

BIOINFORMATICS — INSTRUMENT INTERPRETATION PROTEOMIC PROFILES OF MEAT PROTEIN

БИОИНФОРМАТИКА — ИНСТРУМЕНТ ИНТЕРПРЕТАЦИИ ПРОТЕОМНЫХ ПРОФИЛЕЙ БЕЛКОВ МЯСА

Vostrikova N.L., Chernukha I.M.

The V.M. Gorbатов All-Russian Meat Research Institute, Moscow, Russia

Ключевые слова: биоинформатика, протеомика, белки, базы данных, двумерный электрофорез, протеомный профиль белка.

Keywords: bioinformatics, proteomics, protein database, two-dimensional electrophoresis, protein proteomic profile.

Аннотация

Протеомные технологии оказались весьма эффективными для выявления в мясных продуктах биохимических изменений, таких как изменения термоустойчивых и видоспецифичных белков, способных стать соответствующими биомаркерами. В работе, представленной в данном обзоре (в период с 2013–2016 гг), с помощью протеомных технологий в исследуемых образцах мяса и в специально выработанных мясных изделиях, было определено несколько тканеспецифичных белков, которые были определены как индивидуальные биомаркеры при контроле мясных изделий.

Существование огромного количества разнообразных белков привело к необходимости создания информационных массивов — баз (или банков) данных. В настоящее время существует множество общих и специализированных баз данных, которые доступны в Интернете каждому желающему. При исследовании протеомных профилей белков, многие ученые останавливаются на этапе получения двумерных электрофореграмм, не имея порой даже представления о дальнейших перспективах использования современных инструментальных и биоинформационных ресурсов, позволяющих подтвердить или опровергнуть их гипотезы, а порой просто идентифицировать. В данной статье представлена цепочка действий, позволяющих пройти путь от получения профиля белков на геле, до конкретной интерпретации полученного результата. Выполнение исследований в данном направлении позволило сформулировать и значительно расширить подходы к идентификации и количественному определению белковых маркеров качества, функциональности и безопасности мясного сырья (выявления фальсификации) в готовых мясных продуктах. По полученным данным систематизирована информация с помощью методов биоинформатики, позволившая создать уникальный Атлас «Протеомные профили белков мяса сельскохозяйственных животных».

Введение

Существование огромного количества разнообразных белков привело к необходимости создания информационных массивов — баз (или банков) данных, в которые заносились бы все известные о них сведения. В настоящее время существует множество общих и специализированных баз данных, которые доступны в Интернете каждому желающему.

В общих базах содержатся сведения обо всех известных белках живых организмов, т.е. о глобальном протеоме всего живого. Примером такой базы явля-

Abstract

Proteomic technologies have proven very effective for detection in meat products of biochemical changes, such as changes in heat resistant and species-specific proteins that could be relevant biomarkers.

In the work presented in this report (for the period of 2013–2016), several tissue-specific proteins were detected in the samples of meat and specially developed meat products using proteomic technologies and identified as individual biomarkers in meat product control.

The existence of a large number of different proteins resulted in the need to create information arrays — databases (or banks). Currently, there are a number of general and specialized databases that are available online to anyone interested. When studying protein proteomic profiles, many scientists stop at the stage of two-dimensional electrophoregrams sometimes even without ideas about the future prospects of using modern instruments and bioinformation resources to confirm or refute their hypotheses, and sometimes just to identify. This overview shows the chain of actions that allows going from profiling proteins in the gel to a specific interpretation of the results. Studies in this field have enabled formulating and significantly expanding the approaches to the identification and quantification of protein markers of quality, functionality and safety of meat raw material (detection of falsification) in the finished meat products. Based on the obtained data, the information was systematized using bioinformatics techniques with creation of the unique Atlas «Proteomic profiles of farm animal meat proteins.»

Introduction

The existence of a huge number of different proteins has led to the necessity of creating information arrays, i.e. databases, for entering all known information about them. At present, there are many general and specialized databases, which are available to everyone through the Internet.

The general databases contain information about all known proteins of living organisms, i.e., about the global proteome of all living things. An example of such database

ется SwissProt-TrEMBL (Швейцария–Германия), в которой на сегодняшний день содержатся структуры почти 200 000 белков, установленные аналитическими методами, и еще почти 2 млн структур, которые определены в результате трансляции с нуклеотидных последовательностей [1].

В глобальном протеоме особое место занимают небольшие очень подвижные молекулы, содержащие не более 50 аминокислотных остатков и обладающие специфическим спектром функциональной активности. Они называются олигопептидами, или просто пептидами. Для них, т.е. для глобального пептидома, создан особый банк данных, который называется EROP-Moscow. Это название представляет собой аббревиатуру от термина Endogenous Regulatory OligoPeptides (эндогенные регуляторные олигопептиды), и указывает на то, что банк создан и базируется в столице нашей страны [2].

На сегодняшний день расшифрована структура почти 6000 олигопептидов, выделенных из представителей всех царств живого. Однако следует отметить, что, ввиду огромного структурного и функционального разнообразия, как белков, так и пептидов, для них до сих пор не создано строгой классификации.

Таким образом, в данном случае задачами биоинформатики являются накопление информации о физико-химических и биологических свойствах белков, анализ этой информации, каталогизация и подготовка информационной базы и вычислительных средств для выявления механизмов их функционирования [3]. Протеомика — последовала за геномикой. Когда был частично расшифрован геном человека, возникли, так называемые постгеномные технологии. Они так называются потому, что основываются на информации, обнаруженной в геноме. Расшифровка генома человека, представляющего собой огромную матрицу, где содержится вся информация о человеке и о каждой клетке его организма, — длительное, мучительное и даже неблагодарное занятие. Это чисто механическая работа, которая идет до победного конца, а концом является просто перечень букв, огромный список, книга с буквами и всё. Всё остальное — это уже дальнейшее, «постгеномика».

Изучением и расшифровкой генетической информации в высокопроизводительном масштабе занимается геномика. Данные ее исследований позволили приступить к изучению РНК и белка, которые находятся уже «за» геномом. Нужно при этом понимать, чем геномика отличается от генетики. Если генетика — это изучение частного, то геномика — изучение всего генетического материала (геном — его совокупность).

О протеомике, которая занимается инвентаризацией белков, впервые заговорили за рубежом в середине 90-х гг. Ее основной метод — определение совокупности белков в каких-то образцах и одновременно срав-

is SwissProt-TrEMBL (Switzerland –Germany), which currently contains the structures of almost 200,000 proteins detected by the analytical methods and about 2 million structures, which were determined as a result of nucleotide sequence translation. [1].

A special place in the global proteome is occupied by very mobile small molecules that contain no more than 50 amino acid residues and have specific spectra of functional activity. They are called oligopeptides or simply peptides. For them, i.e., for the global peptidome, a specific data bank EROP-Moscow was created. This name is an abbreviation of the term Endogenous Regulatory OligoPeptides and indicates that the bank was created and is located in the capital of our country [2].

Up to date, the structure of approximately 6000 oligopeptides isolated from representatives of all biological kingdoms has been deciphered. However, it is necessary to note that due to the huge structural and functional variability of both proteins and peptides, their strict classification has not been developed to the present day.

Therefore, in this case, the objectives of bioinformatics are accumulation of knowledge about physico-chemical and biological properties of proteins, analysis of this information, cataloguing and preparation of an information base and computation tools to establish the mechanisms of their function [3]. Proteomics followed the genomics. When the human genome was partly deciphered, the so-called post-genomic technologies emerged. They were given this term because they are based on information revealed in the genome. The decryption of the human genome, which represents an enormous matrix containing all information about humans and each cell of their organism, is time-consuming, torturous and even thankless task. It is purely mechanical work, which is performed up to the bitter end and the result is simply a list of letters, a huge list, a book with letters and nothing more. Everything else is the following — postgenomics.

Genomics deals with the research and decryption of the genetic information in the high-throughput scale. The data from its studies make it possible to approach to the analysis of RNA and proteins, which are beyond the genome. With that, it is necessary to understand that genomics is different from genetics. While genetics is a study of particulars, genomics is a study of the whole genetic material (genome is its complex).

Proteomics, which deals with protein «inventories», was talked about for the first time abroad in the middle of the 1990s. Its main method is detection of protein sets in some samples and then comparison of these sets with

нение этих комплексов с другими образцами. Очень важно знать, какие белки экспрессируются в клетках, например, патологических организмов. Вообще, особенностью многоклеточных животных является то, что геном их клеток похож, а сами клетки не похожи: эпителиальные, кровяные, клетки печени и т.д. Вот эту загадку — почему во всех клетках геном плюс-минус одинаковый, а клетки все разные — и необходимо разрешить с помощью постгеномных технологий. Основными задачами и геномики, и протеомики является технологическое составление базы данных [4].

Биоинформатика — наука, занимающаяся изучением биологической информации с помощью математических, статистических и компьютерных методов с использованием вычислительной техники, математики и информационной теории для анализа и моделирования молекулярно-биологических систем, в особенности систем, состоящих из генов, РНК, белков и метаболитов и др. Но прежде, чем подробнее остановиться на информационных ресурсах биоинформатики немного познакомимся с практической протеомикой [5].

Итак, главной задачей протеомики является выявление механизма взаимодействия огромного числа белков и пептидов в одном организме. Какова же практическая значимость этой грандиозной и дорогостоящей работы? Очевидно, что в первую очередь в результатах такой работы заинтересованы фармакологи и медики, поскольку очень часто прослеживается тесная связь между изменениями в белковом составе и болезненным состоянием человека. Поэтому новые данные в протеомике будут использоваться (и уже используются) для быстрой разработки новых лекарственных средств и новейших методов лечения болезней, с которыми медицина боролась веками. На сегодняшний день 95% всех фармакологических средств воздействуют на белки. Протеомика со своим системным подходом может помочь идентифицировать и оценить важность появления новых белков гораздо эффективнее, что, в свою очередь, ускорит разработку новых диагностических тестов и терапевтических средств.

Первое практическое применение протеомных исследований состоялось задолго до появления термина «протеомика», еще в начале XX в., когда была обнаружена роль инсулина в развитии такого тяжелого заболевания, как диабет. Создание инсулиновых препаратов спасло жизнь миллионам людей.

В настоящее же время протеомика, вместе с геномикой и биоинформатикой, ориентирована на создание новых лекарственных препаратов, в которых молекулярными мишенями будут служить те или иные белки. Процесс нахождения новых мишеней для действия лекарств решается с помощью биоинформатики, причем объектом анализа является геном. Однако после анализа генома необходимо получить доказательства того, что данный белок интенсивно

other samples. It is very important to know what proteins are expressed in cells of pathological organisms, for example. In general, the peculiarity of the multicellular animals is the fact that the genome of their cells is similar, but the cells (epithelial, blood, hepatic etc.) are not. This puzzle — why the genome is similar in all cells and cells are different — is necessary to solve using postgenomic technologies. The main tasks of both genomics and proteomics are technological development of databases [4].

Bioinformatics is a science that study the biological information by the mathematical, statistical and computer methods using computational apparatus, mathematics and information theory for analysis and modeling of molecular-biological systems, in particular, systems consisting of genes, RNA, proteins, metabolites and so on. However, before discussing the information resources of bioinformatics in more detail, let's get acquainted, to some extent, with practical proteomics [5].

The main task of proteomics is detecting a mechanism of a relationship of multiple proteins and peptides in a single organism. What is the practical significance of this tremendous and expensive work? It is obvious that mainly pharmacists and medical practitioners are interested in results of this work because a close relationship between changes in the protein composition and a human disease is often traced. Thus, new data in proteomics will be used (and have been already used) for quick development of new drugs and methods for curing diseases, with which medicine has been fighting for centuries. At present, 95% of all pharmacological preparations affect proteins. Proteomics with its systematic approach can help identify and assess the significance of emergence of new proteins much more effectively, which in turn, will accelerate the development of new diagnostic tests and therapeutic preparations.

The proteomic investigations were applied in practice for the first time much earlier than the term «proteomics» appeared, already at the beginning of the 20th century, when the role of insulin in the development of such serious disease as diabetes was discovered. The development of the insulin preparations saved the lives of millions of people.

Nowadays, proteomics, along with genomics and bioinformatics, is oriented at creation of new drugs, which molecular targets will be various proteins. A process of finding new targets for drug action is solved using bioinformatics, and the object of the analysis is a genome. However, after the genome analysis, it is necessary to obtain an evidence

экспрессируется и находится в клетке в рабочем состоянии. Эту задачу решает протеомика. Таким образом, выявляется молекулярная генетическая мишень для лекарства.

Следует отметить, что протеомика может и сама по себе решать проблему нахождения мишени. Если получить протеомные карты нормальных и патологических тканей, то по различиям в них можно установить, какие белки важны для развития того или иного патологического состояния, и выбрать их в качестве мишеней или использовать эти знания для диагностики. Можно предположить, что в будущем к обычному анализу крови добавится создание протеомных карт крови. Для этого в поликлиниках необходимо будет использовать специальное оборудование, с помощью которого у пациентов периодически будут брать кровь. При возникновении болезненного состояния протеомную карту больного человека нужно будет всего лишь сравнить с его же протеомной картой, но составленной в то время, когда он был здоров, и можно будет выявить произошедшие изменения в белковом составе крови и определить причину заболевания. Подобное сравнение протеомов опухолевых и нормальных клеток, клеток до и после воздействия определенных факторов (например, физических или химических), использование биологических жидкостей в диагностических целях — все это представляет огромный интерес и открывает совершенно новые перспективы для медицины, ветеринарии, фармакологии, пищевой промышленности и других прикладных областей [6, 7]. Применение протеомных технологий в лабораторной практике пищевых направлений нашло свое место сравнительно недавно. Поэтому впереди предстоит огромная и интересная работа.

Материалы и методы

Для более полного понимания применения ресурсов биоинформатики рассмотрим общий алгоритм исследования протеомного профиля белков мяса.

Типичная последовательность операций при протеомных исследованиях такова:

- отбор образца (клетки, ткань, биологическая жидкость),
- приготовление образца, лизис клеток, экстракция белков,
- изоэлектрофокусировка, электрофорез в 1-м направлении,
- электрофорез в 2-м направлении, полиакриламидный гель, додецилсульфат натрия,
- проявление белковых пятен на геле,
- анализ двумерной электрофореграммы (количество пятен, их расположение),
- выделение участков геля, содержащих индивидуальные белковые пятна,
- расщепление индивидуальных белков трипсином прямо в геле,

that this protein is intensively expressed and presents in a cell in a working condition. This task is solved by proteomics. In this way, the molecular genetic target for a drug is revealed.

It is worth noting that proteomics per se can solve the problem of target detection. If one obtains the proteomic maps of normal and pathological tissues, then it will be possible to detect which proteins are important for developing one or another pathological condition and select them as targets or use this knowledge for diagnostics. We can suggest that, in the future, the conventional blood analysis will be complemented with blood proteomic maps. To this end, it will be necessary to use in clinics specific equipment for periodical blood sampling from patients. At disease onset, proteomic maps of patients will be compared with their proteomic maps when they were healthy, and it will be possible to reveal changes in the blood protein composition and detect a cause of a disease. A similar comparison of proteomes of malignant and normal cells, cells before and after exposure to specific factors (for instance, physical or chemical) and the use of biological fluids with the diagnostic purposes are of utmost interest and open completely new prospects for medicine, veterinary medicine, pharmacology, food industry and other applied fields [6, 7]. The application of proteomic technologies in the laboratory practice of food directions has found its place comparatively recently. Thus, a tremendous and interesting work is ahead.

Materials and methods

For more thorough understanding of the use of bioinformatics resources, let's examine the general algorithm for studying meat protein proteomic profile.

The typical workflow in the proteomic investigations consists of the following:

- Sampling (cell, tissue, biological fluid),
- Sample preparation, cell lysis, protein extraction,
- Isoelectrofocusing, electrophoresis in the first dimension,
- Electrophoresis in the second dimension, polyacrylamide gel, sodium dodecyl sulfate,
- manifestation of protein spots in a gel,
- analysis of a two-dimensional gel electropherogram (number of spots, their location),
- excision of the gel areas containing individual protein spots,
- tryptic digestion of individual proteins directly in a gel,

- масс-спектрометрический анализ:
 - определение аминокислотных последовательностей фрагментов индивидуальных белков,
 - идентификация каждого белка и измерение его концентрации, документирование, обработка результатов.
 - интерпретация полученных данных с помощью биоинформатики, анализ баз данных, в итоге, получение дифференциального профиля белков.

Результатом масс-спектрометрической идентификации белковых молекул является список потенциальных белков-кандидатов, ранжированных в соответствии со значением показателя Score (показатель соответствия или «счет очков»), рассчитанного для каждого потенциального кандидата. Результат считается достоверным, если значение данного показателя превышает 200. Также, для каждого из кандидатов, указаны видовая принадлежность, что может стать решающим при интерпретации, и ссылки на персональные страницы (итоговый результат), содержащие исчерпывающую информацию о потенциальном белке (значения его молекулярной массы и изоэлектрической точки, расшифровка последовательности триптических пептидов, число совпадений, % покрытия полной аминокислотной последовательности белка выявленными пептидами и т.д.).

В качестве основных протеомных технологий применяют двумерный электрофорез (2-D) по O'Farrell с изоэлектрофокусированием в амфолиновом (IEF-PAGE) или иммобилиновом (IPG-PAGE) градиентах pH; последующую детекцию белков проводят окрашиванием Кумасси R-250 и азотнокислым серебром [8, 12].

Схематично это можно представить следующим образом (Рисунок 1).

Идентификацию белковых фракций на двумерных электрофореграммах (ДЭ) осуществляют после трипсинолиза методами MALDI-TOF MS и MS/MS масс-спектрометрии на MALDI- времяпролетном масс-спектрометре с УФ-лазером (336 нм) в режиме положительных ионов в диапазоне масс 500–1000 Да с калибровкой их по известным пикам аутолиза трипсина (Рисунок 2).

После идентификации на масс-спектрометре искомого белка (маркера), на завершающем этапе главную роль играет правильная интерпретация полученных масс-спектров, по имеющимся базам данных (пример Рисунок 3), с подтверждающими или опровергающими догадками о полученном результате.

Обсуждение

Рассмотрим пример идентификации кандидатного белка (искомого/маркера) лошади по международной базе данных Национального центра биотехнологической информации США (NCBI).

Суммарно в ходе исследования на двумерных электрофореграммах белков длинной мышцы лошади было идентифицировано 61 фракция (Рисунок 4).

- mass spectrometric analysis,
 - detection of amino acid sequences of the individual protein fragments,
 - identification of each protein and measurement of its concentration, documentation and data processing.
 - interpretation of the obtained data using bioinformatics, analysis of databases, and, finally, generation of distinct protein profiles.

The result of the mass-spectrometric identification of protein molecules is a list of potential candidate proteins ranged according to a Score value (an indicator of matches or scoring), calculated for each potential candidate. The result is considered significant if the value of this indicator is higher than 200. For every candidate, a species origin is also indicated, which can be decisive in interpretation, and references to the personal pages (the final result), which contain comprehensive information about a potential protein (its molecular weight and isoelectric points, decryption of the tryptic peptide sequences, the number of matches, % of complete coverage of amino acid sequence of a protein by peptides etc.)

The two-dimensional electrophoresis (2DE) by O'Farrell with isoelectrofocusing in ampholine (IEF-PAGE) or immobiline (IPG-PAGE) pH gradients is used as the main proteomic technology; the following protein detection is carried out by staining with Coomassie R-250 and silver nitrate [8, 12].

This can be presented schematically as follows (Fig. 1):

Identification of protein fractions on two-dimensional electrophoregrams (2DE) is performed after tryptic proteolysis by MALDI-TOF MS and MS/MS mass-spectrometry using MALDI- TOF mass-spectrometer with UV-laser (336 nm) in the positive ion mode and a mass range of 500–1000 Da with their calibration according to the known trypsin autolysis peaks (Fig. 2).

At the final stage, after identification on a mass-spectrometer of a target protein (marker), the main role plays correct interpretation of the obtained mass-spectra using available databases (Fig. 3, an example) with confirming or refuting suggestions about the obtained result.

Discussion

Let's consider an example of identification of an equine candidate protein (target/marker) using the International Base of the National Center for Biotechnology Information (NCBI).

In total, 61 fractions were identified on the two-dimensional electrophoregrams of proteins from the equine longissimus muscle (Fig. 4).

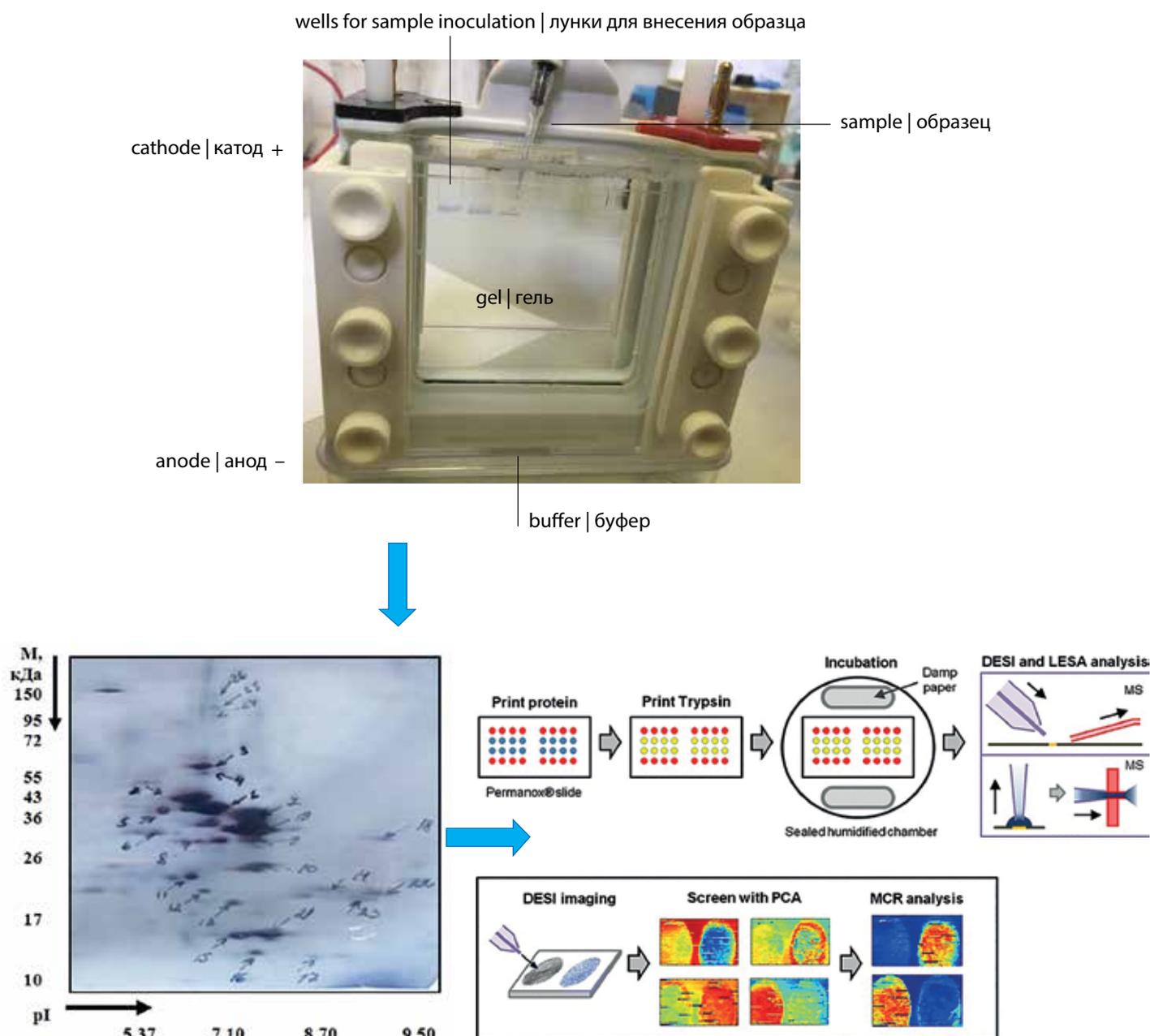


Figure 1. Scheme of 2-D electrophoresis with the following identification of protein spectra using time-of-flight mass-spectrometry (MALDI-TOF)

Рис. 1. Схема проведения 2-D электрофореза с последующей идентификацией спектров белков при помощи метода время-пролетной масс-спектрометрии (MALDI-TOF)

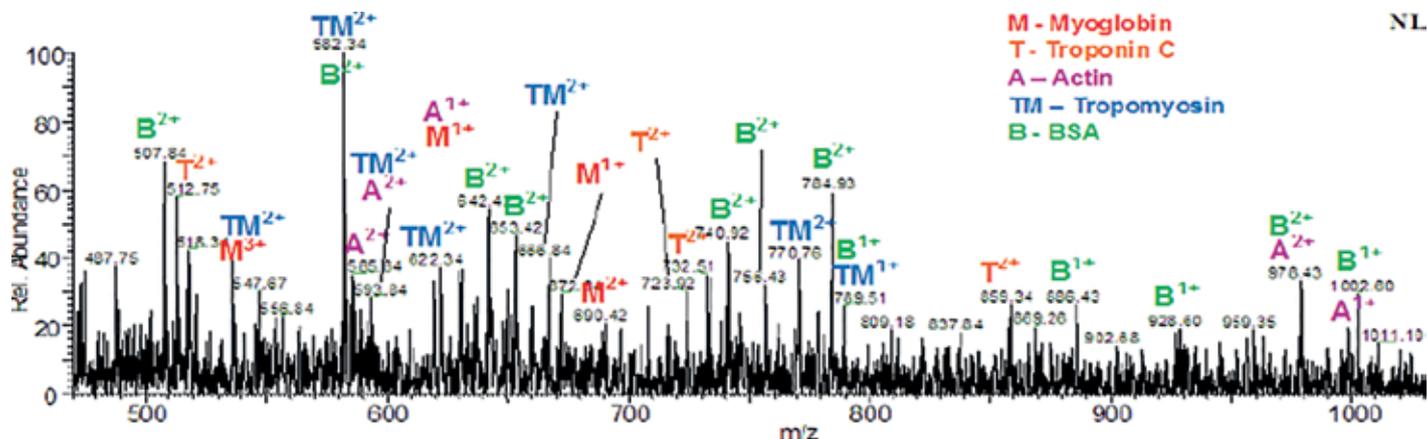


Figure 2. Mass-spectrometric identification of the selected peptide (marker/target)

Рис. 2. Масс-спектрометрическая идентификация выбранного пептида (маркера/искомого)

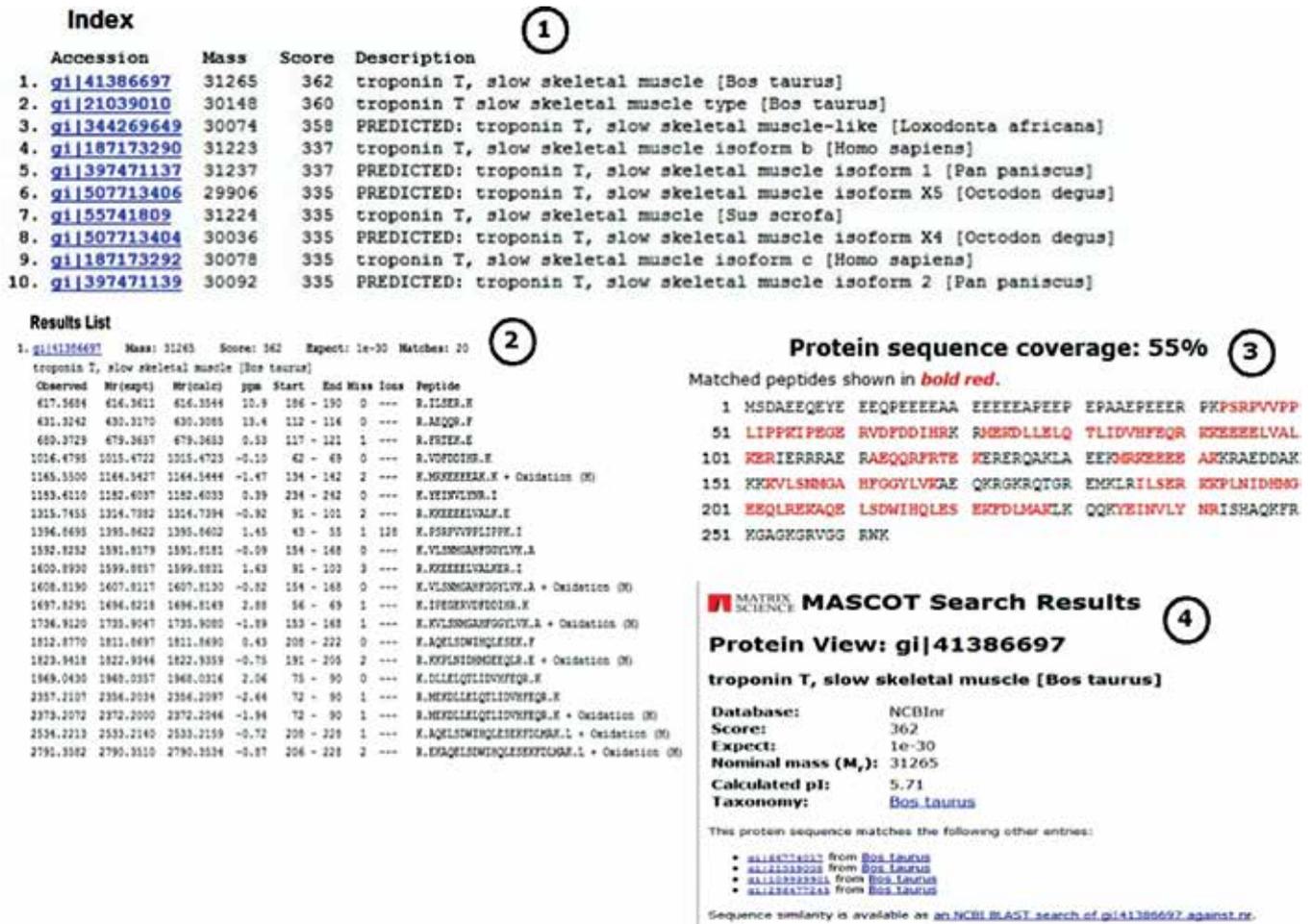


Figure 3. Identification of a protein using the database of the National Center for Biotechnology Information (NCBI) (USA) (Mascot software, Matrix Science, USA)

(1 — a list of potential candidate proteins; 2 — decryption of tryptic peptide sequences with determination of the number of matches; 3 — distribution of the revealed peptides on an amino acid sequence; 4—final result).

Рис.3. Идентификация белка по международной базе данных Национального центра биотехнологической информации США (NCBI) (программа Mascot«MatrixScience», США)

(1 — список потенциальных белков-кандидатов; 2 — расшифровка триптических пептидов с определением числа совпадений; 3 — распределение выявленных пептидов по аминокислотной последовательности; 4—итоговый результат). Не могу убрать этот рисунок он очень наглядно отображает работу по базе данных-как одним из ключевых элементов биоинформатики.

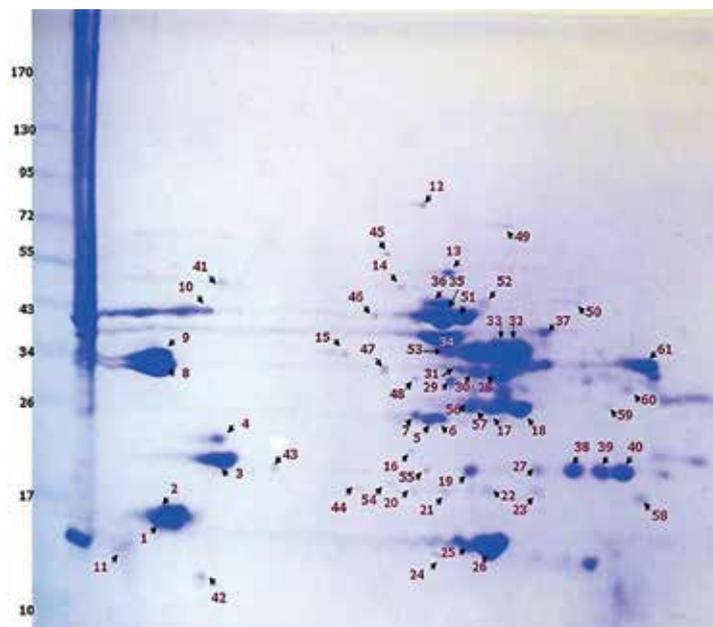


Figure 4. The results of the proteomic analysis of total proteins from equine *m. Longissimus dorsi* (*Equus caballus*)

Рис.4. Результаты протеомного анализа суммарных белков *m. Longissimus dorsi* лошади (*Equus caballus*)

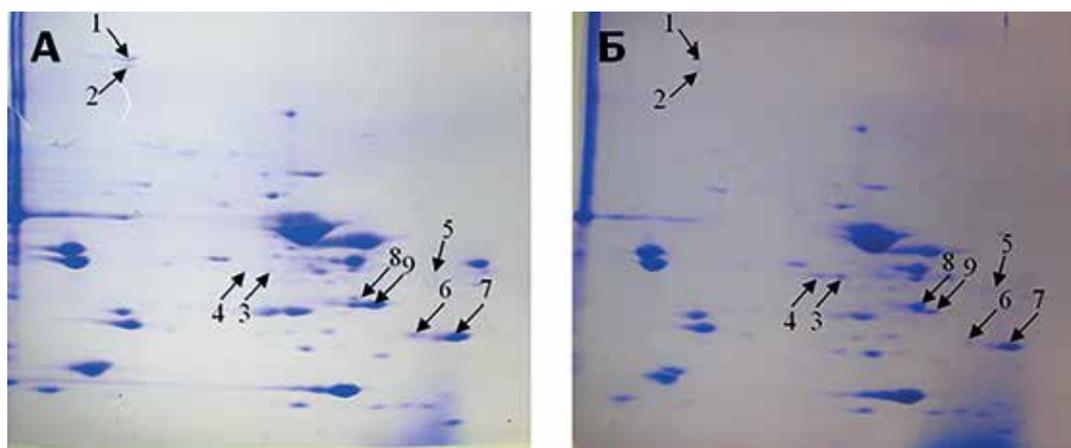


Figure 5. Proteomic profiles of *m. Triceps brachii* (A) and *m. Biceps femoris* (B) of *Equus caballus*

Рис. 5. Протеомные профили *m. Triceps brachii* (A) и *m. Biceps femoris* (B) *Equus caballus*

Различные виды скелетных мышц имеют определенные особенности в белковом составе. Наиболее полно исследования, затрагивающие данный аспект, представлены по тканям человека, а что касается тканей с/х животных, информации явно недостаточно [8]. С целью поиска данных особенностей, было проведено сравнение белкового состава трехглавой мышцы плеча (*m. Triceps brachii*) и двуглавой мышцы бедра (*m. Biceps femoris*) домашней лошади. В результате найден ряд количественных отличий (Рисунок 5).

Результаты идентификации показали (Табл. 1), что основные различия наблюдались по таким белковым

Different types of skeletal muscles have specific characteristics of the protein composition. The most comprehensive investigations concerning this aspect are presented for human tissues; as for the tissues of farm animals, the information is clearly insufficient [8]. To establish these specific characteristics, the protein composition of the triceps brachii muscle (*m. Triceps brachii*) and biceps femoris muscle (*m. Biceps femoris*) of domestic horses was compared. As a result, several quantitative differences were found (Fig. 5).

The results of identification (Table 1) showed that the main differences were observed for such protein fractions

Table 1. Results of the mass-spectrometric identification (MALDI-TOF MS and MS/MS) of protein fractions that differed in quantity in *m. Triceps brachii* and *m. Biceps femoris* (*Equus caballus*)

Таблица 1. Результаты масс-спектрометрической идентификации (MALDI-TOF MS и MS/MS) белковых фракций, отличающихся по количеству в *m. Triceps brachii* и *m. Biceps femoris* (*Equus caballus*)

№	Protein; certain synonyms, (<i>gene symbol</i>) Наименование белка; некоторые синонимы, (<i>символ гена</i>)	Numbers in Protein NCBI* Номера в Protein NCBI*	S / M/ C **	Мм/pI (exper.) Мм/pI (эксп.)	Мм/pI (calcul.)*** Мм/pI (расчет.)***
1	C-terminal fragment of myosin-1 (<i>MYH1</i>), [<i>Equus caballus</i>] (563–1938) C — концевой фрагмент myosin-1 (<i>MYH1</i>) [<i>Equus caballus</i>] (563–1938)	126352470	402/81/35	130,0/5,10	222,0/5,59
2	myosin-7 (<i>MYH7</i>) [<i>Equus caballus</i>]	1263523320	389/77/40	127,0/5,05	223,0/5,57
3	troponin T homolog, slow skeletal muscle isoform X1 (<i>TNNT1</i>) [<i>Sus scrofa</i>] Гомолог troponin T, slow skeletal muscle isoform X1 (<i>TNNT1</i>) [<i>Sus scrofa</i>]	545832797	254/48/64	29,0/6,70	32,5/5,54
4	troponin T homolog, slow skeletal muscle isoform X1 (<i>TNNT1</i>) [<i>Sus scrofa</i>] Гомолог troponin T, slow skeletal muscle isoform X1 (<i>TNNT1</i>) [<i>Sus scrofa</i>]	545832797	336/50/66	29,0/6,50	32,5/5,54
5	myozenin-1 (<i>MYOZ1</i>) [<i>Equus caballus</i>]	14968997	203/23/62	32,0/8,30	31,7/7,85
6	troponin I homolog, fast skeletal muscle (<i>TNNI2</i>) [<i>Equus asinus</i>] гомолог troponin I, fast skeletal muscle (<i>TNNI2</i>) [<i>Equus asinus</i>]	958805655	478/63/86	40,0/8,10	21,4/8,86
7	troponin I homolog, fast skeletal muscle (<i>TNNI2</i>) [<i>Equus asinus</i>] гомолог troponin I, fast skeletal muscle (<i>TNNI2</i>) [<i>Equus asinus</i>]	958805655	435/56/88	40,0/8,60	21,4/8,86
8	carbonic anhydrase 3	255653028	151/15/58	29,0/7,70	29,5/7,70
9	phosphoglycerate mutase 2 isoform X1	149704608	209/21/70	28,5/7,90	28,6/8,86

* Предсказаны по транскриптам или генам.

** S / M/ C — традиционные показатели идентификации, принятые в англоязычной литературе: Score — показатель соответствия или «счет очков»;

Matchpeptides — количество совпавших пептидов;
Coverage — % покрытия полной аминокислотной последовательности белка выявленными пептидами.

*** расчет показателей Мм/pI сделан по предсказанной аминокислотной последовательности по записи, удаленной из последней версии базы данных Protein NCBI.

* Predicted on the basis of transcripts or genes.

** S / M/ C — traditional indices for identification used in English literature:

Score — an indicator of matches or scoring;
Matchpeptides — The number of peptide spectrum matches;
Coverage — The percentage of the complete protein sequence covered by identified peptides.

*** Мм/pI were calculated on the basis of the predicted amino acid sequence according to the entry deleted in the latest version of the NCBI Protein database.

фракциям, как тяжелые цепи миозина (изменение соотношения электрофоретических изоформ № 1 и 2), количество медленного (№ 3 и 4) скелетномышечного тропонина Т, при том, что фракции быстрого скелетномышечного тропонина I (№ 6 и 7) не меняли своего соотношения. Также в двуглавой мышце бедра было отмечено значительное увеличение количества миозина-1 (№ 5), связывающего саркомерные белки в области Z-дисков и очень сильно менялось соотношение мышечной карбоангидразы и фосфолипазы (№ 8 и 9).

Построение двумерных карт скелетной мышцы лошади и формирование информационного модуля «Белки скелетной мышцы лошади»

Для построения двумерных карт белков скелетных мышц лошади было использовано электрофореграммы, окрашены как Кумасси R-250, так и нитратом серебра. Распределение белковых фракций на каждой из полученных двумерных электрофореграмм документировали в виде соответствующего изображения. Каждое изображение регистрировалось и сохранялось в виде графического файла формата *.tif. Полные изображения ДЭ и (в некоторых случаях) их отдельных участков получали по результатам сканирования и/или по данным цифровой фотографии.

Построенные карты, на которые были нанесены электронные «кнопки» для каждой идентифицированной белковой фракции, составили первый уровень для представления всех собранных материалов о белках скелетных мышц лошади и верблюда.

В соответствии с программой формирования модулей в БД для каждой электронной «кнопки» было сформировано на втором информационном уровне 21 поле и на третьем уровне — 27 полей для внесения данных, характеризующих идентифицированный белок.

На Рисунке 6 в качестве примера представлен информационный модуль «Белки скелетной мышцы лошади (*Equus caballus*)», состоящий из 3 основных уровней с графой авторской принадлежности полученных данных.

Количественный анализ отдельных белковых фракций

Для проведения количественного анализа отдельных белковых фракций на ДЭ сначала создавали полные цифровые изображения отобранных для сравнения двумерных электрофореграмм (или их отдельных фрагментов) с помощью сканера Epson Expression 1680 (или Perfection 2450 Photo). Сканирование проводилось во влажном состоянии. Далее полученные цифровые изображения редактировали в графическом редакторе из специализированного пакета программ Melanie ImageMaster, версий 6 и 7 («GeneBio», Швейцария).

as heavy myosin chains (changes in the ratio of the electrophoretic isoforms No.1 and 2), the quantity of slow (No. 3 and 4) skeletal muscle troponin T, while the fractions of the fast skeletal muscle troponin I (No. 6 and 7) did not change their ratio. In addition, it was found that the quantity of myozenin-1 (No.5), which links the sarcomeric proteins in the area of Z-disks, significantly increased and the ratio of muscle carbohydrazase and phosphoglycerate mutase (No. 8 and 9) highly changed.

Construction of two-dimensional maps of the equine skeletal muscle and creation of the information module «Proteins of the equine skeletal muscle»

To construct two-dimensional maps of the equine skeletal muscles, the electrophoregrams stained both with Coomassie R-250 and silver nitrate were used. Distribution of the protein fractions on each of the obtained two-dimensional electrophoregrams were documented as a corresponding image. Each image was registered and saved as an image file in the TIFF format.

The complete DE images and in some cases their individual areas were obtained on the basis of the scanning results and/or the digital photography data.

The constructed maps, on which the electronic «buttons» for each identified protein fraction were applied, comprised the first level for presentation of all collected information about the equine and camel skeletal muscle proteins.

According to the program of module creation, in the database, 21 fields and 27 fields were formed for each electronic «button» at the second and third information levels, respectively, to entry the data that characterized an identified protein.

As an example, Fig. 6 presents the information module «Proteins of the equine skeletal muscle (*Equus caballus*)», which consists of 3 main levels with indication of the authorship of the obtained data.

Quantitative analysis of individual protein fractions

For quantitative analysis of the individual protein fractions on DE, the complete digital images of the selected two-dimensional electoforegrams (or their individual fragments) were created using Epson Expression 1680 (or Perfection 2450 Photo) scanner. Scanning was carried out in a wet condition. Then, the obtained digital images were edited in the graphical editor from the specialized software package Melanie ImageMaster, versions 6 and 7 (GeneBio, Switzerland).

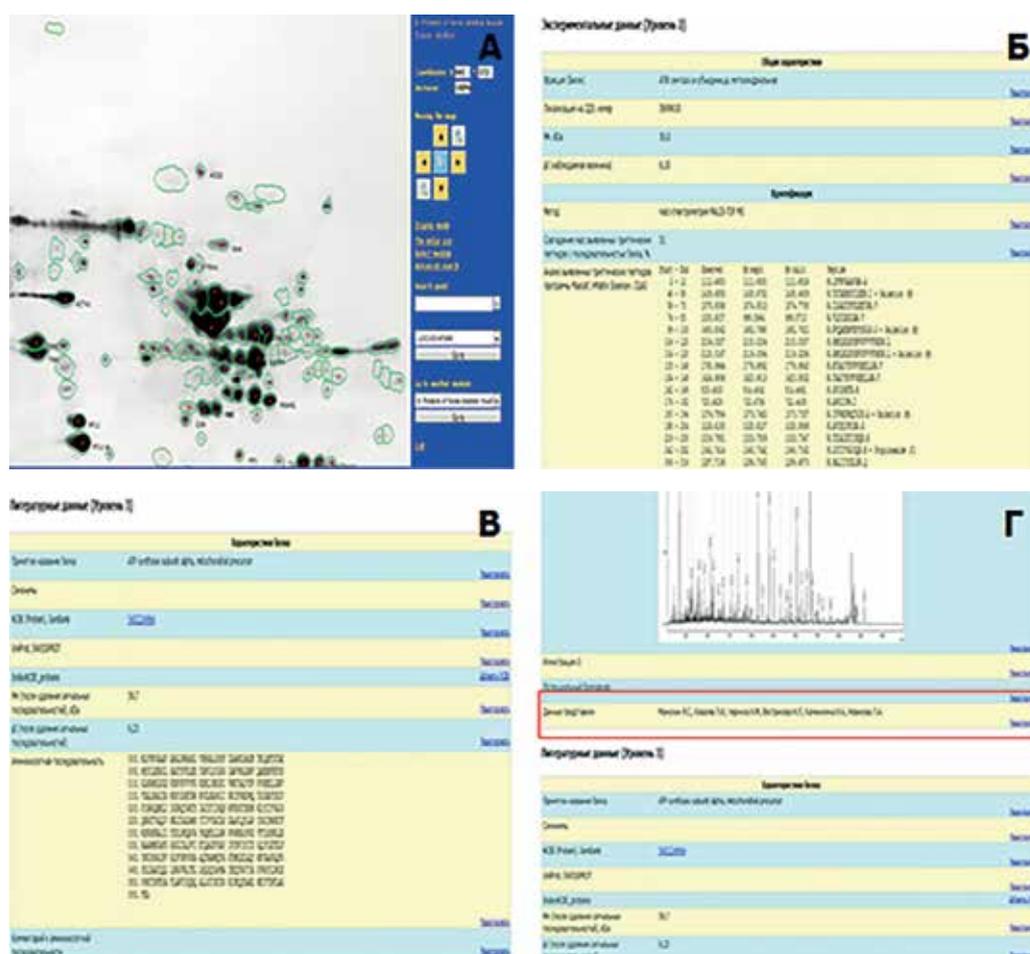


Figure 6. Information module «Proteins of the equine skeletal muscle»: А — level 1; Б — level 2; В — level 3; Г –author’s line

Рис. 6. Информационный модуль «Белки скелетной мышцы лошади»: А — 1 уровень; Б — 2 уровень; В — 3 уровень; Г — авторская графа

Дальнейшая процедура проходит в несколько этапов.

На первом этапе, проводился автоматический программный анализ гелей, в результате которого программа находит пятна и придает очертание по их окрашенной площади. Промежуточный результат такого компьютерного анализа представлен на (Рисунок 7).

The following procedure is performed in several stages.

At the first stage, an automatic program analysis of gels was carried out, which resulted in detecting spots by the program and drawing their contours according to the stained area. An intermediate result of this computer analyses is presented in Fig. 7.

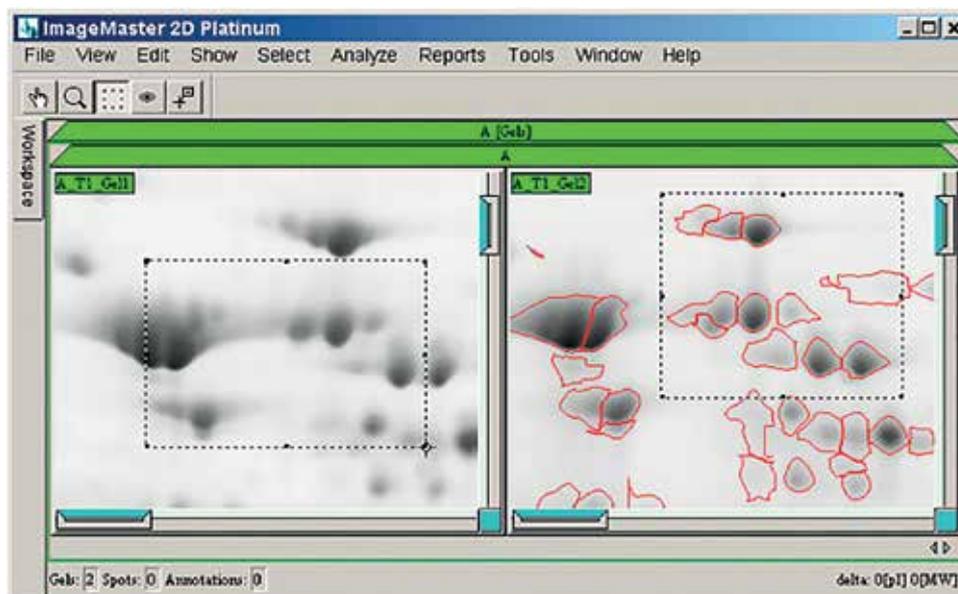


Figure 7. Automatic spot detection in the gel

Рис. 7. Автоматическое определение пятен на геле

Поскольку белковые фракции пятна имеют разную степень окраски, и могут сливаться с фоном, в программе задаются 3 параметра («Smooth», «Saliency», «Min Area») для выявления («identification») белковых фракций (пятен, «spots»). Окно настройки параметров автоматического обнаружения пятен и дополнительное окно «cursor information» показаны на Рисунке 8.

Параметр «Smooth», используя алгоритм диффузного сглаживания, обеспечивает идентификацию наиболее сильно выраженных пятен, а также четкость определения края пятна. Для того чтобы отделить слабо окрашенные пятна от фона и шума изменяется параметр «Saliency».

Изменяя данный параметр, можно обеспечить фильтрацию по интенсивности окрашивания пятен. Для точного определения интенсивности, необходимо вызвать дополнительное окно cursor information, после чего курсор мышки наводится на слабоокрашенное пятно и высвечивается его численный замер, который показывает разницу между фоном и интенсивно окрашенными пятнами.

Таким образом, задается промежуточное значение интенсивности пятен (между серым фоном и черными пятнами) благодаря которому будут учитываться все пятна, интенсивность которых выше этого порога.

Третий параметр «Min Area» задает минимальную площадь пятна, все пятна обладающей площадью ниже этого значения не будут идентифицированы. Несмотря на проведенную предварительную обработку изображений, программа иногда в отдельных участках изображения давала не совсем точные очертания пятна. Для устранения подобных недостатков форма отдельных пятен дополнительно корректировалась вручную.

As protein fractions of a spot have different degrees of staining and can blend into the background, the program sets 3 parameters (Smooth, Saliency, Min Area) to identify protein fractions (spots).

The window for adjusting parameters of spot automatic detection and the additional window «Cursor Information» are shown in Fig. 8.

Smooth parameter uses a smooth-by-diffusion algorithm and enables identification of the most highly pronounced spots as well as clear detection of spot edge.

Saliency parameter is used to separate weakly stained spots from the background and noise. By changing this parameter, it is possible to ensure filtration by the spot staining intensity. For precise detection of the intensity, it is necessary to open Cursor Information; after that, the cursor is moved to a weakly stained spot and its values are displayed, demonstrating the difference between the background and intensively stained spots.

Thus, an intermediate value of the spot intensity (between the grey background and black spots) is given, due to which all spots with the intensity higher than this threshold will be taken into account.

The third parameter «Min Area» sets the minimal spot area; all spots with areas lower than this value will not be identified. Despite the performed preliminary processing of images, the program sometimes gave not exactly precise spot contours in the individual areas. To eliminate such drawbacks, a shape of individual spots was additionally corrected by hand.

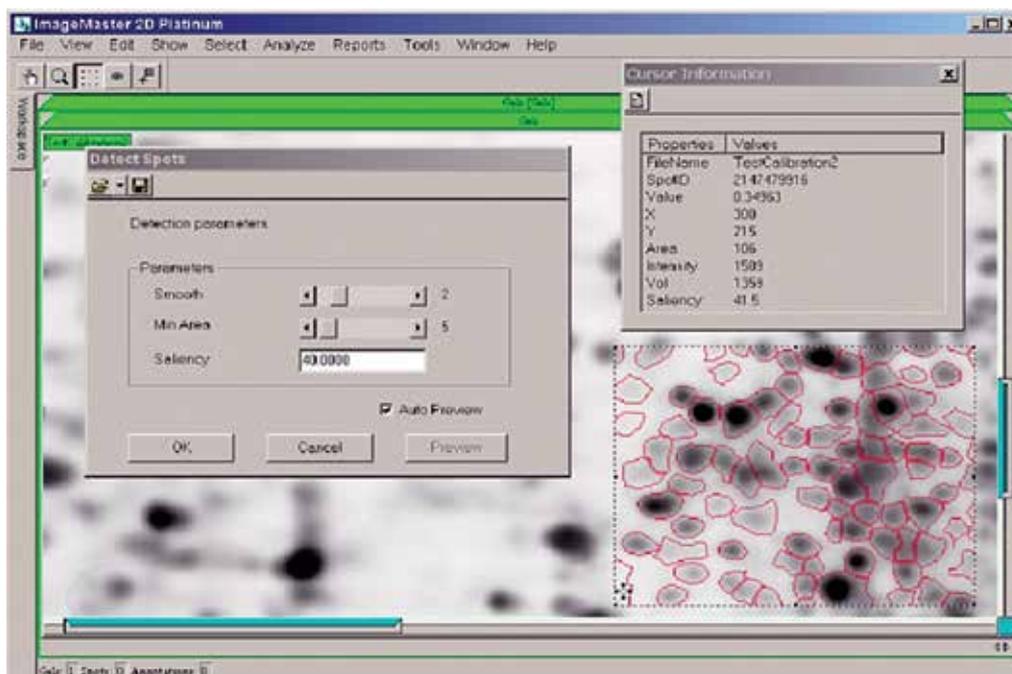


Figure 8. The window for adjusting parameters of spot automatic detection and the additional window «Cursor Information»
Рис. 8. Окно настройки параметров автоматического обнаружения пятен и дополнительное окно «cursor information»

Использование дополнительной ручной обработки отдельных участков изображений приводило к тому, что при построении общего синтетического изображения (карты) сильно увеличивался итоговый размер, что приходилось учитывать при последующем анализе.

Далее на втором этапе обработки изображений осуществляется сбор сведений о пятнах и построение трехмерных моделей на их основе. Анализ пятен проводился ещё по трем основным параметрам: интенсивность, площадь и объем пятна.

Интенсивность — показывает степень окрашивания пятна по сравнению с фоном; при этом берется значение наиболее сильно окрашенных пикселей самого пятна и наиболее светлой области ближайшего фона, окружающего пятно.

Площадь пятна — данный параметр высчитывает по среднему значению интенсивности окрашивания. Поскольку точно определить границы пятна в автоматическом режиме часто затруднительно, то пятнам присваивается несколько большая площадь, и значение показателя берется из расчета 75% от интенсивности пятна. Площадь выражается в мм^2 .

Объем пятна — вычисляется из показателя площадь пятна, рассчитываемого строго по линии обводки пятна.

Итоговые трехмерные модели представляют собой наборы пиков, при этом, чем больше интенсивность, тем выше пик, и тем больше концентрация белка в данной фракции. Высота пика берется из расчета 75% от интенсивности пятна.

Основные шаги в решении данной задачи показаны на Рисунок 9.

The use of additional manual processing of the individual image areas led to a significant increase in the final size when constructing the total synthetic image (map), which was necessary to take into consideration during the following analysis.

Then, at the second stage of image processing, information about spots was collected and the three-dimensional models were constructed on their base. Spot analysis was carried out also by three main parameters: the spot intensity, area and volume.

The intensity shows a degree of staining compared to the background; with that, the values of the most strongly stained pixels of a spot and the lightest area of the nearest background surrounding a spot are taken.

The area of a spot is calculated by a mean value of the staining intensity. As it is often difficult to precisely determine spot boundaries in the automatic regime, slightly larger areas are assigned to the spots and the value of the indicator is calculated as 75% of the spot intensity. The area is expressed in mm^2 .

The volume of a spot is derived from a spot area calculated strictly along the outline of a spot.

The final three-dimensional models represent sets of peaks; with that, the higher intensity, the higher peak and the larger the protein concentration in this fraction. The height of a peak is calculated as 75% of the spot intensity.

The main steps in solving this task are presented in Fig. 9.

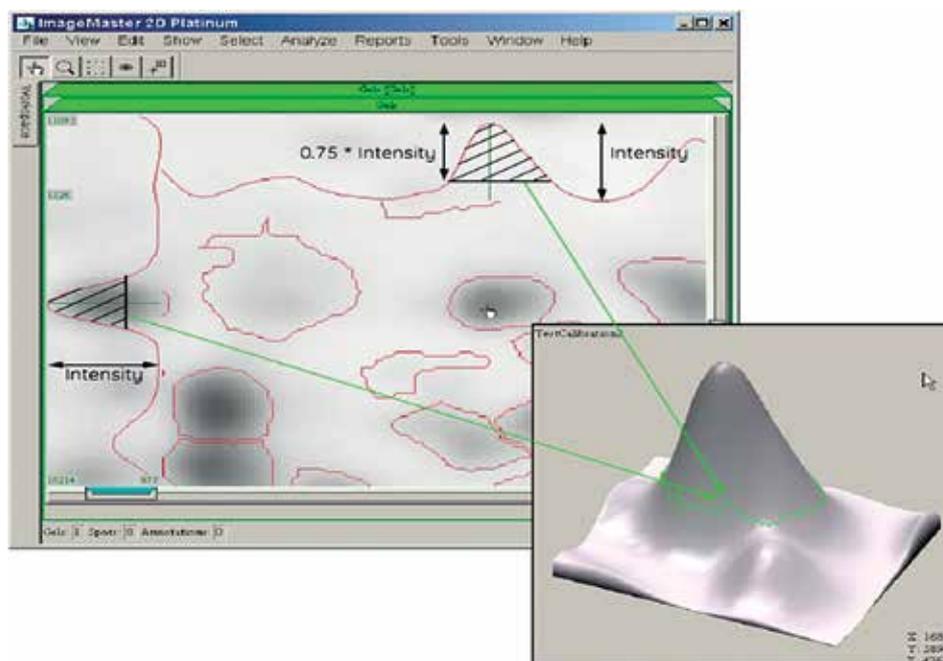


Figure 9. The main steps in the task of constructing a three-dimensional model of an image area under investigation (the arrows show: a difference in calculation of the parameters of intensity, area and volume (100×75), three-dimensional spot model is presented as a peak, which reflects the shape and volume of a spot).

Рис. 9. Основные шаги в решении задачи построения трехмерной модели исследуемого участка изображения (стрелками указаны: разница при расчетах параметров интенсивности, площади и объема (100×75), трехмерная модель пятна, представлена в виде пика, который отображает форму и объем пятна).

Таким образом, в принципе комплексная компьютерная денситометрия по ряду видоспецифичных белков-маркеров может существенно увеличить точность определения видов исходного мясного сырья в конечном продукте.

К настоящему времени результаты, выполненных протеомных исследований мышц сельскохозяйственных животных, открыли путь к созданию высокочувствительных технологий контроля качества мясных продуктов питания на основе анализов видоспецифических изоформ ряда мышечных белков.

Для развития биохимии белков в начале 21-го века принципиальное значение приобрело широкое применение протеомных биоинформационных технологий [9, 10]. Накапливающиеся результаты, представляющие собой совокупности взаимосвязанных сведений, подлежащих совместной обработке, рассматриваются как соответствующие информационные массивы, на основе которых формируются различные общие и специализированные базы данных, размещаемые в сети Интернет. Среди них надо особо отметить в базе данных UniProt информационный ресурс, названный «Complete proteome of Homo sapiens», который к середине 2012 года включал более 70 000 аннотаций, однако из них только 25 000 аннотаций (35,2%) представляли результаты прямых исследований соответствующего белка. Таким образом, очевидно, что большая часть (64,8%) созданных аннотаций нуждается в дополнительных экспериментальных материалах, при получении которых решающую роль могут сыграть протеомные технологии и дальнейшее развитие информационных ресурсов, что свидетельствует о высокой актуальности подобных исследований [11].

Наряду с изучением разных аспектов белкового полиморфизма и других фундаментальных проблем биохимии белков мышечных органов протеомные технологии находят все более широкое применение в разработках биомедицинских проблем, ориентированных на решение многих прикладных задач — от выявления потенциальных диагностических белковых биомаркеров, мишеней фармакологических воздействий [9] до создания методов контроля за качеством различных пищевых продуктов, изготавливаемых из мышечных тканей животных [13].

При исследовании протеомных профилей белков, многие ученые останавливаются на этапе получения двумерных электрофореграмм, не имея порой даже представления о дальнейших перспективах использования современных инструментальных и биоинформационных ресурсов, позволяющих подтвердить или опровергнуть их гипотезы, а порой просто идентифицировать. В данной работе представлена цепочка действий, позволяющих пройти путь от получения профиля белков на геле, до конкретной интерпретации полученного результата.

Thus, as a principle, the complex computer densitometry by a range of species-specific marker proteins can significantly increase a precision of species detection of initial meat raw material in a final product.

Up to date, the results of the performed proteomic studies of muscles from farm animals opened a way to creation of highly sensitive technologies for quality control of meat products based on the species-specific isoforms of several meat proteins.

A wide use of proteomic bioinformatics technologies took on great significance for development of protein biochemistry at the beginning of the 21st century [9, 10]. The accumulated results, which present a complex of interrelated data subjected to integrated processing, are regarded as corresponding information arrays, on which basis various general and specialized databases are formed and placed on the Internet. Among them, it is necessary to particularly note an information resource in the database UniProt called «Complete proteome of Homo sapiens», which included more than 70 000 summaries up to the middle of 2012; however, only 25 000 of the summaries (35.2%) represented the results of the direct studies of the corresponding proteins. Therefore, it is evident that the majority (64.8%) of the developed summaries require additional experimental data; with that, the proteomic technologies and further development of information resources can play an important role in acquisition of these data suggesting high topicality of such studies [11].

In addition to studying different aspects of the protein polymorphism and other fundamental problems of protein biochemistry of muscular organs, the proteomic technologies are finding ever-widening application in developments in the field of biomedical problems directed at solving many applied tasks from revealing potential diagnostic protein biomarkers, targets for pharmacological interventions [9] to developing methods of quality control for various food products produced from animal muscle tissues [13].

When studying protein proteomic profiles, many scientists stop at the stage of obtaining two-dimensional electrophoregrams without any consideration of the following prospects of using modern instrumental and bioinformatics resources that make it possible to confirm or refute their hypotheses and sometimes just identify. This paper presents a workflow, which enables going from obtaining protein profiles in a gel to the concrete interpretation of the obtained result.

БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЙ СПИСОК

1. Электронный ресурс. URL: http://web.expasy.org/docs/swiss-prot_guideline.html/ UniProtKB/Swiss-Prot/SIB Швейцарский Институт биоинформатики. (дата обращения: 26.10.2016).
2. Замятнин, А.А. Фрагменты пищевых белков — регуляторные олигопептиды / А.А. Замятнин, О.Л. Воронина // Биохимия. — 2012. — Т. 77. — № 5. — С. 622–632.
3. Замятнин, А.А. Блестящий мир белков и пептидов / А.А. Замятнин // Биология. — 2002. — № 25. — С. 8–13.
4. Протеомика — шаг, следующий за геномикой / Антон Иванов, STRF.ru Электронный ресурс. URL: http://old.strf.ru/material.aspx?CatalogId=352&d_no=11979#.WFIn3IOLTIU (дата обращения: 26.10.2016)
5. Sun, H. Proteomic and bioinformatic analysis of differentially expressed proteins in denervated skeletal muscle / H. Sun, J. Qiu, Y. Chen et al. // *Int. J. Mol. Med.* — 2014. — V. 33. — № 6. — P. 1586–1596.
6. Weckwerth, W. Metabolomics: an integral technique in systems biology // *Bioanalysis.* — 2010. — V. 2. — P. 829–836.
7. Venter, C.J. The Sequence of the Human Genome / C.J. Venter, M.D. Adams, E.W. Myers et al. // *Science.* — 2001. — V. 291. — P. 1304–1351.
8. Ковалев, Л.И. Протеомное изучение белков в образцах свинины и выработанных из нее мясных продуктах / Ковалев Л.И., Шишкин С.С., Ковалева М.А., Иванов А.В., Вострикова Н.Л., Чернуха И.М. // *Всё о мясе.* — 2013. — №3. — С. 32–34.
9. Novel markers for tying-up in horses by proteomics analysis of equine muscle biopsies / F.G. Bouwman, M.M van Ginneken, J.H. van der Kolk, E.C. Mariman // *Comp BiochemPhysiol Part D Genomics Proteomics.* — 2010. — V. 5 — № 2. — P. 178–183. DOI: 10.1016/j.cbd.2010.03.009.
10. Shibata, M. Differential expression of the skeletal muscle proteome in grazed cattle / M. Shibata, K. Matsumoto, M. Oe et al. // *J. anim. Sci.* — 2009. — V. 87. — № 8. — P. 2700–2708.
11. The human plasma proteome: a nonredundant list developed by combination of four separate sources / N.L. Anderson, M. Polanski, R. Pieper, et al. // *Mol. Cell Proteomics.* — 2004. — V. 3. — № 4. — P. 311–326.
12. Применение протеомных технологий для анализа мышечных белков сельскохозяйственных животных, используемых в мясной промышленности (обзор) / С.С. Шишкин, Л.И. Ковалев, М.А. Ковалева и др. // *Прикладная биохимия и микробиология.* — 2014. — № 5. — С. 453–465.
13. Shishkin S.S., Kovaleva M.A., Eryomina L.S., Lisitskaya K.V., Kovalev I.I. Proteomic Approaches for the Study of Transgelins as Tumor-associated Proteins and Potential Biomarkers. // *Current Proteomics.* — 2013. — V. 10. — № 2. — P. 165–178.

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ

Принадлежность к организации

Вострикова Наталья Леонидовна — кандидат технических наук, заведующий лабораторией «Научно-методические работы, биологические и аналитические исследования», Всероссийский научно-исследовательский институт мясной промышленности им. В.М. Горбатова.

109316, г. Москва, ул. Талалихина д. 26

Тел.: 8-495-676-79-81

E-mail: nvostrikova@list.ru

Чернуха Ирина Михайловна — доктор технических наук, профессор, ведущий научный сотрудник Экспериментальной клинико-лаборатории биологически активных веществ животного происхождения, Всероссийский научно-исследовательский институт мясной промышленности имени В.М. Горбатова

109316, г. Москва, ул. Талалихина, 26

Телефон: раб. 8-495-676-97-18

E-mail: imcher@inbox.ru

Критерии авторства

Авторы в равных долях имеют отношение к написанию рукописи и одинаково несут ответственность за плагиат.

Конфликт интересов

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила 20.12.2016

REFERENCES

1. Electronic resource. URL: http://web.expasy.org/docs/swiss-prot_guideline.html/ UniProtKB/Swiss-Prot/SIB Swiss Institute of Bioinformatics (access date: 26.10.2016).
2. Zamyatnin, A.A. Fragments of food proteins — regulatory oligopeptides / A.A. Zamyatnin, O.L. Voronina // *Biochemistry.* — 2012. — V. 77. — № 5. — P. 622–632.
3. Zamyatnin, A.A. Brilliant world of proteins and peptides / A.A. Zamyatnin // *Biology* — 2002. — V. 25. — P. 8–13.
4. Proteomics — a step following genomics/ Anton Ivanov, STRF.ru Electronic resource. URL: http://old.strf.ru/material.aspx?CatalogId=352&d_no=11979#.WFIn3IOLTIU (access date: 26.10.2016)
5. Sun, H. Proteomic and bioinformatic analysis of differentially expressed proteins in denervated skeletal muscle / H. Sun, J. Qiu, Y. Chen et al. // *Int. J. Mol. Med.* — 2014. — V. 33. — № 6. — P. 1586–1596.
6. Weckwerth, W. Metabolomics: an integral technique in systems biology // *Bioanalysis.* — 2010. — V. 2. — P. 829–836.
7. Venter, C.J. The Sequence of the Human Genome / C.J. Venter, M.D. Adams, E.W. Myers et al. // *Science.* — 2001. — V. 291. — P. 1304–1351.
8. Kovalev, L.I. Proteomic study of proteins in the pork and pork product samples / Kovalev L.I., Shishkin S.S., Kovaleva M.A., Ivanov A.V., Vostrikova N.L., Chernukha I.M. // *All About Meat* . — 2013. — № 3. — P. 32–34.
9. Novel markers for tying-up in horses by proteomics analysis of equine muscle biopsies / F.G. Bouwman, M.M van Ginneken, J.H. van der Kolk, E.C. Mariman // *Comp BiochemPhysiol Part D Genomics Proteomics.* — 2010. — V. 5 — № 2. — P. 178–183. DOI: 10.1016/j.cbd.2010.03.009.
10. Shibata, M. Differential expression of the skeletal muscle proteome in grazed cattle / M. Shibata, K. Matsumoto, M. Oe et al. // *J. anim. Sci.* — 2009. — V. 87. — № 8. — P. 2700–2708.
11. The human plasma proteome: a nonredundant list developed by combination of four separate sources / N.L. Anderson, M. Polanski, R. Pieper, et al. // *Mol. Cell Proteomics.* — 2004. — V. 3. — № 4. — P. 311–326.
12. Application of proteomic technologies for analysis of muscle proteins from farm animal used in the meat industry (a review) / S.S. Shishkin, L.I. Kovalev, M.A. Kovaleva // *Applied biotechnology and microbiology.* — 2014. — № 5. — P. 453–465.
13. Shishkin S.S., Kovaleva M.A., Eryomina L.S., Lisitskaya K.V., Kovalev I.I. Proteomic Approaches for the Study of Transgelins as Tumor-associated Proteins and Potential Biomarkers. // *Current Proteomics.* — 2013. — V. 10. — № 2. — P. 165–178

AUTHOR INFORMATION

Affiliation

Vostrikova Natalya Leonidovna — candidate of technical sciences, head of laboratory «Scientific and methodical work, biological and analytical research», The V.M. Gorbатов All-Russian Meat Research Institute

109316, Moscow, Talalikhina str., 26

Tel.: 8-495-676-79-81

E-mail: nvostrikova@list.ru

Chernukha Irina Mihailovna — doctor of technical sciences, professor, corresponding members of RAS, leading research scientist of Experimental clinic — laboratory «Biologically active substances of an animal origin», The V.M. Gorbатов All-Russian Meat Research Institute

109316, Moscow, Talalikhina str., 26

Tel.: 8-495-676-97-18

E-mail: imcher@inbox.ru

Contribution

The authors equally contributed to the writing of the manuscript and are equally responsible for plagiarism.

Conflict of interest

The authors declare no conflict of interest.

Received 20.12.2016