



УДК 543

Модификация метода сбора конденсата выдыхаемого воздуха при контакте с поверхностью пластика и измерения концентрации H_2O_2 у пациентов с раком лёгкого

© 2019 Гуреев А.П.¹, Луценко Н.А.¹, Хорольская В.Г.¹,
Сержантова О.В.^{1,2}, Михайлов А.А.², Мошуров И.П.², Попов В.Н.^{1,3}

¹Воронежский государственный университет, Воронеж

²Воронежский областной клинический онкологический диспансер, Воронеж

³Воронежский государственный университет инженерных технологий, Воронеж

Поступила в редакцию 15.11.2019 г.

DOI: 10.17308/sorpchrom.2019.19/2237

В работе рассматривается метод сбора конденсата выдыхаемого воздуха (КВВ) из выдыхаемой воздушной смеси с учетом сорбционного взаимодействия с пластиком пробирок типа Фалькон. Показано, что ключевым фактором, повышающим эффективность сбора перекиси водорода, является охлаждение пробирки для сбора образцов. По-видимому, это способствовало снижению сорбционного воздействия H_2O_2 с полипропиленовой поверхностью пластика и соответственно приводило к снижению скорости его распада до воды. В результате работы нами был модифицирован метод измерения концентрации H_2O_2 в КВВ с использованием реагента Amplex[®] Ultra Red. Применяя данный метод, установлено, что у пациентов с раком легкого уровень H_2O_2 в КВВ 9 раз выше, чем у здоровых людей. Полученные данные свидетельствуют о том, что концентрация H_2O_2 в КВВ может являться потенциальным маркером для ранней диагностики рака легкого.

Ключевые слова: сорбция перекиси водорода, Amplex[®] Ultra Red, неинвазивная диагностика, рак легкого,

Modification of exhausted breath condensate collection method in contact with plastic surface and measurement of H_2O_2 concentration in patients with lung cancer

© 2019 Gureev A.P.¹, Lutsenko N.A.¹, Khorolskaya V.G.¹,
Serzhantova O.V.^{1,2}, Mikhailov A.A.², Moshurov I.P.², Popov V.N.^{1,3}

¹Voronezh State University, Voronezh

²Voronezh Regional Clinical Oncological Dispensary, Voronezh

³Voronezh State University of Engineering Technologies, Voronezh

Lung cancer is one of the most common types of cancer in the world, in which the survival is approximately equal to its mortality, which is largely due to the start of treatment at the stages indicating a later tumor process. Therefore, an important area in modern oncology is the development of a screening model for the purpose of early non-invasive diagnosis of the disease. As a marker of lung cancer, the work examines the exhaled breath condensate (EBC) from the exhaled air mixture, taking into account its sorption interaction with the plastic of Falcon type tubes. It has been shown that the key factor increasing the efficiency of collecting hydrogen peroxide is the cooling of the sample collection tube. Apparently, this contributed to a

decrease in the sorption effect of H_2O_2 with the polypropylene surface of the plastic and, accordingly, led to a decrease in its decay rate to water. As a result of the work, the method for measuring the concentration of H_2O_2 in the EBC was modified using the Amplex® Ultra Red reagent. The methods used earlier for such studies were not perfect enough and poorly reproducible. Using this method, it was found that in patients with lung cancer, the level of H_2O_2 in the EBC is 9 times higher than in healthy people. It is likely that overproduction of H_2O_2 can be caused both by a feature of tumor metabolism and by macrophages that migrate to the lungs during the development of malignant neoplasms. The data obtained indicate that the concentration of H_2O_2 in the E may be a potential marker for the early diagnosis of lung cancer.

Keywords: hydrogen peroxide sorption, Amplex® UltraRed, non-invasive diagnosis, lung cancer

Введение

В последние годы в медицине наблюдается тенденция к использованию неинвазивных методов диагностики различных заболеваний [1]. Особенно это актуально для различного рода легочных заболеваний. Черескожная биопсия легкого, бронхоальвеолярный лаваж и другие инвазивные методы диагностики легочных заболеваний являются трудоемкими, требующими специальной сертификации врачей и по этой причине не подходят для массового скрининга населения [2]. В этой ситуации оптимальным источником биомаркеров является конденсат выдыхаемого воздуха (КВВ). КВВ чрезвычайно неоднороден и состоит главным образом из трех составных компонентов. В основе его лежит вода, которая конденсируется из газовой фазы водонасыщенного выдоха. Вторым важным компонентом является частицы и капли, которые входят в состав оболочки дыхательных путей. Но с точки зрения диагностики наибольший интерес представляет третий класс веществ. Это летучие соединения, которые могут быть как растворимы, так и не растворимы в воде. Именно они и являются биомаркерами различного рода онкологических заболеваний (табл. 1) [3].

Таблица 1. Биомаркеры онкологических заболеваний, встречающиеся в КВВ [3, 9]

Соединение	Метод изменения	Тип онкологического заболевания
Нонановый альдегид	Газовая хроматография-масс-спектрометрия	Плоскоклеточный рак
Гексаналь	Газовая хроматография-масс-спектрометрия; Спектроскопия ионной мобильности	Плоскоклеточный рак
Октаналь	Газовая хроматография-масс-спектрометрия; Спектроскопия ионной мобильности	Плоскоклеточный рак
Этилбензен	Газовая хроматография-масс-спектрометрия	Аденокарцинома и плоскоклеточный рак
Додекан	Спектроскопия ионной мобильности	Мелкоклеточный и немелкоклеточный рак легкого
Пропионовая кислота	Газовая хроматография-масс-спектрометрия	Немелкоклеточный рак легкого
8-Изопростан	Иммуноферментный анализ	Немелкоклеточный рак легкого
Перекись водорода	Спектрофотометрия	Немелкоклеточный рак легкого

Ранее было показано, что H_2O_2 может являться маркером онкологических новообразований в легких. Однако стоит отметить, что в данных исследования, несмотря на схожий дизайн эксперимента, сильно различается концентрация H_2O_2 даже в контрольных значениях. «Разброс» между значениями концентрации H_2O_2 в

КВВ даже у клинически здоровых людей составляет практически 3 порядка (примерно от 20 нмоль до 10 мкмоль) [4-10].

Мы предполагаем, что такие различия, скорее всего, вызваны использованием разных методов сбора и измерения концентрации H_2O_2 . Перекись водорода – соединение неустойчивое, его распад до воды ускоряется при высоких значениях pH, воздействии ультрафиолета и контакте с материалом поверхности сосудов. Широко распространен метод определения концентрации H_2O_2 с использованием в качестве зонда DCFH-DA (2',7'-dichlorofluorescein diacetate), однако данное вещество может само по себе продуцировать активные формы кислорода (АФК), поэтому возможны артефакты по время измерения [11]. Метод, описанный Ruch et al (1989), считается достаточно надежным [12], но была отмечена плохая воспроизводимость результатов из-за флуктуаций при поглощении в УФ-диапазоне [13]. Согласно работе Dikalov et al. (2007) наиболее оптимальным методом детекции H_2O_2 является флюоресцентный метод с использованием реагента Amplex[®] Red [11]. Данное вещество в присутствии пероксидазы хрена активно вступает в реакцию с H_2O_2 в соотношении 1:1 с образованием устойчивого флюоресцентного комплекса резорурфина. Измерения проводятся флюорометрически при длине волны экстинкции 571 нм и длине волны эмиссии 585 нм (рис 1).

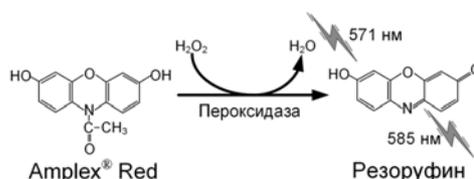


Рис. 1. Химическая структура Amplex[®] Red и его окисленной формы резорурфина

Долгое время именно Amplex[®] Red являлся «золотым стандартом» измерения концентрации H_2O_2 . Правда стоит отметить, что в 2016 году Dębski et al показал, что Amplex[®] Red способен окисляться не только в присутствии H_2O_2 , но и при помощи пероксинитрита. Так же было показано, что Amplex[®] Red может демонстрировать иные свойства поглощения при значении pH, отличающегося от физиологического [14]. Эти недостатки были учтены при разработке следующего поколения реактива Amplex[®] Ultra Red, за счет увеличения специфичности реакции с H_2O_2 и снижения чувствительности к колебаниям pH. При этом разработчик (Invitrogen, США) не раскрывает изменения, которые были внесены в структуру оригинального Amplex[®] Red [15] (лишь указано, что вместо резорурфина образуется окисленная форма, называемая Amplex[®] UltroxRed, и наблюдается максимум экстинкции при 568 нм, эмиссии 581 нм) [16].

Целью данного исследования являлось разработка метода сбора КВВ из выдыхаемой воздушной смеси с учетом необходимости снижения скорости распада перекиси водорода вследствие сорбционного взаимодействия с поверхностью пробирок, а также количественное определение концентрации H_2O_2 в КВВ клинически здоровых людей и пациентов с диагностированным раком легкого с помощью высокочувствительного реагента Amplex[®] Ultra Red [17].

Эксперимент

Объект исследования. В качестве объекта исследования выступали здоровые добровольцы, у которых не были диагностированы рак легкого и какие-либо другие легочные заболевания (n=10) и пациенты с диагностированным раком лёгкого (n=10). Группа пациентов с раком легкого была отобрана в БУЗ ВО «Воронежский

областной клинический онкологический диспансер». Согласие на зачисление в исследование было получено от всех участников, проинформированных о дальнейших тестах, которые будут выполнены с их биологическими материалами. Протокол исследования был утвержден этическим комитетом Воронежского государственного университета, который следует основным положениям Хельсинкской декларации.

Среда для измерения концентрации H_2O_2 в КВВ. Измерения проводились в акриловых кюветках, в среде объемом 1 см^3 , содержащей 20 мМ HEPES (pH 7.4), 1 мМ ЭДТА, 10 мкМ Amplex[®] Ultra Red (Invitrogen, США) и 4 ед. пероксидазы хрена (Thermo Fisher Scientific, США). Измерение содержания пероксида водорода производилось на флуориметре Hitachi F-7000 (Hitachi, Япония) при длине волны экстинкции 568 нм и длины волны эмиссии 581 нм.

Калибровка. Для калибровки прибора рекомендуется использовать свежеприготовленные стандартные растворы H_2O_2 . В данном эксперименте использовался коммерческий раствор 30% H_2O_2 (Sigma Aldrich, США) и 3% раствор H_2O_2 (Экотекс, Россия), доступный для розничной продажи в аптеках. Для построения калибровочного графика использовались растворы H_2O_2 с концентрацией 200, 400, 600, 800 нМ.

Для построения калибровочного графика были выполнены повторные добавления стандартных растворов в трех повторностях. После каждого добавления были зафиксированы «скачки» флуоресценции (рис. 2). Был построен калибровочный график и выведена формула линейного уравнения для расчета концентрации H_2O_2 непосредственно во время измерения.

Сбор конденсата выдыхаемого воздуха. Устройства для сбора конденсата (рис. 2) представляло собой фалькон объемом 15 см^3 , приводящая и отводящая трубка, одноразовый мундштук. Испытуемый в течение 5 минут дышал в мундштук. Ватный тампон предотвращает попадание слюны, содержащей большое количество антиоксидантного фермента каталазы. После этого фалькон с конденсатом помещался в другой фалькон объемом 50 см^3 и центрифугировался в охлаждаемой центрифуге при 500 g в течение 1 минуты при температуре $+4^\circ\text{C}$. При таком способе объем собранного КВВ составляет 100-300 мкл (в зависимости от интенсивности дыхания испытуемого).

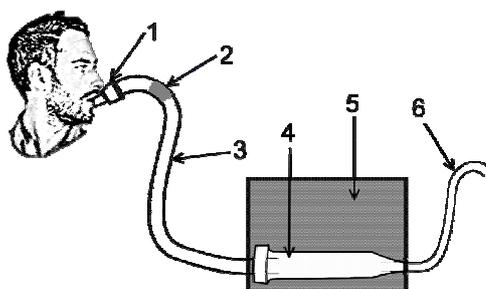


Рис. 2. Устройство для сбора КВВ. 1. Одноразовый мундштук; 2. Ватный тампон; 3. Приводящая трубка; 4. Пластиковая пробирка Фалькон 15 см^3 ; 5. Емкость со льдом; 6. Отводящая трубка

Измерение. В измерительную кювету, содержащую 1 см^3 среды, для измерения вносилось 15 мкл КВВ. Измеряется значение «скачка» флуоресценции. Начальной точкой считается значение флуоресценции на момент добавления КВВ. Далее следует резкое увеличение флуоресценции и последующее незначительное снижение. Конечная точка флуоресценции считается не по максимальной точке «отскока», а после выхода кривой на плато (рис. 3).

Измерения проводились в 3 технических повторностях. Расчет концентрации H_2O_2 проводился по формуле (1), полученной при построении калибровочного графика с помощью стандартных растворов, приготовленных из 3% раствор H_2O_2 .

$$y=01057x+6.5 \quad (1)$$

где y – значение «скачка» флюоресценции после добавления 15 мкм КВВ, x – концентрация H_2O_2 в КВВ, выраженная в нмоль.

Нами сравнивались пробирки из различных типов стекла и пластика. Выдыхаемый воздух конденсировался при различных температурах. Оптимальным оказалось использование охлаждения за счет льда, и использование пластиковых пробирок типа Фалькон. Снижение температуры при использовании сухого льда увеличивало выход конденсата, но концентрация перекиси в пробе снижалась при этом до 25%, возможно, за счет замерзания-оттаивания пробы. Использование стеклянных пробирок также ускоряло деградацию перекиси водорода. Повышение температуры конденсации существенно снижало объем конденсата и приводило к ускоренному распаду перекиси водорода. Это может быть связано с повышенной адсорбцией перекиси водорода пластиком пробирки и ее распаду при взаимодействии с полимерным материалом.

Статистический анализ. Статистический анализ проводился с помощью программного обеспечения STADIA 8.0 (STADIA, Россия). Данные представлены в виде значений среднего арифметического \pm стандартная ошибка средней. Различия между группами оценивались с помощью Т-критерия Стьюдента. Построение калибровочного графика осуществлялось в Microsoft Excel 2010 (Microsoft, США).

Обсуждение результатов

Анализируя состав пластика, с которым соприкасается КВВ и содержащиеся в нем летучие компоненты (табл. 1), было сделано предположение, что будет происходить дополнительный расход окислителя (H_2O_2) при взаимодействии с полипропиленовой поверхностью пластиковой пробирки (рис. 4). Подобный процесс является сорбционным и зависит как от состава пластика, так и от компонентов КВВ. Подобные явления могут приводить к уменьшению концентрации H_2O_2 за счет сопряженных реакций с поверхностью пластика. Данная реакция возможна при повышении температуры и давлении, поэтому охлаждение пробирки для сбора конденсата необходимо для минимизации сопряженных реакций. Оптимальным оказалось охлаждение собирательной пластиковой пробирки до $0-4^\circ\text{C}$ с помощью льда, так как при более низких температурах в результате замерзания-оттаивания образца происходит существенная деградация перекиси. Осаждение конденсата проводилось в охлаждаемой центрифуге при температуре $+4^\circ\text{C}$, что также способствовало минимизации сорбционных процессов.

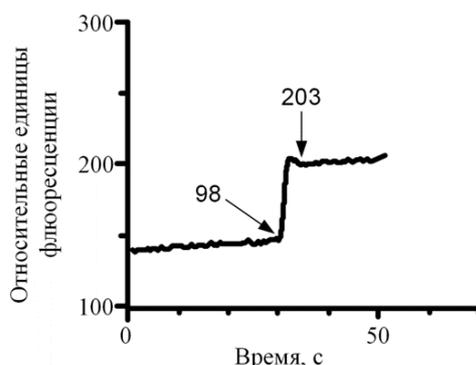


Рис. 3. Измерение скачка флюоресценции при добавлении КВВ

Для приготовления стандартных растворов рекомендуется использовать концентрированные коммерческие растворы, например, 30% раствор Sigma Aldrich (CAS Number 7722-84-1). Согласно прилагаемой документации молярность 30% раствора H_2O_2 составляет 9.8 моль.

Можно использовать 3% раствор H_2O_2 , но такой раствор является менее стабильным, поэтому рекомендуется спектрофотометрически проверять концентрацию H_2O_2 . Измерения требуется проводить в кварцевой кювете при длине волны 240 нм. Коэффициент молярной экстинкции 43.6. В проведенном нами исследовании концентрация 3%-ого раствора H_2O_2 составила 720 ммоль.

Сорбционные процессы на поверхности полипропиленовых пробирок и кварцевой кюветы могут быть связаны с образованием полимерными цепочками полипропилена и Si-O-Si кварцевого стекла с сопутствующими летучими органическими компонентами в выдыхаемой смеси «ассоциативных узлов»: «полипропилен-нонановый альдегид», «полипропилен-октаналь», «полипропилен-пропионовая кислота». Эти узлы содержат группировки, способные образовывать с молекулами воды водородные, ориентационные и индукционные связи [17, 18].

Необходимо отметить, что хроматография – междисциплинарный раздел химии, одним из направлений которой является рассмотрение процессов, представленных на рис. 3, таких как реакции с поверхностью органического материала [17, 18]. Поэтому вполне обосновано соотносить эти процессы с плоскостными реакциями, то есть с сорбционными процессами, описанными для тонкослойной хроматографии.

Образованию карбоксильных и альдегидных групп на поверхности полипропилена (рис. 4) предшествует появление спиртовых групп, что позволяет отнести модификацию тонкого слоя в полимере как переход его в дипольную фазу [18]. Влияние температуры выше 24°C на результаты хроматографических взаимодействий в этом слое будет описываться уравнением

$$(R_f)_T - (R_f)_{24} \approx (297/T - 1) \cdot \alpha \cdot f(X, S), \quad (2)$$

где $(R_f)_T$ и $(R_f)_{24}$ – подвижность вещества при температуре T и при 24°C соответственно; α – активность слоя сорбента; $f(X, S)$ – функция, учитывающая свойства вещества X и растворителя S . В большинстве случаев произведение $\alpha \cdot f(X, S)$ равно 2.

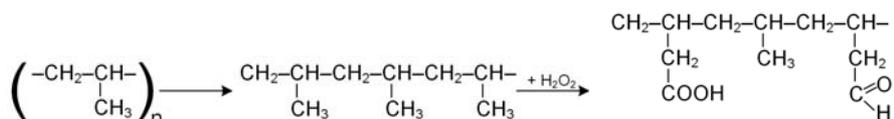


Рис. 4. Схема окисления полипропилена перекисью водорода

Снижение температуры целесообразно, если исследуются соединения с низкой термической стабильностью.

Калибровки спектрофлуориметра проводили для обоих растворов с учетом минимизации сопряженных реакций с пластиковой и стеклянной поверхностями, что позволило поддерживать в системе постоянную концентрацию H_2O_2 . Значительных различий не было обнаружено. Значение линейности для 3% раствор H_2O_2 было всего на 0.0047 меньше, чем для 30% раствора H_2O_2 производства Sigma Aldrich (рис.5).

Ранее было показано, что в опухоли меняется окислительный статус из-за нарушения баланса между производством АФК и их детоксификации с помощью антиоксидантных систем, в результате чего опухоль начинает продуцировать в несколько раз больше АФК [19]. Другим источником окислительного стресса в легких при злокачественных новообразованиях могут являться макрофаги, которые продуцируют АФК с целью стимуляции апоптоза опухолевых клеток [9].

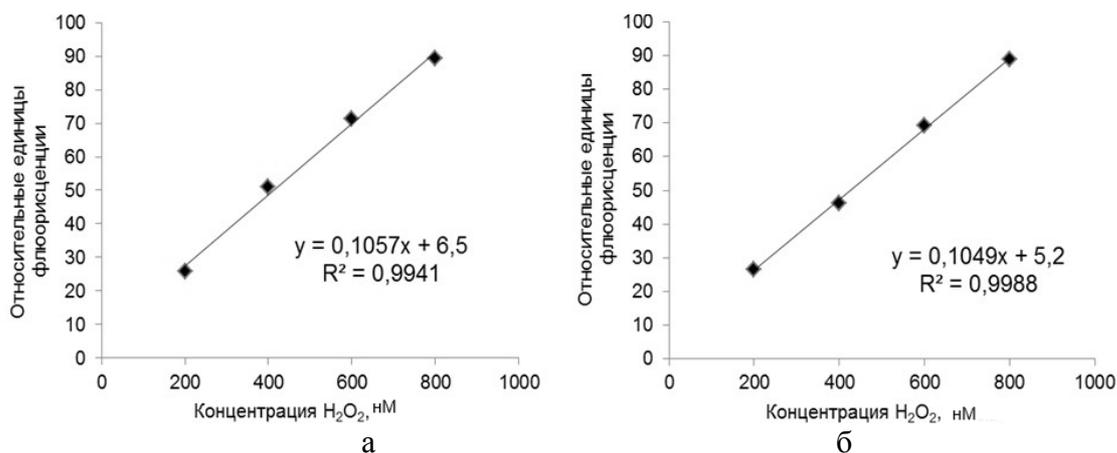


Рис. 5. Калибровочный график при использовании стандартных растворов 3% H_2O_2 (а) и 30% H_2O_2 (б)

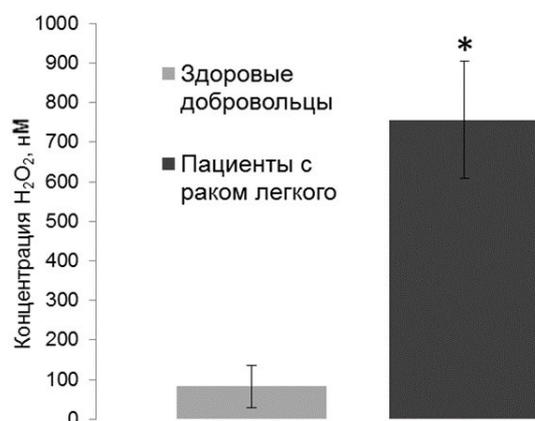


Рис. 6. Концентрация H_2O_2 у здоровых людей и пациентов с раком легкого ($p < 0.001$)

Ранее уже было показано, что содержание H_2O_2 у пациентов с раком легкого превышает контрольные значения в несколько раз [8, 9]. Установлено, что концентрация H_2O_2 в КВВ людей без диагностированных легочных заболеваний составляет 82.1 ± 52.4 нмоль. У группы людей с диагностированным раком легкого концентрация H_2O_2 составила 756.1 ± 148.6 нмоль, что в 9 раз выше, чем у контрольной группы ($p < 0.001$) (рис. 6). Эти данные согласуются с результатами, полученными Krawczyk et al. (2017) [9]. Полученные значения концентрации H_2O_2 в КВВ на порядок меньше, чем данные полученные Chan et al. (2009) с помощью спектрофотометрического метода исследования [8].

Заключение

В ходе исследования был модифицирован метод сбора КВВ из выдыхаемой воздушной смеси за счет взаимодействия с пластиком пробирок типа Falcon. Модификация метода количественного определения H_2O_2 в КВВ клинически здоровых людей и пациентов с диагностированным раком легкого была осуществлена с помощью высокочувствительного реагента Amplex® Ultra Red. Охлаждение собирательной пробирки во время сбора КВВ приводило к минимизации потерь перекиси водорода, вызванных адсорбционными и реакционными процессами, связанными с пластиковой поверхностью пробирки. По сравнению с ранее используемыми методами,

модифицированный метод является наиболее точным подходом к измерению концентрации H_2O_2 . Установлено, что у пациентов с диагностированным раком легкого уровень H_2O_2 в КВВ 9 раз выше, чем у здоровых добровольцев. Полученные данные свидетельствуют о том, что концентрация H_2O_2 в КВВ может являться потенциальным маркером для ранней диагностики рака легкого.

Исследование выполнено при финансовой поддержке РФФИ в рамках научного проекта № 17-29-06036 офи_м.

Список литературы/References

1. Konstantinidi E.M., Lappas A.S., Tzortzi A.S., Behrakis P.K., *The Scientific World Journal*, 2005, pp. 1-25.
2. Morozov V.N., Mikheev A.Y., Shlyapnikov Y.M., Nikolaev A.A. et al., *J Breath Res.*, 2017, Vol. 12, No 1, pp. 017103.
3. Ganeev A.A., Gubal A.R., Lukyanov G.N., Arseniev A.I. et al., *Russ. Chem. Rev.*, 2018, Vol. 87, No 9, pp. 904-921.
4. Nagaraja C., Shashibhushan B.L., Sagar Asif M., Manjunath P.H., *Lung India*, 2012, Vol. 29, № 2. pp. 123 – 127.
5. Trischler J., Merkel N., Könitzer S., Müller C.M., Unverzagt S., *Lex C. // Respir Res.* Vol. 14. No 1, pp. 1-7.
6. Vergara D., Ávila D., Escobar E., Carrasco-Pozo C. Et al., *Nutr J.*, 2015, Vol. 14, No 27, pp. 1-5.
7. Riccelli M.G., Goldoni M., Andreoli R., Mozzoni P. et al., *Toxicol Lett.*, 2018, Vol. 292, pp. 108-114.
8. Chan H.P., Tran V., Lewis C., Thomas P.S., *J Thorac Oncol.*, 2009, Vol. 4, No 2, pp. 172-178.
9. Krawczyk A., Nowak D., Nowak P.J., Padula G. et al., *Redox Rep.*, 2017, Vol. 22, No 6, pp. 308-314.
10. Vasiliou E.G., Makarovska Ya.M., Pneumatikos I.A., Lolis N.V. et al., *Braz. Chem. Soc.*, 2007, Vol. 18, No 5, pp. 1040-1047.
11. Dikalov S., Griendling K.K., Harrison D.G., *Hypertension*, 2007, Vol. 49, No 4, pp. 717-727.
12. Ruch R.J., Cheng S.J., Klaunig J.E., *Carcinogenesis*, 1989, Vol. 10, No 6, pp. 1003-1008.
13. Fernando C.D., Soysa P., *MethodsX*, 2015, Vol. 2, pp. 283-291.
14. Debski D., Smulik R., Zielonka J., Michałowski B. et al., *Free Radic Biol Med.*, 2016, Vol. 95, pp. 323-332.
15. Cadenas E., Packer L., *Methods Mol Biol.*, 2013, Vol. 526, P. 195.
16. Wong H.S., Monternier P.A., Orr A.L., Brand M.D., *Methods Mol Biol.*, 2018, Vol. 1, pp. 287-299.
17. Selemenev V.F., Rudakov O.B., Slavinskaja G.V., Drozdova N.V. Pigmenty pishhevyh proizvodstv (melanoidins), M., DeLiprint, 2008, 246 p.
18. Shytikov S.N., Sumina E.G., Smushkina E.V., Tyurina N.V., *J. Planar Chromatogr.*, 1999, Vol. 12, No 2, pp. 129-133.
19. Liou G.Y., Storz P., *Free Radic Res.*, 2010, Vol. 44, No 5, pp. 479-496.

Гуреев Артем Петрович – ассистент кафедры генетики, цитологии и биоинженерии медико-биологического факультета ВГУ, Воронеж

Луценко Наталья Андреевна – магистр 2 года обучения кафедры генетики, цитологии и биоинженерии медико-биологического факультета ВГУ, Воронеж

Хорольская Виктория Георгиевна – студентка кафедры генетики, цитологии и биоинженерии медико-биологического факультета ВГУ, Воронеж

Сержантова Ольга Викторовна – врач лабораторной диагностики Воронежского областного клинического онкологического диспансера, Воронеж; аспирант кафедры генетики, цитологии и биоинженерии медико-

Gureev Artem P. – assistant, Department of Genetics, Cytology and Bioengineering, Faculty of Medicine and Biology, VSU, Voronezh

Lutsenko Natalya A. – student, Department of Genetics, Cytology and Bioengineering, Faculty of Medicine and Biology, VSU, Voronezh

Khorolskaya Victoria G. – student, Department of Genetics, Cytology and Bioengineering, Faculty of Medicine and Biology, VSU, Voronezh

Serzhantova Olga V. – doctor of laboratory diagnostics of the Voronezh Regional Clinical Oncology Center, Voronezh; Postgraduate Student, Department of Genetics, Cytology and Bioengineering, Faculty of Medicine and Biology, VSU,

биологического факультета ВГУ, Воронеж

Михайлов Андрей Анатольевич – к.м.н., врач высшей категории, заместитель главного врача по хирургии Воронежского областного клинического онкологического диспансера, Воронеж

Мошуров Иван Петрович – д.м.н., главный врач Воронежского областного клинического онкологического диспансера, Воронеж

Попов Василий Николаевич – д.б.н., профессор, заведующий кафедры генетики, цитологии и биоинженерии медико-биологического факультета ВГУ, Воронеж; ректор ВГУИТ, Воронеж

Voronezh

Mikhailov Andrey A. – PhD medical sciences, doctor of the highest category, deputy chief doctor for surgery of the Voronezh Regional Clinical Oncology Center, Voronezh

Moshurov Ivan P. – Doctor of Medical Sciences, chief physician of the Voronezh Regional Clinical Oncology Center, Voronezh

Popov Vasily N. – Doctor of Biological Sciences, Professor, Head of the Department of Genetics, Cytology and Bioengineering, Faculty of Medicine and Biology, VSU, Voronezh; Rector of VSUET, Voronezh