

КОНЦЕНТРАЦИЯ ПРОКАТЕПСИНА В И ИНГИБИТОРА ЦИСТЕИНОВЫХ ПРОТЕАЗ ЦИСТАТИНА С В БИОЛОГИЧЕСКИХ ЖИДКОСТЯХ ПРИ РАЗВИТИИ ОПУХОЛЕЙ

Елена Андреевна ГАШЕНКО¹, Валентина Алексеевна ЛЕБЕДЕВА²,
Вадим Федорович КОВАЛЕНКО³, Наталья Игоревна ГАВРИЛОВА²,
Татьяна Григорьевна ФИЛАТОВА¹, Елена Александровна ЦИКАЛЕНКО²,
Екатерина Геннадьевна ЛАСКАВАЯ³, Татьяна Александровна КОРОЛЕНКО¹

¹НИИ физиологии СО РАМН,
630117, г. Новосибирск, ул. Тимакова, 4

²ГОУ ВПО Новосибирский государственный медицинский университет Росздрава
630091, г. Новосибирск, Красный проспект, 52

³ГБУЗ Городская клиническая больница № 1
630047, г. Новосибирск, ул. Залесского, 6

Активность цистеиновых протеаз млекопитающих регулируется скоростью превращения незрелых проформ в активные зрелые ферменты и специфичными эндогенными ингибиторами цистатинами, нарушения которых связывают с развитием опухолей и процессом метастазирования. Методами иммуноферментного анализа (ИФА) проведено сравнительное исследование концентрации прокатепсина В (предшественника активного катепсина В) и эндогенного ингибитора цистеиновых протеаз цистатина С в сыворотке крови здоровых людей и пациентов со злокачественными опухолевыми заболеваниями. У здоровых лиц распределение концентраций прокатепсина В было сходным с таковым цистатина С (спинномозговая жидкость > слюна > сыворотка крови > моча). В сыворотке крови женщин с онкологическими заболеваниями репродуктивной системы (рак тела матки I-II стадии, рак яичников II-III стадии) до лечения, с доброкачественными и пограничными опухолями яичников обнаружено повышение концентрации прокатепсина В. У больных раком молочной железы (II-III стадии) отмечена тенденция к увеличению концентрации прокатепсина В. Полученные данные свидетельствуют о возможности использования повышенной концентрации прокатепсина В в качестве одного из диагностических маркеров опухолевых заболеваний и мониторинга эффективности терапии.

Ключевые слова: прокатепсин В, цистатин С, сывороточные маркеры, опухоли.

Развитие опухолевого процесса связывают с повышенной экспрессией протеаз и нарушением их регуляции [1]. Активность цистеиновых протеаз млекопитающих регулируется собственно транскрипцией, скоростью синтеза пептидаз, их деградацией и специфичными эндогенными ингибиторами – цистатинами [2–4]. Важное регуляторное значение имеет скорость превращения незрелых проформ в активные зрелые протеазы [1, 5, 6]. Лизосомная цистеиновая протеаза катепсин В (семейство СА, субсемейство С1) для активации требует, чтобы был расщеплен прорегион, который блокирует субстрат-связывающий сайт [2]. Взаимодействие активной и латентной форм высокомолекулярных изоферментов катепсина В до настоящего времени исследовано

неполно [7, 8]. Недостаточно изучен внутриклеточный процессинг, приводящий к активации неактивного профермента катепсина В, микрорегетерогенность форм катепсина В в различных тканях, хотя анализ клонированных кДНК не обнаружил существенных различий показателя [1]. Показано, что полианионные полисахариды – гликозаминогликаны – способны ускорять аутокаталитическое удаление пропептида с последующей активацией катепсина В [6, 9]. Диагностическая и прогностическая роли проформ цистеиновых протеаз находятся в стадии активного исследования. Последнее актуально в связи с тем, что протеазы и их эндогенные ингибиторы рассматривают как возможные терапевтические мишени при различных опухолевых заболеваниях

Гашенко Е.А. – аспирант лаборатории клеточной биохимии и физиологии клетки

Лебедева В.А. – к.м.н., доцент кафедры онкологии, зав. отделением гинекологии

Коваленко В.Ф. – к.м.н., Заслуженный врач, главный врач

Гаврилова Н.И. – к.м.н., доцент кафедры «Детские инфекционные болезни»

Филатова Т.Г. – врач-лаборант, зав. лабораторией клинической и лабораторной диагностики

Цикаленко Е.А. – врач-лаборант, ассистент кафедры клинической лабораторной диагностики

Ласкавая Е.Г. – врач онколог-гинеколог

Короленко Т.А. – д.м.н., проф., зав. лабораторией клеточной биохимии и физиологии,

e-mail: T.A.Korolenko@physiol.ru

ях [4, 10–12]. В связи с изложенным представляется интерес выяснение взаимоотношений между основными физиологическими ингибиторами катепсина В, проферментом и эндогенным ингибитором цистатином С, при опухолевых заболеваниях [13, 14]. Цель работы – исследовать концентрацию прокатепсина В и цистатина С в биологических жидкостях человека и оценить роль этих нарушений как возможных маркеров ряда злокачественных опухолей.

Материал и методы

Использовали сыворотку крови практически здоровых лиц (женщин и мужчин в возрасте 20–45 и 50–65 лет) и женщин с опухолями органов репродуктивной системы (в возрасте 30–70 лет). Были обследованы группы больных до лечения в возрасте 40–60 лет, страдающих злокачественной опухолью молочной железы ($n = 6$), раком тела матки ($n = 15$), раком яичников ($n = 8$) и доброкачественными и пограничными опухолями яичников ($n = 9$). Работа по забору материала проведена на базе Городского онкологического диспансера ГБУЗ Городская клиническая больница № 1, в отделениях гинекологии и маммологии. Забор крови проводили до оперативного вмешательства и назначения лечения натошак из локтевой вены, сыворотку получали при центрифугировании образцов крови 3000 g при +4 °С в течение 20 мин («Eppendorf 5415 R», Германия).

Слюну (забор утром по общепринятой методике), мочу (средняя порция утренней мочи) получали у практически здоровых лиц, спинномозговую жидкость – у больных после диагностической пункции и исключения воспалительных и опухолевых заболеваний нервной системы, желчь – после операции холецистэктомии (без гнойного воспаления). Пробы хранили при –20 °С не более одного месяца и исследовали после однократного размораживания.

Концентрацию прокатепсина В оценивали методом иммуноферментного анализа (ИФА) с помощью коммерческих наборов «R&D» (США) для количественного определения концентрации прокатепсина В в сыворотке (плазме) крови, слюне, моче, лизатах и супернатантах клеточных культур человека. Использование данных наборов позволяет провести достаточно специфичную оценку концентрации прокатепсина В, так как перекрестная реакция с активной формой катепсина В человека обнаружена лишь в 6 % случаев, не отмечено перекрестной реакции и с другими цистеиновыми протеазами (катепсинами L, H, S, K). Метод основан на технике сэндвича; моноклональные антитела к прокатепсину В нанесены на микропланшет. Интенсивность окрашивания, пропорционального количеству прокатепсина В, связанного на начальном этапе, оценивали с помощью планшетного ридера «Multiscan EX» («ThermoLabSystems»,

США). Измерения проводили при 540 нм, в качестве стандарта использовали рекомбинантный прокатепсин В человека. Результаты выражали в нг прокатепсина В в расчете на мл биологического образца.

Концентрацию цистатина С оценивали с помощью наборов ИФА «BioVendor» (Чехия) и «КРКА» («Нове Место», Словения) для человека. Их применение специфично для цистатина С и позволяет исключить перекрестную реакцию с другими цистатинами человека (цистатин А, цистатин F и др.). Определение интенсивности окраски проводили при 540 нм с помощью планшетного ридера «Multiscan EX»; результаты выражали в нг прокатепсина В в расчете на мл биологического образца.

Статистическая обработка результатов проведена методом параллельных рядов вариационной статистики в среде приложения «Statistica 8.0», результаты представлены в виде $M \pm m$, где M – среднее арифметическое значение, m – ошибка среднего. В ряде случаев ввиду наличия выборок переменных, не подчиняющихся нормальному распределению, использовали непараметрические методы статистической обработки: в связи с большой индивидуальной вариативностью концентрации прокатепсина В в исследуемых группах наряду с параметрическим (t -критерий Стьюдента) использовали непараметрические методы анализа (тесты Манна – Уитни, Колмогорова – Смирнова, Вальда – Вольфовица), достоверными считались результаты при $p < 0,05$.

Результаты и обсуждение

В сыворотке крови практически здоровых молодых людей (мужчин и женщин) 20–40 лет, 12 практически здоровых женщин 40–55 лет и мужчин и женщин 55–65 лет не обнаружено возрастных различий концентрации прокатепсина В (табл. 1). У практически здоровых лиц наиболее высокая концентрация прокатепсина В (в 3–4 раза выше, чем в сыворотке) обнаружена в спинномозговой жидкости, более низкая – в слюне, минимальная – в моче. Различия концентрации прокатепсина В во всех биологических образцах статистически достоверны ($p < 0,01$).

Концентрация эндогенного ингибитора цистеиновых протеиназ цистатина С в биологических жидкостях практически здоровых людей напоминает аналогичные соотношения, обнаруженные нами для прокатепсина В. Максимальное содержание цистатина С обнаружено в спинномозговой жидкости, более низкое – в сыворотке крови и незначительное – в моче и желчи (табл. 1). Различия показателей между всеми сравниваемыми биологическими жидкостями у здоровых людей статистически достоверны ($p < 0,01$). Обнаружено повышение концентрации этого ингибитора в сыворотке крови практически здоровых лиц

Таблица 1

Концентрация цистатина С и прокатепсина В в биологических жидкостях здоровых людей, нг/мл

Показатель	Спинальная жидкость	Слюна	Сыворотка крови			Моча	Желчь
Цистатин С	3700 ± 170 (n = 7)	1930 ± 9,5 (n = 5)	991,1 ± 163,1 (n = 25)			78,1 ± 12,0 (n = 10)	3,0 ± 0,3 (n = 4)
Возраст	267 ± 20,0 (n = 7)	158,3 ± 3,1 (n = 5)	20–40	41–55	56–65	11,4 ± 2,8 (n = 9)	–
Прокатепсин В			63,9 ± 9,07 (n = 10) мужчины женщины	78,5 ± 5,2 (n = 12) женщины	67,8 ± 0,15 (n = 10) мужчины женщины		

50–65 лет по сравнению с молодыми людьми 20–45 лет ($p < 0,05$).

При исследовании концентрации прокатепсина В в сыворотке крови у больных раком тела матки до лечения, выявленного преимущественно в возрастных группах 45–54 лет и 55–70 лет с II и III стадиями процесса, отмечали ее достоверное отличие от показателя контрольной группы при использовании t-критерия Стьюдента ($p = 0,032$) и метода Манна – Уитни ($p = 0,002$) (табл. 2). У больных раком яичников до лечения со II и III стадиями процесса содержание прокатепсина В также было повышено, что подтверждает применение t-критерия Стьюдента ($p < 0,004$), методов Манна – Уитни ($p < 0,049$), Колмогорова – Смирнова ($p < 0,05$) и Вальда – Вольфовица ($p < 0,031$) (табл. 2). В сыворотке крови больных раком молочной железы II стадии (до лечения) выявлена лишь тенденция к увеличению концентрации прокатепсина В ($p < 0,1$). После комплексной терапии у некоторых пациенток отмечается повышение концентрации прокатепсина В, что может быть обусловлено прогрессированием процесса. При доброкачественных и пограничных опухолях яичников концентрация прокатепсина В согласно критериям Стьюдента и Вальда – Вольфовица по сравнению с контрольной группой не изменена. В то же время в связи с ненормальным распределением показателей в группах при использовании методов статистической обработки по Манну – Уитни ($p < 0,001$) и по Колмогорову – Смирнову ($p < 0,05$) обнаружено достоверное повышение показателя (табл. 2); выявленный факт требует дальнейшего изучения.

Таким образом, использование непараметрического критерия теста Манна – Уитни выявило достоверное повышение концентрации прокатепсина В в сыворотке крови у больных раком яичников ($p < 0,002$) и раком тела матки ($p < 0,049$) по сравнению с контрольной группой практически

здоровых женщин. Параметрический t-критерий Стьюдента показал аналогичное повышение исследуемого показателя в тех же группах больных ($p < 0,032$; $p < 0,004$) по сравнению с контрольной группой (табл. 2).

Ранее в нашей лаборатории показано, что у больных гемобластозами (лимфомами) выявлено статистически достоверное повышение концентрации цистатина С в сыворотке крови – как при В-клеточной, так и при Т-клеточной лимфоме. Отмечена большая выраженность повышения содержания цистатина С при Т-клеточной, чем при В-клеточной лимфоме, увеличение показателя на поздних стадиях развития опухоли (II–III и IV стадиях) [10, 12].

Полученные данные свидетельствуют о прогностической и диагностической значимости уровня ингибитора цистеиновых протеаз и возможности использования показателя в качестве прогностического маркера опухолевой прогрессии и эффективности проводимой терапии при гемобластозах человека.

Биологическая роль эндогенного ингибитора цистеиновых протеаз цистатина С связана с регуляцией их активности, прежде всего катепсина В [13]. Превращение незрелой формы неактивного прокатепсина В в зрелую форму фермента играет важное значение в регуляции активности катепсина В. В ряде работ цистатин С и прокатепсин В рассматривают как возможные маркеры отдельных опухолевых заболеваний (обнаружена повышенная секреция незрелой и зрелой форм катепсина В внеклеточно при дефиците ингибиторов так же, как и цистатина С); возможное прогностическое и диагностическое значение данных показателей находится в стадии исследования [4, 10–13]. Определение содержания ингибитора цистеиновых протеаз цистатина С, а также, как мы полагаем, незрелой формы катепсина В (в меньшей степени), может быть использовано для диагностики и прогноза ряда опухолевых заболеваний,

Таблица 2

Концентрация прокатепсина В в сыворотке крови в контрольной группе практически здоровых исследуемых и больных с опухолями органов женской репродуктивной системы до лечения ($M \pm m$)

	Контрольная группа	Рак тела матки	Рак яичников	Рак молочной железы	Доброкачественные и пограничные опухоли
Концентрация прокатепсина В (нг/мл)	78,5 ± 5,2 (n = 12)	133,2 ± 21,1 (n = 15)	171,0 ± 34,5 (n = 8)	99,8 ± 13,6 (n = 6)	92,1 ± 17,3 (n = 14)
Достоверность отличия от концентрации прокатепсина В в контрольной группе после применения критериев:					
Стьюдента		p = 0,032	p = 0,004	p = 0,094	p = 0,490
Манна – Уитни		p = 0,002	p = 0,0049	p = 0,783	p = 0,001
Колмогорова – Смирнова		p > 0,10	p < 0,005	p > 0,10	p < 0,005
Вальда – Вольфовица		0,097	0,031	0,223	0,30

сопровождающихся системным ответом при нарушениях регуляции и повышенной секреции цистеиновых протеаз и их ингибиторов.

Биологическая роль проформ цистеиновых протеаз исследована неполно [1, 6, 8]. Предшественник катепсина В человека состоит из 339 аминокислотных остатков, включая сигнальный пептид (1–17), прорегион (18–79) и зрелую цепь (80–333 аминокислоты) [5, 6]. Показано, что катепсин В участвует в процессинге ряда ферментов, в том числе прокаспаз и активных каспаз, проренина и секреторного ингибитора протеаз лейкоцитов. Таким образом, катепсин В, вероятно, участвует в ключевых этапах апоптоза, продукции ангиотензина, что важно при прогрессировании опухолей [6, 14]. Высказана гипотеза, что при повышенной экспрессии фермента в опухолях человека и животных прокатепсин В и активная зрелая формы катепсина В могут быть маркерами инвазии опухолей, например, при раке молочной железы, прямой кишки, предстательной железы [2, 3, 6, 9, 11, 12, 15, 18]. Показано, что зрелая форма катепсина В локализована внутри лизосом большинства клеток млекопитающих, а при стимуляции определенных типов клеток (макрофагов) происходит внеклеточная секреция фермента, когда он принимает участие в процессе внеклеточного протеолиза. Для отдельных опухолевых клеток человека продемонстрировано резкое усиление секреции как зрелой формы катепсина В, так и проформы, причем повышенная секреция прокатепсина В имеет значение для рака яичников и некоторых опухолей эпителиального происхождения, сопровождаемых формировани-

ем асцита [5, 8, 12, 19–22]. Вероятно, секреция проформы катепсина В внеклеточно при опухолях (вместо «траффика» внутрь лизосом и формирования зрелой формы фермента) напоминает аналогичный процесс при некоторых лизосомных болезнях накопления, сопровождающихся выбросом гидролаз внеклеточно вместо направленного транспорта внутрь лизосом.

Полученные нами данные о повышении концентрации прокатепсина В в сыворотке крови женщин со злокачественной и пограничной опухолью яичников, раком тела матки свидетельствуют о возможной прогностической и диагностической значимости данного показателя в качестве одного из маркеров онкологических заболеваний женской репродуктивной системы в зависимости от локализации опухоли и прогрессирования злокачественного процесса.

В то же время отмечена лишь тенденция к повышению концентрации прокатепсина В в сыворотке крови у женщин, больных раком молочной железы, что требует дальнейшего анализа и исследований.

Благодарности

Выражаем признательность и благодарность научному сотруднику лаборатории психофизиологии НИИ физиологии СО РАМН Ивану Викторовичу Браку за помощь при обработке результатов.

Список литературы

1. Stoka V., Turk B., Turk V. Lysosomal cysteine cathepsins: signaling pathways in apoptosis // Biol. Chem. 2007. 388. (6). 555–560.

2. *DeClerck Y.A., Mercurio A.M., Stack M.S. et al.* Proteases, extracellular matrix and cancer: a workshop of the path B study section. // *Am. J. Pathol.* 2004. 164. (4). 1131–1139.
3. *Geraghty P., Rogan M.P., Greene C.M. et al.* Neutrophil elastase up-regulates cathepsin B and matrix metalloprotease-2 expression. // *J. Immunol.* 2007. 178. (9). 5871–5878.
4. *Leung-Toung R., Zhao Y., Li W. et al.* Thiol proteases: inhibitors and potential therapeutic targets // *Cur. Med. Chem.* 2006. 13. (5). 547–581.
5. *Roshy S., Sloane B.F., Moin K.* Pericellular cathepsin B and malignant progression // *Cancer Metastasis Rev.* 2003. 22. (2–3). 271–286.
6. *Sinha A.A., Morgan J.L., Betre K. et al.* Cathepsin B expression in prostate cancer of native Japanese and Japanese-American patients: an immunohistochemical study // *Anticancer Res.* 2008. 28. (4B). 2271–2277.
7. *Baici A., Muntener K., Willmann A., Zwicky R.* Regulation of human cathepsin B by alternative mRNA splicing: homeostasis, fatal errors and cell death // *J. Biol. Chem.* 2006. 387. (8). 1017–1021.
8. *Mach L., Schwihla H., Stiwe K. et al.* Activation of procathepsin B in human hepatoma cells: the conversion into the mature enzyme relies on the action of cathepsin B itself // *Biochem. J.* 1993. 293. (Pt. 2). 437–442.
9. *Caglic D., Pungercar J.R., Pejler G. et al.* Glycosaminoglycans facilitate procathepsin B activation through disruption of propeptide-mature enzyme interactions // *J. Biol. Chem.* 2007. 282. (45). 33076–33085.
10. *Короленко Т.А., Жанаева С.Я., Потеряева О.Н. и др.* Активность и концентрация катепсина В как прогностический фактор в развитии лимфосаркомы ЛС мышей и аденокарциномы легких Льюис // *Бюл. exper. биол. мед.* 2002. 135. (4). 452–455.
11. *Короленко Т.А., Потеряева О.Н., Джаняева С.Я. et al.* Cystatin C in LS lymphosarcoma and HA-1 hepatoma treated with Ukrain and cyclophosphamide and involvement of apoptosis // *Drugs Exp. Clin. Res.* 2000. 26. (5–6). 285–92.
12. *Короленко Т.А., Филатова Т.Г., Черканова М.С. и др.* Цистатины: регулирование цистеиновых протеаз и нарушения при опухолях и воспалении // *Биомед. химия.* 2008. 54. (2). 210–217.
13. *Короленко Т.А., Филатова Т.Г., Черканова М.С. et al.* Cystatins: cysteine proteases regulation and disturbances in tumors and inflammation // *Biomed. khim.* 2008. 54. (2). 210–217.
13. *Mussap M., Plebani M.* Biochemistry and clinical role of human cystatin C // *Crit. Rev. Clin. Lab. Sci.* 2004. 41. (5–6). 467–550.
14. *Overall Ch. M., Dean R.A.* Degradomics: systems biology of the protease web. Pleiotropic roles of MMPs in cancer // *Cancer Metastasis Rev.* 2006. 25. (1). 69–75.
15. *Dickinson D.P.* Cysteine peptidases of mammals: their biological roles and potential effects in the oral cavity and other tissues in health and disease // *Crit. Rev. Oral Biol. Med.* 2002. 13. (3). 238–275.
16. *Vashishta A., Fusek M., Vetvicka V.* Possible role of procathepsin D in human cancer // *Pathol. Oncol. Res.* 2005. 50. (1). 71–76.
17. *Elliott E., Sloane B.F.* The procathepsin B in cancer // *Perspect. Drug Des.* 1996. 6. 12–32.
18. *Sameni M., Elliott E., Ziegler G. et al.* Cathepsin B and D are localized at the surface of human breast cancer cells // *Pathol. Oncol. Res.* 1995. 1. (1). 43–53.
19. *Бочкарева Н.В., Кондакова И.В., Коломиец Л.А. и др.* Прогностическое значение анализа половых гормонов, их рецепторов и ферментов, участвующих в синтезе эстрогенов и метаболизма в рак эндометрия // *Вопр. онкол.* 2007. 53. (3). 315–20.
20. *Бочкарева Н.В., Коломиец Л.А., Кондакова И.В. и др.* Ферменты метаболизма эстрогенов при раке эндометрия // *Бюл. exper. биол. мед.* 2006. 141. (2). 240–242.
21. *Бочкарева Н.В., Коломиец Л.А., Кондакова И.В. и др.* Половые гормоны в системном и локальном маточном кровотоке при гиперплазии и раке эндометрия: связь с активностью ферментов метаболизма эстрогенов // *Вопр. онкол.* 2008. 54. (6). 729–733.
22. *Бочкарева Н.В., Коломиец Л.А., Кондакова И.В. et al.* Enzymes of estrogen metabolism in endometrial cancer // *Vopr. onkol.* 2007. 53. (3). 315–320.
22. *Спирина Л.В., Кондакова И.В.* Роль специфического внутриклеточного протеолиза в онкогенезе // *Вопр. онкол.* 2008. 54. (6). 690–694.
23. *Спирина Л.В., Кондакова И.В.* The role of specific intracellular proteolysis in oncogenesis // *Vopr. onkol.* 2008. 54. (6). 690–694.

PROCATHEPSIN B AND CYSTATIN C CONCENTRATION IN BIOLOGICAL LIQUIDS AND THEIR ROLE AS POSSIBLE MARKER IN MALIGNANCY

Elena Andreevna GASHENKO¹, Valentina Alekseevna LEBEDEVA², Vadim Fedorovich KOVALENKO³,
Nataliya Igorevna GAVRILOVA², Tatyana Grigorevna FILATOVA¹, Elena Aleksandrovna TSIKALENKO²,
Ekaterina Gennadevna LASKAVAYA³, Tatyana Aleksandrovna KOROLENKO¹

¹*Institute of Physiology SB RAMS
630117, Novosibirsk, Timakova st., 4*

²*Novosibirsk State Medical University of Roszdrav
630091, Novosibirsk, Krasnyi av., 52*

³*Municipal Clinical Hospital № 1
630047, Novosibirsk, Zalesskii st., 6*

Cysteine proteases are regulated by rate of their inactive proform formation and specific endogenous inhibitors (cystatins), playing the important role in the regulation, especially in tumor growth and metastasis process. The procathepsin B concentration (precursor of active cathepsin B) and endogenous cysteine protease inhibitor cystatin C concentration in serum of patients with malignancies have been studied by ELISA method. It was shown that in serum of healthy people procathepsin B distribution was similar to distribution of cystatin C (cerebrospinal fluid > saliva > serum > urine). The increased level of procathepsin B in serum was registered in women with oncological diseases of reproductive system (before treatment). The tendency to increased level of serum procathepsin B was noted in the patients with breast cancer (II-III stages). The obtained data can testify to availability of the use of increased procathepsin B concentration index as one of the diagnostic markers of tumors and therapy effectiveness monitoring.

Key words: procathepsin B, cystatin C, serum markers, tumors.

Gashenko E.A. – post-graduate student of the laboratory of cellular biochemistry and physiology

*Lebedeva V.A. – candidate of medical sciences, assistant professor of the chair for oncology,
head of the gynecology department*

Kovalenko V.F. – candidate of medical sciences, Honored doctor, head physician

Gavrilova N.I. – candidate of medical sciences, assistant professor of the chair for children's infectious diseases

Filatova T.G. – clinical biochemist, head of clinical and laboratory diagnostics unit

Tsikalenko E.A. – laboratory doctor, assistant professor of the chair for clinical and laboratory diagnostics

Laskavaya E.G. – oncologist-gynaecologist

*Korolenko T.A. – doctor of medical sciences, professor, head of the laboratory of cellular biochemistry
and physiology, e-mail: T.A.Korolenko@physiol.ru*