

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

Автореферат

диссертации на соискание учёной степени

доктора биологических наук

Томск – 2026

Работа выполнена в Федеральном государственном бюджетном учреждении науки Институте химической биологии и фундаментальной медицины Сибирского отделения Российской академии наук

Научные консультанты: доктор биологических наук, профессор, академик РАН
Ткачук Всеволод Арсеньевич

доктор медицинских наук, профессор РАН
Чернышова Алёна Леонидовна

Официальные оппоненты:

Красильников Михаил Александрович доктор биологических наук, профессор, Федеральное государственное бюджетное учреждение «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии имени Н.Н. Блохина» Министерства здравоохранения Российской Федерации, отдел экспериментальной биологии опухолей, заведующий

Малек Анастасия Валерьевна доктор медицинских наук, Федеральное государственное бюджетное учреждение «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии имени Н.Н. Петрова» Министерства здравоохранения Российской Федерации, научная лаборатория субклеточных технологий с группой онкоэндокринологии, заведующий

Нарыжный Станислав Николаевич доктор биологических наук, Федеральное государственное бюджетное учреждение «Петербургский институт ядерной физики им. Б.П. Константинова Национального исследовательского центра «Курчатовский институт», Группа протеомики, руководитель

Ведущая организация: Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования Первый Московский государственный медицинский университет имени И.М. Сеченова Министерства здравоохранения Российской Федерации

Защита состоится «___» _____ 2026 г. в ___ часов на заседании диссертационного совета 24.1.215.06 на базе Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Томский национальный исследовательский медицинский центр Российской академии наук» по адресу: г. Томск, пер. Кооперативный, 5.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке и на сайте Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Томский национальный исследовательский медицинский центр Российской академии наук», адрес сайта: <http://tnimc.ru>

Автореферат разослан «___» _____ 2026 г.

Ученый секретарь диссертационного совета
доктор медицинских наук



А.А. Медведева

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность работы

На сегодняшний день злокачественные новообразования (ЗНО) 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 %) (*Bray F, 2024*).

Современная диагностика РМЖ основывается на комплексном подходе, включающем методы инструментальной визуализации и биопсии первичного опухолевого узла и регионарных лимфоузлов. Тем не менее, у 24 % больных РМЖ определяется на поздних стадиях заболевания, что существенно сказывается на прогнозе заболевания: на I стадии заболевания 5-летняя общая выживаемость составляет 98,6 %, при вовлечении регионарных лимфатических узлов — 84,9 %, при метастатической форме РМЖ — 25,9 % (*Пятницкий И, 2019; Каприн А, 2024*). Таким образом, выявление ЗНО 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 (*Hong H, 2025; Venkataraman J, 2025; Alum E, 2025*) и белков (*Chen Q, 2025*), а также биополимеров в составе внеклеточных везикул (ВВ), в том числе экзосом (*Нao X, 2025*) ведутся интенсивные исследования с целью повышения эффективности диагностики и прогноза течения ЗНО, а также оценки эффективности противоопухолевой терапии.

Во внеклеточной ДНК (внДНК) опухолевого происхождения (вноДНК) можно выявить аналогичные для ДНК злокачественной клетки точечные мутации, микросателлитную нестабильность, амплификации, делеции и эпигенетические изменения. Однако серьезным препятствием для внедрения «жидкостной биопсии» на основе внДНК в широкую практику является низкое содержание в крови онкологических больных целевых молекул — доля вноДНК не превышает 1 % от общего содержания внДНК (*Naik S, 2014*). 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) (*Holdenrieder S, 2009; Kononova I, 2022*). 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 (*Liang N, 2023*), защищающие нуклеиновую кислоту от гидролиза. Показано, что формирование ДНПК является необходимым условием для переноса функционально активной ДНК в клетки (*Mouliere F, 2012*) и, более того, может приводить к ее злокачественному перерождению (*Garcia-Olmo D, 1999*).

Помимо внДНК, входящей в состав ДНПК, важную роль в прогрессировании и метастазировании опухоли играют ВВ, такие как экзосомы. Характерными чертами экзосом являются их малый размер (30–150 нм), наличие поверхностных тетраспанинов CD9, CD63, CD81, а также белков, отражающих их эндосомальное происхождение — TSG-101 и Alix (*Kok V, 2020*). Как и в случае с внДНК, экзосомы секретируются всеми типами клеток и в норме циркулируют в крови в невысоких концентрациях (*Yunusova N, 2021*); при развитии ЗНО изменяется состав и увеличивается концентрация ВВ (*Lin B, 2022*). Более того, опухолевые экзосомы стимулируют такие канцерогенез-ассоциированные процессы, как эпителиально-мезенхимальный переход (ЭМП) (*Wang L, 2025*), ангиогенез (*Feng C, 2025*), клеточную пролиферацию (*Ye Y, 2025*) и миграцию (*Song X, 2025*). Биологическая активность экзосом обеспечивается специфическим сортированием белков и различных типов РНК по время созревания ВВ, и, как следствие, несмотря на сходство состава экзосом с секретирующими их клетками, они имеют уникальный молекулярный портрет (*Yanshina D, 2018*).

Таким образом, особенности распределения в крови ДНПК и экзосом, их биологическая активность и изменение состава при развитии ЗНО, 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 ввиду сложности как пробоподготовки, так и масс-спектрометрического анализа), что не позволяет идентифицировать ключевые белки, участвующие в межклеточной коммуникации, механизмах инвазии и метастазирования. 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

Циркулирующие опухолевые клетки (*Zhong H, 2025*), вноДНК (*Hong H, 2025*), различные типы опухоль-ассоциированных некодирующих РНК (*Karaca Dogan B, 2025; Alum E, 2025*) и экзосомы, содержащие РНК и белки раковых клеток (*Haо X, 2025*), в настоящее время рассматриваются как основа для разработки новых панелей для ранней дифференциальной диагностики ЗНО, выделения неблагоприятных прогностических групп и оценки эффективности терапии. 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. Необходимо отметить, что ожидания от тестов Epi proColon 2.0 и EpiroLung оказались завышенными, и в настоящее время существует потребность в их доработке для повышения чувствительности (*Zhang J, 2024; Guo Y, 2024*). Таким образом, разработка подходов для обогащения вноДНК является актуальной задачей молекулярной онкологии и позволит улучшить диагностику ЗНО, 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. Трудности данного исследования связаны с низкой концентрацией вноДНК и отсутствием доступных методов анализа.

Данных о белках, формирующих комплексы с вноДНК, в литературе крайне мало. 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 дальнейшей судьбе. Биологическая роль вноДНК также остается практически не исследованной, за исключением проканцерогенного потенциала вноДНК (*Garcia-Olmo D, 2011, 2012*).

Экзосомы выявлены во всех биологических жидкостях, причем при ЗНО изменяется их состав и статистически значимо возрастает их концентрация (*Huang S, 2022*). За биораспределение и связывание экзосом с клетками-мишенями или внеклеточным матриксом ответственны поверхностные рецепторы и лиганды экзосом (*Mathieu M, 2019*). Несмотря на лавинообразный рост числа публикаций в этой области, до сих пор не ясна биологическая роль

экзосом. В частности, какова роль и диагностическая значимость экзосом, ассоциированных с поверхностью ФЭ (Mamaeva S, 2020).

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-метирированной 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 ЗНО 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 внДНК и белковом составе ДНПК, а также морфологии и протеоме экзосом, циркулирующих в крови больных РМЖ. Комплексный анализ размера, природы концов внДНК и белков, формирующих ДНПК, показал, что как в норме, так и при патологии помимо процессов клеточной гибели, активная секреция также вносит вклад в появление внДНК в кровотоке. Полученные новые знания о размере, распределении внДНК между плазмой и ФЭ, а также ее индексе метилирования представляют значительную ценность для разработки новых методов направленного обогащения опухолевых нуклеиновых кислот крови. 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 [39], 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 внДНК 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 опухоль-ассоциированных белков в ДНПК и экзосомах крови пациенток.

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 перспективным источником aberrантно-метилованных маркеров является внДНК, ассоциированная с ФЭ крови, по сравнению с внДНК плазмы.
5. ВнДНК, ассоциированная с ФЭ 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 материалов диссертации

Результаты проведенного исследования и основные положения работы автором доложены и обсуждены на 52 международных и российских конференциях.

Публикации

По теме диссертации 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 РФ 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.

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.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Клиническая характеристика больных РМЖ

Образцы крови больных РМЖ получены из Новосибирского областного клинического онкологического диспансера ($T_{1-2}N_{0-1}M_0$, $n = 194$, возраст 27–74 года, таблица 1). *Критерии включения в группу больных РМЖ*: возраст старше 18 лет; размер ЗНО менее 5 см; отсутствуют признаки поражения метастазами регионарных лимфатических узлов либо выявлено поражение не более 3 подмышечных и/или внутригрудных лимфоузлов на стороне поражения; наличие подписанного информированного согласия.

Таблица 1 — Клиническая характеристика группы больных РМЖ

Клинико-морфологическая характеристика		РМЖ, n = абсолютное количество больных, (относительное, %)		
		Люминаль- ный, n = 165 (85 %)	Трижды- негатив- ный, 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 %)

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.

Образцы крови для контрольной группы получены из Медицинского научно-образовательного центра Института медицины и медицинских технологий Новосибирского государственного университета и Центра новых медицинских технологий ИХБФМ СО РАН. Группа Здж (n = 190, возраст 22–81 год) была сформирована на основе клинического обследования и анкетирования. *Критерии включения в контрольную группу:* возраст старше 18 лет; отсутствие заболеваний репродуктивной системы; отсутствие в анамнезе онкологических заболеваний; отсутствие экзогенных факторов; наличие подписанного информированного согласия. *Критерии исключения из контрольной группы:* возраст моложе 18 лет; наличие заболеваний репродуктивной системы организма; наличие онкологических заболеваний; наличие экзогенных факторов; отказ от подписания информированного согласия.

Работу проводили с соблюдением принципов добровольности и конфиденциальности в соответствии с Основами законодательства РФ об охране здоровья граждан. Работа одобрена локальным этическим комитетом ИХБФМ СО РАН (протокол №10 от 30.05.2018 г., протокол №16 от 30.06.2020, протокол №3 от 24.09.2024) и локальным этическим комитетом НГУ (протокол №2 от 01.03.2023).

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. Дизайн исследования ДНПК приведен на рисунке 1, дизайн исследования экзосом – на рисунке 2. Поскольку в экспериментах были использованы только образцы, хранившиеся менее года, для каждого этапа исследований создан новый банк образцов; для некоторых экспериментов в связи с низкой концентрацией исследуемых объектов в крови требовалось объединение образцов.

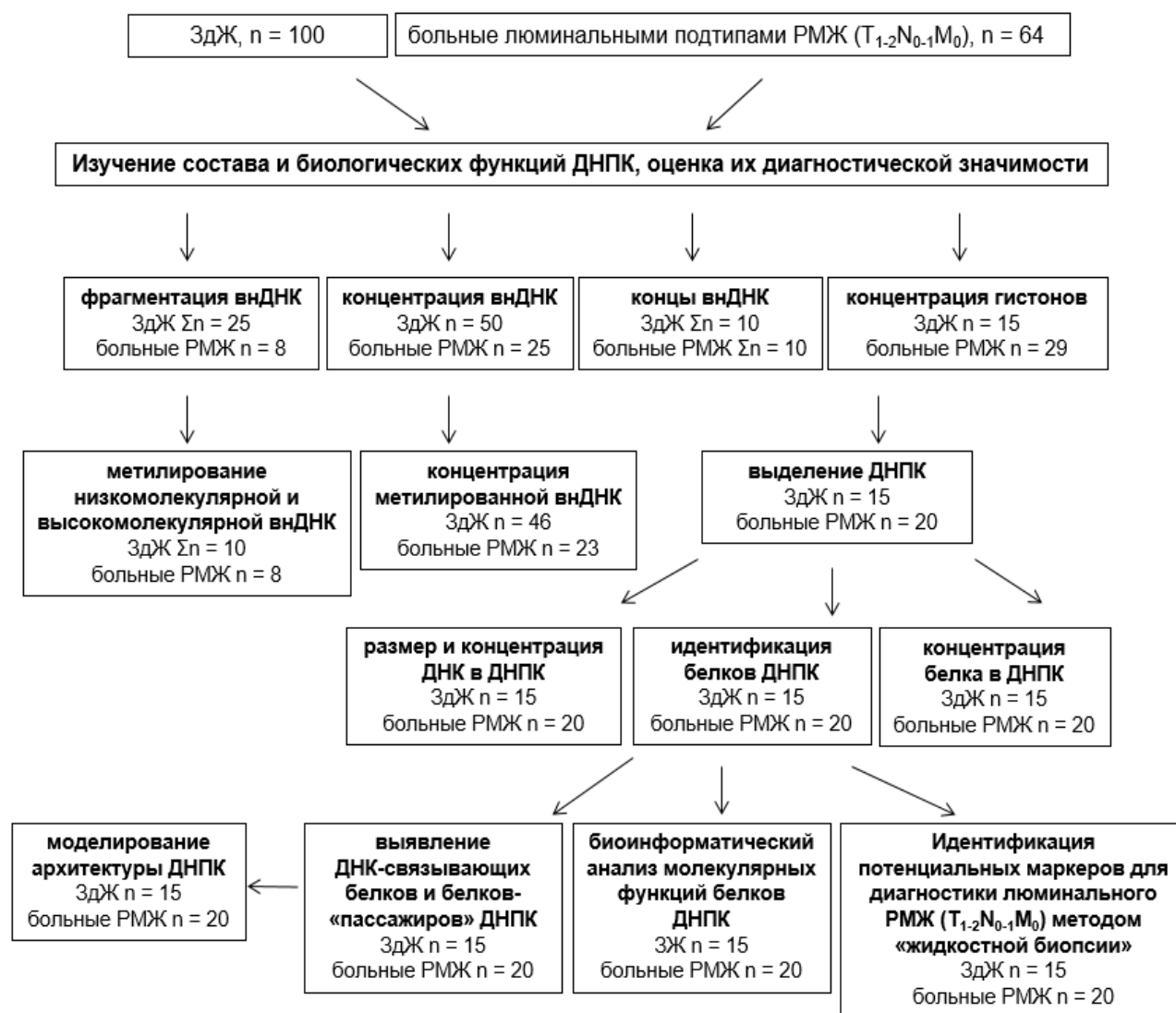


Рисунок 1 — Дизайн исследования циркулирующих в крови ДНПК в норме и при РМЖ. Объединенные образцы промаркированы символом Σ

Методы исследования

Кровь условно ЗдЖ (контрольная группа) и первичных больных РМЖ собирали венепункцией в пробирки, содержащие К₃ЭДТА и хранили при 4°C менее 1 ч. до дальнейшей обработки. После отделения плазмы, которая являлась источником вДНК и экзосом, для получения асс-ФЭ вДНК и экзосом проводили последовательную обработку ФЭ фосфатным буфером, содержащим 5 мМ ЭДТА (ФБ-ЭДТА элюат), затем 0,125 % раствором трипсина (трипсиновый элюат) (Laktionov P, 2004).

вДНК выделяли из образцов с помощью коммерческого набора «DNA Isolation Kit» (ООО «БиоСилика», Россия) и концентрировали осаждением в ацетоне в виде триэтиламмониевых солей. Концентрацию вДНК измеряли с помощью количественной ПЦР, специфичной для *LINE-1*. Для изучения концов вДНК, фосфорилированную ДНК лигировали с биотинилированными

двухцепочечными дезоксирибоолигонуклеотидными адаптерами, имеющими случайные 3'- и 5'-концы. Продукты лигирования выделяли с помощью стрептавидиновых сефарозных бусин, ДНК отделяли путем гидролиза адаптеров рестриктазой *Sau* IIIA, количество ДНК оценивали количественной ПЦР.

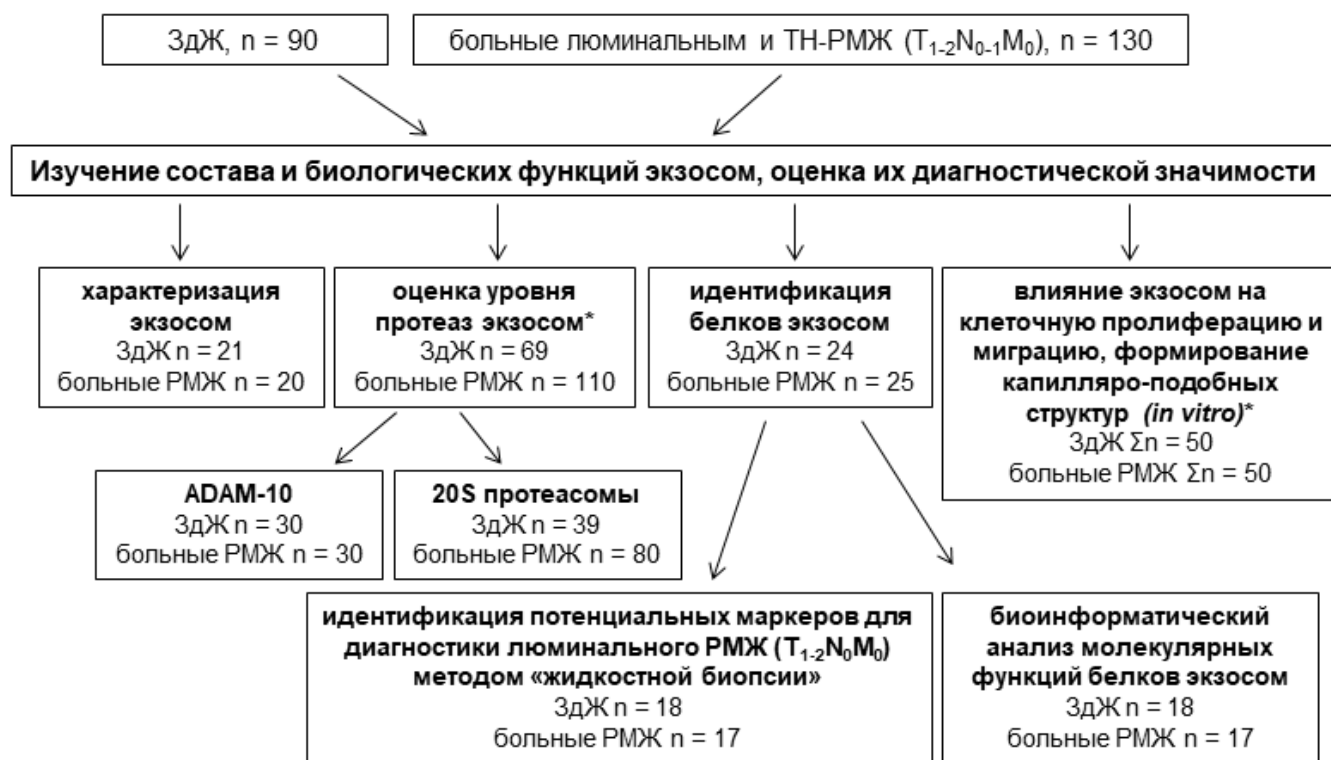


Рисунок 2 — Дизайн исследования экзосом в крови ЗдЖ и больных РМЖ.

Объединенные образцы экзосом промаркированы символом Σ, образцы экзосом, проанализированные индивидуально и использованные в пулированном виде промаркированы символом*

Размер ДНК оценивали с помощью капиллярного электрофореза на приборе Agilent Bioanalyzer 2100TM (Agilent Technologies, Германия) с использованием набора «Agilent High Sensitivity DNA Kit». Для оценки доли низкомолекулярных фрагментов в составе вДНК, после разделения ДНК в ПААГ, методом электроэлюции выделяли фрагменты 0,1-1 т.п.н. и определяли их концентрацию количественной ПЦР.

Бисульфитную обработку ДНК проводили с помощью набора EZ DNA Methylation-GoldTM Kit (ZymoResearch, США). Концентрацию метилированных и независимых от метилирования форм гена *RARβ2* оценивали с помощью количественной ПЦР. Индекс метилирования рассчитывали как $100 \times [\text{количество копий метилированного } RAR\beta2 / (\text{количество копий метилированного } RAR\beta2 + \text{неметилированного } RAR\beta2)]$.

Концентрацию белка определяли с помощью коммерческого набора «NanoOrange Protein Quantification Kit» (Molecular Probes, США). Концентрацию гистонов H2a и H4 в плазме крови оценивали с помощью коммерческих наборов «ELISA Kit for Histone H2B» и «ELISA Kit for Histone H4» (Cloud-Clone Corp., Китай).

По стандартной схеме получены и охарактеризованы поликлональные кроличьи антитела против гистонов человека. Антитела выделяли аффинной хроматографией и иммобилизовали на BrCN-сефарозе. Гистон-содержащие ДНПК плазмы крови выделяли аффинной хроматографией и концентрировали на фильтрах «Centricon 3 kDa» (Immobilon, Millipore, США). Концентрацию вДНК в составе ДНПК крови Здж и больных РМЖ определяли количественной ПЦР, размер вДНК — с помощью капиллярного электрофореза.

Для идентификации белков при помощи MALDI-TOF масс-спектрометрии, образцы разделяли в ПААГ, фрагменты геля вырезали с шагом 3 мм и обрабатывали по методу Розенфельда. После трипсинолиза пептиды экстрагировали из геля и обессоливали на микроколонках C18 ZipTips (Milipore, США). Масс-спектры регистрировали в позитивном режиме, с диапазоном 700-3000 Да. Белки идентифицировали путем с использованием БД NCBI и SwissProt с помощью ПО Mascot (Matrix Science Ltd.).

Биоинформатический анализ белков проводили с помощью ПО FunRich и БД Reactome и NCI-Nature Pathway Interaction Database. Профилирование универсальных белков проводили с помощью ПО STRING, вовлечённых в процессы стимуляции канцерогенеза — с использованием аннотаций QuickGO. Анализ наличия ДНК-связывающих мотивов в составе белков проводили с помощью Interpro и БД Interpro, PROSITE, Pfam, SMART и CDD.

Экзосомы плазмы и экзосомы крови (содержат экзосомы плазмы и ассоциированные с ФЭ экзосомы) выделяли комбинацией ультрафильтрации (диаметр пор 100 нм, Minisart high flow, Sartorius) и ультрацентрифугирования (100 000g, 90 мин, 4°C). Морфологию и размер экзосом оценивали крио-электронной и трансмиссионной микроскопией. Размер и концентрацию экзосом оценивали с помощью анализа траектории частиц.

Для проведения проточной цитофлуорометрии иммобилизовали антитела против CD9 или против ADAM-10 (Abcam, Англия) на поверхности 4 % латексных частиц (Invitrogen, США). После инкубации экзосом с такими частицами, комплексы окрашивали флуоресцентно-мечеными антителами против CD9, CD63, CD81 и CD24 (BD Bioscience, США).

Иммуноблоттинг проводили с использованием специфических антител против α - и β -субъединиц протеасомы 20S человека (Abcam, Великобритания).

Уровень 20S-протеасомы нормировали на уровень экзосомального CD9 и выражали в отн. ед. от уровня 20S-протеасом в экзосомах контрольной группы.

Для оценки влияния экзосом на ангиогенез использовали модель формирования КПС на Матригеле, обедненным ростовыми факторами. Для этого клетки HUVEC второго пассажа инкубировали с экзосомами в течение 18 ч, затем оценивали суммарную длину сформированных КПС.

Для анализа миграции псевдо-нормальные эпителиоциты молочной железы MCF10A и клетки карциномы молочной железы SKBR-3 инкубировали с экзосомами в инкубационной камере микроскопа Nikon Eclipse-Ti, изображения получали каждые 5 мин в течение 15–20 ч. Для оценки интенсивности пролиферации клеток было рассчитано количество митозов на том же видео.

Статистический анализ проводили с использованием ПО Statistica 6.0. Оценку распределения данных проводили с использованием критериев Колмогорова-Смирнова и 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 тест-систем рассчитаны на основе ROC-кривых, полученных для дифференцирования больных с РМЖ и ЗдЖ.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Анализ внДНК в составе ДНПК крови ЗдЖ и больных РМЖ

Аберрантно метилированная ДНК входит в список потенциальных циркулирующих опухолевых маркеров, поскольку данная модификация ДНК является одним из самых ранних событий при трансформации опухолевых клеток, эффективно выявляется на фоне неметирированной ДНК, а также способствует более длительной циркуляции ДНК в крови (*Palanca-Ballester C, 2021*).

Выявлено увеличение концентрации внДНК в плазме крови больных РМЖ по сравнению с контрольной группой (медианы 23,5 нг/мл и 10,5 нг/мл, соответственно, критерий Манна-Уитни, $p = 0,006$), 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 и 66 и 43 нг/мл для трипсинового элюатов, соответственно). Показано, что доля низкомолекулярных фрагментов в плазме крови ЗдЖ составляет 18,7 % внДНК, у больных РМЖ — 2,6 %. В составе асс-ФЭ ДНК низкомолекулярные фрагменты практически отсутствуют (таблица 2).

Выявленные преимущественно высокомолекулярные фрагменты ДНК в плазме крови больных РМЖ свидетельствуют о снижении вклада апоптоза в

появление внДНК при ЗНО. Наличие преимущественно высокомолекулярных фрагментов в составе асс-ФЭ ДНК как в норме, так и при РМЖ может объясняться как устойчивостью ДНК к гидролизу, так и специфическом вывезывании ДНПК с мембранными рецепторами.

Таблица 2 — Распределение низкомолекулярных и высокомолекулярных фрагментов в составе внДНК, (%)

ДНК	Контрольная группа			Больные РМЖ		
	Плазма	ФБ-ЭДТА элюат	Трипсиновый элюат	Плазма	ФБ-ЭДТА элюат	Трипсиновый элюат
0,1-1 т.п.н.	18,7	0,9	0,1	2,6±1,4	0,3±0,1	0,2±0,1
> 1 т.п.н.	81,3	99,1	99,9	97,5±1,4	99,7±0,1	99,8±0,1

Установлено, что в норме концы внДНК гетерогенны – выявлены 5'-выступающие, 3'-выступающие и «тупые» концы (рисунок 3а). Анализ строения концов внДНК плазмы при РМЖ 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 3б).

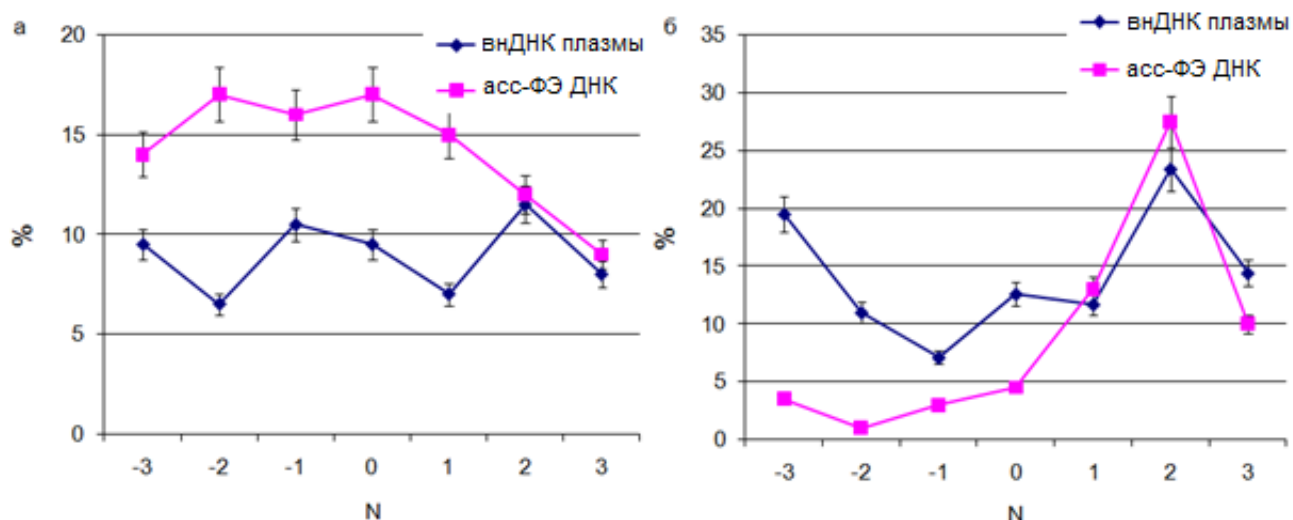


Рисунок 3 — Представленность концов в составе внДНК крови ЗдЖ (а) и больных РМЖ (б)

Эти данные 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, что при ЗНО не менее 1/4 внДНК имеет некротическое происхождение.

Поскольку метилированная ДНК более стабильна, чем неметилированная (Скворцова Т., 2010) и легко связывается с клетками (Брызгунова О, 2010), была проведена оценка уровня метилирования внДНК плазмы асс-ФЭ ДНК. В качестве мишени была выбрана промоторная область гена *RARβ2*, который кодирует ядерный рецептор ретиноидной кислоты и играет критическую роль во время дифференцировки клеток. Как в норме, так и при патологии метилированные последовательности промоторной области гена *RARβ2* выявлены только в составе высокомолекулярной внДНК, при этом индекс метилирования в крови ЗдЖ не превысил 10 %, а у больных люминальным А РМЖ (T₂N₀M₀) достигал 61 % (таблица 3). Концентрация данного эпигенетического маркера в крови больных РМЖ статистически значимо выше в составе асс-ФЭ ДНК по сравнению с внДНК плазмы (медиана 381 против 72 пг/мл, $p < 0,01$, соответственно).

Таким образом, наиболее ценным источником опухолеспецифической ДНК для «жидкостной биопсии» являются высокомолекулярные фрагменты асс-ФЭ ДНК. Во-первых, ассоциация ДНК с ФЭ предотвращает влияние нуклеаз крови на данные ПЦР, а во-вторых, асс-ФЭ ДНК обогащена метилированной ДНК, что подтверждается индексом метилирования *RARβ2*.

Таблица 3 — Индекс метилирования в составе внДНК крови контрольной группы и больных РМЖ, среднее $\pm$ SD*

Фракция крови	ДНК	ЗдЖ	Больные РМЖ	<i>p</i>
Плазма	Суммарная ДНК 100-1000 п.н.	10 $\pm$ 3 0	33 $\pm$ 11 0	<0,05
ФБ-ЭДТА элюат	Суммарная ДНК 100-1000 п.н.	9 $\pm$ 4 0	15 $\pm$ 6 0	
Трипсиновый элюат	Суммарная ДНК 100-1000 п.н.	7 $\pm$ 4 0	61 $\pm$ 12 0	<0,05
Примечание -* Концентрация внДНК ниже чувствительности метода обозначена как 0				

Сравнительный анализ ДНПК крови Здж и больных РМЖ

Поскольку белковый состав ДНПК крови может определять не только время жизни вДНК в циркуляции, но и её биологические функции, был разработан подход для выделения нативных ДНПК крови за гистоновую компоненту, идентифицированы в их составе белки и с помощью биоинформатического анализа установлены ДНК-связывающие мотивы, а также молекулярные функции и биологические процессы, в которые вовлечены как ДНК-связывающие белки, так и белки-«пассажиры» ДНПК.

С помощью масс-спектрометрии с высокой достоверностью ($p < 0,05$) были идентифицированы 177 и 169 белков в ДНПК крови Здж и больных РМЖ, соответственно. Доля универсальных белков ДНПК (встречались в норме и при ЗНО) составила 12 % (38 белков).

Биоинформатический анализ показал, что мембранные белки составляют почти половину универсальных белков, что косвенно указывает на возможность связывания циркулирующих вДНК с клеточной поверхностью, и, вероятно, является необходимым условием для проникновения в клетку и влияния на её биологические процессы. Доля внеклеточных универсальных белков в ДНПК составляет менее 5 %, что косвенно указывает, что в циркуляцию попадают уже сформированные комплексы. Среди уникальных как для Здж, так и для больных РМЖ белков в составе ДНПК преобладали белки, обладающие каталитической активностью (52,2 % и 48,7 %), ДНК/РНК/нуклеотид-связывающие белки (21,7 % и 10,3 %), а также белки, регулирующие активность рецепторов (10,9 % и 10,3 %, соответственно). Кроме того, при РМЖ в составе ДНПК значительно возрастает доля белков-участников ионных каналов (в 4,7 раз), белков, связывающих белки (в 3,5 раза), белков, участвующих в транспорте и передаче сигналов (в 2,3 и в 3,4 раза, соответственно), что может косвенно объяснять причину повышения концентрации вДНК в крови при развитии ЗНО.

Установлено, что со связыванием нуклеиновых кислот и нуклеотидов (НК-связывающие) ассоциированы 118 белков (37 %), из них 20 являются универсальными (47 % от всех универсальных белков ДНПК). В составе уникальных белков ДНПК крови Здж доля НК-связывающих белков составила 41 %, в составе уникальных белков ДНПК больных РМЖ — 36 %; в них выявлено 38 типов ДНК-связывающих мотивов. В составе белков ДНПК крови Здж обнаружено 17, а у больных РМЖ — 9 уникальных ДНК-связывающих мотивов. В дальнейшем выявленные уникальные ДНК-связывающие мотивы опухоль-специфических белков могут быть использованы для обогащения вДНК, что повысит эффективность диагностики ЗНО на основе вДНК.

Биоинформатический анализ показал, что представленность ДНК-связывающих белков ДНПК, вовлеченных в регуляцию метаболизма нуклеиновых кислот, при РМЖ увеличивается (с 34 % до 43 %), а белков, вовлеченных в процессы межклеточной коммуникации и передачи сигналов — снижается (с 25 % и 27 % до 17 % в обоих случаях), при этом представленность белков-«пассажира», опосредующих энергетические пути, при ЗНО снижалась (с 16 % до 5 %), а вовлеченных в процессы транспорта – увеличивалась (с 7 % до 12 %). Таким образом, в процессы регуляции метаболизма нуклеиновых кислот вовлечены преимущественно ДНК-связывающие белки, а в процессы межклеточной коммуникации и передачи сигнала — белки-«пассажиры» ДНПК.

Установлено, что при РМЖ в составе ДНПК увеличивается представленность белков-«пассажира», стимулирующих инвазию, ангиогенез, пролиферацию, миграцию клеток и регулирующих иммунный надзор, при этом представленность ДНК-связывающих белков в норме и при ЗНО сопоставима (за исключением ЭМП) (рисунок 4).

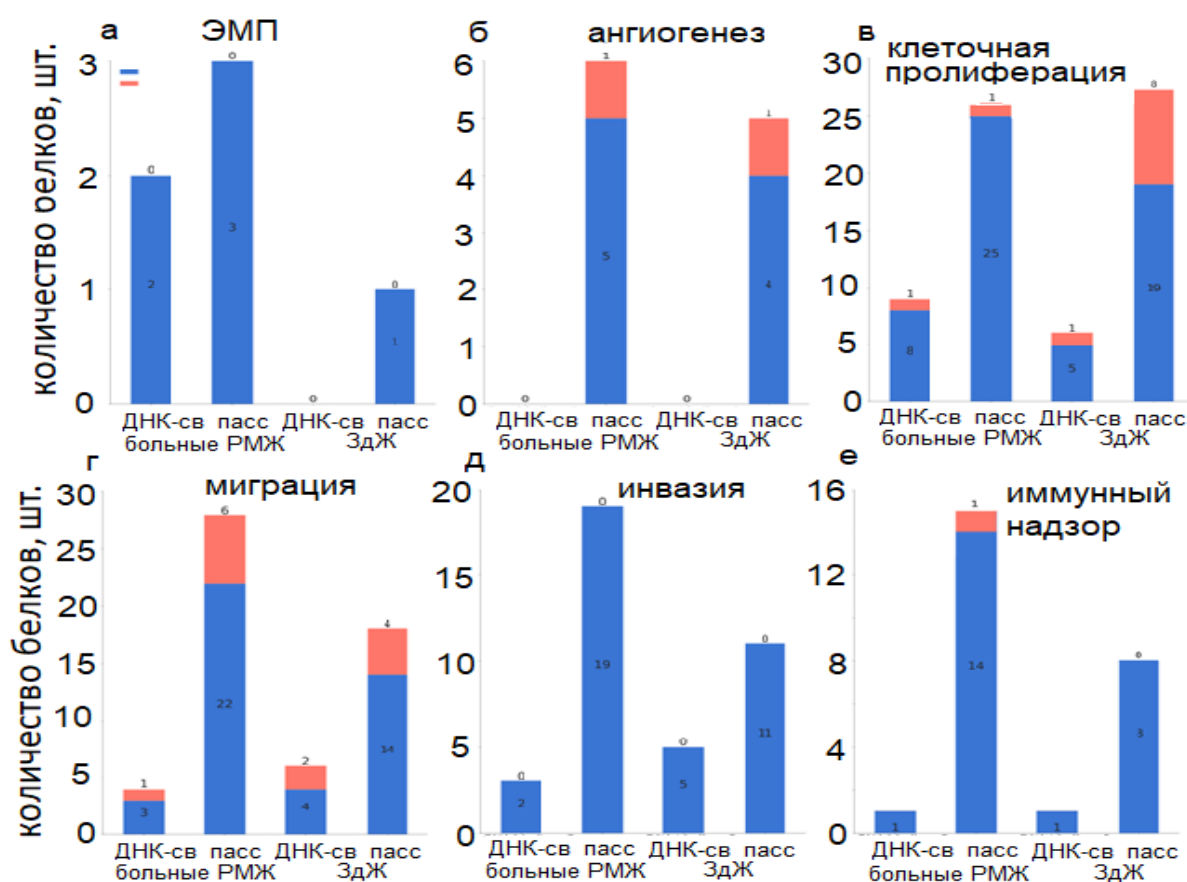


Рисунок 4 — Ассоциированные с канцерогенезом белки ДНПК крови ЗдЖ и больных РМЖ: ЭМП; ангиогенез; клеточная пролиферация; миграция; инвазия; иммунный надзор. Синим цветом указаны белки-стимулирующие, красным — ингибирующие процесс

Полученные данные косвенно свидетельствуют, что внДНК обладает биологической активностью только в комплексе с белками.

Установлено, 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. 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 больных РМЖ. Полученные данные косвенно указывают на направленную сортировку белков в ДНПК, которые, наряду с ВВ, могут осуществлять направленный перенос генетического материала от клеток-доноров к клеткам-реципиентам.

Опухоль-ассоциированные белки ДНПК крови больных РМЖ

Комбинация белков SPG7, ADRB1, SMCO4, RNF1, PSMG1 в составе ДНПК позволяет дифференцировать первичных больных люминальным РМЖ (T1-2N0M0) от контрольной группы с чувствительностью 100 % и специфичностью 80 % (AUC 0,900, 95 % доверительный интервал 0,751 до 0,975). Необходимо отметить, что из 5 белков в составе панели только RNF1 является ДНК-связывающим белком.

Выявленные перспективные маркеры РМЖ (SPG7, ADRB1, SMCO4, RNF1, PSMG1) в составе ДНПК необходимо в дальнейшем верифицировать на обширных группах пациентов. В комбинации с анализом последовательностей опухолевой внДНК данные опухоль-ассоциированные белки ДНПК могут быть использованы для разработки методов ранней неинвазивной диагностики ЗНО.

Характеризация экзосом

С помощью ТЭМ было показано, что препараты ВВ не содержали частиц более 100 нм, а их форма и размер соответствуют характеристикам экзосом, выделенных из других биологических жидкостей (Yunusova N, 2019; Grigor'eva A, 2016).

По данным крио-электронной микроскопии, в плазме в норме и при РМЖ преобладают одиночные ВВ, при этом доля такой субпопуляции ВВ на поверхности ФЭ больных РМЖ в 2 раза выше, чем у ЗдЖ. Кроме того, у

больных РМЖ в составе ассоциированных с ФЭ ВВ по сравнению со ЗдЖ значительно снижается представленность других субпопуляций — электроно-плотных, с двойной мембраной, двойных и многослойных ВВ (рисунок 5).

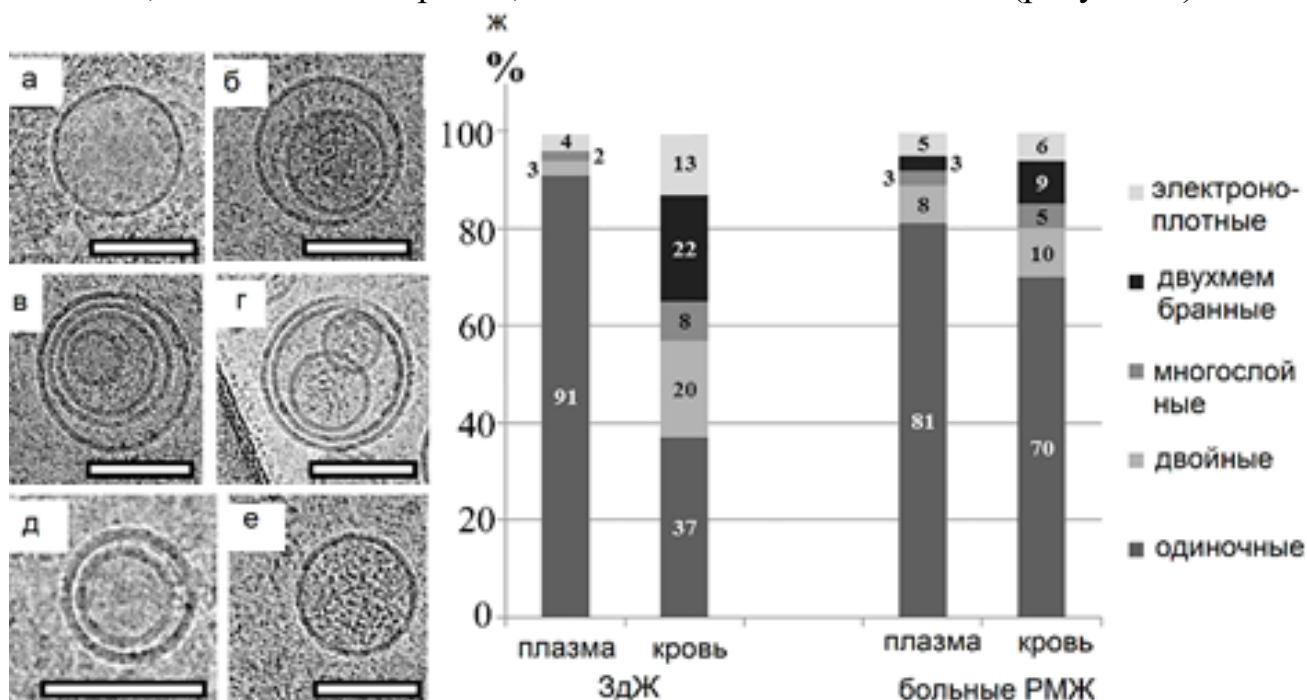


Рисунок 5 — Крио-электронная микроскопия: представленность ВВ с различной морфологией в объединенных образцах. Одинарные ВВ (а), двойные ВВ (б), многослойные ВВ (в, г), двухмембранные ВВ (в-д), электроно-плотные ВВ (б, е). Масштабные линейки составляют 100 нм. Процентное соотношение одно-, двойных, двухмембранных, многослойных и электроно-плотных ВВ, визуализированных в образцах плазмы и крови ЗдЖ и больных РМЖ (ж)

С помощью анализа траектории частиц установлено, что у больных РМЖ в плазме и в крови концентрация ВВ статистически значимо ($p < 0,05$) выше, чем у ЗдЖ — медианы в плазме составили $31,9 \times 10^9$ и $7,9 \times 10^9$ ВВ/мл крови, а в крови — $57,4 \times 10^9$ и $18,4 \times 10^9$ ВВ/мл крови, соответственно. Впервые установлено, что у ЗдЖ и у больных РМЖ около половины ВВ крови ассоциированы с поверхностью ФЭ (медианы количества ВВ в плазме от общего количества ВВ в крови составили 43 % и 55 %, соответственно).

По убыванию интенсивности медианы флуоресценции как в плазме, так и в крови контрольной группы и больных РМЖ идентифицированы следующие субпопуляции ВВ: $CD9+/CD24+ > CD9+/CD81+ > CD9+/CD63+$, т.е. субпопуляция $CD9+/CD24+$ экзосомо-подобных ВВ преобладала как в плазме, так и в препаратах крови и в норме, и при РМЖ. При РМЖ не выявлено достоверных различий между проанализированными популяциями ВВ плазмы и ВВ крови.

В совокупности полученные данные показывают, что выделенные из плазмы и из крови ВВ обладают всеми свойствами экзосом (морфология, размер, наличие поверхностных тетраспанинов). Увеличение концентрации и изменение морфологии ассоциированных с ФЭ экзосом уже на начальных стадиях заболевания косвенно указывает на значимость данного типа ВВ в развитии РМЖ.

Протеазы в составе экзосом крови ЗдЖ и больных РМЖ

Известно, что тетраспанины экзосом формируют функциональные комплексы, включающие в себя в том числе протеазы. В частности, тетраспанин-ассоциированная ADAM-10 путем эктодоменного шеддинга рецепторов факторов роста, рецепторов адгезии и кадгеринов индуцирует подвижность клеток, увеличивая метастатический потенциал опухолевых клеток (Leech, 2018). Показано, что уровень ADAM-10 статистически значимо возрастает в субпопуляции CD9+ экзосом плазмы и экзосом крови больных люминальным РМЖ по сравнению со ЗдЖ (в 1,8 и 1,3 раза, соответственно, $p < 0,05$) (таблица 4).

Таблица 4 — Уровень ADAM-10 на поверхности CD 9+ и CD 24+ экзосом крови ЗдЖ и больных РМЖ

Источник экзосом			CD9+	CD24+
ЗдЖ (n = 30)		плазма	844±99	884±124
		кровь	804±79	920±91
Источник экзосом			CD9+	CD24+
Больные РМЖ	люминальный подтип (n = 25)	плазма	1531±162*	926±94
		кровь	1026±100*	1103±99
	ТН-подтип (n = 5)	плазма	962±88	908±109
		кровь	862±69	969±106
Примечания:				
1 * статистически значимые различия между ЗдЖ и онкологическими больными, p < 0,05;				
2 ** статистически значимые различия между люминальным и ТН-подтипами РМЖ, p < 0,05.				

Существенный вклад в опухолевую прогрессию вносят также неассоциированные с тетраспанинами протеазы, в частности 20S протеасомы, обладающие трипсиноподобной, химотрипсиноподобной и каспазоподобной

активностью (Mofers, 2017). Протеасомы участвуют в регуляции пролиферации, апоптоза, миграции клеток, транскрипции генов и иммунного ответа, разрушая или активируя белки — компоненты сигнальных путей, факторы транскрипции и другие функционально значимые молекулы (Shashova E, 2017). Показано статистически значимое увеличение уровня 20S протеасомы в экзосомах плазмы и экзосомах крови первичных больных РМЖ по сравнению с контрольной группой (в 1,6 и 2,8 раза, соответственно, $p < 0,05$, (таблица 5)), причем уровень 20S протеасом ассоциирован с молекулярным подтипом РМЖ: уровень протеазы значимо выше при ТН-подтипе, чем при менее агрессивных люминальных подтипах (таблица 6).

Таблица 5 — Уровень 20S протеасомы ($\alpha+\beta$) в составе экзосом плазмы и крови Здж и больных РМЖ

Источник экзосом		Медиана и диапазон [25;75%], отн. ед.
Здж (n = 39)	плазма	1,00 [0,90; 1,12]
	кровь	1,15 [0,95; 1,22]
Больные РМЖ (n = 80)	плазма	1,59 [1,22; 1,61]*
	кровь	2,28 [1,95; 2,61]*
Примечание - * значимые различия между Здж и больными РМЖ, $p < 0,05$		

Таблица 6 – Уровень 20S протеасомы ($\alpha+\beta$) в составе экзосом плазмы больных РМЖ с различными подтипами

Источник экзосом		Медиана и диапазон [25;75%], отн. ед.
Здж (n = 39)		1,00 [0,90; 1,12]
Больные РМЖ	люминальный подтип (n = 61)	1,57 [1,22; 1,73]*
	ТН-подтип (n = 19)	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, $p < 0,05$.		

Таким образом, протеазный груз экзосом различается в крови Здж и больных РМЖ. Различный уровень тетраспанин-ассоциированных и

тетраспанин-неассоциированных протеаз в субпопуляциях экзосом при разных подтипах РМЖ свидетельствует о различных механизмах сортировки белков во ВВ и о значимой роли экзосом, ассоциированных с ФЭ, в развитии ЗНО.

Протеом экзосом плазмы и экзосом крови ЗдЖ и больных РМЖ

Для выявления уникальных опухолевых белков проведен сравнительный анализ протеомов экзосом плазмы и экзосом крови ЗдЖ и больных РМЖ. В составе экзосом крови ЗдЖ ($n = 18$) и первичных больных люминальным РМЖ (T1-2N0M0, $n = 17$) идентифицированы 111 и 146 белков, соответственно. Доля универсальных белков экзосом крови условно ЗдЖ и больных РМЖ составила 15 %, доля уникальных белков — 27 % и 49 %.

У больных РМЖ 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). Установлено, что 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, подвижность и инвазию (рисунок 6). Таким образом, анализ протеомного состава экзосом крови значительно дополняет информацию о биогенезе и функциональной роли в канцерогенезе данного типа ВВ.

Опухоль-ассоциированные белки экзосом больных РМЖ

Показано, что комбинация пяти белков APPBP2, KRT1, KRT6B, SERPINA1, SOCS3 в составе экзосом крови позволяет дифференцировать первичных больных РМЖ от условно ЗдЖ с чувствительностью 71 % и специфичностью 100 % ($AUC = 0,853$, 95 % доверительный интервал 0,692-0,949).

Влияние молекулярного груза экзосом крови на диссеминацию РМЖ

Для подтверждения гипотезы о различной функциональной роли экзосом плазмы и экзосом, ассоциированных с ФЭ в стимуляции роста опухоли было исследовано влияние экзосом плазмы и экзосом крови ЗдЖ и больных РМЖ на ключевые этапы опухолевой прогрессии: пролиферацию и миграцию

опухолевых клеток, стимуляцию ангиогенеза, а также оценена возможность транспорта ДНК в составе экзосом.

Экзосомы плазмы и экзосомы крови первичных больных РМЖ значительно стимулировали увеличение числа подвижных неопухолевых клеток MCF10A, при этом отсутствовало влияние экзосом на скорость клеточной миграции. Все экзосомы стимулировали скорость миграции опухолевых клеток SKBR-3, но не влияли на количество подвижных клеток (рисунок 7, таблица 7).

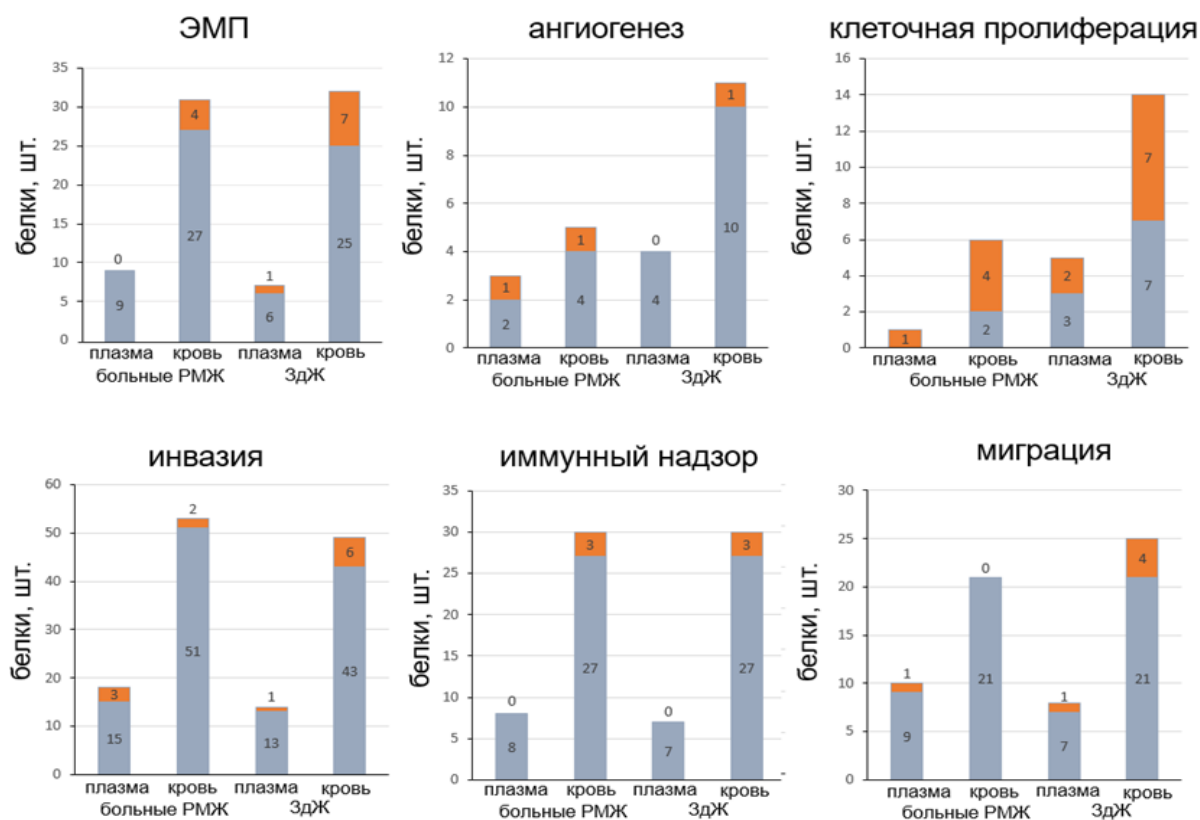


Рисунок 6 — Ассоциированные с канцерогенезом белки в составе экзосом крови ЗдЖ и больных РМЖ. Серым цветом указаны белки-стимулирующие, оранжевым – ингибирующие процесс

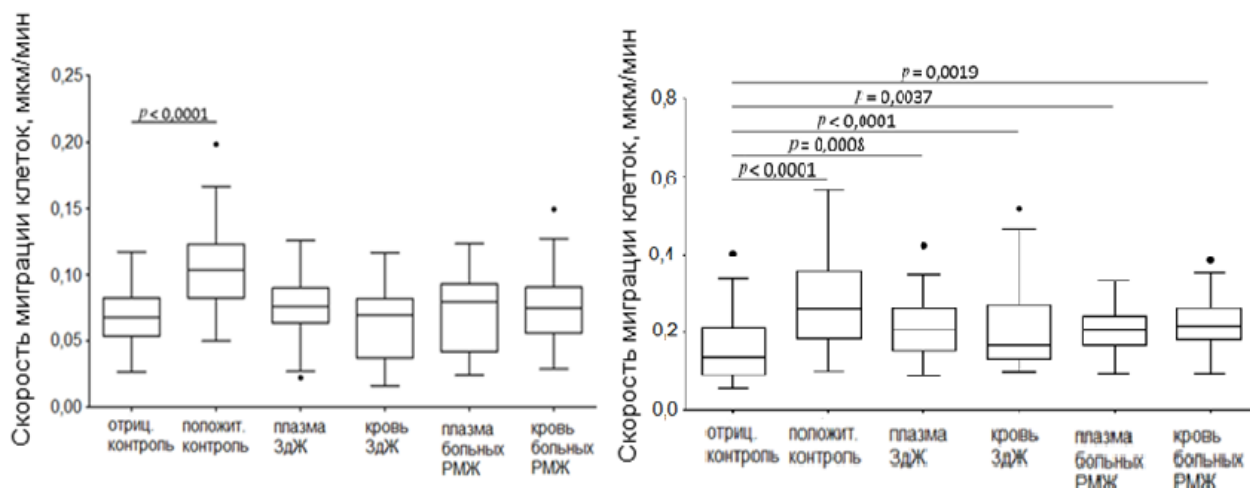


Рисунок 7 — Скорость миграции клеток MCF10A (а) и SKBR-3 (б) в указанных условиях. Указана медиана (-) скорости с интервалом 25–75 % (□) и интервалы

Таблица 7 — 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

Показано, что добавление экзосом крови как ЗдЖ, так и онкологических больных в два раза увеличивало число митотических событий ($p = 0,016$ в обоих случаях) клеток MCF10A, в то время как добавление экзосом плазмы не оказывало существенного влияния на клеточную пролиферацию (таблица 8).

Таблица 8 — Митотическая активность

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

На пролиферацию клеток карциномы молочной железы SKBR-3 не влияло отсутствие сыворотки и добавление экзосом из любых источников (таблица 8).

Показано, что наибольшим ангиогенным потенциалом обладают экзосомы больных РМЖ, причем экзосомы плазмы стимулируют формирование КПС больше, чем экзосомы крови ($p = 0,021$). Экзосомы крови ЗдЖ ингибируют формирование КПС (по сравнению с отрицательным контролем $p = 0,002$, по сравнению с экзосомами плазмы ЗдЖ и экзосомами крови онкологических больных — $p = 0,017$ и $p = 0,001$, соответственно).

Установлено, что одна экзосома содержит $1,4 \times 10^{-8}$ пг ДНК в плазме условно ЗдЖ, в плазме больных РМЖ — $1,1 \times 10^{-8}$ пг ДНК, а доля экзосомальной ДНК не превышает 0,025 % в плазме ЗдЖ и 0,004 % в плазме больных РМЖ от вДНК. Таким образом, экзосомы не являются основными транспортерами вДНК в крови.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

ЗНО молочной железы представляют собой наиболее распространенную онкологическую патологию среди женщин, при этом 24 % первично выявленных больных с РМЖ имеют III-IV стадии заболевания (Шахзадова А, 2023). Данное обстоятельство связано с бессимптомным развитием заболевания, несвоевременным обращением пациенток к специалистам, тенденцией к более раннему старту ЗНО, 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. 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.

Поскольку вовремя диагностированный РМЖ лучше поддается лечению и имеет большую вероятность ремиссии, актуальной задачей молекулярной онкологии является выявление 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 (Игнатьева В., 2016), ранняя диагностика ЗНО снизит социально-экономическое бремя в РФ путем уменьшения затрат на оказание медицинской помощи, выплату пенсий по инвалидности и пособий по временной утрате трудоспособности.

Диагностика ЗНО с использованием «жидкостной биопсии» имеет такие преимущества перед тканевой биопсией, как минимальная инвазивность, возможность серийного взятия крови, более полное отражение гетерогенности опухоли (Alimirzaie S, 2019), а также способность выявлять новообразования в анатомически недоступных областях (Cohen J, 2018). 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 пациентов. Кроме того, 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, в частности, экзосом. Известно, что в

процессе созревания в экзосомы происходит направленный сортинг биологически-активных молекул, влияющих на метаболизм клеток-реципиентов путем переноса ВВ с током крови и лимфы. Как и в случае с внДНК, 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 ДНПК и экзосом крови, установление их патогенетической значимости и диагностической ценности у больных РМЖ.

Для этого в проспективном исследовании, включающем от 190 лиц контрольной группы и 194 первичных больных РМЖ (T1-2N0-1M0), был проведен анализ особенностей циркуляции и состава ДНПК и экзосом.

Методологически данное исследование было разделено на четыре блока. Первый блок работы посвящен фундаментальным аспектам молекулярной онкологии, в частности, анализу строения концов, фрагментации и оценке индекса метилирования внДНК плазмы крови и асс-ФЭ ДНК больных РМЖ. Второй блок работы включает идентификацию и анализ белков в ДНПК крови ЗдЖ и больных РМЖ. Третий блок работы посвящен исследованию морфологии экзосом и репертуара белков в их составе в крови онкологических больных. Четвертый блок работы посвящен исследованию биологических эффектов экзосом крови на первичные, псевдо-нормальные и злокачественные клетки. Используемые современные методологические подходы к исследованию нуклеиновых кислот и белков, включающих молекулярно-биологические, биохимические 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 ЗдЖ и больных РМЖ подтверждены в экспериментах *in vitro*. Информация о строении концов, фрагментации и индексе метилирования внДНК плазмы и асс-ФЭ ДНК существенно расширяет знания о феномене циркулирующей ДНК при ЗНО, 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 ЗНО 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-«пассажиров», 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-«пассажиров» 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]. 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].

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ

асс-ФЭ ДНК — ассоциированная с форменными элементами ДНК
 ВВ — внеклеточные везикулы
 внДНК — внеклеточная ДНК
 вноДНК — внеклеточная опухолевая ДНК
 ДНПК — дезоксирибонуклеопротеиновые комплексы
 Здж — здоровые женщины
 ЗНО — злокачественное новообразование
 ИМ — индекс метилирования
 КПС — капилляро-подобные структуры
 РМЖ — рак молочной железы
 ФЭ — форменные элементы
 ЭМП — эпителиально-мезенхимальный переход
 ADAMs — A Disintegrin And Metalloproteinases — протеазы семейства ADAM
 HER-2 — рецептор человеческого эпидермального фактора роста 2 типа
 HUVEC — первичные клетки пупочной вены человека
 MALDI-TOF масс-спектрометрия — времяпролётная масс-спектрометрия с матрично-активированной лазерной десорбцией/ионизацией

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ:

1. **Тамкович С. Н.**, Власов В. В., Лактионов П. П. Циркулирующие дезоксирибонуклеиновые кислоты крови и их использование в медицинской диагностике / **С. Н. Тамкович**, В. В. Власов, П. П. Лактионов // Молекулярная биология. – 2008. – Т. 42. – С. 12–23. DOI: 10.1134/S0026893308010020.
2. **Тамкович С. Н.**, Войцицкий В. Е., Лактионов П. П. Современные методы диагностики рака молочной железы / **С. Н. Тамкович**, В. Е. Войцицкий, П. П. Лактионов // Биомедицинская химия. – 2014. – Т. 60(2). – С. 141–160. DOI: 10.18097/PBMC20146002141.
3. **Тамкович С. Н.**, Челобанов Б. П., Дужак Т. Г. Метод выделения циркулирующих в крови нуклеопротеиновых комплексов / **С. Н. Тамкович**, Б. П. Челобанов, Т. Г. Дужак // Известия академии наук. Сер. хим. – 2015. – Т. 6. – С. 1458–1463. DOI: 10.1007/s11172-015-1032-1.
4. **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. DOI: 10.1134/S1068162015060163.
5. Kapustin A.N. UK-Russia Researcher Links Workshop: extracellular vesicles — mechanisms of biogenesis and roles in disease pathogenesis, M.V. Lomonosov Moscow State University, Moscow, Russia, 1-5 March 2015 / A. Kapustin, N. Kalinina, T. Lopatina [et al.] // J. Extracell. Vesicles. – 2015. – V. 4. – P. 28094. DOI: 10.3402/jev.v4.28094.
 6. **Tamkovich S.**, Bryzgunova O. Protease activity and cell-free DNA in blood of healthy donors and breast cancer patients / **S. Tamkovich** // J. Immunoassay Immunochemistry. – 2016. – V. 37(2). – P. 141–153. DOI: 10.1080/15321819.2015.1069745.
 7. Тамкович С. Н., Тутанов О. С., Лактионов П. П. Экзосомы: механизмы возникновения, состав, транспорт, биологическая активность, использование в диагностике / С. Н. Тамкович, О. С. Тутанов, П. П. Лактионов // Биологические мембраны. – 2016. – Т. 33(3). – С. 163–175. DOI: 10.1134/S1990747816020112.
 8. **Tamkovich S. N.** Protein content of circulating nucleoprotein complexes / **S. N. Tamkovich**, O. S. Tutanov, D. S. Serdukov [et al.] // Adv. Exp. Med. Biol. – 2016. – V. 924. – P. 133–136. DOI: 10.1007/978-3-319-42044-8_26.
 9. **Tamkovich S. N.** Features of circulating DNA fragmentation in blood of healthy females and breast cancer patients / **S. N. Tamkovich**, N. A. Kirushina, V. E. Voytsitskiy [et al.] // Adv. Exp. Med. Biol. – 2016. – V. 924. – P. 47–51. DOI 10.1007/978-3-319-42044-8_10.
 10. Тамкович С. Н. Протеомный анализ циркулирующих экзосом крови в норме и при злокачественных новообразованиях молочной железы / **С. Н. Тамкович**, Ю. С. Бакакина, О. С. Тутанов [и др.] // Биоорганическая химия. – 2017. – Т. 43(2). – С. 146–156. DOI: 10.1134/S1068162017020157.
 11. Григорьева А. Е. Контаминация препаратов экзосом, выделенных из биологических жидкостей / А. Е. Григорьева, Н. С. Дырхеева, О. Е. Брызгунова [и др.] // Биомедицинская химия. – 2017. – Т. 63(1). – С. 91–96. DOI: 10.18097/PBMC20176301091.
 12. **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. DOI:10.1134/S1990750817030106.
 13. Юнусова Н. В., **Тамкович С. Н.**, Кондакова И.В. Экзосомы в различных биологических жидкостях: состав и функции / Н. В. Юнусова, **Тамкович С. Н.**, И. В. Кондакова // Молекулярная медицина. – 2017. – Т. 15. – С. 14–22.
 14. **Тамкович С. Н.** Сравнительный субпопуляционный анализ экзосом плазмы крови больных злокачественными новообразованиями / **С. Н.**

- Тамкович, Н. В. Юнусова, А. К. Сомов [и др.]** // Биомедицинская химия. – 2018. – Т. 64(1). – С. 110–114. DOI:10.1134/S1990750818020130.
15. Юнусова Н. В. Роль тетраспанинов и протеаз экзосом в опухолевой прогрессии / Н. В. Юнусова, Е. А. Тугутова, **С. Н. Тамкович** [и др.] // Биомедицинская химия. – 2018. – Т. 64(2). – С. 123–133. DOI 10.1134/S1990750818030095.
 16. **Tamkovich S. N.** Protease cargo in circulating exosomes of breast cancer and ovarian cancer patients / **S. N. Tamkovich**, N. V. Yunusova, E. A. Tugutova [et al.] // Asian Pac. J. Cancer Prev. – 2019. – V. 20(1). – P. 255–262. DOI: 10.31557/APJCP.2019.20.1.255.
 17. **Tamkovich S.** Blood circulating exosomes contain distinguishable fractions of free and cell-surface-associated vesicles / **S. Tamkovich**, O. Tutanov, A. Efimenko [et al.] // Curr. Mol. Med. – 2019. – V. 19(4). – P. 273–285. DOI: 10.2174/1566524019666190314120532.
 18. Tamkovich S. N., Laktionov P. P. Cell-surface-bound circulating DNA in the blood: biology and clinical application / **S. N. Tamkovich**, P. P. Laktionov // IUBMB Life. – 2019. – V. 71(9). – P. 1201–1210. DOI: 10.1002/iub.2070.
 19. 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.
 20. 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. – P. 495. DOI:10.3390/biom10040495.
 21. Тутанов О. С. Поиск протеомных маркеров рака молочной железы в составе суммарных экзосом крови / О. С. Тутанов, Ю. С. Бакакина, К. В. Проскура [и др.] // Сибирский онкологический журнал. – 2020. – V. 19(2). – P. 49–61. DOI: 10.21294/1814-4861-2020-19-2-49-61.
 22. 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.
 23. Tutanov O. Protein profiling of plasma and total blood exosomes in breast cancer: a potential role in tumor progression, diagnosis, and prognosis / O. Tutanov, K. Proskura, R. Kamyshinsky [et al.] // Front. Oncol. – 2020. – V. 10. – P. 580891. DOI: 10.3389/fonc.2020.580891.
 24. Tutanov O. S. Identification of tumor dissemination facilitating proteins in exosomes associated with blood cells of breast cancer patients / O. S. Tutanov, K. V.

- Proskura, A. E. Grigor'eva [et al.] // Russ. J. Bioorg. Chem. – 2020. – V. 46(6). – P. 1018–1033. DOI: 10.1134/S1068162020060357.
25. 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. – V. 26(22). – P. 6965. DOI:10.3390/molecules26226965.
 26. Tutanov O. Blood plasma exosomes contain circulating DNA in their crown / O. Tutanov, T. Shtam, A. Grigor'eva [et al.] // *Diagnostics (Basel)*. – 2022. – V. 12(4) – P. 854. DOI: 10.3390/diagnostics12040854.
 27. Tutanov O., **Tamkovich S.** The influence of proteins on fate and biological role of circulating DNA / O. Tutanov, **S. Tamkovich** // *Int. J. Mol. Sci.* – 2022. – V. 23(13). – P. 7224. DOI: 10.3390/ijms23137224.
 28. Shefer A., Yalovaya A., **Tamkovich S.** Exosomes in breast cancer: involvement in tumor dissemination and prospects for liquid biopsy // *Int. J. Mol. Sci.* – 2022. – V. 23(16). – P. 8845. DOI: 10.3390/ijms23168845.
 29. **Tamkovich S.** Size and methylation index of cell-free and cell-surface-bound DNA in blood of breast cancer patients in the contest of liquid biopsy / **S. Tamkovich**, A. Tupikin, A. Kozyakov [et al.] // *Int. J. Mol. Sci.* – 2022. – V. 23. – P. 8919. DOI:10.3390/ijms23168919.
 30. 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 [et al.] // *Int. J. Mol. Sci.* – 2023. – V. 24(8). – P. 7279. DOI:10.3390/ijms24087279.
 31. 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.] // *J. Pers. Med.* – 2023. – V. 13. – P. 1691. DOI:10.3390/jpm13121691.
 32. 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.
 33. **Tamkovich S.** Exosomal microRNA: diagnostic potential and role in breast cancer dissemination / **S. Tamkovich**, A. Borisova, A. Shevela [et al.] // *Molecules* – 2025. – V.30 – P. 3858. DOI:10.3390/ molecules30193858.
 34. **Тамкович С. Н.** Уровень экзосомальных протеосом как перспективный маркер для дифференцирования больных с мастопатией и раком молочной железы методом «жидкостной биопсии» / **С. Н. Тамкович**, Н. В. Юнусова, Д. А. Сваровский [и др.] // *Вопросы онкологии*. – 2025. – Т.71(6). – С. 1340-1350. DOI: 10.37469/0507-3758-2025-71-6-OF-2500.

Патенты РФ и свидетельства о регистрации:

1. Патент РФ № 2272072 С1 Российская Федерация, МПК С12N015/10. Способ выделения нуклеиновых кислот / Лактионов П. П., Тамкович С. Н., Рыкова Е. Ю., Власов В. В. // Лактионов П. П., Власов В. В. - № 20044126133; заявл. 26.08.2004; опубл. 20.03.2006 г.
2. Патент РФ № 2556825 С1 Российская Федерация, МПК С15N5/00. Способ получения экзосом из крови / Тамкович С. Н., Лактионов П. П., Тутанов О. С., Рябчикова Е. И., Григорьева А. Е., Власов В. В. // ИХБФМ СО РАН - № 2014137279/10; заявл. 15.09.2014; опубл. 18.06.2015 г.
3. Патент РФ № 2571507 С1 Российская Федерация, МПК G01N33/48, С12Q1/00. Способ диагностики и мониторинга онкологических заболеваний с использованием экзосом крови / Тамкович С. Н., Лактионов П. П., Тутанов О. С., Власов В. В. // ИХБФМ СО РАН - № 2014140894/15; заявл. 09.10.2014; опубл. 20.12.2015 г.
4. Свидетельство о государственной регистрации базы данных № 2012621042. База данных учета биологических образцов и описания клинико-патологических характеристик пациентов с новообразованиями молочной железы (УБО-НМЖ) / Тамкович С. Н., Милейко В. А., Попов А. В., Власов В. В., Лактионов П. П. // Заявитель ИХБФМ СО РАН. - № 2012620856; заявл. 13.06.2012; опубл. 05.10.2012 г.
5. Свидетельство о государственной регистрации базы данных № 2025624522. База клинических данных первичных больных раком молочной железы / Косарев И. А., Чернышова А. Л., Тамкович С. Н., Рекеда И. А. // Заявитель ИХБФМ СО РАН. - № 2025624083; заявл. 02.10.2025; опубл. 16.10.2025 г.