Cryo-electron microscopy of extracellular vesicles from cerebrospinal fluid / A. Emelyanov, T. Shtam, R. Kamyshinsky [et al.] // PLoS One. — 2020. — V.15. — P.e0227949. doi: 10.1371/journal.pone.0227949.
387. Тамкович С.Н. Выделение и характеристика экзосом плазмы крови больных раком молочной железы и колоректальным раком / С.Н. Тамкович, Н.В. Юнусова, М.Н. Стахеева [и др.] // Биомедицинская химия. — 2017. — Т.63, №2. — С. 165–169.
388. Сомов А.К. ADAM-10 на поверхности экзосом крови больных раком молочной железы: новые механизмы опухолевой диссеминации / А.К. Сомов, Н.В. Юнусова, Т.А. Штам [и др.] // Вопросы онкологии. — 2019. — Т.65(5). — С. 678–683.
389. Pathan, M. FunRich: An open access standalone functional enrichment and interaction network analysis tool / M. Pathan, S. Keerthikumar, C. Ang [et al.] // Proteomics. — 2015. — V.15(15). — P.2597–2601. doi: 10.1002/pmic.201400515.
390. Skvortsova, T.E. Methylated Cell-Free DNA In Vitro and In Vivo / T.E. Skvortsova, O.E. Bryzgunova, A.O. Lebedeva [et al.] // In Circulating Nucleic Acids in Plasma and Serum; Gahan, P., Ed. — Springer: Dordrecht, Switzerland, 2010. — Chapter 25. — P.185–194.
391. Warren, J.D. Septin 9 methylated DNA is a sensitive and specific blood test for colorectal cancer / J.D. Warren, W. Xiong, A.M. Bunker [et al.] // BMC Med. — 2011. — V.9. — P.133.
392. Schmidt, B. SHOX2 DNA methylation is a biomarker for the diagnosis of lung cancer based on bronchial aspirates / B. Schmidt, V. Liebenberg, D. Dietrich [et al.] // BMC Cancer. — 2010. — V.10. — P.600.
393. Rykov, S.V. Gene Methylation in Circulating Cell-Free DNA from the Blood Plasma as Prognostic and Predictive Factor in Breast Cancer / S.V. Rykov, E.A. Filippova, V.I. Loginov, E.A. Braga // Russ. J. Genet. — 2021. — V.57. — P.1239–1252.
394. Panagopoulou, M., Esteller, M., Chatzaki, E. Circulating Cell-Free DNA in Breast Cancer: Searching for Hidden Information towards Precision Medicine // Cancers. — 2021. — V.13. — P.728.
395. Ivanov, M. Non-random fragmentation patterns in circulating cell-free DNA reflect epigenetic regulation / M. Ivanov, A. Baranova, T. Butler [et al.] // BMC Genomics. — 2015. — V.16(Suppl. 13). — P.S1.

396. Shi, J. Size profile of cell-free DNA: A beacon guiding the practice and innovation of clinical testing / J. Shi, R. Zhang, J. Li, R. Zhang // *Theranostics*. — 2020. — V.10. — P.4737–4748.
397. Ponomaryova, A.A. Potentialities of aberrantly methylated circulating DNA for diagnostics and post-treatment follow-up of lung cancer patients / A.A. Ponomaryova, E.Y. Rykova, N.V. Cherdyntseva [et al.] // *Lung Cancer*. — 2013. — V.81. — P.397–403.
398. Skvortsova, T.E. Cell-free and cell-bound circulating DNA in breast tumours: DNA quantification and analysis of tumour-related gene methylation / T.E. Skvortsova, E.Y. Rykova, S.N. Tamkovich [et al.] // *Br. J. Cancer*. — 2006. — V.94. — P.1492–1495.
399. Ostertag, E.M., Kazazian H.H. Jr. Biology of mammalian L1 retrotransposons // *Ann. Rev. Genet.* — 2001. — V.35. — P.501–538.
400. Choy, L.Y.L. Single-molecule sequencing enables long cell-free DNA detection and direct methylation analysis for cancer patients / L.Y.L. Choy, W. Peng, P. Jiang [et al.] // *Clin. Chem.* — 2022. — V.68(9). — P.1151–1163. doi: 10.1093/clinchem/hvac086.
401. Didenko, V.V. Early necrotic DNA degradation: presence of blunt-ended DNA breaks, 3' and 5' overhangs in apoptosis, but only 5' overhangs in early necrosis / V.V. Didenko, H. Ngo, D.S. Baskin // *Am. J. Pathol.* — 2003. — V.162(5). — P.1571–1578. doi: 10.1016/S0002-9440(10)64291-5.
402. 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.
403. Sun, K. Plasma DNA tissue mapping by genome-wide methylation sequencing for noninvasive prenatal, cancer, and transplantation assessments / K. Sun, P. Jiang, K.C. Allen Chan [et al.] // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. — 2015. — V.112. — P.E5503–E5512.
404. Bryzgunova, O. 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 / O. Bryzgunova, A. Bondar, P. Ruzankin [et al.] // *Cancers*. — 2021. — V.13. — P.6234.
405. Korshunova, Y. Massively parallel bisulphite pyrosequencing reveals the molecular complexity of breast cancer-associated cytosine-methylation patterns obtained from tissue and serum DNA / Y. Korshunova, R. Maloney, N. Lakey [et al.] // *Genome Res.* — 2008. — V.18. — P.19–29.
406. Van der Auwera, I. Quantitative methylation profiling in tumor and matched morphologically normal tissues from breast cancer patients / I. Van der Auwera, C. Bovie, C. Svensson [et al.] // *BMC Cancer*. — 2010. — V.10. — P.97.

407. Kwabi-Addo, B. Age-related DNA methylation changes in normal human prostate tissues / B. Kwabi-Addo, W. Chung, L. Shen [et al.] // *Clin. Cancer Res.* — 2007. — V.13. — P.3796–3802.
408. Mc Auley, M.T. DNA methylation in genes associated with the evolution of ageing and disease: A critical review // *Ageing Res. Rev.* — 2021. — V.72. — P.101488.
409. Botezatu, I. Genetic analysis of DNA excreted in urine: a new approach for detecting specific genomic DNA sequences from cells dying in an organism / I. Botezatu, O. Serdyuk, G. Potapova [et al.] // *Clin. Chem.* — 2000. — V.46. — P.1078.
410. Власов В.В. Взаимодействие олигонуклеотидов с белками сыворотки крови / В.В. Власов, Л.В. Паутова, Е.Ю. Рыкова, Л.А. Якубов // *Биохимия.* — 1993. — Т.58. — С.1247–1251.
411. Tiruppathi, 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.
412. Wang, J. Binding of serum albumin on tumor cells and characterization of the albumin binding protein / J. Wang, H. Ueno, T. Masuko, Y. Hashimoto // *J. Biochem. (Tokyo).* — 1994. — V.115(5). — P.898–903. doi: 10.1093/oxfordjournals.jbchem.a124437.
413. Tsoneva, D.K. Circulating histones to detect and monitor the progression of cancer / D.K. Tsoneva, M.N. Ivanov, N.V. Conev [et al.] // *Int. J. Mol. Sci.* — 2023. — V.24. — P.942.
414. Xu, J. Extracellular histones are major mediators of death in sepsis / J. Xu, X. Zhang, R. Pelayo [et al.] // *Nat. Med.* — 2009. — V.15. — P.1318–1321.
415. Tian, J. Toll-like receptor 9-dependent activation by DNA-containing immune complexes is mediated by HMGB1 and RAGE / J. Tian, A.M. Avalos, S. Mao [et al.] // *Nat. Immunol.* — 2007. — V.8. — P.487–496.
416. Scaffidi, P., Misteli, T., Bianchi, M.E. Release of chromatin protein HMGB1 by necrotic cells triggers inflammation // *Nature.* — 2002. — V.418. — P.191–195.
417. 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. — P.281–288.
418. Tanner, J.E. Nucleosomes activate NF-kappaB in endothelial cells for induction of the proangiogenic cytokine IL-8 // *Int. J. Cancer.* — 2004. — V.112. — P.155–160.
419. Bauden, M.P. Circulating nucleosomes as epigenetic biomarkers in pancreatic cancer / M.P. Bauden, D. Pamart, D. Ansari [et al.] // *Clin. Epigenet.* — 2015. — V.7. — P.106.
420. Rahier, J.-F. Circulating nucleosomes as new blood-based biomarkers for detection of colorectal cancer / J.-F. Rahier, A. Druez, L. Faugeras [et al.] // *Clin. Epigenet.* — 2017. — V.9. — P.53.

421. Ackerveken, P.V.D. A novel proteomics approach to epigenetic profiling of circulating nucleosomes / P.V.D. Ackerveken, A. Lobbens, J.-V. Turatsinze [et al.] // *Sci. Rep.* — 2021. — V.11. — P.7256.
422. Lin, Z. Value of circulating cell-free DNA analysis as a diagnostic tool for breast cancer: A meta-analysis / Z. Lin, J. Neiswender, B. Fang [et al.] // *Oncotarget.* — 2017. — V.8. — P.26625–26636. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.15775>.
423. Holdenrieder, S. DNA integrity in plasma and serum of patients with malignant and benign diseases / S. Holdenrieder, A. Burges, O. Reich, F.W. Spelsberg, P. Stieber // *Ann. N. Y. Acad. Sci.* — 2008. — V.1137. — P.162–170.
424. Грызунов Г.Е., Добрецов Ю.А. Альбумин сыворотки крови в клинической медицине. — М.: Ириус, 1994.
425. Kustanovich, A. Life and death of circulating cell—free DNA / A. Kustanovich, R. Schwartz, T. Peretz, A. Grinshpun // *Cancer Biol. Ther.* — 2019. — V.20(8). — P.1057–1067. <https://doi.org/10.1080/15384047.2019.1598759>.
426. Stephan, F. Cooperation of factor VII-activating protease and serum DNase I in the release of nucleosomes from necrotic cells / F. Stephan, G. Marsman, L.M. Bakker [et al.] // *Arthritis Rheumatol.* — 2014. — V.66(3). — P.686–693. doi:10.1002/art.38265.
427. Martin, M. Factor H uptake regulates intracellular C3 activation during apoptosis and decreases the inflammatory potential of nucleosomes / M. Martin, J. Leffler, K.I. Smolag [et al.] // *Cell Death Differ.* — 2016. — V.23(5). — P.903–911. doi:10.1038/cdd.2015.164.
428. Sacks, D. Multisociety consensus quality improvement revised consensus statement for endovascular therapy of acute ischemic stroke / D. Sacks, B. Baxter, B.C.V. Campbell // *Int. J. Stroke.* — 2018. — V.13(6). — P.612–632. doi: 10.1177/1747493018778713.
429. Liu, F. Dysopsonin activity of serum DNA-binding proteins favorable for gene delivery / F. Liu, A. Frick, X. Yuan, L. Huang // *J. Pharmacol. Exp. Ther.* — 2010. — V.332(2). — P.500–504. doi:10.1124/jpet.109.159541.
430. Jones, P. InterProScan 5: genome-scale protein function classification / P. Jones, D. Binns, H. Chang // *Bioinformatics.* — 2014. — V.30(9). — P.1236–1240. doi: 10.1093/bioinformatics/btu031.
431. Finn, R.D. InterPro in 2017 — beyond protein family and domain annotations / R.D. Finn, T.K. Attwood, P.C. Babbitt // *Nucleic Acids Res.* — 2017. — V.45(D1). — P.D190–D199. doi: 10.1093/nar/gkw1107.
432. Alanis-Lobato, G. HIPPIE v2.0: enhancing meaningfulness and reliability of protein–protein interaction networks / G. Alanis-Lobato, M.A. Andrade-Navarro, M.H. Schaefer // *Nucleic Acids Res.* — 2017. — V.45(D1). — P.D408–D414. <https://doi.org/10.1093/nar/gkw985>.

433. Shchegolev, Yu.Yu. Exosomes are involved in the intercellular transfer of rapamycin resistance in the breast cancer cells / Yu.Yu. Shchegolev, D.V. Sorokin, A.M. Scherbakov [et al.] // *BioImpacts*. — 2023. — V.13(4). — P.313–321. DOI: 10.34172/bi.2023.27490.
434. Danesh, A. Exosomes from red blood cell units bind to monocytes and induce proinflammatory cytokines, boosting T-cell responses in vitro / A. Danesh, H.C. Inglis, R.P. Jackman [et al.] // *Blood*. — 2014. — V.123(5). — P.687–696. doi: 10.1182/blood-2013-10-530469.
435. Minciacchi, 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.
436. Mamaeva, S.N. [Название не указано, вероятно, пропущено в источнике] / S.N. Mamaeva, I.V. Kononova, M. Ruzhansky [et al.] // *Int. J. Biomed.* — 2020. — V.10. — P.70–75. doi 10.21103/Article10(1)_OA12.
437. Nazarenko, I. Cell surface tetraspanin Tspan8 contributes to molecular pathways of exosome-induced endothelial cell activation / I. Nazarenko, S. Rana, A. Baumann [et al.] // *Cancer Res.* — 2010. — V.70(4). — P.1668–1678. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-09-2470.
438. Clayton, A. Adhesion and signaling by B cell-derived exosomes: the role of integrins / A. Clayton, A. Turkes, S. Dewitt [et al.] // *FASEB J.* — 2004. — V.18(9). — P.977–979.
439. Yunusova, N.V. Metalloproteinases at the surface of small extracellular vesicles in advanced ovarian cancer: Relationships with ascites volume and peritoneal canceromatosis index / N.V. Yunusova, M.R. Patysheva, S.V. Molchanov [et al.] // *Clin. Chim. Acta.* — 2019. — V.494. — P.116–122. doi 10.1016/j.cca.2019.03.1621.
440. Tamkovich, S. What information can be obtained from the tears of a patient with primary open angle glaucoma? / S. Tamkovich, A. Grigor'eva, A. Eremina [et al.] // *Clin. Chim. Acta.* — 2019. — V.495. — P.529–537. doi: 10.1016/j.cca.2019.05.028.
441. 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.
442. Hassuna, N. Strategies for targeting tetraspanin proteins: potential therapeutic applications in microbial infections / N. Hassuna, P.N. Monk, G.W. Moseley, L.J. Partridge // *BioDrugs*. — 2009. — V.23(6). — P.341–359. doi: 10.2165/11315650-000000000-00000.
443. Hoshino, A. Tumour exosome integrins determine organotropic metastasis / A. Hoshino, B. Costa-Silva, T.L. Shen [et al.] // *Nature*. — 2015. — V.527(7578). — P.329–335. doi: 10.1038/nature15756.

444. Kim, S.H., Baek, K.H. Regulation of cancer metabolism by deubiquitinating enzymes: the Warburg effect // *Int. J. Mol. Sci.* — 2021. — V.22(12). — P.6173.
445. Zou, T., Lin, Z. The involvement of ubiquitination machinery in cell cycle regulation and cancer progression // *Int. J. Mol. Sci.* — 2021. — V.22(11). — P.5754.
446. Shashova, E.E. Changes in the activity of proteasomes and calpains in metastases of human lung cancer and breast cancer / E.E. Shashova, E.S. Kolegova, A.A. Zav'yalov [et al.] // *Bull Exp Biol Med.* — 2017. — V.163(4). — P.486–489. doi: 10.1007/s10517-017-3834-7.
447. 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.
448. 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.
449. Raimondo, F. Advances in membranous vesicle and exosome proteomics improving biological understanding and biomarker discovery / F. Raimondo, L. Morosi, C. Chinello [et al.] // *Proteomics.* — 2011. — V.11. — P.709–720. doi: 10.1002/pmic.201000422.
450. Rosa-Fernandes, L. A perspective on extracellular vesicles proteomics / L. Rosa-Fernandes, V.B. Rocha, V.C. Carregari [et al.] // *Front. Chem.* — 2017. — V.5. — P.102. doi: 10.3389/fchem.2017.00102.
451. 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.
452. Cufaro, M.C. Extracellular vesicles and their potential use in monitoring cancer progression and therapy: the contribution of proteomics / M.C. Cufaro, D. Pieragostino, P. Lanuti [et al.] // *J. Oncol.* — 2019. — V.2019. — P.1639854. doi: 10.1155/2019/1639854.
453. Calzolari, A. TfR2 localizes in lipid raft domains and is released in exosomes to activate signal transduction along the MAPK pathway / A. Calzolari, C. Raggi, S. Deaglio [et al.] // *J. Cell. Sci.* — 2006. — V.119. — P.4486–4498.
454. 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.
455. Uhlen, M. Tissue-based map of the human proteome / M. Uhlen, L. Fagerberg, B.M. Hallstrom [et al.] // *Science.* — 2015. — V.347(6220). — P.1260419. DOI: 10.1126/science.1260419.
456. Uhlen, M. A pathology atlas of the human cancer transcriptome / M. Uhlen, C. Zhang, S. Lee [et al.] // *Science.* — 2017. — V.357. — P.eaan2507. doi: 10.1126/science.aan2507.

457. Pontén, F. The Human Protein Atlas as a proteomic resource for biomarker discovery / F. Pontén, J.M. Schwenk, A. Asplund, P.H. Edqvist // *J. Intern. Med.* — 2011. — V.270. — P.428–446. doi: 10.1111/j.1365-2796.2011.02427.x.
458. Kwon, C.H. Snail and serpinA1 promote tumor progression and predict prognosis in colorectal cancer / C.H. Kwon, H.J. Park, J.H. Choi [et al.] // *Oncotarget.* — 2015. — V.6(24). — P.20312–20326. doi: 10.18632/oncotarget.3964.
459. Ávalos-Navarro, G. Serum α 1-AT Levels and *SERPINA1* Molecular Analysis in Breast Cancer: An Experimental and Computational Study / G. Ávalos-Navarro, L.A. Bautista-Herrera, A.F. Garibaldi-Ríos [et al.] // *Diseases.* — 2024. — V.13(1). — P.1. doi: 10.3390/diseases13010001.
460. Qiao, E., Ye, J., Huang, K. An endoplasmic reticulum stress related signature for clinically predicting prognosis of breast cancer patients // *Hum Mol Genet.* — 2024. doi: 10.1093/hmg/ddae170.
461. Cilibrasi, C. Definition of an Inflammatory Biomarker Signature in Plasma-Derived Extracellular Vesicles of Glioblastoma Patients / C. Cilibrasi, T. Simon, M. Vintu [et al.] // *Biomedicines.* — 2022. — V.10(1). — P.125. doi: 10.3390/biomedicines10010125.
462. Livasy, C.A. Phenotypic evaluation of the basal-like subtype of invasive breast carcinoma / C.A. Livasy, G. Karaca, R. Nanda [et al.] // *Mod. Pathol.* — 2006. — V.19(2). — P.264–271. doi: 10.1038/modpathol.3800528.
463. Modi, A. In-Silico Analysis of Differentially Expressed Genes and Their Regulating microRNA Involved in Lymph Node Metastasis in Invasive Breast Carcinoma / A. Modi, P. Purohit, A. Gadwal [et al.] // *Cancer Invest.* — 2022. — V.40(1). — P.55–72. doi: 10.1080/07357907.2021.1969574.
464. Song, Q. Bladder cancer-derived exosomal KRT6B promotes invasion and metastasis by inducing EMT and regulating the immune microenvironment / Q. Song, H. Yu, Y. Cheng [et al.] // *J Transl Med.* — 2022. — V.20(1). — P.308. doi: 10.1186/s12967-022-03508-2.
465. Tang, H. miR-665 promotes the progression of gastric adenocarcinoma via elevating FAK activation through targeting SOCS3 and is negatively regulated by lncRNA MEG3 / H. Tang, Q. Long, K. Zhuang [et al.] // *J. Cell. Physiol.* — 2020. — V.235(5). — P.4709–4719. doi: 10.1002/jcp.29349.
466. Chu, Q. Prognostic significance of SOCS3 and its biological function in colorectal cancer / Q. Chu, D. Shen, L. He [et al.] // *Gene.* — 2017. — V.627. — P.114–122. doi: 10.1016/j.gene.2017.06.013.

467. Li, X. Unleashing Breast Cancer Progression: miR-455-5p's Targeting of SOCS3 Drives Proliferation, Migration, and Invasion / X. Li, B. Peng, J. Li [et al.] // *Protein Pept Lett.* — 2023. — V.30(12). — P.992–1000. doi: 10.2174/0109298665245603231106050224.
468. Ni, J. Tumor Cell-Derived Exosomal miR-191-5p Activates M2-Subtype Macrophages Through SOCS3 to Facilitate Breast Cancer / J. Ni, X. Xi, S. Xiao, X. Xiao // *Mol Biotechnol.* — 2024. — V.66(5). — P.1314–1325. doi: 10.1007/s12033-023-01034-0.
469. Tian, Z. IGF2R expression is associated with the chemotherapy response and prognosis of patients with advanced NSCLC / Z. Tian, G. Yao, H. Song [et al.] // *Cell. Physiol. Biochem.* — 2014. — V.34. — P.1578–1588. doi: 10.1159/000 366361.
470. Yin, S. A Novel Tumor-Associated Neutrophil-Related Risk Signature Based on Single-Cell and Bulk RNA-Sequencing Analyses Predicts the Prognosis and Immune Landscape of Breast Cancer / S. Yin, C. Li, Y. Zhang [et al.] // *J Cancer.* — 2024. — V.15(17). — P.5655–5671. doi: 10.7150/jca.100338.
471. Zhong, Y. Insulin-like growth factor 2 receptor is a key immune-related gene that is correlated with a poor prognosis in patients with triple-negative breast cancer: A bioinformatics analysis / Y. Zhong, X. Ren, X. Cao [et al.] // *Front Oncol.* — 2022. — V.12. — P.871786. doi: 10.3389/fonc.2022.871786.
472. Soudy, R. Breast cancer targeting peptide binds keratin 1: a new molecular marker for targeted drug delivery to breast cancer / R. Soudy, H. Etayash, K. Bahadorani [et al.] // *Mol. Pharm.* — 2017. — V.14(3). — P.593–604.
473. Zhou, Y. Human adipose-derived mesenchymal stem cells-derived exosomes encapsulated in pluronic F127 hydrogel promote wound healing and regeneration / Y. Zhou, X.L. Zhang, S.T. Lu [et al.] // *Stem Cell Res Ther.* — 2022. — V.13(1). — P.407. doi: 10.1186/s13287-022-02980-3.
474. Schulte, I. Structural analysis of the genome of breast cancer cell line ZR-75-30 identifies twelve expressed fusion genes / I. Schulte, E.M. Batty, J.C. Pole [et al.] // *BMC Genomics.* — 2012. — V.13. — P.719. doi: 10.1186/1471-2164-13-719.
475. Harris, D.A. Exosomes released from breast cancer carcinomas stimulate cell movement / D.A. Harris, S.H. Patel, M. Gucek [et al.] // *PLoS One.* — 2015. — V.10. — P.e0117495. doi: 10.1371/journal.pone.0117495.
476. Shtam, T. Plasma exosomes stimulate breast cancer metastasis through surface interactions and activation of FAK signaling / T. Shtam, S. Naryzhny, R. Samsonov [et al.] // *Breast Cancer Res. Treat.* — 2019. — V.174. — P.129–141.

477. Li, R. Exosome-mediated secretion of LOXL4 promotes hepatocellular carcinoma cell invasion and metastasis / R. Li, Y. Wang, X. Zhang [et al.] // *Mol. Cancer*. — 2019. — V.18(1). — P.18. doi: 10.1186/s12943-019-0948-8.
478. Li, Z. Exosomal leucine-rich-alpha2-glycoprotein 1 derived from non-small-cell lung cancer cells promotes angiogenesis via TGF- β signal pathway / Z. Li, C. Zeng, Q. Nong [et al.] // *Mol. Ther. Oncolytics*. — 2019. — V.14. — P.313–322. doi: 10.1016/j.omto.2019.08.001.
479. 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.
480. Jeppesen, D.K. Reassessment of Exosome Composition / D.K. Jeppesen, A.M. Fenix, J.L. Franklin [et al.] // *Cell*. — 2019. — V.177(2). — P.428–445. doi:10.1016/j.cell.2019.02.029.
481. Kalavska, K. Prognostic value of various subtypes of extracellular DNA in ovarian cancer patients / K. Kalavska, T. Minarik, B. Vlkova [et al.] // *J. Ovarian Res.* — 2018. — V.11(1). — P.85. doi: 10.1186/s13048-018-0459-z.
482. Zhang, W. Proteomics profiling of plasma exosomes in epithelial ovarian cancer: A potential role in the coagulation cascade, diagnosis and prognosis / W. Zhang, X. Ou, X. Wu // *Int. J. Oncol.* — 2019. — V.54(5). — P.1719–1733. doi: 10.3892/ijo.2019.4742.
483. 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.
484. Zheng, J. AIM2 inhibits the proliferation, invasion and migration, and promotes the apoptosis of osteosarcoma cells by inactivating the PI3K/AKT/mTOR signaling pathway / J. Zheng, C. Liu, J. Shi [et al.] // *Mol. Med. Rep.* — 2022. — V.2592. — P.53. doi: 10.3892/mmr.2021.12569.
485. Corona, R.I. Non-coding somatic mutations converge on the PAX8 pathway in ovarian cancer / R.I. Corona, J.H. Seo, X. Lin [et al.] // *Nat. Commun.* — 2020. — V.11(1). — P.2020. doi: 10.1038/s41467-020-15951-0.
486. Yang, M. Methylation-induced silencing of ALDH2 facilitates lung adenocarcinoma bone metastasis by activating the MAPK pathway / M. Yang, A. Wang, C. Li [et al.] // *Front. Oncol.* — 2020. — V.10. — P.1141. doi: 10.3389/fonc.2020.01141.
487. Du, C. The adipogenic transcriptional cofactor ZNF638 interacts with splicing regulators and influences alternative splicing / C. Du, X. Ma, S. Meruvu [et al.] // *J. Lipid Res.* — 2014. — V.55(9). — P.1886–1896. doi: 10.1194/jlr.M047555.

488. Engels, K. Up-regulation of thymidine phosphorylase expression is associated with a discrete pattern of angiogenesis in ductal carcinomas in situ of the breast / K. Engels, S.B. Fox, R.M. Whitehouse [et al.] // *J Pathol.* — 1997. — V.182(4). — P.414–420.
489. Cho, J.A. Exosomes from breast cancer cells can convert adipose tissue derived mesenchymal stem cells into myofibroblast-like cells / J.A. Cho, H. Park, E.H. Lim, K.W. Le // *INTERNATIONAL JOURNAL OF ONCOLOGY.* — 2012. — V.40. — P.130–138.
490. 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.
491. Hood, J.L. Paracrine induction of endothelium by tumor exosomes / J.L. Hood, H. Pan, G.M. Lanza [et al.] // *Lab Invest.* — 2009. — V.89(11). — P.1317–1328. doi: 10.1038/labinvest.2009.94.
492. Zhang, L. The 786-0 renal cancer cell-derived exosomes promote angiogenesis by downregulating the expression of hepatocyte cell adhesion molecule / L. Zhang, X. Wu, C. Luo [et al.] // *Mol Med Rep.* — 2013. — V.8, № 1. — P. 272–276.
493. Lee, J.K. Exosomes derived from mesenchymal stem cells suppress angiogenesis by down-regulating VEGF expression in breast cancer cells / J.K. Lee, S.R. Park, B.K. Jung [et al.] // *PLoS One.* — 2013. — V.8(12).
494. Ma, S.R. Red Blood Cell-Derived Extracellular Vesicles: An Overview of Current Research Progress, Challenges, and Opportunities / S.R. Ma, H.F. Xia, P. Gong, Z.L. Yu // *Biomedicines.* — 2023. — V.11(10). — P.2798. doi: 10.3390/biomedicines11102798.
495. Soule, H.D. Isolation and characterization of a spontaneously immortalized human breast epithelial cell line MCF-10 / H.D. Soule, T.M. Maloney, S.R. Wolman [et al.] // *Cancer Res.* — 1990. — V.50. — P.6075–6086.
496. Arora, H. miR-506 regulates epithelial mesenchymal transition in breast cancer cell lines / H. Arora, R. Qureshi, W.Y. Park // *PLoS One.* — 2013. — V.8(5). — P.e64273. doi: 10.1371/journal.pone.0064273.
497. Almendros, I. Tumor cell malignant properties are enhanced by circulating exosomes in sleep apnea / I. Almendros, A. Khalyfa, W. Trzepizur [et al.] // *Chest.* — 2016. — V.150(5). — P.1030–1041. doi: 10.1016/j.chest.2016.08.1438.
498. Khalyfa, A. Circulating exosomes potentiate tumor malignant properties in a mouse model of chronic sleep fragmentation / A. Khalyfa, I. Almendros, A. Gileles-Hillel [et al.] // *Oncotarget.* — 2016. — V.7(34). — P.54676–54690. doi: 10.18632/oncotarget.10578.

499. Starinsky, V.V., Shakhzadova, A.O., Kaprin, A.D. Malignant neoplasms in Russia in 2020 (morbidity and mortality). P.A. Herzen Moscow Oncology Research Institute. — 2021. — 252 p. (in Russian).
500. Шахзадова А.О., Старинский В.В., Лисичникова И.В. Состояние онкологической помощи населению России в 2022 году // Сибирский онкологический журнал. — 2023. — Т.22. — С.5–13. doi: 10.21294/1814-4861-2023-22-5-5-13.
501. Shakhzadova, A.O., Starinsky, V.V., Lisichnikova, I.V. Status of cancer care in Russia in 2022 // Siberian Oncol J. — 2023. — V.22. — P.5-13. doi: 10.21294/1814-4861-2023-22-5-5-13. (in Russian)
502. Алиева Г.С. Комплексная лучевая диагностика раннего рака молочной железы (обзор литературы) / Г.С. Алиева, Г.П. Корженкова, И.В. Колядина // Современная онкология. — 2019. — Т.21 (3). — С.26–32.
503. Johnson, K.S., Conant, E.F., Soo, M.S. Molecular Subtypes of Breast Cancer: A Review for Breast Radiologists // Journal of Breast Imaging. — 2021. — V.3. — P.12–24.
504. Игнатьева В.И. Социально-экономическое бремя рака молочной железы в РФ / В.И. Игнатьева, О.П. Грецова, М.Б. Сткнина [и др.] // Медицинские технологии. — 2016. — Т.4. — С. 32–49.
505. Winters, S. Breast Cancer Epidemiology, Prevention, and Screening / S. Winters, C. Martin, D. Murphy [et al.] // Prog Mol Biol Transl Sci. — 2017. — V.151. — P.1–32. doi: 10.1016/bs.pmbts.2017.07.002.
506. Alimirzaie, S. Liquid biopsy in breast cancer: A comprehensive review / S. Alimirzaie, M. Bagherzadeh, M.R. Akbari // Clin Genet. — 2019. — V.95. — P.643–660. doi: 10.1111/cge.13514.
507. Ye, Q. Liquid biopsy in hepatocellular carcinoma: circulating tumor cells and circulating tumor DNA / Q. Ye, S. Ling, S. Zheng, X. Xu // Mol Cancer. — 2019. — V.18. — P.114. doi: 10.1186/s12943-019-1043-x.
508. Tay, T.K.Y., Tan, P.H. Liquid Biopsy in Breast Cancer: A Focused Review // Arch Pathol Lab Med. — 2020. — V.145. — P.678–686. doi: 10.5858/arpa.2019-0559-RA.
509. Aakel, N. Role of Exosome in Solid Cancer Progression and Its Potential Therapeutics in Cancer Treatment / N. Aakel, R. Mohammed, A. Fathima [et al.] // Cancer Med. — 2025. — V.14. — P.e70941. doi: 10.1002/cam4.70941.
510. Uttam, V. Circulating long non-coding RNA EWSAT1 acts as a liquid biopsy marker for esophageal squamous cell carcinoma: A pilot study / V. Uttam, M.K. Rana, U. Sharma [et al.] // Noncoding RNA Res. — 2024. — V.9. — P.1–11. doi: 10.1016/j.ncrna.2023.10.009.

511. Kabzinski, J., Kucharska-Lusina, A., Majsterek, I. RNA-Based Liquid Biopsy in Head and Neck Cancer // *Cells*. — 2023. — V.12. — P.1916. doi: 10.3390/cells12141916.
512. Khodyrev, D. Methylation of promoter region of RAR- β gene in renal cell, breast, and ovarian carcinomas / D. Khodyrev, V. Loginov, I. Pronina [et al.] // *Russ. J. Genet.* — 2008. — V.44. — P.983–988.
513. Mirza, S. Clinical significance of Stratifin, ER α and PR promoter methylation in tumor and serum DNA in Indian breast cancer patients / S. Mirza, G. Sharma, R. Parshad [et al.] // *Clin. Biochem.* — 2010. — V.43. — P.380–386.
514. Koumangoye, R.B. Detachment of breast tumor cells induces rapid secretion of exosomes which subsequently mediate cellular adhesion and spreading / R.B. Koumangoye, A.M. Sakwe, J.S. Goodwin [et al.] // *PLoS One*. — 2011. — V.6(9). — P.e24234. doi: 10.1371/journal.pone.0024234.
515. Mamaeva, S.N. Using scanning electron microscopy and atomic force microscopy to study the formation of nanoparticles on red blood cell surface in cervical cancer patients / S.N. Mamaeva, I.V. Kononova, M. Ruzhansky [и др.] // *Int. J. Biomedicine*. — 2020. — V.10(1). — P.70–75.
516. Leech, A.O. Cleavage of the extracellular domain of junctional adhesion molecule-A is associated with resistance to anti-HER2 therapies in breast cancer settings / A.O. Leech, S.H. Vellanki, E.J. Rutherford [et al.] // *Breast Cancer Res.* — 2018. — V.20(1). — P.140. doi: 10.1186/s13058-018-1064-1.
517. Miller, M.A. ADAM-10 and -17 regulate endometriotic cell migration via concerted ligand and receptor shedding feedback on kinase signaling / M.A. Miller, A.S. Meyer, M.T. Beste [et al.] // *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*. — 2013. — V.110(22). — P.E2074-83. doi: 10.1073/pnas.1222387110.
518. Lee, S.B. ADAM10 is upregulated in melanoma metastasis compared with primary melanoma / S.B. Lee, A. Schramme, K. Doberstein [et al.] // *J. Invest. Dermatol.* — 2010. — V.130(3). — P.763–773. doi: 10.1038/jid.2009.335.
519. Chen, Y. Protein content and functional characteristics of serum-purified exosomes from patients with colorectal cancer revealed by quantitative proteomics / Y. Chen, Y. Xie, L. Xu [et al.] // *Int. J. Cancer*. — 2017. — V.140. — P.900–913. doi: 10.1002/ijc.30496.

ПРИЛОЖЕНИЯ

Приложение 1

Акт о внедрении

«УТВЕРЖДАЮ»
ректор НГУ
академик РАН, д.ф.-м.н.,
проф. М.П. Федорук



2025 г.

АКТ

внедрения в учебный процесс Федерального государственного автономного образовательного учреждения высшего образования «Новосибирский национальный исследовательский государственный университет» результатов диссертационной работы Тамкович С.Н. «Дезоксирибонуклеопротеиновые комплексы и экзосомы при раке молочной железы: диагностический потенциал и биологическая роль», представленной на соискание ученой степени доктора биологических наук по специальностям 3.1.6 – онкология, лучевая терапия, 1.5.4 – биохимия.

Мы, нижеподписавшиеся, комиссия в составе: председатель – и.о. директора ИММТ НГУ, д.м.н., проф. Ю. Г. Самойлова и ее члены – зав. кафедрой клинической биохимии ИММТ д.б.н., проф. Гуляева Л.Ф., д.б.н., доцент Пустыльняк В.О. и к.х.н. Бабайлова Е.С. удостоверяем, что разработанные положения докторской диссертации Тамкович С.Н. используются в настоящее время в рамках курса «Биохимия патологических состояний» ИММТ НГУ. В частности, в курс включены данные по перспективности жидкостной биопсии онкологических заболеваний на основе внеклеточных нуклеиновых кислот и экзосом.

Председатель:

и.о. директора ИММТ НГУ, д.м.н., проф. Ю. Г. Самойлова

Члены комиссии:

д.б.н., проф. Л. Ф. Гуляева

д.б.н., доцент В. О. Пустыльняк

к.х.н. Е. С. Бабайлова

Информированное согласие

**ИНФОРМИРОВАННОЕ СОГЛАСИЕ
пациента на участие в научном исследовании**

Ответственные организации: Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН и Новосибирский областной онкологический диспансер

Тема: Поиск циркулирующих в крови эпигенетических маркеров рака молочной железы.

Цель исследования: Целью данного проекта является идентификация эпигенетических маркеров в составе циркулирующих ДНК крови, которые могут быть использованы для ранней неинвазивной диагностики злокачественных новообразований молочной железы и мониторинга противоопухолевой терапии.

Методы исследования: клинический осмотр, сбор анамнеза, постановка клинических и морфологических диагнозов, выделение внеклеточной ДНК из приготовленных образцов плазмы и элюатов с поверхности клеток крови, химическая конверсия и амплификация ДНК.

Проводимое (Ф. И. О. исследователя) Тамкович Светланой Николаевной

Я, _____

(Ф. И. О. заполняется собственноручно пациентом)

настоящим даю согласие на участие в исследовании добровольно.

Я был осведомлен о следующем:

- проводимое исследование носит научный характер,
- о целях данного исследования,
- о методике проведения данного исследования, длительности участия, медицинских процедурах, дополнительных анализах,
- о потенциальной пользе и риске, а также возможном дискомфорте, который может принести участие в исследовании.

Мною в письменном виде была получена вышеназванная информация и ответы на все интересующие меня вопросы.

Мною были получены гарантии того, что я имею право прекратить участие в исследовании в любое время и мой выход из исследования никак не повлияет на мое дальнейшее медицинское обслуживание.

Я даю согласие на просмотр моей медицинской карты сотрудниками, задействованными в исследовании, при условии сохранения ими профессиональной конфиденциальности.

Я даю согласие на то, чтобы данные обо мне были занесены в компьютерный файл, обеспечивающий гарантию защиты лицами, определенными законодательством. Я имею право обращаться к этим данным и при необходимости исправлять их через выбранного мною врача.

Дата _____

Ф. И. О. испытуемого _____

Подпись пациента _____

Сведения о пациенте (контактная информация)

Информированное согласие

III. Информированное согласие

Я,

согласен принять участие в исследовании «Протеом циркулирующих в крови нуклеопротеиновых комплексов: поиск опухолевых маркеров и исследование роли в диссеминации рака молочной железы на молекулярном уровне» в качестве исследуемого (участника). Я согласен на осмотр и сбор крови из вены.

Я получил(а) подробные разъяснения от исследователя

о характере и цели исследования, в том числе, об отсутствии материального вознаграждения и получения какой-либо иной выгоды от участия в исследовании. Мне была предоставлена возможность задавать ему вопросы, затрагивающие все аспекты данного исследования. Я осведомлен, что при возникновении у меня в дальнейшем любых вопросов, я могу обращаться к любому члену исследовательской группы в любое время. Мое решение является добровольным.

После внимательного рассмотрения я даю согласие на сотрудничество с исследователем и, при необходимости, со всеми лицами из его группы.

Мне известно, что в любое время я могу прекратить участие в исследовании по собственному желанию, о чем мне следует незамедлительно проинформировать любого члена исследовательской группы. Мне также известно, что мое исследование может быть прекращено по решению врача, если это, по его мнению, в наибольшей степени отвечает моим интересам. Для разъяснения своих прав я также могу обращаться в Этический комитет НГУ по тел..

Информация обо мне никогда не будет разглашена, а полученные в ходе исследования данные останутся конфиденциальными. Я согласен с тем, что не буду стремиться ограничивать использование результатов исследования.

Дата, подпись и расшифровка (исследователь)
расшифровка (участник)

Дата, подпись и

« ____ » _____ 2023г
_____ 2023г

« ____ »

Информированное согласие

III. Информированное согласие

Я,

согласен принять участие в исследовании «Комплексный анализ микроРНК и белков экзосом: поиск биомаркеров для выявления рака молочной железы методом «жидкостной биопсии» и исследование роли в диссеминации опухоли на молекулярном уровне» в качестве исследуемого (участника). Я согласен на осмотр и сбор крови из вены.

Я получил(а) подробные разъяснения от исследователя

о характере и цели исследования, в том числе, об отсутствии материального вознаграждения и получения какой-либо иной выгоды от участия в исследовании. Мне была предоставлена возможность задавать ему вопросы, затрагивающие все аспекты данного исследования. Я осведомлен, что при возникновении у меня в дальнейшем любых вопросов, я могу обращаться к любому члену исследовательской группы в любое время. Мое решение является добровольным.

После внимательного рассмотрения я даю согласие на сотрудничество с исследователем и, при необходимости, со всеми лицами из его группы.

Мне известно, что в любое время я могу прекратить участие в исследовании по собственному желанию, о чем мне следует незамедлительно проинформировать любого члена исследовательской группы. Мне также известно, что мое исследование может быть прекращено по решению врача, если это, по его мнению, в наибольшей степени отвечает моим интересам. Для разъяснения своих прав я также могу обращаться в Этический комитет ИХБФМ СО РАН по тел.

Информация обо мне никогда не будет разглашена, а полученные в ходе исследования данные останутся конфиденциальными. Я согласен с тем, что не буду стремиться ограничивать использование результатов исследования.

Дата, подпись и расшифровка (исследователь) Дата, подпись и расшифровка

(участник)

« ____ » _____ 2024 г

« ____ » _____ 2024 г

_____/_____

_____/_____

Белки НПК крови условно ЗДЖ*

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-acetylneuraminate-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	ZN645	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

UniprotID	Название белка	Gene Name	Score
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

UniprotID	Название белка	Gene Name	Score
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
Q6NWX9	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

UniprotID	Название белка	Gene Name	Score
Q96CM3	RNA pseudouridylate synthase domain-containing protein 4	RPUSD4	58
Q9Y324	rRNA-processing protein FCF1 homolog	FCF1	64
Q2I0M5	R-spondin-4	RSP04	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

UniprotID	Название белка	Gene Name	Score
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
Приложение - *универсальные белки выделены курсивом.			

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	Archaeometzincin-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

UniprotID	Название белка	Gene Name	Score
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

UniprotID	Название белка	Gene Name	Score
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

UniprotID	Название белка	Gene Name	Score
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

UniprotID	Название белка	Gene Name	Score
Q96N20	Zinc finger protein 75A	ZNF75A	68
P51815	Zinc finger protein 75D	ZNF75D	57
Q9UPG8	Zinc finger protein PLAGL2	PLAGL2	61
Примечание - *универсальные белки выделены курсивом.			

[illegible]

Белки и предсказанная для них классификация InterPro и категории GO в составе ДНПК
крови условно ЗДЖ

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

Protein	InterPro classification	GO (Biological Process)	GO (Molecular Function)	GO (Cellular Component)
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

Protein	InterPro classification	GO (Biological Process)	GO (Molecular Function)	GO (Cellular Component)
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

Protein	InterPro classification	GO (Biological Process)	GO (Molecular Function)	GO (Cellular Component)
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

Protein	InterPro classification	GO (Biological Process)	GO (Molecular Function)	GO (Cellular Component)
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

Protein	InterPro classification	GO (Biological Process)	GO (Molecular Function)	GO (Cellular Component)
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

Protein	InterPro classification	GO (Biological Process)	GO (Molecular Function)	GO (Cellular Component)
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

Protein	InterPro classification	GO (Biological Process)	GO (Molecular Function)	GO (Cellular Component)
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

Protein	InterPro classification	GO (Biological Process)	GO (Molecular Function)	GO (Cellular Component)
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

Protein	InterPro classification	GO (Biological Process)	GO (Molecular Function)	GO (Cellular Component)
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
Q2I0M5.2	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; IPR017907	None predicted	GO:0005515 protein binding; GO:0008270 zinc ion binding	GO:0005622 intracellular
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

Protein	InterPro classification	GO (Biological Process)	GO (Molecular Function)	GO (Cellular Component)
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

Protein	InterPro classification	GO (Biological Process)	GO (Molecular Function)	GO (Cellular Component)
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; IPR025891	None predicted	None predicted	None predicted
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

Protein	InterPro classification	GO (Biological Process)	GO (Molecular Function)	GO (Cellular Component)
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

Protein	InterPro classification	GO (Biological Process)	GO (Molecular Function)	GO (Cellular Component)
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

Protein	InterPro classification	GO (Biological Process)	GO (Molecular Function)	GO (Cellular Component)
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

Protein	InterPro classification	GO (Biological Process)	GO (Molecular Function)	GO (Cellular Component)
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

Protein	InterPro classification	GO (Biological Process)	GO (Molecular Function)	GO (Cellular Component)
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

Protein	InterPro classification	GO (Biological Process)	GO (Molecular Function)	GO (Cellular Component)
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

Белки и предсказанная для них классификация InterPro и категории GO в составе ДНПК
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

Protein	InterPro classification	GO (Biological Process)	GO (Molecular Function)	GO (Cellular Component)
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

Protein	InterPro classification	GO (Biological Process)	GO (Molecular Function)	GO (Cellular Component)
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

Protein	InterPro classification	GO (Biological Process)	GO (Molecular Function)	GO (Cellular Component)
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

Protein	InterPro classification	GO (Biological Process)	GO (Molecular Function)	GO (Cellular Component)
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

Protein	InterPro classification	GO (Biological Process)	GO (Molecular Function)	GO (Cellular Component)
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 ⁺) 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 activity	GO:0016020 membrane; GO:0016021 integral component of membrane
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

Protein	InterPro classification	GO (Biological Process)	GO (Molecular Function)	GO (Cellular Component)
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

Protein	InterPro classification	GO (Biological Process)	GO (Molecular Function)	GO (Cellular Component)
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

Protein	InterPro classification	GO (Biological Process)	GO (Molecular Function)	GO (Cellular Component)
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

Protein	InterPro classification	GO (Biological Process)	GO (Molecular Function)	GO (Cellular Component)
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

Protein	InterPro classification	GO (Biological Process)	GO (Molecular Function)	GO (Cellular Component)
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

Protein	InterPro classification	GO (Biological Process)	GO (Molecular Function)	GO (Cellular Component)
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

Protein	InterPro classification	GO (Biological Process)	GO (Molecular Function)	GO (Cellular Component)
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 development	None predicted	None predicted

Protein	InterPro classification	GO (Biological Process)	GO (Molecular Function)	GO (Cellular Component)
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

Protein	InterPro classification	GO (Biological Process)	GO (Molecular Function)	GO (Cellular Component)
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 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
Q9Y2B1.1	IPR004263	None predicted	None predicted	None predicted

Protein	InterPro classification	GO (Biological Process)	GO (Molecular Function)	GO (Cellular Component)
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

Сводный список категорий GO «Клеточные компоненты» по результатам анализа
функционального обогащения белков ДНПК крови Здж 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	-

Категории GO «Клеточные компоненты»	Условно ЗЖ	Больные РМЖ
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

Сводный список категорий GO «Молекулярные функции» по результатам анализа функционального обогащения белков ДНПК крови ЗдЖ 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 ⁺) activity	1	1

Категории GO «Молекулярные функции»	Условно ЗЖ	Больные РМЖ
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

Категории GO «Молекулярные функции»	Условно ЗЖ	Больные РМЖ
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

Категории GO «Молекулярные функции»	Условно ЗЖ	Больные РМЖ
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

Сводный список категорий GO «Биологические процессы» по результатам анализа функционального обогащения белков ДНПК крови Здж 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

Категории GO «Биологические процессы»	Условно ЗЖ	Больные РМЖ
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	-

Категории GO «Биологические процессы»	Условно ЗЖ	Больные РМЖ
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

Белки, для которых классификация категорий по базам данных InterPro и GO не была
проведена*

Белок	Ген (Gene ID)	Условно ЗЖ	Больные РМЖ	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
Примечание - * Код белка в соответствии с UniProtKB/Swiss-Prot.				

Белки, в составе ДНПК, вовлеченные в канцерогенез*

женщины	ДНПК	ЭМП	пролиферация	инвазия	миграция	ангиогенез	иммунный надзор
Больные РМЖ	ДНК-связывающие белки	LMCD1 UNCX	CDX2 CHST7 EGR4 ENOX2 LMCD1 PLAGL2 THAP7 U2AF1 UNCX	JUND POU5F1B	HAND1 JUND PLAGL2 POU5F1B	-	IRF2
	Белки-«пассажиры»	FZD2 LCE3D SEC61G	ANO5 ATE1 BIRC5 CATSPER1 CSNK1G1 DGKI DPPA2 GNA14 LPL ME1 MED19 MRPL35 MYO1C NDN NUMB RANBP1 RNF167 RPL5 SEC61G SMARCD3 SNRPD1 TRAM1 TRIP13 TRPC1 TTC9 TUSC3	CASP1 CCDC134 CSNK1G1 DPPA2 FZD7 HECTD3 MCUR1 ME1 MMP28 MYL9 MYL9 RALA SEC61G STARD13 STK32A STRN3 TRIP13 TRPC1 TTC9 TUSC3	ATE1 CASP1 CERCAM CSNK1G1 DPPA2 FZD2 FZD7 HECTD3 MCUR1 ME1 MMP28 MYL9 NAIF1 NUMB PRPH2 RALA RPL5 RSU1 SEC61G SLC4A5 STARD13 STK32A STRN3 TACR3 TRIP13 TRPC1 TTC9 TUSC3	GUCY1A1 KRIT1 MYL9 SZRD1 USP12 VEGFA	ADRB1 APBB1IP APOL3 ATE1 CASP1 CCDC13 4 DGKI HECTD3 LPL MAP3K1 4 ME1 SLC13A 4 SPG7 TRIP13 WASL

ЗДЖ	ДНК-связывающие белки	-	EIF5 FBXL19 HOXB4 KLF10 SRSF5 U2AF1	EIF5 FBXL19 HOXA13 JUND SRSF5	EIF5 ESRP1 HOXA13 JUND MKRN2 SRSF5	-	AIRE
	Белки-«пассажиры»	SERPINH 1	ACOT11 ARHGAP30 ARHGEF9 CCDC34 CCNE2 CTPS1 DNAJB6 DPPA2 FKBP11 GAL3ST1 HAT1 LMNB2 MAP3K5 MAPKAPK2 MT2A PRR12 PSMD7 RABL6 RPS6KB1 SCUBE3 SHMT1 SNRPD1 TCP1 TRAF3 TRAM1 UFC1 VPS53	ACOT11 CHAF1A DPPA2 HS2ST1 MCUR1 MYL9 PSMD7 RALA SEC62 STK32A STRN3	ACOT11 CCDC34 CTPS1 DPPA2 HS2ST1 MCUR1 MX2 MYL9 OLFM1 RABL6 RALA RPS6KB1 SEC62 SERPINH1 SHMT1 SLC4A5 STK32A STRN3	CYP4Z2P GUCY1A1 KRIT1 MYL9 SZRD1	ADRB1 APBB1IP CLEC1B CTSG MAP3K1 4 PASD1 SERPINH 1 SPG7

Примечание -*Белки-ингибиторы прцессов отмечены жирным шрифтом.

Белки экзосом плазмы крови ЗдЖ

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

Uniprot ID	Protein	Gene Name
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
A0A1B0GU7 1	Uncharacterized protein CFAP97D2	CFAP97D 2
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

Белки экзосом крови Здж

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

Uniprot	Protein	Gene Name
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 DNM1P46	DNM1P46
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

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

Uniprot	Protein	Gene Name
Q9UKW4	Guanine nucleotide exchange factor VAV3	VAV3
P00738	Haptoglobin	HP
P69905	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	Periphrin-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
Q14966	Zinc finger protein 638	ZNF638

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
P69905	Haptoglobin alpha chain	
P00739	Haptoglobin-related protein	HPR
Q15477	Helicase SKI2W	SKI2L
P09601	Heme oxygenase 1	HMOX1

Uniprot	Protein	Gene Name
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	RABGAP1 L
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

Uniprot	Protein	Gene Name
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

Универсальные белки экзосом, идентифицированные в крови ЗДЖ 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