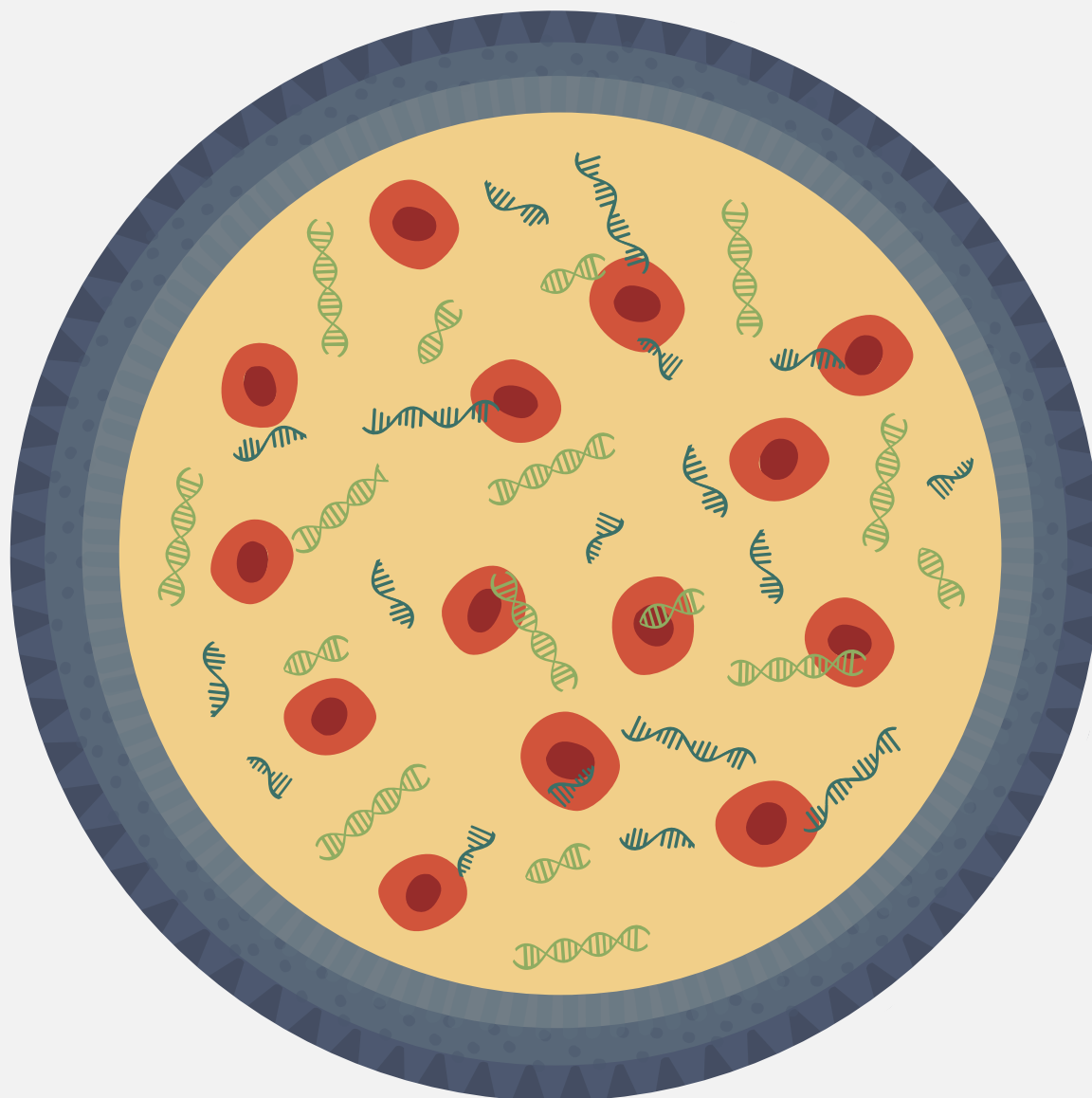


ВЕСТНИК РГМУ

04 / 2017 ИЮЛЬ-АВГУСТ
VESTNIKRGMU.RU



ЖИДКОСТНАЯ БИОПСИЯ **ОБЗОР**

МЕТОД Исследование внеклеточной ДНК 21

Предложена модификация мультиплексной ПЦР-РВ для оценки степени фрагментированности вкДНК

КЛИНИЧЕСКИЙ СЛУЧАЙ Синдром Козна 37

Описан редкий семейный случай заболевания

ВЕСТНИК РОССИЙСКОГО ГОСУДАРСТВЕННОГО МЕДИЦИНСКОГО УНИВЕРСИТЕТА

НАУЧНЫЙ МЕДИЦИНСКИЙ ЖУРНАЛ РНИМУ ИМ. Н. И. ПИРОГОВА

ГЛАВНЫЙ РЕДАКТОР Денис Ребриков, д. б. н.

ЗАМЕСТИТЕЛЬ ГЛАВНОГО РЕДАКТОРА Александр Эттингер, д. м. н.

РЕДАКТОРЫ Елена Куликова, Лилия Егорова

КОРРЕКТОР Ольга Комар

ПЕРЕВОДЧИКИ Екатерина Третьякова

РУКОВОДИТЕЛЬ РЕДАКЦИИ Елена Куликова

РЕДАКЦИОННАЯ КОЛЛЕГИЯ

М. Р. Богомильский, член-корр. РАН, д. м. н., профессор (Москва, Россия)

В. В. Белоусов, д. б. н., профессор (Москва, Россия)

В. К. Боженко, д. м. н., к. б. н., профессор (Москва, Россия)

Н. А. Былова, к. м. н., доцент (Москва, Россия)

Р. Р. Гайнетдинов, к. м. н. (Санкт-Петербург, Россия)

Е. К. Гинтер, академик РАН, д. б. н. (Москва, Россия)

А. В. Гудков, PhD, DSc (Буффало, США)

Н. В. Гуляева, д. б. н., профессор (Москва, Россия)

Е. И. Гусев, академик РАН, д. м. н., профессор (Москва, Россия)

В. Н. Даниленко, д. б. н., профессор (Москва, Россия)

И. И. Затевахин, академик РАН, д. м. н., профессор (Москва, Россия)

А. А. Иванов, к. м. н. (Москва, Россия)

Ю. Г. Кжышковска, д. б. н., профессор (Гейдельберг, Германия)

Ю. В. Котелевцев, к. х. н. (Москва, Россия)

М. А. Лебедев, PhD (Дарем, США)

С. А. Мошковский, д. б. н., профессор (Москва, Россия)

Д. Б. Мунблит, MSc, PhD (Лондон, Великобритания)

В. В. Негребцкий, д. х. н., профессор (Москва, Россия)

А. А. Новиков, д. б. н. (Москва, Россия)

Н. В. Полунина, член-корр. РАН, д. м. н., профессор (Москва, Россия)

Г. В. Порядин, член-корр. РАН, д. м. н., профессор (Москва, Россия)

Г. М. Савельева, академик РАН, д. м. н., профессор (Москва, Россия)

В. Ф. Семиглазов, член-корр. РАН, д. м. н., профессор (Санкт-Петербург, Россия)

Т. А. Славянская, д. м. н., профессор (Москва, Россия)

В. И. Стародубов, академик РАН, д. м. н., профессор (Москва, Россия)

В. А. Степанов, член-корр. РАН, д. б. н., профессор (Томск, Россия)

С. В. Сучков, д. м. н., профессор (Москва, Россия)

Х. П. Тахчиди, член-корр. РАН, д. м. н., профессор (Москва, Россия)

Г. Е. Труфанов, д. м. н., профессор (Санкт-Петербург, Россия)

О. О. Фаворова, д. б. н., профессор (Москва, Россия)

М. Л. Филипенко, к. б. н., в. н. с. (Новосибирск, Россия)

Р. Н. Хазипов, д. м. н. (Марсель, Франция)

Н. Л. Шимановский, член-корр. РАН, д. м. н., профессор (Москва, Россия)

Л. Н. Шишкина, д. б. н., с. н. с. (Новосибирск, Россия)

Р. И. Якубовская, д. б. н., профессор (Москва, Россия)

для подачи рукописей editor@vestnikrgmu.ru

для сотрудничества manager@vestnikrgmu.ru

АДРЕС РЕДАКЦИИ ул. Островитянова, д. 1, г. Москва, 117997

Журнал включён в РИНЦ. IF 2014: 0,139

Журнал включён в Перечень 27.01.2016 (№ 1760)

Индекс Хирша (h²) журнала по оценке Google Scholar: 3

Здесь находится открытый архив журнала



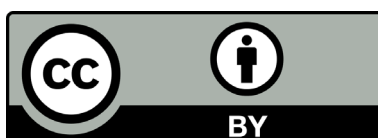
ВЫСШАЯ
АТТЕСТАЦИОННАЯ
КОМИССИЯ (ВАК)



Свидетельство о регистрации средства массовой информации № 012769 от 29 июля 1994 г.

Учредитель и издатель — Российский национальный исследовательский медицинский университет имени Н. И. Пирогова (Москва, Россия)

Журнал распространяется по лицензии Creative Commons Attribution 4.0 International www.creativecommons.org



Подписано в печать 31.08.2017
Тираж 100 экз. Отпечатано в типографии Print.Formula
www.print-formula.ru

BULLETIN OF RUSSIAN STATE MEDICAL UNIVERSITY

BIOMEDICAL JOURNAL OF PIROGOV RUSSIAN NATIONAL
RESEARCH MEDICAL UNIVERSITY

EDITOR-IN-CHIEF Denis Rebrikov, DSc

DEPUTY EDITOR-IN-CHIEF Alexander Oettinger, DSc

EDITORS Elena Kulikova, Liliya Egorova

PROOF-READER Olga Komar

TRANSLATORS Ekaterina Tretiyakova

EDITORIAL MANAGER Elena Kulikova

EDITORIAL BOARD

Bogomilskiy MR, corr. member of RAS, DSc, professor (Moscow, Russia)

Belousov VV, DSc, professor (Moscow, Russia)

Bozhenko VK, DSc, CSc, professor (Moscow, Russia)

Bylova NA, CSc, docent (Moscow, Russia)

Gainetdinov RR, CSc (Saint-Petersburg, Russia)

Ginter EK, member of RAS, DSc (Moscow, Russia)

Gudkov AV, PhD, DSc (Buffalo, USA)

Gulyaeva NV, DSc, professor (Moscow, Russia)

Gusev EI, member of RAS, DSc, professor (Moscow, Russia)

Danilenko VN, DSc, professor (Moscow, Russia)

Zatevakhin II, member of RAS, DSc, professor (Moscow, Russia)

Ivanov AA, CSc (Moscow, Russia)

Kzyshkowska YuG, DSc, professor (Heidelberg, Germany)

Kotelevtsev YuV, CSc (Moscow, Russia)

Lebedev MA, PhD (Darem, USA)

Moshkovskii SA, DSc, professor (Moscow, Russia)

Munblit DB, MSc, PhD (London, Great Britain)

Negrebetsky VV, DSc, professor (Moscow, Russia)

Novikov AA, DSc (Moscow, Russia)

Polunina NV, corr. member of RAS, DSc, professor (Moscow, Russia)

Poryadin GV, corr. member of RAS, DSc, professor (Moscow, Russia)

Savelieva GM, member of RAS, DSc, professor (Moscow, Russia)

Semiglazov VF, corr. member of RAS, DSc, professor (Saint-Petersburg, Russia)

Slavyanskaya TA, DSc, professor (Moscow, Russia)

Starodubov VI, member of RAS, DSc, professor (Moscow, Russia)

Stepanov VA, corr. member of RAS, DSc, professor (Tomsk, Russia)

Takhchidi KhP, corr. member of RAS, DSc (medicine), professor (Moscow, Russia)

Suchkov SV, DSc, professor (Moscow, Russia)

Trufanov GE, DSc, professor (Saint-Petersburg, Russia)

Favorova OO, DSc, professor (Moscow, Russia)

Filipenko ML, CSc, leading researcher (Novosibirsk, Russia)

Khazipov RN, DSc (Marsel, France)

Shimanovskii NL, corr. member of RAS, DSc, professor (Moscow, Russia)

Shishkina LN, DSc, senior researcher (Novosibirsk, Russia)

Yakubovskaya RI, DSc, professor (Moscow, Russia)

FOR PAPERS SUBMISSION editor@vestnikrgmu.ru

FOR COLLABORATION manager@vestnikrgmu.ru

ADDRESS ul. Ostrovityanova, d. 1, Moscow, Russia, 117997

The journal is included in RSCI. IF 2014: 0,139

The journal is included in the list of HAC 27.01.2016 (no. 1760)

Five-year h-index is 3

Free access archive of the journal is here



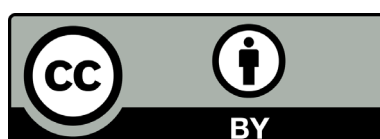
ВЫСШАЯ
АТТЕСТАЦИОННАЯ
КОМИССИЯ (ВАК)



The mass media registration certificate no. 012769 issued on July 29, 1994

Founder and publisher is Pirogov Russian National Research Medical University (Moscow, Russia)

The journal is distributed under the terms of Creative Commons Attribution 4.0 International License www.creativecommons.org



Approved for print 31.08.2017
Circulation: 100 copies. Printed by Print.Formula
www.print-formula.ru

Содержание

Contents

ОБЗОР

5

Диагностический потенциал внеклеточной ДНК в качестве жидкостной биопсии

М. Л. Филипенко

Diagnostic potential of cell-free DNA as a liquid biopsy marker

Filipenko ML

МЕТОД

14

Анализ соматических мутаций в генах RAS-каскада свободно циркулирующей ДНК плазмы крови пациентов с колоректальным раком методом усиленной аллель-специфической

ПЦР в «реальном времени»

Е. Н. Телышева, Г. П. Снигирева

The use of wild-type blocking allele-specific real-time polymerase chain reaction for the analysis of somatic mutations in RAS genes of circulating free DNA isolated from the blood plasma of patients with colorectal cancer

Telysheva EN, Snigireva GP

МЕТОД

21

Модификация мультиплексной ПЦР в «реальном времени» для количественной оценки фракций внеклеточной ДНК разного размера

Е. А. Соколова, И. В. Хлистун, Д. Н. Кушлинский

Modified multiplex real-time PCR for quantification of differently sized cell-free DNA fragments

Sokolova EA, Khlistun IV, Kushlinsky DN

ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ

26

Оценка представленности внеклеточных РНК изоформ VEGF в плазме крови пациенток с раком молочной железы

Е. А. Тыщик, В. В. Кометова, В. В. Родионов, Д. В. Ребриков

Analysis of VEGF circulating RNA isoforms in patients with breast cancer

Tyschik EA, Kometova VV, Rodionov VV, Rebrikov DV

ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ

31

Оценка значимости определения количества miR-146a в плазме крови человека для диагностики колоректального рака

А. Н. Ширшова, Д. А. Шамовская, У. А. Боярских, С. В. Апалько, Л. С. Лесков, А. В. Соколов, С. А. Коваленко, С. Г. Щербак, И. В. Пикалов, А. Э. Кель, М. Л. Филипенко

Significance of miR-146a quantification in human blood plasma for the diagnosis of colorectal cancer

Shirshova AN, Shamovskaya DA, Boyarskikh UA, Apalko SV, Leskov LS, Sokolov AV, Kovalenko SA, Scherbak SG, Pikalov IV, Kel AE, Filipenko ML

КЛИНИЧЕСКИЙ СЛУЧАЙ

37

Семейный случай синдрома Козна: клиническое наблюдение

О. А. Левченко, Р. А. Зинченко, А. В. Лавров

Cohen syndrome in family members: a case report

Levchenko OA, Zinchenko RA, Lavrov AV

ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ

42

Определение частоты встречаемости мутаций в гене *PAH* с применением комбинации технологий ПЦР «в реальном времени» и высокопроизводительного секвенирования у больных фенилкетонурией Московского региона

А. И. Никифорова, Д. Д. Абрамов, В. В. Кадочникова, Г. Ю. Зобкова, К. А. Огурцова, Н. О. Брюханова, Е. А. Шестопалова, Т. О. Кочеткова, Е. С. Шубина, А. Е. Донников, Д. Ю. Трофимов

Determining the frequency of *PAH* mutations in Moscow region residents with phenylketonuria using a combination of real-time PCR and next-generation sequencing

Nikiforova AI, Abramov DD, Kadochnikova VV, Zobkova GU, Ogurtsova KA, Brjuhanova NO, Shestopalova EA, Kochetkova TO, Shubina ES, Donnikov AE, Trofimov DYU

ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ

50

Ассоциация полиморфных вариантов генов *ACE* и *BDKRB2* с параметрами variability сердечного ритма у спортсменов Республики Карелии

С. Н. Коломейчук, Р. В. Алексеев, А. А. Путилов, А. Ю. Мейгал

Association of polymorphic variants of *ACE* and *BDKRB2* with heart rate variability in athletes of the Republic of Karelia

Kolomeichuk SN, Alekseev RV, Putilov AA, Meigal AYU

КЛИНИЧЕСКИЙ СЛУЧАЙ

59

Идентификация нетипичного бактериального вида *Streptococcus intermedius*, вызвавшего абсцесс головного мозга, секвенированием по Сэнгеру гена 16S рРНК из ДНК образца гноя

М. А. Гордукова, Ю. В. Дивилина, О. В. Мишукова, Е. В. Галеева, А. П. Пролдеус, М. Л. Филипенко

Identification of the atypical bacterial strain *Streptococcus intermedius* that caused brain abscess in the patient using Sanger sequencing of the 16S rRNA gene from the DNA extracted from a pus sample

Gordukova MA, Divilina YuV, Mishukova OV, Galeeva EV, Prodeus AP, Filipenko ML

МЕТОД

63

Возможность проведения фотон-захватной терапии с использованием 6 МВ фотонного излучения

Е. С. Воробьева, А. А. Липенгольц, А. А. Черепанов, Е. Ю. Григорьева, И. Н. Нечкина, Н. С. Калыгина, А. В. Сокоиков, В. Н. Кулаков, И. Н. Шейно

Feasibility of using 6 MV photon beams in contrast-enhanced radiotherapy

Vorobyeva ES, Lipengolts AA, Cherepanov AA, Grigorieva EYu, Nechkina IN, Kalygina NS, Sokovikov AV, Kulakov VN, Sheino IN

ДИАГНОСТИЧЕСКИЙ ПОТЕНЦИАЛ ВНЕКЛЕТОЧНОЙ ДНК В КАЧЕСТВЕ ЖИДКОСТНОЙ БИОПСИИ

М. Л. Филипенко^{1,2} ✉

¹ Лаборатория фармакогеномики,
Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, Новосибирск

² Новосибирский государственный университет, Новосибирск

Внеклеточная ДНК (вкДНК) была обнаружена в плазме крови человека в середине прошлого века, однако ее диагностический потенциал стали по-настоящему активно изучать лишь в последние несколько десятилетий в связи с накоплением данных о геноме и эпигеноме клетки человека в норме и при различных патологиях и бурным развитием методов анализа ДНК и ее модификаций. Использование вкДНК для диагностики заболеваний принято называть жидкостной биопсией. В настоящем обзоре рассматриваются история открытия вкДНК, современные представления об источниках вкДНК в организме и перспективные направления применения анализа вкДНК в медицине. В частности, чаще всего жидкостную биопсию используют в онкологии, но метод актуален и для таких направлений, как пренатальная диагностика, прогноз отторжения имплантатов органов и прогноз сепсиса.

Ключевые слова: внеклеточная ДНК, вкДНК, циркулирующая ДНК, жидкостная биопсия, онкология, фетальная ДНК, пренатальная диагностика

Финансирование: статья подготовлена в рамках базового проекта Программы фундаментальных научных исследований государственных академий наук на 2017–2020 гг. Тема № VI.62.2.2 «Развитие методов персонализированной медицины» (0309-2016-0007).

✉ **Для корреспонденции:** Филипенко Максим Леонидович
Пр-т Ак. Лаврентьева, д. 8, г. Новосибирск, 630090; max@niboch.nsc.ru

Статья получена: 25.08.2017 **Статья принята к печати:** 30.08.2017

DIAGNOSTIC POTENTIAL OF CELL-FREE DNA AS A LIQUID BIOPSY MARKER

Filipenko ML^{1,2} ✉

¹ Laboratory of Pharmacogenomics,
Institute of Chemical Biology and Fundamental Medicine of the Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences, Novosibirsk, Russia

² Novosibirsk State University, Novosibirsk, Russia

Cell-free DNA (cfDNA) was discovered in human blood plasma as early as the middle of the 20th century, but it was not until a few decades ago that knowledge of human genome and epigenome in health and pathology became sufficient and methods of nucleic acid analysis became more advanced to encourage active research of the diagnostic potential of cfDNA. The use of cfDNA as a diagnostic biomarker is conventionally referred to as liquid biopsy. The following review tells a story of cfDNA discovery, summarizes contemporary views on cfDNA sources inside the body and touches upon possible prognostic and diagnostic applications of cfDNA analysis in medicine, specifically in cancer and prenatal screening, prediction of implant failure and sepsis development.

Keywords: cell-free DNA, cfDNA, circulating DNA, liquid biopsy, cancer screening, fetal DNA, prenatal screening

Funding: this review was supported by the state-funded project for basic research (2017-2020) *Development of methods of personalized medicine* (VI.62.2.2, 0309-2016-0007).

✉ **Correspondence should be addressed:** Maxim Filipenko
Prospekt Akademika Lavrentieva, d. 8, Novosibirsk, Russia, 630090; max@niboch.nsc.ru

Received: 25.08.2017 **Accepted:** 30.08.2017

Жидкостной биопсией можно назвать уже давно используемые в клинической практике методы исследования онкомаркеров в плазме крови, измерения активности ферментов, синтезируемых печенью, определения количества гормонов щитовидной железы и т. д. Однако термин «жидкостная биопсия» приобрел новый смысл в связи с предположением, что нуклеиновые кислоты специализированных клеток организма, в том числе опухолей и плода, могут попадать в биологические жидкости, могут быть из них выделены и использованы для получения диагностической информации о клетках, в которых они возникли.

Учитывая стремительное развитие методов анализа ДНК и ее модификаций, а также накопление значительных данных о структуре генома и эпигенома клетки человека в норме и при патологиях, анализ ДНК, попадающей в системную циркуляцию (внеклеточной ДНК, или вкДНК), может иметь огромный диагностический потенциал. Именно анализ вкДНК в настоящее время принято называть жидкостной биопсией.

Хотя авторам известно, что различные типы РНК также несут важную информацию и могут анализироваться наравне с ДНК, предметом обзора является вкДНК.

Исследование вкДНК: исторические вехи

Впервые внеклеточная ДНК была обнаружена в плазме периферической крови человека Mandel и Métais в 1948 г. [1], однако эта работа практически не была замечена научным сообществом. До 1970-х гг. большинство исследований, связанных с изучением вкДНК, были посвящены ее присутствию в сыворотке крови пациентов с системной красной волчанкой и ревматоидным артритом [2–4]. Были усовершенствованы методы измерения количества вкДНК за счет применения естественных аутоантител к разным формам ДНК от пациентов с системной красной волчанкой.

В 1977 г. Stroun и соавт. предложили ставшие классическими определения внеклеточной и циркулирующей ДНК [5]. В том же году Leon и соавт. предложили радиоиммунноанализ в качестве метода для количественного определения вкДНК: меченую ДНК использовали в качестве антигена, а источником антител являлась сыворотка крови пациентов с системной красной волчанкой [6]. Сыворотка крови 93 % условно здоровых людей, принявших участие в исследовании, содержала вкДНК на уровне 0–50 нг/мл, и это значение показателя было принято за норму (данные, полученные современными методами, подтверждают обоснованность такого подхода). Содержание вкДНК в сыворотке крови половины пациентов с онкологическими заболеваниями (экспериментальная группа) было значительно выше — 50–5000 нг/мл. После лучевой терапии содержание вкДНК снижалось у 66–90 % пациентов с лимфомой, раком легких, яичников, матки и цервикального канала и у 16–33 % пациентов с глиомами, опухолями молочной железы, толстой и прямой кишки. Если содержание вкДНК возрастало или оставалось неизменным, одновременно не наблюдали ответа на терапию. В дальнейшем присутствие опухолевой вкДНК в кровотоке было подтверждено детекцией опухоль-специфических мутаций, микросателлитной нестабильности и метилирования [7–9].

Конец XX в. ознаменовался появлением универсального и хорошо воспроизводимого метода для измерения количества вкДНК — количественной полимеразной цепной реакции (ПЦР) в «реальном времени» [10, 11]. Этот метод позволил не только определять количество вкДНК, но и устанавливать соотношение ее фракций, различающихся по размеру фрагментов вкДНК [12]. Наконец, новая эра в области исследования вкДНК началась с использованием высокопроизводительного секвенирования, позволяющего проводить полногеномный анализ специфичности и количества вкДНК [13, 14].

Как нуклеиновые кислоты попадают в системную циркуляцию?

В своем пионерском исследовании Leon и соавт. пришли к выводу, что, так как только у половины пациентов с онкологическими заболеваниями было отмечено повышенное содержание вкДНК в плазме крови, а у другой половины показатель был в норме, источником вкДНК в крови является не только опухоль. Недавние данные свидетельствуют о том, что в первые часы и дни после цитотоксического лечения обнаруживается увеличение количества свободной ДНК в клетках, которая затем исчезает в течение недели. Кроме того, при патологиях, связанных с повышенной гибелью клеток или разрушением тканей, таких как гепатит, сепсис и травма, растет содержание вкДНК в плазме крови. Эти факты свидетельствуют в пользу того, что некроз, апоптоз и, возможно, другие типы клеточной смерти дей-

ствительно значимо влияют на содержание нуклеиновых кислот в плазме крови в том числе больных раком. Вероятно, механизмы высвобождения нуклеиновых кислот из клетки могут различаться для разных типов рака. Тем не менее в 1989 г. Stroun и соавт. предположили, что вкДНК у пациентов с онкологическими заболеваниями попадает в кровь в первую очередь из их опухолевых клеток [15], и обоснованность этого предположения была подтверждена обнаружением онкогенных мутаций в вкДНК, выделенной из плазмы крови пациентов с лейкемией [16] и раком поджелудочной железы [7].

Исследования фетальной вкДНК показали, что ее период полураспада составляет 16,3 мин [17]. Это значение было распространено на все типы вкДНК, и справедливость такого подхода была подтверждена в экспериментах на животных с инъекциями ДНК в кровоток [18]. При электрофоретическом анализе также было обнаружено, что вкДНК фрагментирована и имеет профиль, сходный с профилем ДНК из апоптотических клеток, но, кроме того, представлена небольшим количеством высокомолекулярных фрагментов [19]. Их присутствие Jahr и соавт. связали с некрозом опухолевых клеток. Правда, последнее утверждение недавно было подвергнуто серьезным сомнениям: Diehl и соавт. при анализе вкДНК, полученной от пациентов с онкопатологиями, показали, что высокомолекулярные фрагменты ДНК не содержат опухолеспецифических мутаций, которые, напротив, часто обнаруживаются в коротких (менее 200 п. н.) фрагментах вкДНК [20]. Авторы предположили, что высокомолекулярная вкДНК, вероятно, является производной фагоцитированных некротических клеток.

Несмотря на общее мнение, что некроз обуславливает появление в крови высокомолекулярной вкДНК, этот тип клеточной гибели также приводит к продукции значительного количества ДНК в нуклеосомной упаковке с характерным размером [21, 22]. Обычно освобождение нуклеосом происходит через 24–48 ч после индукции апоптоза или 12 ч — после морфологических проявлений этого процесса [23]. Хотя в норме большая часть попадающих в циркуляцию нуклеосом эффективно удаляется клетками печени, некоторое их количество обнаруживается в крови и других биологических жидкостях. В частности, при повышенной гибели клеток в случае дегенеративных, аутоиммунных, воспалительных, ишемических, травматических и токсин-опосредованных заболеваний или при наличии злокачественных опухолей, когда системы элиминации перегружены или повреждены, количество нуклеосом в крови может повышаться. Таким образом, циркулирующие нуклеосомы могут быть продуктом клеток, погибших в результате апоптоза или некроза или при комбинации форм клеточной гибели — в зависимости от типа и интенсивности стимулов и энергетического состояния клеток.

Другим источником вкДНК в системной циркуляции является высокомолекулярная ДНК нейтрофилов. Нейтрофильные внеклеточные ловушки (neutrophil extracellular traps, NETs) образуются активированными нейтрофилами в процессе нетоза [24]: во внеклеточное пространство высвобождается ядерный материал, включающий молекулы ДНК, цитруллинизированные гистоны и ферменты гранул нейтрофилов, такие как эластаза. Эти компоненты формируют сети, которые способны не только физически захватывать бактерии, но и обеспечивать повышенную концентрацию бактерицидных компонентов. В последние годы стало ясно, что NETs также могут образовываться в стерильных условиях при различных провоспалительных

состояниях — тромбозе, раке, системной красной волчанке, атеросклерозе и диабете. Нетоз может также быть стимулирован хемокинами, например интерлейкином 8 (CXCL8) [25, 26], факторами роста, например гранулоцитарно-колониестимулирующим фактором (G-CSF) [27] и трансформирующим фактором роста- β . В зависимости от микроокружения в опухоли экспрессия вышеперечисленных факторов может быть повышена, тем самым обеспечивая связь между раком и нетозом. И наоборот, многие компоненты NETs могут стимулировать рост опухоли, способствовать ангиогенезу, метастазированию или усиливать образование опухоль-индуцированных тромбоэмболий [28].

Потенциально вкДНК также может активно секретироваться в составе экзосом. Этот вероятный механизм подробно рассмотрен в работах Peters и Reclusa [29, 30].

Наконец, еще одним путем возникновения вкДНК является активная метаболическая секреция [31–33]. При этом процессе вкДНК образует комплекс с гликолипопротеинами и РНК. Аусамп и соавт. на модели клеточных линий в культуре *in vitro* показали, что существует статистически значимая корреляция между интенсивностью гликолиза и высвобождения вкДНК. Фрагменты вкДНК имели длину приблизительно 2 000 п. н., что исключало апоптотическое или некротическое происхождение. К настоящему времени механизмы и вклад активной секреции в общий пул вкДНК изучены недостаточно.

Использование вкДНК для диагностики патологий

Пrenatalная диагностика

После обнаружения вкДНК плода, циркулирующей в плазме крови матери [34], было предложено использовать ее для выявления анеуплоидий плода в рамках неинвазивно-

го пренатального тестирования (noninvasive prenatal testing, NIPT). Фетальная вкДНК появляется в материнской крови уже к 5–7 неделе беременности [35]. В первом триместре приблизительно 10 % от ее общего количества образуется из клеток трофобласта при их апоптозе. Было показано, что методы высокопроизводительного секвенирования достаточно точны для клинической диагностики [36]. В результате возник ряд компаний (Natera, Verinata, Sequenom и др.), предлагающих услугу NIPT. Анализ фетальной вкДНК в плазме крови матери также активно применяется для ранней диагностики моногенных заболеваний [37, 38]. Общая схема исследований с использованием ДНК плода представлена на рис. 1.

Внеклеточная ДНК может быть обнаружена и в фолликулярной жидкости. Ее количественная оценка может использоваться для прогностической оценки качества эмбриона и эффективности экстракорпорального оплодотворения (ЭКО) [39]. Shamonki и соавт. также показали присутствие ДНК эмбриона в культуральной среде в концентрации 2–642 нг/мкл (в исследовании было проанализировано 55 образцов) [40]. Авторы установили корреляцию между результатами преимплантационного генетического скрининга методом биопсии трофобласта и методом анализа вкДНК культуральной среды. При дополнительной валидации метод может упростить скрининг эмбрионов и повысить эффективность ЭКО.

Пересадка органов

Другой важной областью клинического применения анализа вкДНК является мониторинг эффективности трансплантации органов. В основе подхода лежит предположение о том, что клетки трансплантата при отторжении будут гибнуть, а их ДНК — появляться в составе вкДНК крови реципиента.

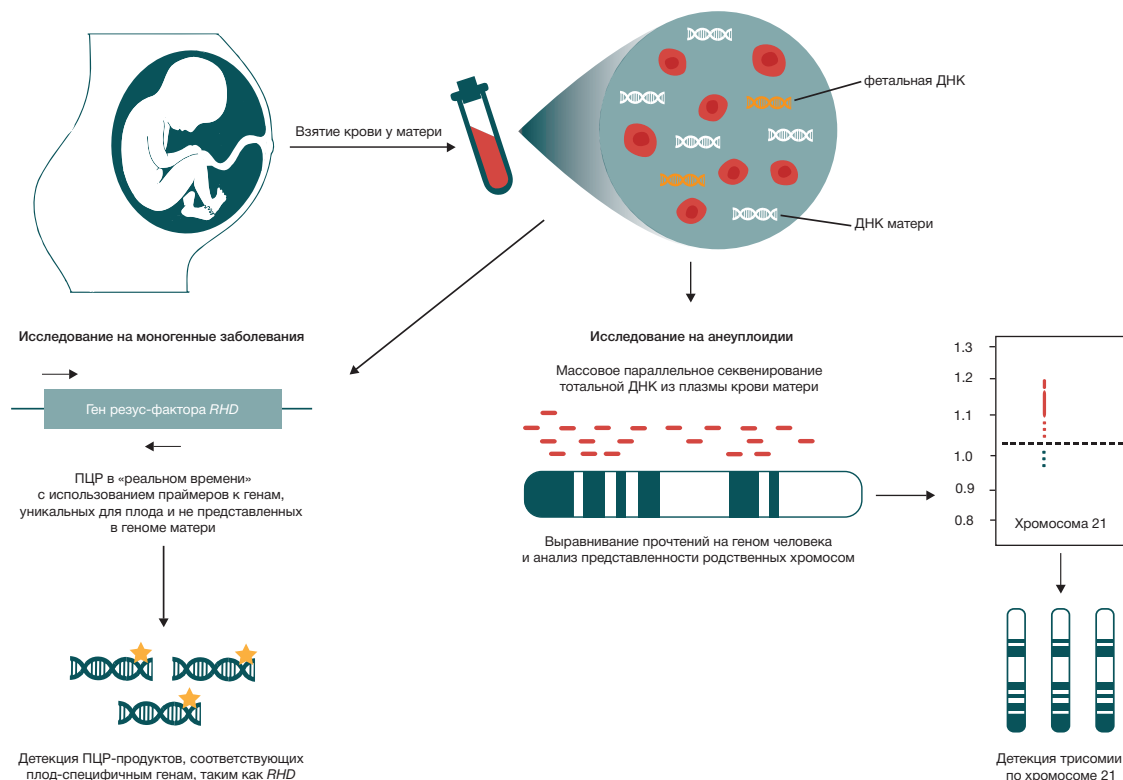


Рис. 1. В плазме крови беременной женщины содержится ДНК плода, которая может быть использована в неинвазивной пренатальной диагностике для выявления анеуплоидий или моногенных заболеваний у плода

Показатель выживаемости пациентов после пересадки легкого является одним из самых низких в сравнении с использованием трансплантатов других органов: существующие диагностические тесты часто не позволяют отличить инфекцию от отторжения. В работе De Vlaminc и соавт. показано, что уровень вкДНК донора в крови реципиента коррелирует с результатами инвазивных тестов на отторжение (AUC = 0,9). Более того, анализ вкДНК помогает выявлять такие инфекционные агенты, как цитомегаловирус, вирусы герпеса человека HHV6 и HHV7 и аденовирус, которые часто не удается обнаружить клинически, но которые присутствуют с высокой частотой в организме пациентов, перенесших пересадку легкого [41].

Bloom и соавт. при пересадке почки установили взаимосвязь между количеством вкДНК доноров в плазме крови реципиентов трансплантатов, определяемым методом таргетного высокопроизводительного секвенирования, и статусом отторжения, установленным морфологически [42]. Авторы установили диагностические интервалы содержания вкДНК донора: менее 1 % от общего количества вкДНК — отсутствие активного отторжения, более 1 % — вероятность активного отторжения. Компания CareDx Clinical Laboratory уже предлагает тест AlloSure dd-cfDNA для клинической диагностики острого отторжения трансплантата почки.

Прогноз сепсиса

Сепсис, системная воспалительная реакция на инфекцию, возникающую в результате распространения патогена по организму из первичного очага путем попадания в кровоток, — распространенная причина смерти. Прогноз развития данного состояния у больных с травмой или после хирургических вмешательств затруднен, поиск и введение в клиническую практику новых биомаркеров необходимы для снижения уровня летальности.

Одна из форм врожденного иммунитета — реакция организма на нарушение стерильности крови в виде выбрасывания нейтрофилами внеклеточных ловушек. Как уже было сказано, NETs состоят из высокомолекулярной вкДНК, ассоциированной с гистонами, протеазами и некоторыми другими белками. В проспективном пилотном исследовании с 45 пациентами с множественной травмой (впоследствии 8 пациентов были исключены из исследования) первоначальное высокое содержание в плазме крови вкДНК/NETs (> 800 нг/мл) с его возвратным повы-

шением на 5–9 день было ассоциировано с последующим сепсисом, множественной недостаточностью органов и смертью [43]. В отличие от этого изменения в содержании С-реактивного белка у пациентов с развитием сепсиса и пациентов без развития сепсиса значимо не различались. Дальнейшая клиническая валидация должна определить прогностическую ценность определения вкДНК/NETs.

Недавнее исследование Hamaguchi и соавт. на мышах также показало, что содержание вкДНК повышается уже на ранней стадии септического состояния, что позволяет использовать вкДНК как биомаркер для раннего выявления сепсиса [44]. В отличие от коллег авторы выяснили, что вкДНК имела отличное от вкДНК нейтрофилов происхождение, и предположили, что основным ее источником могут являться некротические клетки. Эта гипотеза может изменить патофизиологическую концепцию образования вкДНК при сепсисе, но для ее подтверждения необходимы дальнейшие исследования.

Онкология

Возникновение и прогрессия опухоли связаны с накоплением соматических мутаций. Анализ соматических изменений генома опухолевых клеток все чаще используется в диагностических, прогностических и лечебных целях. Генетический профиль солидных опухолей в настоящее время определяют исследованием ДНК, получаемой из хирургических образцов или биоптатов, но такой анализ нельзя выполнять регулярно из-за его инвазивного характера. К тому же информация, получаемая из одного биоптата (ограниченный в пространственном и временном отношении срез опухоли), может не отражать гетерогенности и эволюции новообразования. В противоположность этому вкДНК опухоли, изолированная из плазмы крови или мочи, может содержать данные о генетических особенностях как первичной опухоли, так и метастазов, а также может помочь проследить геномную эволюцию опухоли. Только за последние три года опубликовано более тысячи работ, посвященных различным аспектам исследования вкДНК пациентов с разными типами рака. Возможности использования вкДНК для диагностики онкологических заболеваний развернуто описаны в работах [45–47].

Существует три направления диагностического использования вкДНК в онкологии (рис. 2).

Первое — измерение количества вкДНК или опухолевой вкДНК в крови пациента для диагностики или



Рис. 2. Ключевые направления использования жидкостной биопсии с анализом внеклеточной ДНК в онкологии

мониторинга опухолевой нагрузки. Несмотря на большое число исследований, в которых было показано повышение содержания вкДНК в крови пациентов с онкологическими заболеваниями, этот подход до сих пор не используется в клинической практике в качестве рутинного. Возможно, это обусловлено отсутствием стандартизации методов выделения и определения количества вкДНК, с одной стороны, и невысокой специфичностью метода для онкопатологий в сравнении с другими заболеваниями, в том числе описанными выше, — с другой. Однако, как это еще в 1977 г. было показано Leon и соавт., вкДНК является перспективным маркером опухолевой нагрузки из-за короткого периода полувыведения из организма [6]. Многие белковые маркеры опухолей, используемые в настоящее время для оценки ответа на лечение в клинической практике (например, PSA, CA125, CEA, α FP), длительное время присутствуют в системной циркуляции — до нескольких дней [48], тогда как период полувыведения вкДНК составляет не более нескольких часов [49, 50]. При этом детекция соматических мутаций и эпигенетических модификаций при определении количества опухолевой вкДНК может увеличивать диагностическую ценность метода [51–53]. Применение таргетного высокопроизводительного секвенирования для определения опухолевой фракции в вкДНК после хирургической резекции колоректальных опухолей позволило с высокой точностью спрогнозировать рецидив заболевания (HR = 18; 95 % CI 7,9–40,0; $p < 0.001$) [54].

Работа Tie и соавт. [54] также показательна как пример второго направления диагностического использования вкДНК в онкологии — выявления драйверных соматических мутаций в вкДНК для выбора таргетной терапии, а также в качестве скрининга для обнаружения онкологических заболеваний. Недавнее исследование Bettegowda и соавт. показало, что у пациентов с локализованными опухолями опухолевая вкДНК обнаруживается у 73, 57, 48 и 50 % пациентов с колоректальным раком, гастроэзофагеальным раком, раком поджелудочной железы и аденокарциномой молочной железы соответственно [55]. Было также показано, что опухолевая вкДНК обнаруживается у более чем 75 % пациентов с метастатическими злокачественными новообразованиями поджелудочной железы, яичников, толстого кишечника, мочевого пузыря, молочной железы, кожи и печени. Дальнейшее совершенствование метода может повысить его точность, а приемлемая стоимость исследования — сделать привлекательным для использования в клинической практике.

Третьим направлением является анализ в вкДНК эпигенетических модификаций, специфичных для опухолей. В 2016 г. была опубликована работа Margolin и соавт. [56], в которой был описан высококонсервативный профиль гиперметилирования гена *ZNF154* в вкДНК, характерный для разных типов рака. Такой биомаркер пан-рака, если он будет в дальнейшем валидирован, может представлять собой значимый диагностический инструмент. В 2016 г. также была представлена пионерская работа Lehmann-Werman и соавт., в которой было показано, что суммарный профиль метилирования вкДНК плазмы крови человека, полученный с помощью высокопроизводительного секвенирования, может быть программно распределен по фракциям ДНК, соответствующим специализированным клеткам человека [57]. Таким образом, с помощью такого анализа и при наличии возрастных и других норм содержания ДНК специфических органов в суммарной вкДНК плазмы крови может быть определен орган (тип клеток человека), который подвержен патологическому процессу и продуцирует

большее количество специфичной вкДНК. Данный метод перспективен для проведения неинвазивной ранней диагностики рака и может быть учтен при разработке таргетных панелей для высокопроизводительного секвенирования с целью уменьшения стоимости исследования.

Еще одной эпигенетической модификацией может быть позиционирование нуклеосом, которое влияет на структуру образующихся при апоптозе фрагментов вкДНК. Специфика фрагментации вкДНК была показана в ряде работ. В 2016 г. Snyder и соавт. сообщили, что тотальное секвенирование вкДНК позволяет определить позиции нуклеосом и транскрипционных факторов, специфичные для типов клеток [58]. Авторы показали, что профиль вкДНК условно здоровых доноров наиболее близок лимфоидным и миелоидным клеткам. В то же время секвенирование вкДНК плазмы крови пациентов с различными типами рака позволило достаточно точно соотнести их с профилями 76 клеточных линий соответствующего происхождения. Исследователи предполагают, что их подход может применяться для выявления острого или же хронического патологического состояния органов/типов клеток организма человека.

Несмотря на исключительную важность неинвазивной диагностики для снижения смертности от онкологических заболеваний, только один тест был зарегистрирован в Food and Drug Administration в США в 2016 г. Это cobas EGFR Mutation Test v2 (Roche Molecular Systems, США) для диагностики соматических активирующих мутаций гена *EGFR* в плазме крови.

Анализ вкДНК в клинической практике также позволяет фиксировать интересные диагностические случаи. Например, в работе Smith и соавт. были получены дискордантные результаты между данными анализа вкДНК и последующего диагностического кариотипирования клеток плода [59]. В дальнейшем у пациентки была обнаружена колоректальная аденокарцинома. Авторы подчеркивают необходимость более тщательного рассмотрения аномальных результатов анализа вкДНК и использования мультидисциплинарного клинического подхода.

Другие применения

Повышенная концентрация вкДНК в плазме и сыворотке крови пациентов с аутоиммунными заболеваниями, в особенности пациентов с системной красной волчанкой, была показана неоднократно [4, 60, 61]. Несмотря на это, пока нет однозначных рекомендаций для использования определения количества вкДНК у таких пациентов в клинических целях.

Ershova и соавт. [62] исследовали концентрацию вкДНК и 8-оксо-2'-дезоксигуанозина (8-oxodG) в вкДНК пациентов с острыми психическими расстройствами. Повышенный уровень содержания 8-oxodG был отмечен для вкДНК и лимфоцитов (индекс FL1-8-oxodG) пациентов. Учитывая, что отношение вкДНК/FL1-8-oxodG характеризует уровень апоптоза в поврежденных клетках, авторы делают вывод о том, что увеличение числа клеток с поврежденной ДНК в тканях организма пациента может влиять на этиологию острого психотического расстройства.

Breitbart и соавт. предлагают использовать мониторинг за содержанием вкДНК в спортивной медицине [63]. Длительные упражнения на выносливость или регулярные тренировки с высокой интенсивностью могут вызывать хроническое воспаление, которое ведет к постоянному медленному высвобождению ДНК из клеток, что может

быть обусловлено апоптозом или некрозом. Таким образом, вкДНК может быть биомаркером перетренированности. Для валидации этой гипотезы требуются проспективные исследования, которые были бы проведены на максимально однородных группах спортсменов, получающих хорошо контролируемые физические нагрузки.

Хроническая обструктивная болезнь легких определяет заболеваемость и смертность пациентов с муковисцидозом, при котором в дыхательных путях отмечается непродуктивное нейтрофильное воспаление. После контакта с патогеном или после длительной активации нейтрофилы выделяют уже упомянутые внеклеточные нейтрофильные ловушки, содержащие большое количество ДНК. Считалось, что NETs участвуют в защите организма человека, обладая бактерицидными и фунгицидными свойствами. С другой стороны, чрезмерное их образование ассоциировано с патогенезом аутоиммунных заболеваний. Marcos и соавт. провели анализ вкДНК, представлявшей собой предположительно ДНК из NETs, и показали, что ее уровень положительно коррелирует с обструкцией дыхательных путей, колонизацией легких микроорганизмами и содержанием хемокинов у пациентов с муковисцидозом и у модельных мышей [64]. Таким образом, нейтрофильное воспаление в легких при муковисцидозе связано со значительным увеличением содержания вкДНК, характерным для нетоза, и может быть причиной дисфункции легких. Если данное предположение верно, то становятся возможными диагностика и лечение патологии с применением ДНКазы, антипротеазы и других ингибиторов нетоза.

Наконец, дифференциальное метилирование в промоторе гена *PPAR γ* может быть обнаружено в вкДНК плазмы крови человека и может быть использовано для стратификации тяжести фиброза печени у пациентов с неалкогольной жировой болезнью печени [65].

Приведенный выше список заболеваний, для которых имеются интересные данные о вкДНК, не является исчерпывающим. К тому же он постоянно расширяется в связи с совершенствованием технологий определения количества и структурного профиля вкДНК в различных биологических жидкостях.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Интерес исследователей к внеклеточной ДНК растет во всем мире вследствие высокого потенциала жидкостной биопсии для использования в качестве метода неинвазивной диагностики и мониторинга таких заболеваний, как рак, инсульт, инфаркт миокарда, различные аутоиммунные нарушения, травмы и связанные с беременностью осложнения. Пока нет ясного понимания патофизиологических функций вкДНК: есть ли у нее постоянные биологические функции в клетке или организме? каковы молекулярные механизмы их реализации в норме и при патологии? Эти вопросы требуют ответов со стороны биологов, биоинформатиков, специалистов по эволюции человека и врачей-клиницистов. Кроме того, включение жидкостной биопсии в клиническую практику требует оптимизации технологий на всех этапах диагностического процесса.

Литература

1. Mandel P, Metais P. Les acides nucléiques du plasma sanguin chez l'homme. C R Seances Soc Biol Fil. 1948 Feb; 142 (3–4): 241–3.
2. Koffler D, Agnello V, Winchester R, Kunkel HG. The occurrence of single-stranded DNA in the serum of patients with systemic lupus erythematosus and other diseases. J Clin Invest. 1973 Jan; 52 (1): 198–204.
3. Leon SA, Ehrlich GE, Shapiro B, Labbate VA. Free DNA in the serum of rheumatoid arthritis patients. J Rheumatol. 1977 Summer; 4 (2): 139–43.
4. Tan EM, Schur PH, Carr RI, Kunkel HG. Deoxybonucleic acid (DNA) and antibodies to DNA in the serum of patients with systemic lupus erythematosus. J Clin Invest. 1966 Nov; 45 (11): 1732–40.
5. Stroun M, Anker P, Maurice P, Gahan PB. Circulating nucleic acids in higher organisms. Int Rev Cytol. 1977; 51: 1–48.
6. Leon SA, Shapiro B, Sklaroff DM, Yaros MJ. Free DNA in the serum of cancer patients and the effect of therapy. Cancer Res. 1977 Mar; 37 (3): 646–50.
7. Sorenson GD, Pribish DM, Valone FH, Memoli VA, Bzik DJ, Yao SL. Soluble normal and mutated DNA sequences from single-copy genes in human blood. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev. 1994 Jan–Feb; 3 (1): 67–71.
8. Shaw JA, Smith BM, Walsh T, Johnson S, Primrose L, Slade MJ et al. Microsatellite alterations plasma DNA of primary breast cancer patients. Clin Cancer Res. 2000 Mar; 6 (3): 1119–24.
9. Fujiwara K, Fujimoto N, Tabata M, Nishii K, Matsuo K, Hotta K et al. Identification of epigenetic aberrant promoter methylation in serum DNA is useful for early detection of lung cancer. Clin Cancer Res. 2005 Feb 1; 11 (3): 1219–25.
10. Lo YM, Leung TN, Tein MS, Sargent IL, Zhang J, Lau TK et al. Quantitative abnormalities of fetal DNA in maternal serum in preeclampsia. Clin Chem. 1999 Feb; 45 (2): 184–8.
11. Zhong XY, Bürk MR, Troeger C, Kang A, Holzgreve W, Hahn S. Fluctuation of maternal and fetal free extracellular circulatory DNA in maternal plasma. Obstet Gynecol. 2000 Dec; 96 (6): 991–6.
12. Wang BG, Huang HY, Chen YC, Bristow RE, Kassauei K, Cheng CC et al. Increased plasma DNA integrity in cancer patients. Cancer Res. 2003 Jul 15; 63 (14): 3966–8.
13. Fan HC, Blumenfeld YJ, Chitkara U, Huddins L, Quake SR. Noninvasive diagnosis of fetal aneuploidy by shotgun sequencing DNA from maternal blood. Proc Natl Acad Sci U S A. 2008 Oct 21; 105 (42): 16266–71.
14. Chu T, Bunce K, Hogge WA, Peters DG. Statistical model for whole genome sequencing and its application to minimally invasive diagnosis of fetal genetic disease. Bioinformatics. 2009 May 15; 25 (10): 1244–50.
15. Stroun M, Anker P, Maurice P, Lyautey J, Lederrey C, Beljanski M. Neoplastic characteristics of the DNA found in the plasma of cancer patients. Oncology. 1989; 46 (5): 318–22.
16. Vasioukhin V, Anker P, Maurice P, Lyautey J, Lederrey C, Stroun M. Point mutations of the N-ras gene in the blood plasma DNA of patients with myelodysplastic syndrome or acute myelogenous leukaemia. Br J Haematol. 1994 Apr; 86 (4): 774–9.
17. Lo YM, Zhang J, Leung TN, Lau TK, Chang AM, Hjelm NM. Rapid clearance of fetal DNA from maternal plasma. Am J Hum Genet. 1999 Jan; 64 (1): 218–24.
18. Tsumita T, Iwanaga M. Fate of injected deoxyribonucleic acid in mice. Nature. 1963 Jun 15; 198: 1088–9.
19. Jahr S, Hentze H, Englisch S, Hardt D, Fackelmayer FO, Hesch RD et al. DNA fragments in the blood plasma of cancer patients: quantitations and evidence for their origin from apoptotic and necrotic cells. Cancer Res. 2001 Feb 15; 61 (4): 1659–65.
20. Diehl F, Li M, Dressman D, He Y, Shen D, Szabo S et al. Detection and quantification of mutations in the plasma of patients with colorectal tumors. Proc Natl Acad Sci U S A. 2005 Nov 8; 102 (45): 16368–73.
21. Fairbairn DW, O'Neill KL. Necrotic DNA degradation mimics apoptotic nucleosomal fragmentation comet tail length. In Vitro Cell Dev Biol Anim. 1995 Mar; 31 (3): 171–3.

22. Tran TT, Groben P, Pisetsky DS. The release of DNA into the plasma of mice following hepatic cell death by apoptosis and necrosis. *Biomarkers*. 2008 Mar; 13 (2): 184–200.
23. van Nieuwenhuijze AE, van Lopik T, Smeenk RJ, Aarden LA. Time between onset of apoptosis and release of nucleosomes from apoptotic cells: putative implications for systemic lupus erythematosus. *Ann Rheum Dis*. 2003 Jan; 62 (1): 10–4.
24. Brinkmann V, Reichard U, Goosmann C, Fauler B, Uhlemann Y, Weiss DS et al. Neutrophil extracellular traps kill bacteria. *Science*. 2004 Mar 5; 303 (5663): 1532–5.
25. Gupta AK, Hasler P, Holzgreve W, Gebhardt S, Hahn S. Induction of neutrophil extracellular DNA lattices by placental microparticles and IL-8 and their presence in preeclampsia. *Hum Immunol* 2005 Nov; 66 (11): 1146–54.
26. Gupta AK, Joshi MB, Philippova M, Erne P, Hasler P, Hahn S et al. Activated endothelial cells induce neutrophil extracellular traps and are susceptible to NETosis-mediated cell death. *FEBS Lett*. 2010 Jul 16; 584 (14): 3193–7.
27. Demers M, Krause DS, Schatzberg D, Martinod K, Voorhees JR, Fuchs TA et al. Cancers predispose neutrophils to release extracellular DNA traps that contribute to cancer-associated thrombosis. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2012 Aug 7; 109 (32): 13076–81.
28. Erpenbeck L, Schön MP. Neutrophil extracellular traps: protagonists of cancer progression? *Oncogene*. 2017 May 4; 36 (18): 2483–90.
29. Peters DL, Pretorius PJ. Origin, translocation and destination of extracellular occurring DNA — A new paradigm in genetic behaviour. *Clin Chim Acta*. 2011 May 12; 412 (11–12): 806–11.
30. Reclusa P, Sirera R, Araujo A, Giallombardo M, Valentino A, Sorber L et al. Exosomes genetic cargo in lung cancer: a truly Pandora's box. *Transl Lung Cancer Res*. 2016 Oct; 5 (5): 483–91.
31. van der Vaart M, Pretorius PJ. The origin of circulating free DNA. *Clin Chem*. 2007 Dec; 53 (12): 2215.
32. Gahan PB, Anker P, Stroun M. Metabolic DNA as the origin of spontaneously released DNA? *Ann N Y Acad Sci*. 2008 Aug; 1137: 7–17.
33. Aucamp J, Bronkhorst AJ, Peters DL, Van Dyk HC, Van der Westhuizen FH, Pretorius PJ. Kinetic analysis, size profiling, and bioenergetic association of DNA released by selected cell lines in vitro. *Cell Mol Life Sci*. 2017 Jul; 74 (14): 2689–707.
34. Lo YM, Corbetta N, Chamberlain PF, Rai V, Sargent IL, Redman CW et al. Presence of fetal DNA in maternal plasma and serum. *Lancet*. 1997 Aug 16; 350 (9076): 485–7.
35. Rink BD, Norton ME. Screening for fetal aneuploidy. *Semin Perinatol*. 2016 Feb; 40 (1): 35–43.
36. Twiss P, Hill M, Daley R, Chitty LS. Non-invasive prenatal testing for Down syndrome. *Semin Fetal Neonatal Med*. 2014 Feb; 19 (1): 9–14.
37. Guissart C, Dubucs C, Raynal C, Girardet A, Tran Mau Them F et al. Non-invasive prenatal diagnosis (NIPD) of cystic fibrosis: an optimized protocol using MEMO fluorescent PCR to detect the p.Phe508del mutation. *J Cyst Fibros*. 2017 Mar; 16 (2): 198–206.
38. De Franco E, Caswell R, Houghton JA, Iotova V, Hattersley AT, Ellard S. Analysis of cell-free fetal DNA for non-invasive prenatal diagnosis in a family with neonatal diabetes. *Diabet Med*. 2017 Apr; 34 (4): 582–5.
39. Scalici E, Traver S, Molinari N, Mullet T, Monforte M, Vintejoux E et al. Cell-free DNA in human follicular fluid as a biomarker of embryo quality. *Hum Reprod*. 2014 Dec; 29 (12): 2661–9.
40. Shamonki MI, Jin H, Haimowitz Z, Liu L. Proof of concept: preimplantation genetic screening without embryo biopsy through analysis of cell-free DNA in spent embryo culture media. *Fertil Steril*. 2016 Nov; 106 (6): 1312–8.
41. De Vlaminc I, Martin L, Kertesz M, Patel K, Kowarsky M, Strehl C et al. Noninvasive monitoring of infection and rejection after lung transplantation. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2015 Oct 27; 112 (43): 13336–41.
42. Bloom RD, Bromberg JS, Poggio ED, Bunnapradist S, Langone AJ, Sood P et al. Cell-Free DNA and Active Rejection in Kidney Allografts. *J Am Soc Nephrol*. 2017 Jul; 28 (7): 2221–32.
43. Margraf S, Lögters T, Reipen J, Altrichter J, Scholz M, Windolf J. Neutrophil-derived circulating free DNA (cf-DNA/NETs): a potential prognostic marker for posttraumatic development of inflammatory second hit and sepsis. *Shock*. 2008 Oct; 30 (4): 352–8.
44. Hamaguchi S, Akeda Y, Yamamoto N, Seki M, Yamamoto K, Oishi K et al. Origin of Circulating Free DNA in Sepsis: Analysis of the CLP Mouse Model. *Mediators Inflamm*. 2015; 2015: 614518.
45. Jung K, Fleischhacker M, Rabien A. Cell-free DNA in the blood as a solid tumor biomarker — a critical appraisal of the literature. *Clin Chim Acta*. 2010 Nov 11; 411 (21–22): 1611–24.
46. Crowley E, Di Nicolantonio F, Loupakis F, Bardelli A. Liquid biopsy: monitoring cancer-genetics in the blood. *Nat Rev Clin Oncol*. 2013 Aug; 10 (8): 472–84.
47. Wan JC, Massie C, Garcia-Corbacho J, Mouliere F, Brenton JD, Caldas C et al. Liquid biopsies come of age: towards implementation of circulating tumour DNA. *Nat Rev Cancer*. 2017 Apr; 17 (4): 223–38.
48. Bidart J-M, Thuillier F, Augereau C, Chalas J, Daver A, Jacob N et al. Kinetics of serum tumor marker concentrations and usefulness in clinical monitoring. *Clin Chem*. 1999 Oct; 45 (10): 1695–707.
49. Diehl F, Schmidt K, Choti MA, Romans K, Goodman S, Li M et al. Circulating mutant DNA to assess tumor dynamics. *Nat Med*. 2008 Sep; 14 (9): 985–90.
50. Thierry AR, Mouliere F, Gongora C, Ollier J, Robert B, Ychou M et al. Origin and quantification of circulating DNA in mice with human colorectal cancer xenografts. *Nucleic Acids Res*. 2010 Oct; 38 (18): 6159–75.
51. Zhou J, Chang L, Guan Y, Yang L, Xia X, Cui L et al. Application of Circulating Tumor DNA as a Non-Invasive Tool for Monitoring the Progression of Colorectal Cancer. *PLoS One*. 2016 Jul 26; 11 (7): e0159708.
52. Takahashi H, Kagara N, Tanei T, Naoi Y, Shimoda M, Shimomura A et al. Correlation of Methylated Circulating Tumor DNA with Response to Neoadjuvant Chemotherapy in Breast Cancer Patients. *Clin Breast Cancer*. 2017 Feb; 17 (1): 61–69.
53. Visvanathan K, Fackler MS, Zhang Z, Lopez-Bujanda ZA, Jeter SC, Sokoll LJ et al. Monitoring of Serum DNA Methylation as an Early Independent Marker of Response and Survival in Metastatic Breast Cancer: TBCRC 005 Prospective Biomarker Study. *J Clin Oncol*. 2017 Mar; 35 (7): 751–8.
54. Tie J, Wang Y, Tomasetti C, Li L, Springer S, Kinde I et al. Circulating tumor DNA analysis detects minimal residual disease and predicts recurrence in patients with stage II colon cancer. *Sci Transl Med*. 2016 Jul 6; 8 (346): 346ra92.
55. Bettingowda C, Sausen M, Leary RJ, Kinde I, Wang Y, Agrawal N et al. Detection of circulating tumor DNA in early- and late-stage human malignancies. *Sci Transl Med*. 2014 Feb 19; 6 (224): 224ra24.
56. Margolin G, Petrykowska HM, Jameel N, Bell DW, Young AC, Elnitski L. Robust Detection of DNA Hypermethylation of ZNF154 as a Pan-Cancer Locus with in Silico Modeling for Blood-Based Diagnostic Development. *J Mol Diagn*. 2016 Mar; 18 (2): 283–98.
57. Lehmann-Werman R, Neiman D, Zemmour H, Moss J, Magenheimer J, Vaknin-Dembinsky A et al. Identification of tissue-specific cell death using methylation patterns of circulating DNA. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2016 Mar 29; 113 (13): E1826–34.
58. Snyder MW, Kircher M, Hill AJ, Daza RM, Shendure J. Cell-free DNA Comprises an In Vivo Nucleosome Footprint that Informs Its Tissues-Of-Origin. *Cell*. 2016 Jan 14; 164 (1–2): 57–68.
59. Smith J, Kean V, Bianchi DW, Feldman G, Petrucelli N, Simon M et al. Cell-free DNA results lead to unexpected diagnosis. *Clin Case Rep*. 2017 Jul 3; 5 (8): 1323–6.
60. Raptis L, Menard HA. Quantitation and characterization of plasma DNA in normals and patients with systemic lupus erythematosus. *J Clin Invest*. 1980 Dec; 66 (6): 1391–9.
61. Truszevska A, Foronczewicz B, Pączek L. The role and diagnostic value of cell-free DNA in systemic lupus erythematosus. *Clin Exp Rheumatol*. 2017 Mar–Apr; 35 (2): 330–6.
62. Ershova ES, Jestkova EM, Chestkov IV, Porokhovnik LN, Izevskaya VL, Kutsev SI et al. Quantification of cell-free DNA in blood plasma and DNA damage degree in lymphocytes to evaluate dysregulation of apoptosis in schizophrenia patients. *J Psychiatr Res*. 2017 Apr; 87: 15–22.

63. Breitbach S, Tug S, Simon P. Circulating cell-free DNA: an upcoming molecular marker in exercise physiology. *Sports Med.* 2012 Jul; 42 (7): 565–86.
64. Marcos V, Zhou-Suckow Z, Önder Yildirim A, Bohla A, Hector A, Vitkov L et al. Free DNA in cystic fibrosis airway fluids correlates

- with airflow obstruction. *Mediators Inflamm.* 2015; 2015: 408935.
65. Hardy T, Zeybel M, Day CP, Dipper C, Masson S, McPherson S et al. Plasma DNA methylation: a potential biomarker for stratification of liver fibrosis in non-alcoholic fatty liver disease. *Gut.* 2017 Jul; 66 (7): 1321–8.

References

1. Mandel P, Metais P. Les acides nucléiques du plasma sanguin chez l'homme. *C R Seances Soc Biol Fil.* 1948 Feb; 142 (3–4): 241–3.
2. Koffler D, Agnello V, Winchester R, Kunkel HG. The occurrence of single-stranded DNA in the serum of patients with systemic lupus erythematosus and other diseases. *J Clin Invest.* 1973 Jan; 52 (1): 198–204.
3. Leon SA, Ehrlich GE, Shapiro B, Labbate VA. Free DNA in the serum of rheumatoid arthritis patients. *J Rheumatol.* 1977 Summer; 4 (2): 139–43.
4. Tan EM, Schur PH, Carr RI, Kunkel HG. Deoxybonucleic acid (DNA) and antibodies to DNA in the serum of patients with systemic lupus erythematosus. *J Clin Invest.* 1966 Nov; 45 (11): 1732–40.
5. Stroun M, Anker P, Maurice P, Gahan PB. Circulating nucleic acids in higher organisms. *Int Rev Cytol.* 1977; 51: 1–48.
6. Leon SA, Shapiro B, Sklaroff DM, Yaros MJ. Free DNA in the serum of cancer patients and the effect of therapy. *Cancer Res.* 1977 Mar; 37 (3): 646–50.
7. Sorenson GD, Pribish DM, Valone FH, Memoli VA, Bzik DJ, Yao SL. Soluble normal and mutated DNA sequences from single-copy genes in human blood. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 1994 Jan–Feb; 3 (1): 67–71.
8. Shaw JA, Smith BM, Walsh T, Johnson S, Primrose L, Slade MJ et al. Microsatellite alterations plasma DNA of primary breast cancer patients. *Clin Cancer Res.* 2000 Mar; 6 (3): 1119–24.
9. Fujiwara K, Fujimoto N, Tabata M, Nishii K, Matsuo K, Hotta K et al. Identification of epigenetic aberrant promoter methylation in serum DNA is useful for early detection of lung cancer. *Clin Cancer Res.* 2005 Feb 1; 11 (3): 1219–25.
10. Lo YM, Leung TN, Tein MS, Sargent IL, Zhang J, Lau TK et al. Quantitative abnormalities of fetal DNA in maternal serum in preeclampsia. *Clin Chem.* 1999 Feb; 45 (2): 184–8.
11. Zhong XY, Bürk MR, Troeger C, Kang A, Holzgreve W, Hahn S. Fluctuation of maternal and fetal free extracellular circulatory DNA in maternal plasma. *Obstet Gynecol.* 2000 Dec; 96 (6): 991–6.
12. Wang BG, Huang HY, Chen YC, Bristow RE, Kassaei K, Cheng CC et al. Increased plasma DNA integrity in cancer patients. *Cancer Res.* 2003 Jul 15; 63 (14): 3966–8.
13. Fan HC, Blumenfeld YJ, Chitkara U, Hudgins L, Quake SR. Noninvasive diagnosis of fetal aneuploidy by shotgun sequencing DNA from maternal blood. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2008 Oct 21; 105 (42): 16266–71.
14. Chu T, Bunce K, Hogge WA, Peters DG. Statistical model for whole genome sequencing and its application to minimally invasive diagnosis of fetal genetic disease. *Bioinformatics.* 2009 May 15; 25 (10): 1244–50.
15. Stroun M, Anker P, Maurice P, Lyautey J, Lederrey C, Beljanski M. Neoplastic characteristics of the DNA found in the plasma of cancer patients. *Oncology.* 1989; 46 (5): 318–22.
16. Vasioukhin V, Anker P, Maurice P, Lyautey J, Lederrey C, Stroun M. Point mutations of the N-ras gene in the blood plasma DNA of patients with myelodysplastic syndrome or acute myelogenous leukaemia. *Br J Haematol.* 1994 Apr; 86 (4): 774–9.
17. Lo YM, Zhang J, Leung TN, Lau TK, Chang AM, Hjelm NM. Rapid clearance of fetal DNA from maternal plasma. *Am J Hum Genet.* 1999 Jan; 64 (1): 218–24.
18. Tsumita T, Iwanaga M. Fate of injected deoxyribonucleic acid in mice. *Nature.* 1963 Jun 15; 198: 1088–9.
19. Jahr S, Hentze H, Englisch S, Hardt D, Fackelmayer FO, Hesch RD et al. DNA fragments in the blood plasma of cancer patients: quantitations and evidence for their origin from apoptotic and necrotic cells. *Cancer Res.* 2001 Feb 15; 61 (4): 1659–65.
20. Diehl F, Li M, Dressman D, He Y, Shen D, Szabo S et al. Detection and quantification of mutations in the plasma of patients with colorectal tumors. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2005 Nov 8; 102 (45): 16368–73.
21. Fairbairn DW, O'Neill KL. Necrotic DNA degradation mimics apoptotic nucleosomal fragmentation comet tail length. *In Vitro Cell Dev Biol Anim.* 1995 Mar; 31 (3): 171–3.
22. Tran TT, Groben P, Pisetsky DS. The release of DNA into the plasma of mice following hepatic cell death by apoptosis and necrosis. *Biomarkers.* 2008 Mar; 13 (2): 184–200.
23. van Nieuwenhuijze AE, van Lopik T, Smeenk RJ, Aarden LA. Time between onset of apoptosis and release of nucleosomes from apoptotic cells: putative implications for systemic lupus erythematosus. *Ann Rheum Dis.* 2003 Jan; 62 (1): 10–4.
24. Brinkmann V, Reichard U, Goosmann C, Fauler B, Uhlemann Y, Weiss DS et al. Neutrophil extracellular traps kill bacteria. *Science.* 2004 Mar 5; 303 (5663): 1532–5.
25. Gupta AK, Hasler P, Holzgreve W, Gebhardt S, Hahn S. Induction of neutrophil extracellular DNA lattices by placental microparticles and IL-8 and their presence in preeclampsia. *Hum Immunol* 2005 Nov; 66 (11): 1146–54.
26. Gupta AK, Joshi MB, Philippova M, Erne P, Hasler P, Hahn S et al. Activated endothelial cells induce neutrophil extracellular traps and are susceptible to NETosis-mediated cell death. *FEBS Lett.* 2010 Jul 16; 584 (14): 3193–7.
27. Demers M, Krause DS, Schatzberg D, Martinod K, Voorhees JR, Fuchs TA et al. Cancers predispose neutrophils to release extracellular DNA traps that contribute to cancer-associated thrombosis. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2012 Aug 7; 109 (32): 13076–81.
28. Erpenbeck L, Schön MP. Neutrophil extracellular traps: protagonists of cancer progression? *Oncogene.* 2017 May 4; 36 (18): 2483–90.
29. Peters DL, Pretorius PJ. Origin, translocation and destination of extracellular occurring DNA — A new paradigm in genetic behaviour. *Clin Chim Acta.* 2011 May 12; 412 (11–12): 806–11.
30. Reclusa P, Sirera R, Araujo A, Giallombardo M, Valentino A, Sorber L et al. Exosomes genetic cargo in lung cancer: a truly Pandora's box. *Transl Lung Cancer Res.* 2016 Oct; 5 (5): 483–91.
31. van der Vaart M, Pretorius PJ. The origin of circulating free DNA. *Clin Chem.* 2007 Dec; 53 (12): 2215.
32. Gahan PB, Anker P, Stroun M. Metabolic DNA as the origin of spontaneously released DNA? *Ann N Y Acad Sci.* 2008 Aug; 1137: 7–17.
33. Aucamp J, Bronkhorst AJ, Peters DL, Van Dyk HC, Van der Westhuizen FH, Pretorius PJ. Kinetic analysis, size profiling, and bioenergetic association of DNA released by selected cell lines in vitro. *Cell Mol Life Sci.* 2017 Jul; 74 (14): 2689–707.
34. Lo YM, Corbetta N, Chamberlain PF, Rai V, Sargent IL, Redman CW et al. Presence of fetal DNA in maternal plasma and serum. *Lancet.* 1997 Aug 16; 350 (9076): 485–7.
35. Rink BD, Norton ME. Screening for fetal aneuploidy. *Semin Perinatol.* 2016 Feb; 40 (1): 35–43.
36. Twiss P, Hill M, Daley R, Chitty LS. Non-invasive prenatal testing for Down syndrome. *Semin Fetal Neonatal Med.* 2014 Feb; 19 (1): 9–14.
37. Guissart C, Dubucs C, Raynal C, Girardet A, Tran Mau Them F et al. Non-invasive prenatal diagnosis (NIPD) of cystic fibrosis: an optimized protocol using MEMO fluorescent PCR to detect the p.Phe508del mutation. *J Cyst Fibros.* 2017 Mar; 16 (2): 198–206.
38. De Franco E, Caswell R, Houghton JA, Iotova V, Hattersley AT,

- Ellard S. Analysis of cell-free fetal DNA for non-invasive prenatal diagnosis in a family with neonatal diabetes. *Diabet Med.* 2017 Apr; 34 (4): 582–5.
39. Scalici E, Traver S, Molinari N, Mullet T, Monforte M, Vintejoux E et al. Cell-free DNA in human follicular fluid as a biomarker of embryo quality. *Hum Reprod.* 2014 Dec; 29 (12): 2661–9.
 40. Shamonki MI, Jin H, Haimowitz Z, Liu L. Proof of concept: preimplantation genetic screening without embryo biopsy through analysis of cell-free DNA in spent embryo culture media. *Fertil Steril.* 2016 Nov; 106 (6): 1312–8.
 41. De Vlaminc I, Martin L, Kertesz M, Patel K, Kowarsky M, Strehl C et al. Noninvasive monitoring of infection and rejection after lung transplantation. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2015 Oct 27; 112 (43): 13336–41.
 42. Bloom RD, Bromberg JS, Poggio ED, Bunnapradist S, Langone AJ, Sood P et al. Cell-Free DNA and Active Rejection in Kidney Allografts. *J Am Soc Nephrol.* 2017 Jul; 28 (7): 2221–32.
 43. Margraf S, Lögters T, Reipen J, Altrichter J, Scholz M, Windolf J. Neutrophil-derived circulating free DNA (cf-DNA/NETs): a potential prognostic marker for posttraumatic development of inflammatory second hit and sepsis. *Shock.* 2008 Oct; 30 (4): 352–8.
 44. Hamaguchi S, Akeda Y, Yamamoto N, Seki M, Yamamoto K, Oishi K et al. Origin of Circulating Free DNA in Sepsis: Analysis of the CLP Mouse Model. *Mediators Inflamm.* 2015; 2015: 614518.
 45. Jung K, Fleischhacker M, Rabien A. Cell-free DNA in the blood as a solid tumor biomarker — a critical appraisal of the literature. *Clin Chim Acta.* 2010 Nov 11; 411 (21–22): 1611–24.
 46. Crowley E, Di Nicolantonio F, Loupakis F, Bardelli A. Liquid biopsy: monitoring cancer-genetics in the blood. *Nat Rev Clin Oncol.* 2013 Aug; 10 (8): 472–84.
 47. Wan JC, Massie C, Garcia-Corbacho J, Mouliere F, Brenton JD, Caldas C et al. Liquid biopsies come of age: towards implementation of circulating tumour DNA. *Nat Rev Cancer.* 2017 Apr; 17 (4): 223–38.
 48. Bidart J-M, Thuillier F, Augereau C, Chalas J, Daver A, Jacob N et al. Kinetics of serum tumor marker concentrations and usefulness in clinical monitoring. *Clin Chem.* 1999 Oct; 45 (10): 1695–707.
 49. Diehl F, Schmidt K, Choti MA, Romans K, Goodman S, Li M et al. Circulating mutant DNA to assess tumor dynamics. *Nat Med.* 2008 Sep; 14 (9): 985–90.
 50. Thierry AR, Mouliere F, Gongora C, Ollier J, Robert B, Ychou M et al. Origin and quantification of circulating DNA in mice with human colorectal cancer xenografts. *Nucleic Acids Res.* 2010 Oct; 38 (18): 6159–75.
 51. Zhou J, Chang L, Guan Y, Yang L, Xia X, Cui L et al. Application of Circulating Tumor DNA as a Non-Invasive Tool for Monitoring the Progression of Colorectal Cancer. *PLoS One.* 2016 Jul 26; 11 (7): e0159708.
 52. Takahashi H, Kagara N, Tanei T, Naoi Y, Shimoda M, Shimomura A et al. Correlation of Methylated Circulating Tumor DNA with Response to Neoadjuvant Chemotherapy in Breast Cancer Patients. *Clin Breast Cancer.* 2017 Feb; 17 (1): 61–69.
 53. Visvanathan K, Fackler MS, Zhang Z, Lopez-Bujanda ZA, Jeter SC, Sokoll LJ et al. Monitoring of Serum DNA Methylation as an Early Independent Marker of Response and Survival in Metastatic Breast Cancer: TBCRC 005 Prospective Biomarker Study. *J Clin Oncol.* 2017 Mar; 35 (7): 751–8.
 54. Tie J, Wang Y, Tomasetti C, Li L, Springer S, Kinde I et al. Circulating tumor DNA analysis detects minimal residual disease and predicts recurrence in patients with stage II colon cancer. *Sci Transl Med.* 2016 Jul 6; 8 (346): 346ra92.
 55. Bettegowda C, Sausen M, Leary RJ, Kinde I, Wang Y, Agrawal N et al. Detection of circulating tumor DNA in early- and late-stage human malignancies. *Sci Transl Med.* 2014 Feb 19; 6 (224): 224ra24.
 56. Margolin G, Petrykowska HM, Jameel N, Bell DW, Young AC, Elnitski L. Robust Detection of DNA Hypermethylation of ZNF154 as a Pan-Cancer Locus with in Silico Modeling for Blood-Based Diagnostic Development. *J Mol Diagn.* 2016 Mar; 18 (2): 283–98.
 57. Lehmann-Werman R, Neiman D, Zemmour H, Moss J, Magenheimer J, Vaknin-Dembinsky A et al. Identification of tissue-specific cell death using methylation patterns of circulating DNA. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2016 Mar 29; 113 (13): E1826–34.
 58. Snyder MW, Kircher M, Hill AJ, Daza RM, Shendure J. Cell-free DNA Comprises an In Vivo Nucleosome Footprint that Informs Its Tissues-Of-Origin. *Cell.* 2016 Jan 14; 164 (1–2): 57–68.
 59. Smith J, Kean V, Bianchi DW, Feldman G, Petrucci N, Simon M et al. Cell-free DNA results lead to unexpected diagnosis. *Clin Case Rep.* 2017 Jul 3; 5 (8): 1323–6.
 60. Raptis L, Menard HA. Quantitation and characterization of plasma DNA in normals and patients with systemic lupus erythematosus. *J Clin Invest.* 1980 Dec; 66 (6): 1391–9.
 61. Truszevska A, Foronczewicz B, Pączek L. The role and diagnostic value of cell-free DNA in systemic lupus erythematosus. *Clin Exp Rheumatol.* 2017 Mar–Apr; 35 (2): 330–6.
 62. Ershova ES, Jestkova EM, Chestkov IV, Porokhovnik LN, Izevskaya VL, Kutsev SI et al. Quantification of cell-free DNA in blood plasma and DNA damage degree in lymphocytes to evaluate dysregulation of apoptosis in schizophrenia patients. *J Psychiatr Res.* 2017 Apr; 87: 15–22.
 63. Breitbach S, Tug S, Simon P. Circulating cell-free DNA: an upcoming molecular marker in exercise physiology. *Sports Med.* 2012 Jul; 42 (7): 565–86.
 64. Marcos V, Zhou-Suckow Z, Önder Yildirim A, Bohla A, Hector A, Vitkov L et al. Free DNA in cystic fibrosis airway fluids correlates with airflow obstruction. *Mediators Inflamm.* 2015; 2015: 408935.
 65. Hardy T, Zeybel M, Day CP, Dipper C, Masson S, McPherson S et al. Plasma DNA methylation: a potential biomarker for stratification of liver fibrosis in non-alcoholic fatty liver disease. *Gut.* 2017 Jul; 66 (7): 1321–8.

АНАЛИЗ СОМАТИЧЕСКИХ МУТАЦИЙ В ГЕНАХ RAS-КАСКАДА СВОБОДНО ЦИРКУЛИРУЮЩЕЙ ДНК ПЛАЗМЫ КРОВИ ПАЦИЕНТОВ С КОЛОРЕКТАЛЬНЫМ РАКОМ МЕТОДОМ УСИЛЕННОЙ АЛЛЕЛЬ-СПЕЦИФИЧЕСКОЙ ПЦР В «РЕАЛЬНОМ ВРЕМЕНИ»

Е. Н. Телышева, Г. П. Снигирева ✉

Лаборатория молекулярной биологии и цитогенетики,
Российский научный центр рентгенодиагностики, Москва

Анализ внеклеточной ДНК (жидкостная биопсия) — перспективное направление в современной медицине, особенно в онкологии. В статье представлены результаты исследования соматических онкоспецифических мутаций в свободно циркулирующей ДНК (сцДНК) плазмы крови пациентов с колоректальным раком стадий I–IV методом усиленной аллель-специфической полимеразной цепной реакции в «реальном времени». Названный метод был разработан специально для анализа биологических образцов, содержащих небольшое количество мутантной опухолевой ДНК. В исследование включили 46 человек (18 женщин, 28 мужчин) в возрасте 48–86 лет (средний возраст — $67,1 \pm 8,8$ года). Все пациенты получили хирургическое лечение (радикальное — в 85 % случаев). Молекулярно-генетическое исследование сцДНК плазмы крови проводили на основе результатов стандартного исследования образцов опухолевой ткани. Кровь отбирали до операции и на 5 день после нее. Анализировали мутации в генах *KRAS* и *BRAF*, которые были выявлены в ткани опухоли. Результаты исследования показали, что изучаемый метод позволяет выявлять мутации в генах RAS-каскада чаще на стадиях II–IV заболевания, а порог его чувствительности составляет 0,1 %. Исследование сцДНК до и после операции предположительно может давать дополнительную информацию о качестве хирургического вмешательства, появлении метастазов или существовании недиагностированных метастазов. Метод усиленной аллель-специфической ПЦР в «реальном времени» должен быть валидирован и оценен в различных клинических ситуациях.

Ключевые слова: жидкостная биопсия, внеклеточная ДНК, свободно циркулирующая ДНК, циркулирующая опухолевая ДНК, соматические мутации, неинвазивная диагностика, онкология

Благодарности: авторы благодарят Андрея Зарецкого из компании «Евроген» (Москва) за помощь и ценные советы при проведении молекулярно-генетического исследования.

✉ **Для корреспонденции:** Снигирева Галина Петровна
ул. Профсоюзная, д. 86, г. Москва, 117997; sni_gal@mail.ru

Статья получена: 08.08.2017 **Статья принята к печати:** 17.08.2017

THE USE OF WILD-TYPE BLOCKING ALLELE-SPECIFIC REAL-TIME POLYMERASE CHAIN REACTION FOR THE ANALYSIS OF SOMATIC MUTATIONS IN RAS GENES OF CIRCULATING FREE DNA ISOLATED FROM THE BLOOD PLASMA OF PATIENTS WITH COLORECTAL CANCER

Telysheva EN, Snigireva GP ✉

Laboratory of Molecular Biology and Cytogenetics,
Russian Research Center of Roentgenoradiology, Moscow, Russia

Screening for cell-free DNA usually referred to as liquid biopsy holds great promise in cancer diagnosis and treatment. This article presents the results of the analysis of somatic tumor-specific mutations in circulating free DNA (cfDNA) isolated from the blood plasma of patients with stages I–IV colorectal cancer, based on the use of wild-type blocking allele-specific real-time polymerase chain reaction. This technique was specially designed for the analysis of biological specimens containing small amounts of mutant circulating tumor DNA. The study included 46 patients (18 female and 28 male participants) between 48 and 86 years of age (mean age was 67.1 ± 8.8 years). All patients underwent surgical treatment (radical surgery was performed on 85 % of the participants). Besides the molecular genetic analysis of cfDNA isolated from the blood plasma, standard histological staining was performed. Patients' blood samples were collected before the surgery and on day 5 after it to test for *KRAS* and *BRAF* mutations. The applied PCR technique proved to be effective in detecting mutations in the RAS genes in stages II–IV of the disease, its sensitivity threshold being 0.1 %. Analysis of cfDNA before and after surgery may provide additional information on the surgical treatment outcome, development of new metastases, or presence of those previously overlooked. Wild-type blocking allele-specific real-time PCR is awaiting further validation in different clinical situations.

Keywords: liquid biopsies, cell-free DNA, circulating free DNA, circulating tumor DNA, somatic mutation, non-invasive testing, cancer

Acknowledgements: the authors thank Andrey Zaretsky of Evrogen (Moscow) for his help and valuable advice in conducting molecular genetic analysis

✉ **Correspondence should be addressed:** Galina Snigireva
ul. Profsoyuznaya, d. 86, Moscow, Russia, 117997; sni_gal@mail.ru

Received: 08.08.2017 **Accepted:** 17.08.2017

Выбор тактики лечения пациентов с учетом индивидуальных молекулярно-генетических характеристик опухоли лежит в основе персонализированного подхода в онкологии. Такой подход позволяет существенно повысить качество и эффективность лечения за счет воздействия таргетными препаратами на генетические нарушения в опухоли. Как показали многочисленные исследования, генетический профиль опухоли является уникальной характеристикой конкретного больного и отражает изменения не только в генах, участвующих в развитии данного заболевания, но и случайные изменения в разных участках генома [1, 2].

Анализ молекулярно-генетических маркеров проводится, как правило, на образцах опухолевой ткани, получаемых при хирургической операции или с помощью биопсии до начала лечения. Однако эти методы сопряжены с серьезными трудностями, связанными с получением материала для исследования, его обработкой, а также информативностью: для опухолей характерна молекулярная гетерогенность [3, 4]. При этом и анализ материала, полученного только из одной части опухоли, не дает полного представления о молекулярно-генетическом профиле опухоли и ее метастазов, а многократная биопсия разных участков опухоли трудоемка и дорогостояща.

Как известно, молекулярно-генетические нарушения, возникшие в процессе канцерогенеза, могут быть выявлены не только в самой опухолевой ткани или ее метастазах, но и в плазме или сыворотке крови пациента с помощью анализа циркулирующей опухолевой ДНК (цоДНК), которая выполняет роль онкомаркера [5, 6]. Анализ внеклеточной ДНК называют жидкостной биопсией, и этот метод позволяет преодолеть ограничения, связанные с получением образцов опухолевой ткани и работой с ними, являясь идеальным инструментом для исследования молекулярно-генетических нарушений у пациентов с онкологическими заболеваниями [7]. Взятие пробы крови является минимально инвазивной процедурой, которая может быть осуществлена в любое время в течение курса терапии, что позволяет наблюдать за молекулярными изменениями в опухоли в динамике [8, 9].

Содержание цоДНК в плазме крови очень небольшое: ее количество зависит от стадии заболевания и часто составляет менее 1 % от общего количества свободно циркулирующей ДНК (сцДНК) [10, 11]. По этой причине для обнаружения молекулярно-генетических нарушений в цоДНК необходимы высокочувствительные методы анализа, такие как секвенирование нового поколения (next generation sequencing, NGS) и цифровая полимеразная цепная реакция (ПЦР; droplet digital polymerase chain reaction, ddPCR). Высокая чувствительность этих методов при анализе соматических мутаций в сцДНК плазмы крови была подтверждена неоднократно [12–14]. Однако их рутинное применение в онкологии ограничено из-за крайне высокой стоимости одного исследования, а в случае с NGS — также из-за неоправданной избыточности получаемой информации.

Одним из перспективных методов анализа сцДНК плазмы крови является метод усиленной аллель-специфической ПЦР, разработанный компанией «Евроген» (Россия) специально для работы с биологическими образцами, содержащими небольшое количество мутантной ДНК. Принцип метода заключается в сочетании аллель-специфической ПЦР с блокадой амплификации аллеля «дикого типа» — так же, как при использовании метода мутационно-специфической ПЦР [15]. Две пары праймеров подбирают таким образом, чтобы амплифицировать целе-

вой фрагмент с одной конкретной мутацией для анализа. Одним из преимуществ метода является короткая длина ПЦР-продукта — всего лишь 90 п. о., что важно при анализе сцДНК, присутствующей в кровотоке в крайне фрагментированном виде. Теоретически данный метод позволяет анализировать любые мутации. На сегодняшний день с его помощью можно проверить на 7 ключевых мутаций ген *KRAS* (6 замен в кодоне 12 — p.G12D, p.G12V, p.G12C, p.G12S, p.G12A, p.G12R и замену в кодоне 13 — p.G13D) и на 5 мутаций — ген *BRAF* (p.V600E, p.V600E-2, p.V600K, p.V600K-2, p.V600D). Чувствительность метода усиленной аллель-специфической ПЦР составляет не менее 10 копий ДНК с мутацией, а избирательность — 0,1–1,0 % (в зависимости от количества исходной ДНК), при этом частота ложноположительных результатов не превышает 0,05 %.

В настоящей работе представлены результаты анализа мутаций в генах RAS-каскада (*KRAS*, *BRAF*) в сцДНК плазмы крови пациентов с колоректальным раком (КРР) методом усиленной аллель-специфической ПЦР.

ПАЦИЕНТЫ И МЕТОДЫ

В исследование были включены пациенты, которые проходили обследование и лечение в Российском научном центре рентгенорадиологии (г. Москва) в 2010–2016 гг. Критерием включения в исследование являлось наличие у пациента морфологически подтвержденной злокачественной эпителиальной опухоли ободочной или прямой кишки.

Основываясь на результатах молекулярно-генетического исследования операционного материала больных КРР (метод ПЦР в «реальном времени» с последующим секвенированием по Сэнгеру), для участия в исследовании отобраны 46 человек, у которых в опухолевой ткани были выявлены активирующие мутации в гене *KRAS* (экзон 2: кодоны 12 и 13) или *BRAF* (экзон 15: кодон 600) [16]. В группу исследования включили 46 человек (18 женщин и 28 мужчин) в возрасте от 48 до 86 лет (средний возраст — $67,1 \pm 8,8$ года).

У 13 пациентов (28 %) была стадия I заболевания, у 10 (22 %) — стадия II, также у 10 — стадия III и еще у 13 — стадия IV (табл. 1). По гистологической структуре практически все опухоли являлись аденокарциномами различной степени дифференцировки: у 4 участников исследования опухоль была низкодифференцированной, у 25 — умереннодифференцированной, у 16 — высокодифференцированной, в одном случае аденокарцинома была слизистой.

Все пациенты получили хирургическое лечение: в 85 % случаев (39 человек) операция носила радикальный характер, в 15 % случаев (7 человек со стадией IV заболевания) — нерадикальный. Пациентам проводили молекулярно-генетическое исследование для обнаружения мутаций, выявленных в ткани опухоли: в гене *KRAS* — мутаций p.G12D, p.G13D, p.G12V, p.G12C, p.G12S, p.G12A, в гене *BRAF* — мутации p.V600E, наиболее распространенной при КРР. Для этого до хирургического вмешательства (n = 46) и через 5 дней после него (n = 35) у пациентов брали кровь. По имеющимся в литературе данным, период полувыведения сцДНК из плазмы крови составляет около 15 ч и зависит от локализации опухоли, ее гистологического типа и от стадии заболевания [17, 18]. Таким образом, отбор крови на 5 сутки после операции гарантировал полное выведение цоДНК из кровяного русла в случае удаления опухоли. Кровь отбирали в объеме 15 мл в

пробирки с ЭДТА, в течение часа после взятия крови плазму отделяли от клеточного дебриса путем центрифугирования в течение 15 мин при 4 °С в три этапа: при 1 400, 3 400 и 4 400 об/мин соответственно. Аликвоты плазмы (по 5 мл) хранили до проведения исследования при –80 °С.

Свободно циркулирующую ДНК выделяли из плазмы с помощью набора QIAamp Circulating Nucleic Acid Kit (Qiagen, Нидерланды) по протоколу производителя. Объем элюата для каждого образца составил 20 мкл. Концентрацию выделенной цДНК измеряли методом ПЦР в «реальном времени» с использованием набора «ХУ-Детект» («Синтол», Россия) в соответствии с протоколом производителя.

Для исследования цДНК на наличие мутаций в генах *KRAS* и *BRAF* применяли метод усиленной аллель-специфической ПЦР в «реальном времени» с использованием наборов реагентов фирмы «Евроген» (Россия) на приборе 7500 real-time PCR systems (Applied Biosystems, США). Каждый образец цДНК в исследование брали в объеме 10 мкл.

Статистическую обработку данных проводили с использованием программных пакетов Statistica 8 (StatSoft, США) и Microsoft Excel 2013. Сравнение вариационных рядов проводили с использованием U-критерия Манна-Уитни.

Исследование было одобрено этическим комитетом Российского научного центра рентгенорадиологии (протокол № 3 от 17 марта 2014 г.). Все пациенты дали письменное информированное согласие на участие в исследовании.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Молекулярно-генетическое исследование цДНК плазмы крови, полученной до операции, показало, что у 24 паци-

ентов (52 %) в циркулирующей опухолевой ДНК присутствуют мутации в экзоне 2 гена *KRAS* или экзоне 15 гена *BRAF*, а в цДНК других 22 пациентов их нет (табл. 1). Мы проанализировали распределение пациентов по подгруппам в зависимости от стадии заболевания и установили, что в группе больных с мутациями в генах RAS-каскада большинство (15 человек, 63 %) имели стадию III или IV, а в группе больных без мутаций в цДНК большинство (10 человек, 45 %) имели стадию I заболевания.

В табл. 1 также приведены значения концентрации цДНК и относительного содержания мутантной цДНК в плазме крови участников исследования. У пациентов с онкоспецифическими мутациями в генах RAS-каскада, выявленных изучаемым методом, содержание цДНК было выше независимо от стадии заболевания (особенно заметной была разница между подгруппами больных со стадией IV), но различия оказались статистически незначимыми ввиду высокой вариабельности показателя. А вот относительное содержание мутантной цДНК у пациентов этой группы было достоверно выше, чем в подгруппах пациентов, у которых мутации не были обнаружены ($p < 0,01-0,03$). В этих подгруппах содержание мутантной цДНК в плазме крови было ниже порога чувствительности метода, использованного в данной работе, который составляет 0,1%.

Мы проанализировали возможную связь результатов молекулярно-генетического исследования до операции с прогнозом заболевания, появлением метастазов и рецидивом.

Срок наблюдения составил 27 мес. В группе пациентов, у которых выявили мутации в цДНК плазмы крови изучаемым методом до операции ($n = 24$), у 19 человек (79 %) заболевание прогрессировало, причем 15 человек впоследствии умерли (табл. 2). Во второй группе больных

Таблица 1. Распределение пациентов с колоректальным раком по группам в зависимости от стадии заболевания с учетом содержания свободно циркулирующей ДНК в плазме крови до операции и факта выявления онкоспецифических мутаций в генах RAS-каскада методом аллель-специфической ПЦР в «реальном времени»

Стадия заболевания	Показатель	Пациенты с выявленными мутациями, (n = 24)	Пациенты без мутаций, (n = 22)	p-value
I	Число больных (доля в группе, %)	3 (12)	10 (45)	–
	Содержание цДНК в плазме крови, нг/мкл	3,1 (1,4–3,7)	1,4 (1,2–2,6)	0,09
	Отн. содержание мутантной цДНК, %	1,04 (0,14–12,37)	0,02 (0,0–0,03)	0,01*
II	Число больных (доля в группе, %)	6 (25)	4 (15)	–
	Содержание цДНК в плазме крови, нг/мкл	2,05 (1,6–4,0)	1,4 (0,9–1,8)	0,11
	Отн. содержание мутантной цДНК, %	0,47 (0,2–1,9)	0,0 (0,0–0,0)	0,01*
III	Число больных (доля в группе, %)	4 (17)	6 (27)	–
	Содержание цДНК в плазме крови, нг/мкл	2,4 (1,4–4,9)	1,9 (0,9–1,9)	0,52
	Отн. содержание мутантной цДНК, %	2,59 (1,05–10,77)	0,04 (0,0–0,09)	0,01*
IV	Число больных (доля в группе, %)	11 (46)	2 (9)	–
	Содержание цДНК в плазме крови, нг/мкл	3,8 (1,9–6,9)	1,5 (1,3–1,7)	0,14
	Отн. содержание мутантной цДНК, %	5,65 (1,23–20,96)	0,04 (0,0–0,08)	0,03*

Примечание. Данные представлены в виде $M(Q_1-Q_3)$, т. е. медиана (квартиль первого порядка – квартиль третьего порядка). Достоверность различий определяли при сравнении между собой групп пациентов с выявленными мутациями и без мутаций в генах RAS-каскада. Символом * отмечены статистически значимые различия.

($n = 22$) 17 человек были живы в течение всего срока наблюдения, а у 5 человек было отмечено прогрессирование заболевания, они впоследствии умерли. В табл. 2 приведены данные о концентрации сцДНК и относительном содержании мутантной цоДНК в плазме крови. Значения обоих показателей были достоверно выше в подгруппе пациентов с выявленными в цоДНК мутациями и прогрессированием заболевания по сравнению с подгруппой пациентов с невыявленными мутациями и прогрессированием заболевания. В группе пациентов с не выявленными изучаемым методом мутациями содержание сцДНК и мутантной цоДНК было небольшим, что, по-видимому, и не позволило обнаружить мутации. В то же время в случае с 5 больными без прогрессирования заболевания метод усиленной аллель-специфической ПЦР в «реальном времени» был эффективен, несмотря на низкое содержание сцДНК и цоДНК в плазме крови.

Для 35 из 46 участников исследования сцДНК плазмы крови была проанализирована не только до операции, но и на 5 день после хирургического лечения (табл. 3). В группе больных с выявленными мутациями у 13 человек (76 %) зарегистрировано прогрессирование заболевания, 9 человек из этой группы (53 %) имели стадию IV заболевания, из них 5 получили нерадикальное хирургическое лечение. По-видимому, по факту наличия или отсутствия онкоспецифических мутаций в сцДНК плазмы крови можно судить о степени радикальности хирургической операции, предполагая, что у больных с выявленными мутациями и, соответственно, высоким содержанием мутантной цоДНК, очаги опухоли и метастазов были удалены не полностью или имеются метастазы, которые не были диагностированы.

В группе пациентов, у которых не были выявлены мутации в генах RAS-каскада при молекулярно-генетическом исследовании сцДНК, 14 человек (78 %) были живы на протяжении всего срока наблюдения, а у 4 человек было отмечено прогрессирование заболевания. В этой группе 7 человек имели стадию I заболевания, 5 — стадию II, 5 — стадию III и только 1 — стадию IV.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Как известно, при развитии онкологических заболеваний содержание сцДНК в крови достоверно повышается, но при этом не зависит от локализации опухоли [19]. Имеются данные о связи содержания сцДНК в крови с клиническим течением онкологического заболевания [20], причем более высокое по сравнению с нормой содержание сцДНК в крови часто наблюдается уже на ранних стадиях опухолевого процесса, а также может резко возражать при метастазировании [21]. При этом концентрация сцДНК может сильно различаться у разных пациентов [10]. Это неудивительно, если учесть, что сцДНК может появляться в крови не только в результате гибели клеток опухоли и окружающих ее тканей, но и при естественном разрушении клеток крови. Вклад в общее содержание сцДНК в крови может вносить также секреция опухолевыми клетками фрагментов нуклеиновых кислот, в том числе амплифицированных. Известно, что амплификация отдельных участков генов — достаточно частое событие при опухолевой патологии. В результате общее количество сцДНК у больных с онкологическими заболеваниями сильно варьирует от пациента к пациенту, что не позволяет использовать концентрацию сцДНК в качестве маркера.

Таблица 2. Характеристика клинического течения заболевания пациентов с колоректальным раком с учетом содержания свободно циркулирующей ДНК в плазме крови до операции и факта выявления онкоспецифических мутаций в генах RAS-каскада методом аллель-специфической ПЦР в «реальном времени»

Прогрессирование заболевания	Показатель	Пациенты с выявленными мутациями, (n = 24)	Пациенты без мутаций, (n = 22)	p-value
Да	Число больных (доля в группе, %)	19 (79)	5 (23)	–
	Содержание сцДНК в плазме крови, нг/мкл	3,7 (1,9–6,7)	1,3 (0,9–1,7)	0,01*
	Отн. содержание мутантной цоДНК, %	1,9 (0,85–14,59)	0,0 (0,0–0,08)	0,0007*
Нет	Число больных (доля в группе, %)	5 (21)	17 (77)	–
	Содержание сцДНК в плазме крови, нг/мкл	1,7 (1,6–2,2)	1,7 (1,2–1,9)	0,64
	Отн. содержание мутантной цоДНК, %	0,36 (0,21–3,30)	0,01 (0,00–0,04)	0,0009*

Примечание. Данные представлены в виде $M (Q_1-Q_3)$, т. е. медиана (квартиль первого порядка – квартиль третьего порядка). Достоверность различий определяли при сравнении между собой групп пациентов с выявленными мутациями и без мутаций в генах RAS-каскада. Символом * отмечены статистически значимые различия.

Таблица 3. Характеристика клинического течения заболевания пациентов с колоректальным раком с учетом содержания свободно циркулирующей ДНК в плазме крови после операции и факта выявления онкоспецифических мутаций в генах RAS-каскада методом аллель-специфической ПЦР в «реальном времени»

Прогрессирование заболевания	Показатель	Пациенты с выявленными мутациями, (n = 17)	Пациенты без мутаций, (n = 18)	p-value
Да	Число больных (доля в группе, %)	13 (76)	4 (22)	–
	Содержание сцДНК в плазме крови, нг/мкл	5,4 (3,5–12,7)	8,65 (5,35–11,50)	0,69
	Отн. содержание мутантной цоДНК, %	2,15 (0,19–8,43)	0,0 (0,0–0,01)	0,003*
Нет	Число больных (доля в группе, %)	4 (24)	14 (78)	–
	Содержание сцДНК в плазме крови, нг/мкл	4,75 (2,35–6,95)	5,8 (4,9–8,0)	0,37
	Отн. содержание мутантной цоДНК, %	0,23 (0,16–0,42)	0,02 (0,0–0,07)	0,003*

Примечание. Данные представлены в виде $M (Q_1-Q_3)$, т. е. медиана (квартиль первого порядка – квартиль третьего порядка). Достоверность различий определяли при сравнении между собой групп пациентов с выявленными мутациями и без мутаций в генах RAS-каскада. Символом * отмечены статистически значимые различия.

Косвенно судить о количестве циркулирующей опухолевой ДНК можно, анализируя определенные онкоассоциированные мутации. При этом важно учитывать, что содержание мутантной цоДНК может значительно отличаться от общего содержания цоДНК: быть ниже за счет гетерогенности новообразования [22]. По этой причине не всегда, особенно на ранних стадиях заболевания, удается определить присутствие цоДНК в плазме крови. В свою очередь, это может приводить к ложноотрицательным результатам и, соответственно, снижать чувствительность метода, используемого для анализа сцДНК. Это подтверждают данные нашего исследования, в котором нам не удалось выявить мутации в генах RAS-каскада у пациентов с ранними стадиями заболевания.

В работе Rachiglio и соавт. [13], посвященной исследованию цоДНК плазмы крови 44 пациентов с немелкоклеточным раком легкого и 35 пациентов с колоректальным раком, продемонстрированы возможности методов NGS и цифровой ПЦР. Генетические изменения (мутации в гене *EGFR*) в сцДНК, аналогичные выявленным при анализе опухолевой ткани, методом NGS были обнаружены у 77,3 % больных с немелкоклеточным раком легкого и у 2 больных, у которых в опухолевой ткани стандартным методом ПЦР был выявлен дикий тип *EGFR*. Метод цифровой ПЦР подтвердил наличие мутаций у этих 2 больных как в первичной опухоли, так и в плазме крови. В этом же исследовании в 100 % случаев (6/6) методом NGS в плазме крови были подтверждены мутации в гене *KRAS*, выявленные стандартным методом ПЦР у пациентов, обследованных до хирургического лечения. В то же время у прооперированных пациентов мутации были обнаружены методом NGS только в 46,2 % случаев (6/13). Авторы полагают, что метод обладает высокой чувствительностью для анализа мутаций цоДНК плазмы крови, однако она зависит от присутствия в организме опухолевого очага и гетерогенности драйверных мутаций.

В другом исследовании методом таргетного секвенирования анализировали образцы плазмы крови и ткани опухоли на наличие соматических драйверных мутаций у 58 пациентов с немелкоклеточным раком легкого [12]. Авторами были выявлены часто встречающиеся драйверные мутации в генах *EGFR*, *KRAS*, *PIK3CA* и *TP53*, а также более редкие мутации в других генах в цоДНК плазмы крови и ДНК опухолевой ткани, при этом общая concorдантность метода исследования составила 50,4 %, а чувствительность и специфичность — 53,8 и 47,3 % соответственно. Также ими было отмечено, что уровень содержания

сцДНК коррелирует с некоторыми клиническими характеристиками больных, включая стадию заболевания и подтип опухоли.

В работе Tu и соавт. [14] при исследовании образцов опухолевой ткани и плазмы крови 19 пациентов с колоректальным раком методом капельной цифровой ПЦР было показано соответствие полученных данных по выявленным мутациям в 73 % случаев.

Результаты нашего исследования, а также данные литературы свидетельствуют о том, что жидкостную биопсию, основанную на анализе цоДНК плазмы крови, можно применять в качестве дополнительного метода диагностики онкологических заболеваний, но преимущественно на более поздних стадиях заболевания, а также в тех случаях, когда биопсия по какой-либо причине трудно выполнима или может вызвать осложнения. На сегодняшний день клиническое значение анализа сцДНК, по-видимому, связано с применением в качестве прогностического исследования при индивидуальном мониторинге заболевания. Нами показано, что у пациентов с мутациями в цоДНК, выявленными методом усиленной аллель-специфической ПЦР как до операции, так и на 5 день после хирургического лечения, заболевание прогрессирует. На основании анализа онкоспецифических изменений в плазме крови до и после лечения можно делать предположения о степени агрессивности опухоли и возможном метастазировании, оценивать эффективность терапии и вносить коррективы в лечение при отсутствии необходимого ответа на него.

ВЫВОДЫ

По-прежнему существуют проблемы, ограничивающие внедрение в рутинную клиническую практику метода жидкостной биопсии. В частности, сохраняется потребность в дешевых, но высокочувствительных методах анализа сцДНК плазмы крови больных с онкологическими заболеваниями. Представленные в работе промежуточные результаты исследования сцДНК плазмы крови пациентов с колоректальным раком стадий I–IV продемонстрировали, что метод усиленной аллель-специфической ПЦР в «реальном времени» более эффективен при выявлении онкоспецифических мутаций на более поздних стадиях заболевания. Возможно, метод сможет занять достойное место среди инструментов молекулярной диагностики в онкологии. Усилия должны быть направлены на его валидацию, а также оценку возможности его применения в различных клинических ситуациях.

Литература

- Зборовская И. Б. Современные стратегии исследования маркеров опухолевого роста в клинической практике. Успехи молекулярной онкологии. 2014; 2: 4–15. DOI: 10.17650/2313-805X.2014.1.2.4-15.
- Manne U, Jadhav T, Putcha BK. Molecular Biomarkers of Colorectal Cancer and Cancer Disparities: Current Status and Perspective. Curr Colorectal Cancer Rep. 2016; 12 (6): 332–44. DOI: 10.1007/s11888-016-0338-1.
- Overman MJ, Modak J, Kopetz S, Murthy R, Yao JC, Hicks ME et al. Use of research biopsies in clinical trials: Are risks and benefits adequately discussed? J Clin Oncol. 2013 Jan 1; 31 (1): 17–22. DOI: 10.1200/JCO.2012.43.1618.
- Gerlinger M, Rowan AJ, Horswell S, Math M, Larkin J, Endesfelder D et al. Intratumor heterogeneity and branched evolution revealed by multiregion sequencing. N Engl J Med. 2012 Mar 8; 366 (10): 883–92. DOI: 10.1056/NEJMoa1113205. Erratum in N Engl J Med. 2012 Sep 6; 367 (10): 976.
- Fleischhacker M, Schmidt B. Circulating nucleic acids (CNAs) and cancer – A survey. Biochim Biophys Acta. 2007 Jan; 1775 (1): 181–232. DOI: 10.1016/j.bbcan.2006.10.001.
- Gonzalez JA, Garcia-Olmo D, Garcia-Olmo DC. Circulating nucleic acids in plasma and serum (CNAPS): applications in oncology. OncoTargets Ther. 2013 Jul 8; 6: 819–32. DOI: 10.2147/OTT.S44668.
- Ma M, Zhu H, Zhang C, Sun X, Gao X, Chen G. “Liquid biopsy” – ctDNA detection with great potential and challenges. Ann Transl Med. 2015 Sep; 3 (16): 235. DOI: 10.3978/j.issn.2305-5839.2015.09.29.

8. Diaz LA Jr, Bardelli A. Liquid Biopsies: Genotyping Circulating Tumor DNA. *J Clin Oncol*. 2014 Feb 20; 32 (6): 579–86. DOI: 10.1200/JCO.2012.45.2011.
9. Beije N, Helmijr JC, Weerts MJA, Beaufort CM, Wiggin M, Marziali A et al. Somatic mutation detection using various targeted detection assays in paired samples of circulating tumor DNA, primary tumor and metastases from patients undergoing resection of colorectal liver metastases. *Mol Oncol*. 2016 Dec; 10 (10): 1575–84. DOI: 10.1016/j.molonc.2016.10.001.
10. Diehl F, Schmidt K, Choti MA, Romans K, Goodman S, Li M et al. Circulating mutant DNA to assess tumor dynamics. *Nat Med*. 2008 Sep; 14 (9): 985–90. DOI: 10.1038/nm.1789.
11. Holdhoff M, Schmidt K, Donehower R, Diaz LA. Analysis of circulating tumor DNA to confirm somatic KRAS mutations. *J Natl Canc Inst*. 2009; 101 (18): 1284–5. DOI: 10.1093/jnci/djp240.
12. Chen KZ, Lou F, Yang F, Zhang JB, Ye H, Chen W et al. Circulating tumor DNA detection in early-stage non-small cell-lung cancer patients by targeted sequencing. *Sci Rep*. 2016 Aug 24; 6: 31985. DOI: 10.1038/srep31985.
13. Rachiglio AM, Abate RE, Sacco A, Pasquale R, Fenizia F, Lambiase M et al. Limits and potential of targeted sequencing analysis of liquid biopsy in patients with lung and colon carcinoma. *Oncotarget*. 2016 Oct 11; 7 (41): 66595–605. DOI: 10.18632/oncotarget.10704.
14. Tu M, Chia D, Wei F, Wong D. Liquid biopsy for detection of actionable oncogenic mutations in human cancers and electric field induced release and measurement liquid biopsy (eLB). *Analyst*. 2016 Jan 4; 141 (2): 393–402. DOI: 10.1039/c5an01863c.
15. Белоусова А. В., Дрозд О. В., Зарецкий А. Р. Мутационно-специфическая полимеразная цепная реакция для анализа мутаций в «горячих точках» генов K-Ras и B-Raf в биологических образцах онкологических больных. В сб.: Тезисы конференции «Современные принципы диагностики и лечения колоректального рака», посвященной памяти проф. В. И. Кныша; 26–27 мая 2011 г.; Москва. М.: 2011. с. 16.
16. Тельшева Е. Н. Идентификация молекулярно-генетических онкомаркеров с применением инвазивных и неинвазивных методов исследования. *Поволжский онкологический вестник*. 2014; 3: 60–4.
17. Kim K, Shin DG, Park MK, Baik SH, Kim TH, Kim S et al. Circulating cell-free DNA as a promising biomarker in patients with gastric cancer: diagnostic validity and significant reduction of cfDNA after surgical resection. *Ann Surg Treat Res*. 2014 Mar; 86 (3): 136–42. DOI: 10.4174/ast.2014.86.3.136.
18. Qin Z, Ljubimov VA, Zhou C, Tong Y, Liang J. Cell-free circulating tumor DNA in cancer. *Chin J Cancer*. 2016 Apr 7; 35: 36. DOI: 10.1186/s40880-016-0092-4.
19. Захаренко А. А., Зайцев Д. А., Беляев М. А., Трушин А. А., Тен О. А., Натха А. С. Возможности жидкой биопсии при раке желудка. *Вопросы онкологии*. 2016; 62 (4): 379–85.
20. Тамкович С. Н., Власов В. В., Лактионов П. П. Циркулирующие ДНК крови и их использование в медицинской диагностике. *Молекулярная биология*. 2008; 42 (1): 12–23.
21. Васильева И. Н., Беспалов В. Г. Роль внеклеточной ДНК в возникновении и развитии злокачественных опухолей и возможности ее использования в диагностике и лечении онкологических заболеваний. *Вопросы онкологии*. 2013; 59 (6): 673–81.
22. Немцова М. В., Пальцева Е. М., Бабаян А. Ю., Михайленко Д. С., Бабенко О. В., Самофалова О. Ю. И др. Молекулярно-генетический анализ клональной внутриопухолевой гетерогенности в колоректальных карциномах. *Молекулярная биология*. 2008; 42 (6): 1040–7.

References

1. Zborovskaya IB. [Modern strategies for study of tumor's markers in clinical practice]. *Advances in molecular oncology*. 2014; 2: 4–15. DOI: 10.17650/2313-805X.2014.1.2.4-15. Russian.
2. Manne U, Jadhav T, Putcha BK. Molecular Biomarkers of Colorectal Cancer and Cancer Disparities: Current Status and Perspective. *Curr Colorectal Cancer Rep*. 2016; 12 (6): 332–44. DOI: 10.1007/s11888-016-0338-1.
3. Overman MJ, Modak J, Kopetz S, Murthy R, Yao JC, Hicks ME et al. Use of research biopsies in clinical trials: Are risks and benefits adequately discussed? *J Clin Oncol*. 2013 Jan 1; 31 (1): 17–22. DOI: 10.1200/JCO.2012.43.1618.
4. Gerlinger M, Rowan AJ, Horswell S, Math M, Larkin J, Endesfelder D et al. Intratumor heterogeneity and branched evolution revealed by multiregion sequencing. *N Engl J Med*. 2012 Mar 8; 366 (10): 883–92. DOI: 10.1056/NEJMoa1113205. Erratum in *N Engl J Med*. 2012 Sep 6; 367 (10): 976.
5. Fleischhacker M, Schmidt B. Circulating nucleic acids (CNAs) and cancer – A survey. *Biochim Biophys Acta*. 2007 Jan; 1775 (1): 181–232. DOI: 10.1016/j.bbcan.2006.10.001.
6. Gonzalez JA, Garcia-Olmo D, Garcia-Olmo DC. Circulating nucleic acids in plasma and serum (CNAPS): applications in oncology. *Oncotargets Ther*. 2013 Jul 8; 6: 819–32. DOI: 10.2147/OTT.S44668.
7. Ma M, Zhu H, Zhang C, Sun X, Gao X, Chen G. “Liquid biopsy” – ctDNA detection with great potential and challenges. *Ann Transl Med*. 2015 Sep; 3 (16): 235. DOI: 10.3978/j.issn.2305-5839.2015.09.29.
8. Diaz LA Jr, Bardelli A. Liquid Biopsies: Genotyping Circulating Tumor DNA. *J Clin Oncol*. 2014 Feb 20; 32 (6): 579–86. DOI: 10.1200/JCO.2012.45.2011.
9. Beije N, Helmijr JC, Weerts MJA, Beaufort CM, Wiggin M, Marziali A et al. Somatic mutation detection using various targeted detection assays in paired samples of circulating tumor DNA, primary tumor and metastases from patients undergoing resection of colorectal liver metastases. *Mol Oncol*. 2016 Dec; 10 (10): 1575–84. DOI: 10.1016/j.molonc.2016.10.001.
10. Diehl F, Schmidt K, Choti MA, Romans K, Goodman S, Li M et al. Circulating mutant DNA to assess tumor dynamics. *Nat Med*. 2008 Sep; 14 (9): 985–90. DOI: 10.1038/nm.1789.
11. Holdhoff M, Schmidt K, Donehower R, Diaz LA. Analysis of circulating tumor DNA to confirm somatic KRAS mutations. *J Natl Canc Inst*. 2009; 101 (18): 1284–5. DOI: 10.1093/jnci/djp240.
12. Chen KZ, Lou F, Yang F, Zhang JB, Ye H, Chen W et al. Circulating tumor DNA detection in early-stage non-small cell-lung cancer patients by targeted sequencing. *Sci Rep*. 2016 Aug 24; 6: 31985. DOI: 10.1038/srep31985.
13. Rachiglio AM, Abate RE, Sacco A, Pasquale R, Fenizia F, Lambiase M et al. Limits and potential of targeted sequencing analysis of liquid biopsy in patients with lung and colon carcinoma. *Oncotarget*. 2016 Oct 11; 7 (41): 66595–605. DOI: 10.18632/oncotarget.10704.
14. Tu M, Chia D, Wei F, Wong D. Liquid biopsy for detection of actionable oncogenic mutations in human cancers and electric field induced release and measurement liquid biopsy (eLB). *Analyst*. 2016 Jan 4; 141 (2): 393–402. DOI: 10.1039/c5an01863c.
15. Belousova AV, Drozd OV, Zaretskiy AR. Mutatsionno-spetsificheskaya polimeraznaya tsepnaya reaktsiya dlya analiza mutatsiy v «goryachikh tochkakh» genov K-Ras i B-Raf v biologicheskikh obraztsakh onkologicheskikh bol'nykh. In: Tезисы konferentsii «Sovremennye printsipy diagnostiki i lecheniya kolorekta'nogo raka», posvyashchennoy pamyati prof. V. I. Knysha; 2011 May 26–27; Moscow, Russia. Moscow: 2011. p. 16.
16. Telysheva EN. [Identification of molecular-genetic oncomarkers with using invasive and non-invasive methods of investigation]. *Oncology Bulletin of the Volga Region*. 2014; 3: 60–4. Russian.
17. Kim K, Shin DG, Park MK, Baik SH, Kim TH, Kim S et al. Circulating cell-free DNA as a promising biomarker in patients with gastric cancer: diagnostic validity and significant reduction of cfDNA after surgical resection. *Ann Surg Treat Res*. 2014 Mar; 86 (3): 136–42. DOI: 10.4174/ast.2014.86.3.136.
18. Qin Z, Ljubimov VA, Zhou C, Tong Y, Liang J. Cell-free circulating

- tumor DNA in cancer. *Chin J Cancer*. 2016 Apr 7; 35: 36. DOI: 10.1186/s40880-016-0092-4.
19. Zakharenko AA, Zaytsev DA, Belyaev MA, Trushin AA, Ten OA, Natkha AS. Vozmozhnosti zhidkoy biopsii pri rake zheludka. *Problems in Oncology*. 2016; 62 (4): 379–85. Russian.
 20. Tamkovich SN, Vlassov VV, Laktionov PP. Circulating DNA in in the blood and its application in medical diagnosis. *Molecular Biology*. 2008; 42 (1): 9–19.
 21. Vasilyeva IN, Bepakov VG. [Role of extracellular DNA in the appearance and development of malignant tumors and possibilities of its use in the diagnosis and treatment of cancer]. *Problems in Oncology*. 2013; 59 (6): 673–81. Russian.
 22. Nemtsova MV, Paltseva EM, Babayan AY, Mihaylenko DS, Babenko OV, Zaletaev DV et al. Molecular genetic analysis of the intratumoral clonal heterogeneity of colorectal adenocarcinomas. *Molecular Biology*. 2008; 42 (6): 925–31.

МОДИФИКАЦИЯ МУЛЬТИПЛЕКСНОЙ ПЦР В «РЕАЛЬНОМ ВРЕМЕНИ» ДЛЯ КОЛИЧЕСТВЕННОЙ ОЦЕНКИ ФРАКЦИЙ ВНЕКЛЕТОЧНОЙ ДНК РАЗНОГО РАЗМЕРА

Е. А. Соколова^{1,2}✉, И. В. Хлистун¹, Д. Н. Кушлинский³

¹ ООО «Биокод», Москва

² Лаборатория палеогеномики, факультет естественных наук, Новосибирский государственный университет, Новосибирск

³ Национальный медицинский исследовательский центр онкологии им. Н. Н. Блохина, Москва

Данные о распределении фрагментов внеклеточной ДНК (вкДНК) по фракциям в зависимости от их размера могут иметь диагностическую ценность. В статье описывается разработанный и валидированный авторами метод мультиплексной количественной полимеразной цепной реакции в «реальном времени» для исследования степени фрагментованности вкДНК плазмы крови. Метод основан на определении фрагментов Alu и hLINE-1 с помощью флуоресцентных зондов. Были подобраны последовательности праймеров и зондов, проведена оптимизация ПЦР и оценка динамического диапазона измерений и нижнего порога детекции. Аналитические характеристики метода: динамический диапазон измерений — 6 порядков, эффективность ПЦР — более 90 %. С использованием разработанного подхода было показано, что индекс фрагментованности вкДНК плазмы крови женщин с раком яичников стадий III–IV ($n = 14$) не отличается достоверно ($p = 0,34$) от этого показателя у здоровых женщин ($n = 16$). В дальнейшем следует проводить исследование на более крупной выборке, а также использовать электрофоретическую селекцию фрагментов вкДНК по фракциям.

Ключевые слова: внеклеточная ДНК, вкДНК, мультиплексная количественная ПЦР, Alu-повторы, hLINE-1-повторы, праймеры, флуоресцентный зонд

✉ Для корреспонденции: Соколова Екатерина Алексеевна
Новомещеренский проезд, д. 9, стр. 1, г. Москва, 119619; sokolovaea2608@yandex.ru

Статья получена: 25.08.2017 Статья принята к печати: 30.08.2017

MODIFIED MULTIPLEX REAL-TIME PCR FOR QUANTIFICATION OF DIFFERENTLY SIZED CELL-FREE DNA FRAGMENTS

Sokolova EA^{1,2}✉, Khlistun IV¹, Kushlinsky DN³

¹ Biocode Ltd., Moscow, Russia

² Laboratory of Paleogenomics, Faculty of Natural Sciences, Novosibirsk State University, Novosibirsk, Russia

³ N. N. Blokhin National Medical Research Center of Oncology, Moscow, Russia

There is evidence that size distribution of cell-free DNA (cfDNA) fragments can be diagnostically relevant. The present work describes a multiplex quantitative real-time polymerase chain reaction technique modified and validated by the authors to study the degree of cfDNA fragmentation in blood plasma. Based on the detection of Alu and hLINE-1 repeats, this technique employs fluorescent probes. We selected suitable primers and probes, optimized PCR conditions and estimated the dynamic range and sensitivity threshold of the assay. The modified PCR had a dynamic range of 6 logs, its efficiency being over 90 %. We demonstrated that cfDNA fragmentation index did not differ significantly between healthy women ($n = 16$) and women with stage III–IV ovarian cancer ($n = 14$). Therefore, further research on a larger sample is needed using electrophoretic cfDNA fractionation.

Keywords: cell-free DNA, cfDNA, multiplex quantitative PCR, Alu repeats, hLINE-1 repeats, primers, fluorescent probe

✉ Correspondence should be addressed: Ekaterina Sokolova
Novomereshchensky proezd, d. 9, str. 1, Moscow, Russia, 119619; sokolovaea2608@yandex.ru

Received: 25.08.2017 Accepted: 30.08.2017

Количественный анализ циркулирующей внеклеточной ДНК (вкДНК) для оценки терапевтической эффективности новых антиметастатических препаратов в ксенотрансплантатах был предложен в 1998 г. [1]. Он был основан на ПЦР-амплификации последовательностей Alu генома человека с использованием ³²P-меченного 2'-дезокситидин-5'-трифосфата (dCTP) и обладал высокой чувствительностью (обнаружение эквивалента одной опухолевой клетки человека в 1×10^6 мышинных клеток), достигаемой

за счет высокого содержания последовательностей Alu в геномной ДНК человека. Alu-повторы представляют собой характерные для приматов повторяющиеся элементы ДНК, рассеянные по геному в количестве от 500 тыс. до 1 млн копий. Ввиду высокой копийности и относительной консервативности они представляют собой отличную мишень для амплификации малых количеств ДНК человека [2]. В 2002 г. с целью адаптации к рутинному применению метод был модифицирован: было предложено применять

полимеразную цепную реакцию (ПЦР) в «реальном времени» с детекцией сигнала с помощью интеркалирующего красителя [3, 4]. Достоинства метода навели исследователей на мысль разработать аналогичную систему для семейства повторов hLINE-1, длина консенсусной последовательности которого около 6 тпн, а частота — примерно 200 тыс. копий на геном человека [5]. В 2007 г. была опубликована работа, описывающая подход к оценке количества вкДНК с помощью ПЦР в «реальном времени» для hLINE-1 [6].

Количественный анализ циркулирующей вкДНК ранее рассматривался как потенциальный метод выявления рака яичников у женщин. Несмотря на наличие отдельных публикаций с обнадеживающими результатами, в целом для метода характерны не очень высокие значения по ряду важных диагностических параметров [7]. Соотношение длинных (более 180 п. н.) и коротких фрагментов вкДНК может являться более перспективным маркером опухоли. Предполагается, что продуктом некроза клеток опухоли могут быть более длинные фрагменты ДНК, что изменяет соотношение различных форм вкДНК [8].

С помощью количественной ПЦР с различными размерами ампликона несколько исследователей показали, что более длинные фрагменты ДНК составляют значительную долю от общего количества вкДНК у больных раком [9, 10]. Эта доля уменьшалась на фоне лечения, а ее сохранение было связано с плохим прогнозом [9]. В то же время в других исследованиях при анализе одновременно длины ампликона и специфичных для опухолевой ДНК соматических мутаций было показано, что опухолевая вкДНК, напротив, короче [11]. Можно также предположить, что степень фрагментированности опухолевой вкДНК может зависеть от типа рака и преобладания какого-либо типа клеточной гибели.

В настоящей работе мы описываем метод мультиплексной количественной ПЦР, разработанный, валидированный и примененный нами для исследования степени фрагментированности опухолевой вкДНК при карциноме яичников.

ПАЦИЕНТЫ И МЕТОДЫ

В исследовании приняли участие пациентки Национального медицинского исследовательского центра онкологии им. Н. Н. Блохина. Критерий включения в исследование — серозная аденокарцинома яичников стадий III–IV. Группу пациенток с раком яичников составили 14 женщин со средним возрастом $64,3 \pm 5,6$ года (медиана — 64 года), а контрольную — 16 условно здоровых женщин без онкологических заболеваний со средним возрастом $60,8 \pm 8,2$ года (медиана — 60,5 года). Исследование было одобрено локальным этическим комитетом НМИЦ онкологии им. Н. Н. Блохина (протокол № 3 от 16.05.2016). Данные об участниках исследования были деперсонифицированы.

В качестве биологического материала для исследования использовали плазму крови. Образцы крови условно здоровых женщин были получены при проведении плановых биохимических анализов. Кровь отбирали в количестве 6 мл в вакутейнеры с ЭДТА. Затем пробы центрифугировали при 2 000 g в течение 10 мин, плазму переносили в новые пробирки и повторно центрифугировали при 2 000 g в течение 10 мин. Аликвоты плазмы после центрифугирования вновь переносили в новые пробирки и хранили при -70°C . Аликвоты размораживали непосредственно перед выделением ДНК. Выделение ДНК проводили с помощью набора QIAamp Circulating Nucleic Acid Kit (Qiagen, Нидерланды).

Дизайн праймеров и флуоресцентных зондов для Alu и hLINE-1

Для выбора олигонуклеотидных праймеров и флуоресцентного зонда для Alu нами было проведено выравнивание консенсусных последовательностей наиболее распространенных семейств Alu-повторов: Alu Sx, Alu Sp и Alu Y [12] (рис. 1).

Для hLINE-1 последовательности праймеров были заимствованы из статьи [6]. Флуоресцентный зонд разрабатывали самостоятельно с помощью программы UGENE

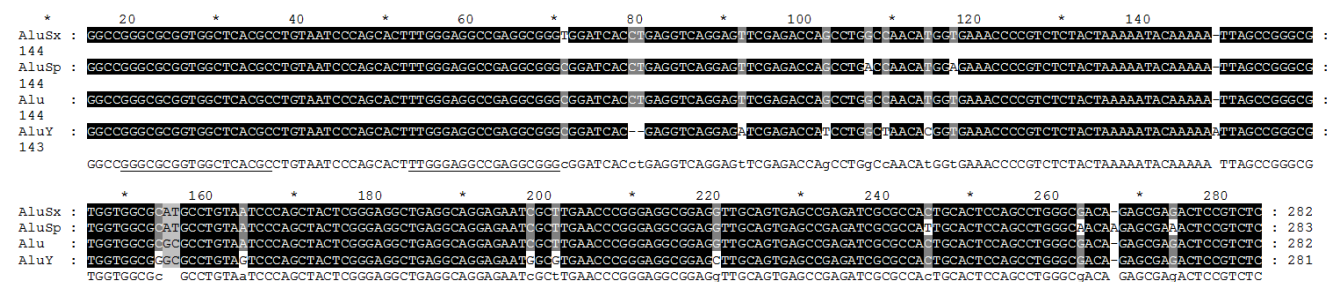


Рис. 1. Выравнивание консенсусных нуклеотидных последовательностей разных семейств Alu-повторов. Позиции выбранных олигонуклеотидных праймеров и флуоресцентного зонда выделены подчеркиванием. Темно-серым цветом выделены позиции, в которых нуклеотид совпадает с консенсусной последовательностью (нижняя строка), светло-серым — позиции с заменой в нуклеотидной последовательности. Прочерк — делеция нуклеотида по данной позиции

Таблица 1. Структуры праймеров и флуоресцентных зондов для Alu и hLINE-1

Наименование	Последовательность	Длина продукта амплификации, п. н.
Alu-U	5'-GGGCGCGGTGGCTCACGC-3'	235
Alu-R	5'-GCGATCTCGGCTCACTGCAA-3'	
Alu-Pr	5'-FAM-TTGGGAGGCCGAGGCGGG-BHQ-3'	
LN-U	5'-TCACTCAAAGCCGCTCAACTAC-3'	82
LN-R	5'-TCTGCCTTCATTCGTTATGTACC-3'	
LN-Pr	5'-HEX-TGGAACTGAACAACCTGCTCTG-BHQ-3'	

software v1.14 [13] и OligoAnalyzer software v1.0.3 (Teemu Kuulasmaa, Финляндия). Для возможности мультиплексирования ПЦР для Alu и hLINE-1 флуоресцентные зонды содержали разные красители. Структура праймеров и флуоресцентных зондов для Alu и hLINE-1, а также длины амплификационных продуктов приведены в табл. 1.

Определение вкДНК в плазме крови методом ПЦР в «реальном времени»

ПЦР в «реальном времени» была проведена на приборе CFX96 Thermal Cycler (Bio-Rad, США). Объем амплификационной смеси составлял 25 мкл и содержал 65 мМ Tris-HCl (pH 8,9), 24 мМ сульфата аммония, 3,5 мМ хлорида магния, 0,05 % Tween-20, 0,2 мМ dNTP, 0,3 мМ каждого праймера, 0,1 мМ каждого флуоресцентного зонда (табл. 1) и 1 ед. акт. термостабильной модифицированной Taq-полимеразы («Интерлабсервис», Россия). ПЦР проводили по протоколу: денатурация — 15 мин при 96 °С с последующими 45 циклами по 10 с при 96 °С и 30 с при 58 °С. Оптимальную температуру отжига подбирали эмпирически.

Динамический диапазон измерений, нижний порог детекции мультиплексной ПЦР

Первоначальную концентрацию раствора двухнитевой ДНК проверяли спектрофотометрически на длине волны 260 нм (NanoDrop LITE, Thermo Fisher Scientific, США). Отношение поглощения на длинах волн 260 и 280 нм (A260/280) использовали для оценки чистоты препарата. Динамический диапазон измерений и нижний порог детекции мультиплексной ПЦР оценивали с помощью 7 последовательных 10-кратных разведений геномной ДНК человека известной концентрации (80 нг/мкл). Измерение каждого образца проводили в 3 повторностях. Нижний порог детекции использовали для демонстрации чувствительности детекции разработанного метода и определяли его как количество ДНК человека на 1 мкл образца.

Статистическая обработка данных

Оценку эффективности мультиплексной ПЦР (Е) и динамического диапазона линейности (R^2) проводили с помощью программного обеспечения, поставляемого с прибором CFX96 Thermal Cycler — Bio-Rad CFX Manager Software v3.1. Статистическую значимость различий между соотно-

шениями фракций (R) в экспериментальной и контрольной группах оценивали с помощью непараметрического критерия Манна–Уитни.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Оптимизация условий мультиплексной ПЦР

Оптимизацию условий мультиплексной ПЦР проводили путем подбора оптимальной температуры отжига в диапазоне 55–68 °С. Наилучшее соотношение уровней флуоресценции и максимальная эффективность мультиплексной ПЦР была при температуре отжига 58 °С.

Динамический диапазон измерений, нижний порог детекции мультиплексной ПЦР

Мы провели эксперимент с использованием 7 последовательных 10-кратных разведений геномной ДНК человека в концентрации 80 нг/мкл, в результате были получены калибровочные кривые (рис. 2). Аликвота каждого разведения была оценена в 3 повторностях. Динамический диапазон линейности мультиплексной ПЦР составил 6 порядков (рис. 3). Эффективность ПЦР для фрагмента Alu составила 94,6 % (линейность $R^2 = 0,988$), для фрагмента hLINE-1 — 92,1 % (линейность $R^2 = 0,996$).

Нижний порог детекции был определен также с использованием 7 последовательных 10-кратных разведений геномной ДНК человека в концентрации 80 нг/мкл, каждая аликвота — в 3 повторностях (в нг/мкл: A1 = 80, A2 = 8, A3 = 0,8, A4 = 0,08, A5 = 0,008, A6 = 0,0008, A7 = 0,00008, A8 = 0,000008) и при наличии отрицательного контроля реакции. Для обоих компонентов мультиплексной ПЦР (Alu и hLINE-1) нижний порог детекции составил 0,08 пг/мкл.

Анализ вкДНК в плазме крови женщин с раком яичников и здоровых женщин

Разработанный метод для количественного определения последовательностей Alu и hLINE-1 генома человека был применен для оценки соотношения фракций вкДНК в плазме крови женщин с раком яичников (n = 14) и условно здоровых женщин без онкологических заболеваний (n = 16). Значение соотношения фракций (R) рассчитывали, деля количество фрагмента Alu (размером 235 п. н.) в условных единицах на количество фрагмента hLINE-1

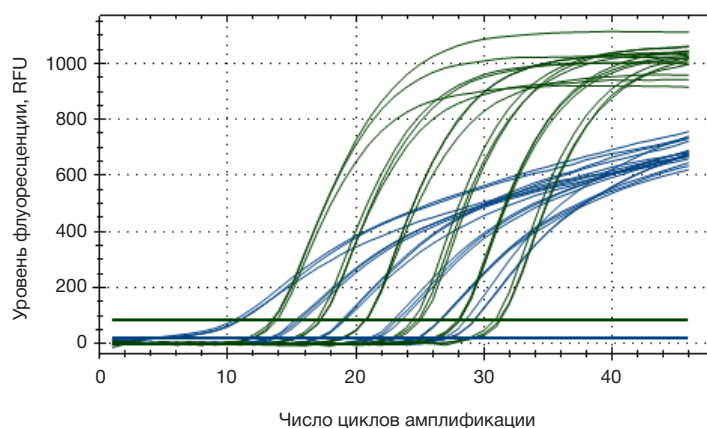


Рис. 2. График мультиплексной ПЦР для Alu и hLINE-1. По оси абсцисс указаны циклы ПЦР, по оси ординат — уровень флуоресценции в относительных единицах RFU. Кривые синего цвета — для зонда FAM, зеленого цвета — для зонда HEX

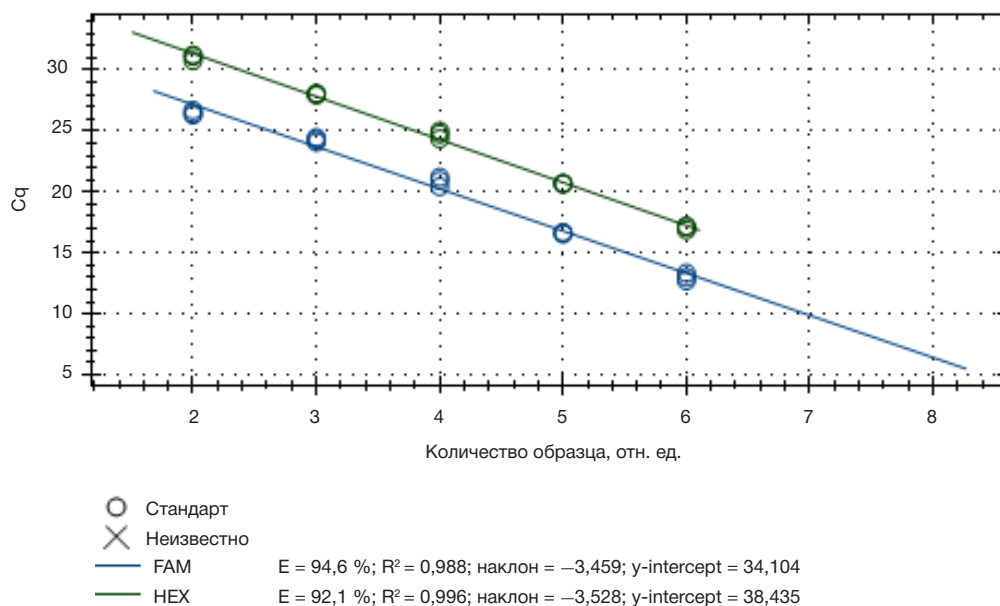


Рис. 3. Динамический диапазон измерений. Ось абсцисс — количество образца в относительных единицах, ось ординат — пороговый цикл Cq. Каждое измерение — в 3 повторностях

(размером 82 п. н.) также в условных единицах. Нами не были выявлены достоверные различия по R между группами (табл. 2, рис. 4).

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Наше исследование показало, что разработанный метод мультиплексной ПЦР в «реальном времени» на основе Alu и hLINE-1 является надежным, точным и чувствительным методом количественного определения плазменной вкДНК по следующим причинам. Во-первых, по сравнению с уже существующими методами детекции вкДНК на основе Alu и hLINE-1 он предполагает использование флуоресцентных зондов. Это гарантирует специфичность детекции продуктов ПЦР в отличие от их детекции с помощью интеркалирующего красителя [3, 4, 14]. Во-вторых, использование флуоресцентных зондов дает возможность мультиплексирования ПЦР, что сокращает количество манипуляций и продолжительность анализа. В-третьих, метод имеет адекватные аналитические характеристики: динамический диапазон измерений — 6 порядков, эффективность ПЦР — более 90 %. В-четвертых, нижний порог детекции составил 0,08 пг/мкл образца, что на 4–5 порядков ниже концентрации вкДНК, обычно выделяемой из плазмы крови здоровых пациентов, например при выделении вкДНК с помощью коммерческого набора QIAamp Circulating Nucleic Acid Kit из 1 мл плазмы с последующей элюцией ДНК в конечный объем 50 мкл концентрация образцов — 0,5–1,5 нг/мкл [15]. И, наконец, использование ампликонов различной длины в мультиплексной ПЦР позволяет оценить степень фрагментированности опухолевой вкДНК.

Мы применили разработанный метод на небольшой выборке пациенток с раком яичников ($n = 14$). Сравнение значений соотношения фракций вкДНК (R) между группой женщин с онкологическим заболеванием и контрольной группой условно здоровых женщин не выявило статистически значимых различий ($p = 0,34$). Тем не менее пока рано говорить о действительном отсутствии различий — и ввиду малой выборки, и ввиду довольно грубой оценки

распределения фракций с использованием всего двух референтных длин — 235 и 82 п. н. Дальнейшие исследования, в том числе включающие электрофоретическую селекцию фрагментов вкДНК по фракциям, с применением количественной ПЦР должны способствовать появлению более рационального дизайна диагностических систем для выявления соматических мутаций в опухолевой вкДНК.

ВЫВОДЫ

Нами разработан и валидирован метод мультиплексной ПЦР для количественной оценки разных по размеру

Таблица 2. Результаты статистического анализа данных о соотношении фракций длинных и коротких фрагментов вкДНК (R), полученной из плазмы крови женщин с раком яичников и здоровых женщин

Группа	Медиана R	$m \pm SD$	p (критерий Манна-Уитни)
Женщины с раком яичников ($n = 14$)	2,56	$2,9 \pm 2,0$	0,34
Здоровые женщины ($n = 16$)	3,08	$3,2 \pm 1,7$	

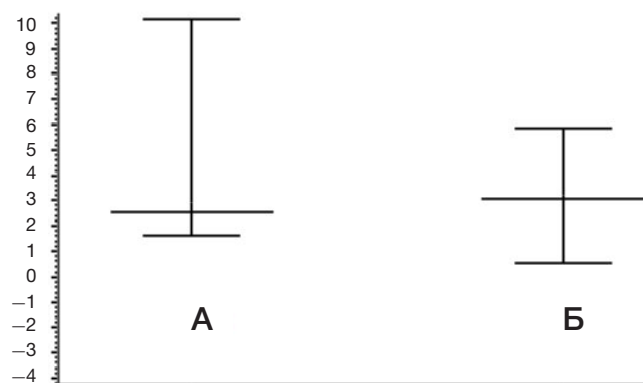


Рис. 4. Соотношение фракций длинных и коротких фрагментов вкДНК (R), в плазме крови женщин с раком яичников (А) и здоровых женщин (Б)

фракций внеклеточной ДНК с хорошими аналитическими характеристиками: динамический диапазон измерений — 6 порядков, эффективность ПЦР — более 90 %. С использованием разработанного метода показали, что индексы фрагментированности вкДНК в группе женщин с раком

яичников и в группе условно здоровых женщин без онкопатологий достоверно не различаются. Необходимы дальнейшие исследования на более значительных выборках и с применением электрофореза для разделения фракций вкДНК.

Литература

- Kim J, Yu W, Kovalski K, Ossowski L. Requirement for Specific Proteases in Cancer Cell Intravasation as Revealed by a Novel Semiquantitative PCR-Based Assay. *Cell*. 1998 Aug 7; 94 (3): 353–62.
- Deininger P. Alu elements: know the SINEs. *Genome Biol*. 2011 Dec 28; 12 (12): 236. DOI: 10.1186/gb-2011-12-12236.
- Zijlstra A, Mellor R, Panzarella G, Aimes RT, Hooper JD, Marchenko ND et al. A quantitative analysis of rate-limiting steps in the metastatic cascade using human-specific real-time polymerase chain reaction. *Cancer Res*. 2002 Dec 1; 62 (23): 7083–92.
- Schneider T, Osl F, Friess T, Stockinger H, Scheuer WV. Quantification of human Alu sequences by real-time PCR — an improved method to measure therapeutic efficacy of anti-metastatic drugs in human xenotransplants. *Clin Exp Metastasis*. 2002; 19 (7): 571–82.
- Boissinot S, Sookdeo A. The Evolution of LINE-1 in Vertebrates. *Genome Biol Evol*. 2016 Dec 1; 8 (12): 3485–507. DOI: 10.1093/gbe/evw247.
- Rago C, Huso DL, Diehl F, Karim B, Liu G, Papadopoulos N et al. Serial Assessment of Human Tumor Burdens in Mice by the Analysis of Circulating DNA. *Cancer Res*. 2007 Oct 1; 67 (19): 9364–70. DOI: 1.1158/0008-5472.Can-06-0705.
- Zhou Q, Li W, Leng B, Zheng W, He Z, Zuo M et al. Circulating Cell Free DNA as the Diagnostic Marker for Ovarian Cancer: A Systematic Review and Meta-Analysis. *PLoS One*. 2016 Jun 2; 11 (6): e0155495. DOI: 10.1371/journal.pone.0155495.
- Jahr S, Hentze H, Englisch S, Hardt D, Fackelmayer FO, Hesch RD et al. DNA fragments in the blood plasma of cancer patients: quantitations and evidence for their origin from apoptotic and necrotic cells. *Cancer Res*. 2001 Feb 15; 61 (4): 1659–65.
- Umetani N, Giuliano AE, Hiramatsu SH, Amersi F, Nakagawa T, Martino S et al. Prediction of breast tumor progression by integrity of free circulating DNA in serum. *J Clin Oncol*. 2006 Sep 10; 24 (26): 4270–6. DOI: 10.1200/JCO.2006.05.9493.
- Ellinger J, Bastian PJ, Haan KI, Heukamp LC, Buettner R, Fimmers R et al. Noncancerous PTGS2 DNA fragments of apoptotic origin in sera of prostate cancer patients qualify as diagnostic and prognostic indicators. *Int J Cancer*. 2009 Jan 1; 122 (1): 138–43. DOI: 10.1002/ijc.23057.
- Mouliere F, Robert B, Arnau Peyrotte E, Del Rio M, Ychou M, Molina F et al. High fragmentation characterizes tumour-derived circulating DNA. *PLoS One*. 2011; 6 (9): e23418. DOI: 10.1371/journal.pone.0023418.
- Britten RJ. Evolutionary selection against change in many Alu repeat sequences interspersed through primate genomes. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1994 Jun 21; 91 (13): 5992–6.
- Okonechnikov K, Golosova O, Fursov M, the UGENE team. Unipro UGENE: a unified bioinformatics toolkit. *Bioinformatics*. 2012 Apr 15; 28: 1166–7. DOI: 10.1093/bioinformatics/bts091.
- Lou X, Hou Y, Liang D, Peng L, Chen H, Ma S et al. A novel Alu-based real-time PCR method for the quantitative detection of plasma circulating cell-free DNA: Sensitivity and specificity for the diagnosis of myocardial infarction. *Int J Mol Med*. 2015 Jan; 35 (1): 72–80. DOI: 10.3892/ijmm.2014.1991.
- Jung K, Fleischlacker M, Rabien A. Cell-free DNA in the blood as a solid tumor biomarker—a critical appraisal of the literature. *Clin Chim Acta*. 2010 Nov; 411 (21–22): 1611–24. DOI: 10.1016/j.cca.2010.07.032.
- Kim J, Yu W, Kovalski K, Ossowski L. Requirement for Specific Proteases in Cancer Cell Intravasation as Revealed by a Novel Semiquantitative PCR-Based Assay. *Cell*. 1998 Aug 7; 94 (3): 353–62.
- Deininger P. Alu elements: know the SINEs. *Genome Biol*. 2011 Dec 28; 12 (12): 236. DOI: 10.1186/gb-2011-12-12236.
- Zijlstra A, Mellor R, Panzarella G, Aimes RT, Hooper JD, Marchenko ND et al. A quantitative analysis of rate-limiting steps in the metastatic cascade using human-specific real-time polymerase chain reaction. *Cancer Res*. 2002 Dec 1; 62 (23): 7083–92.
- Schneider T, Osl F, Friess T, Stockinger H, Scheuer WV. Quantification of human Alu sequences by real-time PCR — an improved method to measure therapeutic efficacy of anti-metastatic drugs in human xenotransplants. *Clin Exp Metastasis*. 2002; 19 (7): 571–82.
- Boissinot S, Sookdeo A. The Evolution of LINE-1 in Vertebrates. *Genome Biol Evol*. 2016 Dec 1; 8 (12): 3485–507. DOI: 10.1093/gbe/evw247.
- Rago C, Huso DL, Diehl F, Karim B, Liu G, Papadopoulos N et al. Serial Assessment of Human Tumor Burdens in Mice by the Analysis of Circulating DNA. *Cancer Res*. 2007 Oct 1; 67 (19): 9364–70. DOI: 1.1158/0008-5472.Can-06-0705.
- Zhou Q, Li W, Leng B, Zheng W, He Z, Zuo M et al. Circulating Cell Free DNA as the Diagnostic Marker for Ovarian Cancer: A Systematic Review and Meta-Analysis. *PLoS One*. 2016 Jun 2; 11 (6): e0155495. DOI: 10.1371/journal.pone.0155495.
- Jahr S, Hentze H, Englisch S, Hardt D, Fackelmayer FO, Hesch RD et al. DNA fragments in the blood plasma of cancer patients: quantitations and evidence for their origin from apoptotic and necrotic cells. *Cancer Res*. 2001 Feb 15; 61 (4): 1659–65.
- Umetani N, Giuliano AE, Hiramatsu SH, Amersi F, Nakagawa T, Martino S et al. Prediction of breast tumor progression by integrity of free circulating DNA in serum. *J Clin Oncol*. 2006 Sep 10; 24 (26): 4270–6. DOI: 10.1200/JCO.2006.05.9493.
- Ellinger J, Bastian PJ, Haan KI, Heukamp LC, Buettner R, Fimmers R et al. Noncancerous PTGS2 DNA fragments of apoptotic origin in sera of prostate cancer patients qualify as diagnostic and prognostic indicators. *Int J Cancer*. 2009 Jan 1; 122 (1): 138–43. DOI: 10.1002/ijc.23057.
- Mouliere F, Robert B, Arnau Peyrotte E, Del Rio M, Ychou M, Molina F et al. High fragmentation characterizes tumour-derived circulating DNA. *PLoS One*. 2011; 6 (9): e23418. DOI: 10.1371/journal.pone.0023418.
- Britten RJ. Evolutionary selection against change in many Alu repeat sequences interspersed through primate genomes. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1994 Jun 21; 91 (13): 5992–6.
- Okonechnikov K, Golosova O, Fursov M, the UGENE team. Unipro UGENE: a unified bioinformatics toolkit. *Bioinformatics*. 2012 Apr 15; 28: 1166–7. DOI: 10.1093/bioinformatics/bts091.
- Lou X, Hou Y, Liang D, Peng L, Chen H, Ma S et al. A novel Alu-based real-time PCR method for the quantitative detection of plasma circulating cell-free DNA: Sensitivity and specificity for the diagnosis of myocardial infarction. *Int J Mol Med*. 2015 Jan; 35 (1): 72–80. DOI: 10.3892/ijmm.2014.1991.
- Jung K, Fleischlacker M, Rabien A. Cell-free DNA in the blood as a solid tumor biomarker—a critical appraisal of the literature. *Clin Chim Acta*. 2010 Nov; 411 (21–22): 1611–24. DOI: 10.1016/j.cca.2010.07.032.

ОЦЕНКА ПРЕДСТАВЛЕННОСТИ ВНЕКЛЕТОЧНЫХ РНК ИЗОФОРМ VEGF В ПЛАЗМЕ КРОВИ ПАЦИЕНТОК С РАКОМ МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ

Е. А. Тыщик¹, В. В. Кометова², В. В. Родионов³, Д. В. Ребриков¹ ✉¹Лаборатория редактирования генома,

Национальный медицинский исследовательский центр акушерства, гинекологии и перинатологии имени академика В. И. Кулакова, Москва

²Патологоанатомическое отделение,

Национальный медицинский исследовательский центр акушерства, гинекологии и перинатологии имени академика В. И. Кулакова, Москва

³Отделение патологии молочной железы,

Национальный медицинский исследовательский центр акушерства, гинекологии и перинатологии имени академика В. И. Кулакова, Москва

Проанализирован уровень представленности внеклеточных РНК IL-6, IL-8, IL-18 и трех сплайсинговых вариантов фактора роста эндотелия сосудов VEGF: 121, 165 и 189 — в плазме крови пациенток с раком молочной железы I и II стадий в сравнении с контрольной группой обследуемых без онкологических заболеваний. Для IL-8 и IL-18 подтвержден, а для изоформ VEGF-121 и VEGF-165 впервые продемонстрирован значимо повышенный уровень внеклеточных РНК в группе пациенток с раком молочной железы на ранних стадиях.

Ключевые слова: внеклеточная РНК, изоформа VEGF, рак молочной железы, цитокины, количественная полимеразная цепная реакция

Благодарности: авторы благодарят Ольгу Бурменскую из отдела клинической и молекулярной генетики Национального медицинского исследовательского центра акушерства, гинекологии и перинатологии имени академика В. И. Кулакова за обсуждение результатов исследования.

✉ **Для корреспонденции:** Ребриков Денис Владимирович
ул. Академика Опарина, д. 4, г. Москва, 117997; drebrikov@gmail.com

Статья получена: 15.08.2017 **Статья принята к печати:** 25.08.2017

ANALYSIS OF VEGF CIRCULATING RNA ISOFORMS IN PATIENTS WITH BREAST CANCER

Tyschik EA¹, Kometova VV², Rodionov VV³, Rebrikov DV¹ ✉¹Laboratory for Genome Editing,

Kulakov National Medical Research Center for Obstetrics, Gynecology and Perinatology, Moscow, Russia

²Department of Anatomic Pathology,

Kulakov National Medical Research Center for Obstetrics, Gynecology and Perinatology, Moscow, Russia

³Department of Breast Pathology,

Kulakov National Medical Research Center for Obstetrics, Gynecology and Perinatology, Moscow, Russia

The present study aims to estimate and compare the levels of cell-free circulating RNAs of three interleukins IL-6, IL-8, and IL-18 and three splice variants of the vascular endothelial growth factor (VEGF), namely 121, 165 and 189, in blood plasma of patients with stage I / II breast cancer and healthy controls. The study reveals that patients with breast cancer have significantly elevated levels of circulating VEGF121 and VEGF165 RNAs, so far unreported in the literature. We also confirm that levels of circulating IL-8 and IL-18 RNAs are considerably increased in breast cancer patients.

Keywords: circulating RNA, VEGF isoform, breast cancer, cytokines, qPCR

Acknowledgements: the authors thank Olga Burmenskaya (Department of Clinical and Molecular Genetics of Kulakov National Medical Research Center for Obstetrics, Gynecology and Perinatology, Moscow, Russia) for participating in the discussion of the study results.

✉ **Correspondence should be addressed:** Denis Rebrikov
ul. Oparina, d. 4, Moscow, Russia, 117997; drebrikov@gmail.com

Received: 15.08.2017 **Accepted:** 25.08.2017

Циркулирующие в плазме крови молекулы нуклеиновых кислот (ДНК и РНК) давно позиционируют в качестве диагностических и прогностических маркеров различных патологических процессов в организме человека [1–4]. Однако информативный потенциал этого легкодоступного для анализа биологического материала далеко не исчерпан. Постоянный и мощный «мониторинг» кровеносной системой практически всех органов и тканей позволяет обнаружить отклонения от нормального состава циркуляции при патологических изменениях в любой части организма. И в то время как количественный состав ДНК в клетках

разных тканей довольно стабилен, профиль транскриптов уникален для каждого типа клеток, что можно использовать при разработке диагностического инструментария.

Появление внеклеточных молекул РНК (вкРНК) в кровотоке имеет различную природу (некроз, апоптоз, активная секреция [5–8]). Количественная оценка уровня отдельных транскриптов в плазме методом ПЦР представляет собой рутинный и сравнительно недорогой диагностический метод, который в случае обнаружения новых информативных маркеров легко внедрить в медицинскую практику в качестве скринингового подхода.

Рак молочной железы (РМЖ) является самым распространенным онкологическим заболеванием у женщин — на него приходится 16 % всех случаев заболевания раком [9]. В литературе представлены обширные данные, демонстрирующие изменение концентрации вкРНК при онкогенезе [1, 2]. В процессы опухолеобразования, как правило, вовлечены гены цитокинов, а также факторов клеточного роста и дифференцировки. Цитокины играют важную роль как в регуляции индукции опухолеобразования, так и в защите от прогрессии РМЖ [10, 11].

Фактор роста эндотелия сосудов (vascular endothelial growth factor, VEGF) является одним из ключевых белков, воздействующих на процессы формирования сосудов, что, в свою очередь, напрямую влияет на рост опухоли. Ангиогенез необходим опухоли для обеспечения клеток кислородом при увеличении размеров новообразования, а также для гематогенного метастазирования. Цитокины и факторы роста, секретируемые опухолевыми и стромальными клетками, стимулируют пролиферацию эндотелиальных клеток. Фактор роста эндотелия сосудов тесно связан с повышенной агрессивностью и метастазированием опухоли [12–14]. VEGF повышен в сыворотке крови у пациентов с онкологическими заболеваниями, и есть данные, что измерение циркулирующего VEGF является суррогатным маркером ангиогенеза и/или метастазирования [15]. Аномальный ангиогенез — общая черта многих форм рака, причем различные изоформы VEGF играют разную роль в этих процессах. Показано, что VEGF-121 является самой опухолегенной изоформой в экспериментальных моделях рака молочной железы [16]. Экспрессия VEGF-121 возрастает в сравнении с VEGF-165 при злокачественных новообразованиях толстой кишки и предстательной железы [17, 18].

Ранее нами было показано, что на начальных стадиях РМЖ достоверно повышен уровень вкРНК IL-8 и IL-18, а уровень IL-6 не изменяется [19]. Целью настоящего исследования было оценить уровень вкРНК трех наиболее представленных изоформ VEGF: VEGF-121, VEGF-165 и VEGF-189 — на ранних стадиях РМЖ и подтвердить ранее полученные данные для IL-6, IL-8 и IL-18.

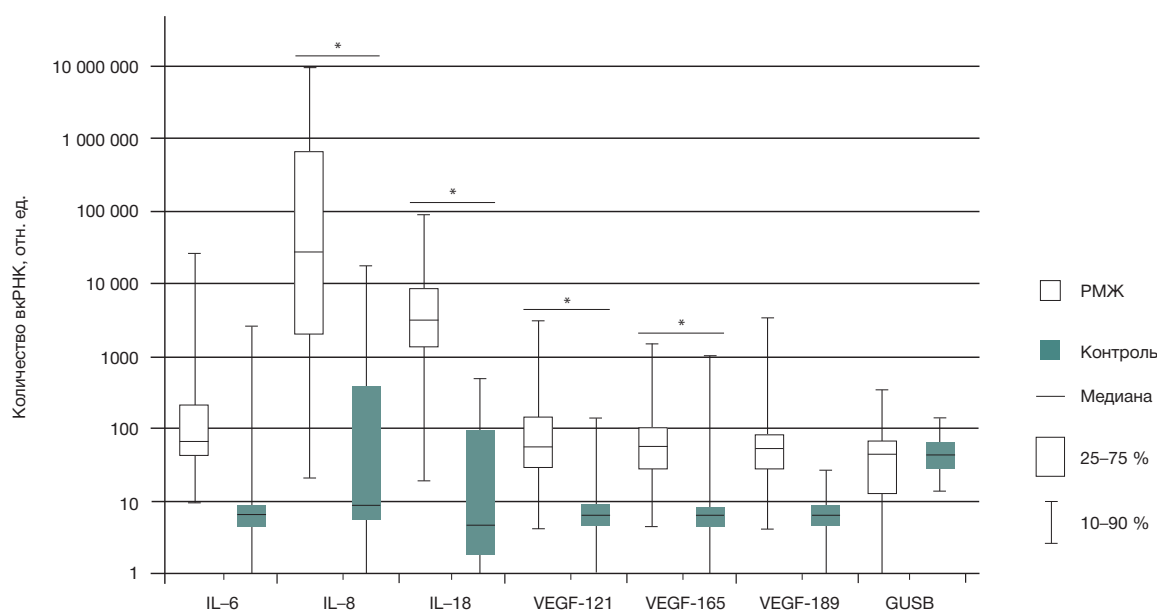
ПАЦИЕНТЫ И МЕТОДЫ

Исследуемую группу составили 36 женщин с гистологически подтвержденным диагнозом «рак молочной железы». Возраст пациенток варьировал от 34 лет до 81 года, средний возраст составил 57,9 года. Опухоль была диагностирована в 0 стадии (TisN0M0) у 2 пациенток, в I стадии (T1N0M0) — у 17 женщин, в стадии IIA — у 13 (T1N1M0 — 7 больных и T2N0M0 — 6), в стадии IIB (T2N1M0) — у 2, в стадии IIIA (T2N2M0) — у одной и в стадии IIIC (T2N3M0) — у одной пациентки. Опухоль менее 2 см выявлена у 32 пациенток. Метастазы в регионарные лимфоузлы были обнаружены у 11 пациенток, из них метастазы в 1–3 лимфоузлах обнаружены у 9 пациенток, в 4 лимфоузлах и более — у 2 женщин. Наиболее часто регистрировался неспецифический протоковый гистологический вариант (21 случай), дольковый вариант был диагностирован у 4 пациенток, особые формы рака — у 9, внутрипротоковый рак — у 2 больных. По степени злокачественности все случаи разделились следующим образом: I степень злокачественности — 6 случаев, II степень — 16, III — 14 случаев. Никто из пациентов, включенных в исследование, не получал предоперационную противоопухолевую терапию.

Контрольную группу составили 56 клинически здоровых женщин (возраст варьировал от 24 до 55 лет, средний возраст — 40 лет).

Информация о всех женщинах, принимавших участие в исследовании, была деперсонифицирована. Исследование одобрено локальным этическим комитетом (протокол № 2016/67).

У пациенток с РМЖ кровь забирали до начала операции. Образцы крови у обследуемых обеих групп забирали в одноразовые пробирки BD Vacutainer (Becton, Dickinson and Company, США) с ЭДТА и доставляли в лабораторию при комнатной температуре в течение 30 мин. Для получения плазмы 1 мл крови отбирали в полипропиленовую пробирку на 1,5 мл и центрифугировали при 1000 об/мин 10 мин, после чего надосадочную жидкость переносили в новую пробирку и центрифугировали при 3000 об/мин 10 мин. После центрифугирования верхнюю фракцию



Профиль представленности РНК генов в плазме крови больных РМЖ и контрольной группы. По оси абсцисс указаны названия исследованных транскриптов, по оси ординат — количество внеклеточных РНК в относительных единицах. * — $p < 0,05$

(плазму) переносили в новые пробирки и хранили при -70°C не более 10 дней. Экстракцию вкРНК проводили набором «ПРОБА-НК» («ДНК-Технология», Россия) согласно инструкции производителя. Очищенную вкРНК немедленно использовали для постановки обратной транскрипции со специфичными ОТ-праймерами по стандартному протоколу. Полученную комплементарную ДНК либо сразу использовали для постановки ПЦР, либо хранили при -20°C не более 10 дней.

Внеклеточную РНК определяли методом количественной ОТ-ПЦР с использованием коммерческой тест-системы «ИммуноГенетика» («ДНК-Технология», Россия). Реакцию проводили в детектирующем амплификаторе DTPRIME («ДНК-Технология», Россия) по предлагаемому производителем тест-системы протоколу.

В качестве нормировочного использовали транскрипт β -глюкуронидазы (GUSB), не меняющий представленность в ходе опухолеобразования [20, 21]. Нормировочные значения для транскриптов каждого гена рассчитывали с помощью метода $\Delta\Delta\text{Ct}$ [22]. Для оценки статистической значимости полученных различий был использован метод параметрической статистики (критерий Стьюдента). Различия групп полагали достоверным при $p < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

На рисунке приведены данные об уровне представленности исследуемых генов (IL-6, IL-8, IL-18, VEGF-121, VEGF-165, VEGF-189) и нормировочного гена GUSB в плазме крови больных РМЖ и контрольной группы.

Достоверные различия в уровне представленности вкРНК в группе больных РМЖ и контрольной группе обнаружены для транскриптов IL-8, IL-18, VEGF-121 и VEGF-165 ($p < 0,05$). Транскрипты IL-6 и VEGF-189 хоть и показали несколько большую представленность в группе пациенток с РМЖ, не достигли значимого уровня.

Литература

1. Holdenrieder S. Liquid Profiling of Circulating Nucleic Acids as a Novel Tool for the Management of Cancer Patients. *Adv Exp Med Biol*. 2016; 924: 53–60. PubMed PMID: 27753019.
2. Suraj S, Dhar C, Srivastava S. Circulating nucleic acids: An analysis of their occurrence in malignancies. *Biomed Rep*. 2017 Jan; 6 (1): 8–14. PubMed PMID: 28123700.
3. Jo P, Azizian A, Salendo J, Kramer F, Bernhardt M, Wolff HA, et al. Changes of Microna Levels in Plasma of Patients with Rectal Cancer during Chemoradiotherapy. *Int J Mol Sci*. 2017 May 27; 18 (6): pii: E1140. PubMed PMID: 28554991.
4. Perge P, Butz H, Pezzani R, Bancos I, Nagy Z, Pálóczi K, et al. Evaluation and diagnostic potential of circulating extracellular vesicle-associated microRNAs in adrenocortical tumors. *Sci Rep*. 2017 Jul 14; 7 (1): 5474. PubMed PMID: 28710381.
5. Rogers JC, Boldt D, Kornfeld S, Skinner A, Valeri CR. Excretion of deoxyribonucleic acid by lymphocytes stimulated by phytohemagglutinin or antigen. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1972 Jul; 69 (7): 1685–9. PubMed PMID: 4505646.
6. Anker P, Stroun M, Maurice P, Vasioukhin V, Lyautey J, Lederrey C, Lefort F, et al. The origin and mechanism of circulating DNA. *Ann N Y Acad Sci*. 2000 Apr; 906: 161–8. PubMed PMID: 10818614.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Полученные результаты согласуются с данными работы [19], где относительные количества РНК IL-8 и IL-18 были достоверно повышены у пациенток на ранних стадиях РМЖ в сравнении со здоровыми испытуемыми.

Достоверное повышение у пациенток с РМЖ в составе циркуляции вкРНК изоформ VEGF-121 и VEGF-165 также согласуется с данными об экспрессии этих вариантов в ходе опухолеобразования [12–18]. Tokunaga и соавт. классифицировали паттерны мРНК VEGF различных опухолей человека на три типа: 1 — экспрессирующий только VEGF-121; 2 — VEGF-121 и VEGF-165; 3 — VEGF-121, VEGF-165 и VEGF-189 [23]. Сочетание всех трех изоформ (третий тип) обнаруживается в метастазах рака прямой кишки [23], при карциноме почек [24], гепатоцеллюлярной карциноме [25] и раке легких с плохим прогнозом [26]. По мнению ряда авторов, VEGF-189 индуцирует петлю аутокринной пролиферации при РМЖ через рецепторы семейства семафоринов (в частности, через Neuropilin-1) [27]. Наши данные для РМЖ в целом подтверждают гипотезу Tokunaga, демонстрируя присутствие в составе циркуляции РНК либо только VEGF-121, либо VEGF-121 в сочетании с VEGF-165 и/или VEGF-189.

ВЫВОДЫ

Полученные результаты подтверждают ранее опубликованные данные о повышенном уровне представленности в составе циркуляции транскриптов IL-8 и IL-18 у пациенток с раком молочной железы I и II стадий. У больных РМЖ также обнаружено повышенное содержание вкРНК VEGF-121 и VEGF-165. Для внеклеточной фракции РНК плазмы крови при РМЖ I и II стадий подтверждается гипотеза Tokunaga о базовых изоформах роста опухоли VEGF-121 и VEGF-165, а также изоформе VEGF-189 как факторе метастазирования.

8. Jahr S, Hentze H, Englisch S, Hardt D, Fackelmayer FO, Hesch RD, et al. DNA fragments in the blood plasma of cancer patients: quantitations and evidence for their origin from apoptotic and necrotic cells. *Cancer Res*. 2001 Feb 15; 61 (4): 1659–65. PubMed PMID: 11245480.
9. Всемирная организация здравоохранения [Интернет]. Швейцария: ВОЗ; с2017 [дата обращения: 28 августа 2017 г.]. Рак молочной железы: профилактика и борьба; [прибл. 5 веб-стр.]. Доступно по: <http://www.who.int/topics/cancer/breastcancer/ru/index1.html>
10. Todorović-Raković N, Milovanović J. Interleukin-8 in Breast Cancer Progression. *J Interferon Cytokine Res*. 2013 Oct; 33 (10): 563–70. PubMed PMID: 23697558.
11. Esquivel-Velázquez M, Ostoa-Saloma P, Palacios-Areola MI, Nava-Castro KE, Castro JI, Morales-Montor J. The Role of Cytokines in Breast Cancer Development and Progression. *J Interferon Cytokine Res*. 2015 Jan; 35 (1): 1–16. PubMed PMID: 25068787.
12. Adams J, Carder PJ, Downey S, Forbes MA, MacLennan K, Allgar V, et al. Vascular endothelial growth factor (VEGF) in breast cancer: comparison of plasma, serum, and tissue VEGF and microvessel density and effects of tamoxifen. *Cancer Res*. 2000 Jun 1; 60 (11): 2898–905. PubMed PMID: 10850435.
13. Byrne GJ, McDowell G, Agarawal R, Sinha G, Kumar S, Bundred NJ. Serum vascular endothelial growth factor in breast

- cancer. *Anticancer Res.* 2007 Sep–Oct; 27 (5B): 3481–7. PubMed PMID: 17972505.
14. Dore-Savard L, Lee E, Kakkad S, Popel AS, Bhujwala ZM. The Angiogenic Secretome in VEGF overexpressing Breast Cancer Xenografts. *Sci Rep.* 2016 Dec 20; 6: 39460. PubMed PMID: 27995973.
 15. Barron GA, Goua M, Wahle KWJ, Bermano G. Circulating levels of angiogenesis-related growth factors in breast cancer: A study to profile proteins responsible for tubule formation. *Oncol Rep.* 2017 Sep; 38 (3): 1886–94. PubMed PMID: 28714000.
 16. Zhang HT, Scott PA, Morbidelli L, Peak S, Moore J, Turley H, et al. The 121 amino acid isoform of vascular endothelial growth factor is more strongly tumorigenic than other splice variants in vivo. *Br J Cancer.* 2000 Jul; 83 (1): 63–8. PubMed PMID: 10883669.
 17. Uthoff SM, Duchrow M, Schmidt MH, Broll R, Bruch HP, Strik MW, et al. VEGF isoforms and mutations in human colorectal cancer. *Int J Cancer.* 2002 Sep 1; 101 (1): 32–6. PubMed PMID: 12209585.
 18. Catena R, Muniz-Medina V, Moralejo B, Javierre B, Best CJ, Emmert-Buck MR, et al. Increased expression of VEGF121/VEGF165-189 ratio results in a significant enhancement of human prostate tumor angiogenesis. *Int J Cancer.* 2007 May 15; 120 (10): 2096–109. PubMed PMID: 17278099.
 19. Турчанинова М. А., Мещеряков А. А., Рахманкулова З. П., Ребриков Д. В. Внеклеточные РНК плазмы крови как диагностический маркер опухолей молочной железы. *Биоорган. хим.* 2011; 37 (3): 393–8.
 20. Majidzadeh-A K, Esmaeili R, Abdoli N. TFRC and ACTB as the best reference genes to quantify Urokinase Plasminogen Activator in breast cancer. *BMC Res Notes.* 2011 Jun 25; 4: 215. PubMed PMID: 21702980.
 21. Iyer G, Wang AR, Brennan SR, Bourgeois S, Armstrong E, Shah P, et al. Identification of stable housekeeping genes in response to ionizing radiation in cancer research. *Sci Rep.* 2017 Mar 6; 7: 43763. PubMed PMID: 28262749.
 22. Vandesompele J, De Preter K, Pattyn F, Poppe B, Van Roy N, De Paepe A, et al. Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. *Genome Biol.* 2002 Jun 18; 3 (7): RESEARCH0034. PubMed PMID: 12184808.
 23. Tokunaga T, Oshika Y, Abe Y, Ozeki Y, Sadahiro S, Kijima H, et al. Vascular endothelial growth factor (VEGF) mRNA isoform expression pattern is correlated with liver metastasis and poor prognosis in colon cancer. *Br J Cancer.* 1998 Mar; 77 (6): 998–1002. PubMed PMID: 9528847.
 24. Tomisawa M, Tokunaga T, Oshika Y, Tsuchida T, Fukushima Y, Sato H, et al. Expression pattern of vascular endothelial growth factor isoform is closely correlated with tumour stage and vascularisation in renal cell carcinoma. *Eur J Cancer.* 1999 Jan; 35 (1): 133–7. PubMed PMID: 10211101.
 25. Li Q, Xu B, Fu L, Hao XS. Correlation of four vascular specific growth factors with carcinogenesis and portal vein tumor thrombus formation in human hepatocellular carcinoma. *J Exp Clin Cancer Res.* 2006 Sep; 25 (3): 403–9. PubMed PMID: 17167981.
 26. Yuan A, Yu CJ, Kuo SH, Chen WJ, Lin FY, Luh KT, et al. Vascular endothelial growth factor 189 mRNA isoform expression specifically correlates with tumor angiogenesis, patient survival, and postoperative relapse in non-small-cell lung cancer. *J Clin Oncol.* 2001 Jan 15; 19 (2): 432–41. PubMed PMID: 11208836.
 27. Hervé MA, Buteau-Lozano H, Vassy R, Bieche I, Velasco G, Pla M, et al. Overexpression of vascular endothelial growth factor 189 in breast cancer cells leads to delayed tumor uptake with dilated intratumoral vessels. *Am J Pathol.* 2008 Jan; 172 (1): 167–78. PubMed PMID: 18079435.

References

1. Holdenrieder S. Liquid Profiling of Circulating Nucleic Acids as a Novel Tool for the Management of Cancer Patients. *Adv Exp Med Biol.* 2016; 924: 53–60. PubMed PMID: 27753019.
2. Suraj S, Dhar C, Srivastava S. Circulating nucleic acids: An analysis of their occurrence in malignancies. *Biomed Rep.* 2017 Jan; 6 (1): 8–14. PubMed PMID: 28123700.
3. Jo P, Azizian A, Salendo J, Kramer F, Bernhardt M, Wolff HA, et al. Changes of Microrna Levels in Plasma of Patients with Rectal Cancer during Chemoradiotherapy. *Int J Mol Sci.* 2017 May 27; 18 (6): pii: E1140. PubMed PMID: 28554991.
4. Perge P, Butz H, Pezzani R, Bancos I, Nagy Z, Pálóczi K, et al. Evaluation and diagnostic potential of circulating extracellular vesicle-associated microRNAs in adrenocortical tumors. *Sci Rep.* 2017 Jul 14; 7 (1): 5474. PubMed PMID: 28710381.
5. Rogers JC, Boldt D, Kornfeld S, Skinner A, Valeri CR. Excretion of deoxyribonucleic acid by lymphocytes stimulated by phytohemagglutinin or antigen. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1972 Jul; 69 (7): 1685–9. PubMed PMID: 4505646.
6. Anker P, Stroun M, Maurice PA. Spontaneous release of DNA by human blood lymphocytes as shown in an in vitro system. *Cancer Res.* 1975 Sep; 35 (9): 2375–82. PubMed PMID: 1149042.
7. Stroun M, Maurice P, Vasioukhin V, Lyautey J, Lederrey C, Lefort F, et al. The origin and mechanism of circulating DNA. *Ann N Y Acad Sci.* 2000 Apr; 906: 161–8. PubMed PMID: 10818614.
8. Jahr S, Hentze H, Englisch S, Hardt D, Fackelmayer FO, Hesch RD, et al. DNA fragments in the blood plasma of cancer patients: quantitations and evidence for their origin from apoptotic and necrotic cells. *Cancer Res.* 2001 Feb 15; 61 (4): 1659–65. PubMed PMID: 11245480.
9. World Health Organization [Internet]. Switzerland: WHO; c2017 [cited 2017 Aug 28]. Breast cancer: prevention and control; [about 6 screens]. Available from: <http://www.who.int/cancer/detection/breastcancer/en/>.
10. Todorović-Raković N, Milovanović J. Interleukin-8 in Breast Cancer Progression. *J Interferon Cytokine Res.* 2013 Oct; 33 (10): 563–70. PubMed PMID: 23697558.
11. Esquivel-Velázquez M, Ostoa-Saloma P, Palacios-Arreola MI, Nava-Castro KE, Castro JI, Morales-Montor J. The Role of Cytokines in Breast Cancer Development and Progression. *J Interferon Cytokine Res.* 2015 Jan; 35 (1): 1–16. PubMed PMID: 25068787.
12. Adams J, Carder PJ, Downey S, Forbes MA, MacLennan K, Algar V, et al. Vascular endothelial growth factor (VEGF) in breast cancer: comparison of plasma, serum, and tissue VEGF and microvessel density and effects of tamoxifen. *Cancer Res.* 2000 Jun 1; 60 (11): 2898–905. PubMed PMID: 10850435.
13. Byrne GJ, McDowell G, Agarawal R, Sinha G, Kumar S, Bundred NJ. Serum vascular endothelial growth factor in breast cancer. *Anticancer Res.* 2007 Sep–Oct; 27 (5B): 3481–7. PubMed PMID: 17972505.
14. Dore-Savard L, Lee E, Kakkad S, Popel AS, Bhujwala ZM. The Angiogenic Secretome in VEGF overexpressing Breast Cancer Xenografts. *Sci Rep.* 2016 Dec 20; 6: 39460. PubMed PMID: 27995973.
15. Barron GA, Goua M, Wahle KWJ, Bermano G. Circulating levels of angiogenesis-related growth factors in breast cancer: A study to profile proteins responsible for tubule formation. *Oncol Rep.* 2017 Sep; 38 (3): 1886–94. PubMed PMID: 28714000.
16. Zhang HT, Scott PA, Morbidelli L, Peak S, Moore J, Turley H, et al. The 121 amino acid isoform of vascular endothelial growth factor is more strongly tumorigenic than other splice variants in vivo. *Br J Cancer.* 2000 Jul; 83 (1): 63–8. PubMed PMID: 10883669.
17. Uthoff SM, Duchrow M, Schmidt MH, Broll R, Bruch HP, Strik MW, et al. VEGF isoforms and mutations in human colorectal cancer. *Int J Cancer.* 2002 Sep 1; 101 (1): 32–6. PubMed PMID: 12209585.
18. Catena R, Muniz-Medina V, Moralejo B, Javierre B, Best CJ, Emmert-Buck MR, et al. Increased expression of VEGF121/

- VEGF165-189 ratio results in a significant enhancement of human prostate tumor angiogenesis. *Int J Cancer*. 2007 May 15; 120 (10): 2096–109. PubMed PMID: 17278099.
19. Turchaninova MA, Mesheryakov AA, Rakhmankulova ZP, Rebrikov DV. Circulating RNA in blood plasma as a diagnostic marker of breast cancer. *Russ J Bioorg Chem*. 2011 May; 37 (3): 351–5.
 20. Majidzadeh-A K, Esmaeili R, Abdoli N. TFRC and ACTB as the best reference genes to quantify Urokinase Plasminogen Activator in breast cancer. *BMC Res Notes*. 2011 Jun 25; 4: 215. PubMed PMID: 21702980.
 21. Iyer G, Wang AR, Brennan SR, Bourgeois S, Armstrong E, Shah P, et al. Identification of stable housekeeping genes in response to ionizing radiation in cancer research. *Sci Rep*. 2017 Mar 6; 7: 43763. PubMed PMID: 28262749.
 22. Vandesompele J, De Preter K, Pattyn F, Poppe B, Van Roy N, De Paepe A, et al. Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. *Genome Biol*. 2002 Jun 18; 3 (7): RESEARCH0034. PubMed PMID: 12184808.
 23. Tokunaga T, Oshika Y, Abe Y, Ozeki Y, Sadahiro S, Kijima H, et al. Vascular endothelial growth factor (VEGF) mRNA isoform expression pattern is correlated with liver metastasis and poor prognosis in colon cancer. *Br J Cancer*. 1998 Mar; 77 (6): 998–1002. PubMed PMID: 9528847.
 24. Tomisawa M, Tokunaga T, Oshika Y, Tsuchida T, Fukushima Y, Sato H, et al. Expression pattern of vascular endothelial growth factor isoform is closely correlated with tumour stage and vascularisation in renal cell carcinoma. *Eur J Cancer*. 1999 Jan; 35 (1): 133–7. PubMed PMID: 10211101.
 25. Li Q, Xu B, Fu L, Hao XS. Correlation of four vascular specific growth factors with carcinogenesis and portal vein tumor thrombus formation in human hepatocellular carcinoma. *J Exp Clin Cancer Res*. 2006 Sep; 25 (3): 403–9. PubMed PMID: 17167981.
 26. Yuan A, Yu CJ, Kuo SH, Chen WJ, Lin FY, Luh KT, et al. Vascular endothelial growth factor 189 mRNA isoform expression specifically correlates with tumor angiogenesis, patient survival, and postoperative relapse in non-small-cell lung cancer. *J Clin Oncol*. 2001 Jan 15; 19 (2): 432–41. PubMed PMID: 11208836.
 27. Hervé MA, Buteau-Lozano H, Vassy R, Bieche I, Velasco G, Pla M, et al. Overexpression of vascular endothelial growth factor 189 in breast cancer cells leads to delayed tumor uptake with dilated intratumoral vessels. *Am J Pathol*. 2008 Jan; 172 (1): 167–78. PubMed PMID: 18079435.

ОЦЕНКА ЗНАЧИМОСТИ ОПРЕДЕЛЕНИЯ КОЛИЧЕСТВА miR-146a В ПЛАЗМЕ КРОВИ ЧЕЛОВЕКА ДЛЯ ДИАГНОСТИКИ КОЛОРЕКТАЛЬНОГО РАКА

А. Н. Ширшова¹, Д. А. Шамовская¹, У. А. Боярских¹, С. В. Апалько², Л. С. Лесков³, А. В. Соколов³, С. А. Коваленко², С. Г. Щербак², И. В. Пикалов⁴, А. Э. Кель¹, М. Л. Филипенко^{1,5} ✉

¹ Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, Новосибирск

² Городская больница № 40, Санкт-Петербург

³ Городская клиническая больница № 1, Новосибирск

⁴ Новосибирский государственный медицинский университет, Новосибирск

⁵ Новосибирский государственный университет, Новосибирск

Колоректальный рак (КРР) — один из наиболее распространенных видов рака в мире. Эффективные методы скрининга для своевременного выявления КРР и аденоматозных полипов могут значительно снизить смертность от этого заболевания. МикроРНК — новый класс потенциальных биомаркеров для широкого круга заболеваний человека, включая онкопатологии. В статье оценивается диагностическая значимость концентрации микроРНК miR-146a в плазме крови человека с КРР. В опытную группу включили пациентов с колоректальным раком стадий I–III (n = 102), а в контрольную — пациентов с хроническим колитом, неспецифическим язвенным колитом и болезнью Крона (n = 58) и условно здоровых людей (n = 42). Количество микроРНК определяли при помощи ПЦР с обратной транскрипцией (ОТ-ПЦР) с детекцией результатов в «реальном времени». Было показано, что концентрация miR-146a статистически значимо выше в образцах плазмы крови пациентов с КРР в сравнении с пациентами контрольной группы (p < 0,0001). Оптимальное значение диагностической чувствительности, определенное с помощью ROC-анализа, составило 47,3 %, специфичности — 91,5 %, AUC = 0,79 ± 0,018. Исследуемый подход обладает недостаточно высокой специфичностью, но показано, что miR-146a в будущем может быть включена в состав диагностических профилей на основе нескольких микроРНК с улучшенной специфичностью.

Ключевые слова: онкология, колоректальный рак, скрининг, биомаркер, микроРНК, miR-146a, cel-238, полимеразная цепная реакция, обратная транскрипция

Финансирование: работа выполнена при финансовой поддержке в рамках федеральной целевой программы «Исследования и разработки по приоритетным направлениям развития научно-технологического комплекса России на 2014–2020 гг.» (Соглашение № 14.604.21.0101, идентификатор RFMEFI60414X0101).

✉ **Для корреспонденции:** Филипенко Максим Леонидович
Пр-т Ак. Лаврентьева, д. 8, г. Новосибирск, 630090; max@niboch.nsc.ru

Статья получена: 25.08.2017 **Статья принята к печати:** 30.08.2017

SIGNIFICANCE OF MIR-146A QUANTIFICATION IN HUMAN BLOOD PLASMA FOR THE DIAGNOSIS OF COLORECTAL CANCER

Shirshova AN¹, Shamovskaya DA¹, Boyarskikh UA¹, Apalko SV², Leskov LS³, Sokolov AV³, Kovalenko SA², Scherbak SG², Pikalov IV⁴, Kel AE¹, Filipenko ML^{1,5} ✉

¹ Institute of Chemical Biology and Fundamental Medicine SB RAS, Novosibirsk, Russia

² City Hospital No. 40, Saint Petersburg, Russia

³ City Clinical Hospital No.1, Novosibirsk, Russia

⁴ Novosibirsk State Medical University, Novosibirsk, Russia

⁵ Novosibirsk State University, Novosibirsk, Russia

Colorectal cancer (CRC) is one of the most common cancer types in the world. Timely diagnosis of CRC and adenomatous polyps aided by effective screening techniques can considerably reduce mortality from this disease. MicroRNAs constitute a new class of promising biomarkers for a range of human diseases including cancer. The following article assesses the diagnostic significance of miR-146a concentrations in the blood plasma of patients with colorectal cancer. The main group included patients with stages I to III colorectal cancer (n = 102); the control group comprised patients with chronic colitis, nonspecific ulcerative colitis and Crohn's disease (n = 58) and healthy individuals (n = 42). MicroRNA levels were quantified by reverse-transcription real-time PCR, revealing significantly higher miR-146a concentrations in the samples of patients with CRC than in the controls (p < 0.0001). The optimal diagnostic sensitivity determined by ROC analysis was 47.3 %, specificity was 91.5 %, with AUC = 0.79 ± 0.018. Our findings demonstrate that the studied approach does not have sufficient specificity, but still suggest that miR-146a can be included into screening tests based on quantification of other microRNAs with improved specificity.

Keywords: cancer research, colorectal cancer, screening, biomarker, microRNA, miR-146a, cel-238, polymerase chain reaction, reverse transcription

Funding: this works was supported by the Federal Targeted Program for Research and Development in Priority Areas of Advancement of the Russian Scientific and Technological Complex for 2014–2020 (Grant No. 14.604.21.0101, ID RFMEFI60414X0101).

✉ **Correspondence should be addressed:** Maxim Filipenko
Prospekt Ak. Lavrentieva, d. 8, Novosibirsk, Russia, 630090; max@niboch.nsc.ru

Received: 25.08.2017 **Accepted:** 30.08.2017

Колоректальный рак — одно из самых распространенных онкологических заболеваний и наиболее часто встречающаяся форма злокачественных опухолей кишечника. При выявлении заболевания на стадии I и адекватной терапии выживаемость пациентов составляет 90 %, тогда как для пациентов со стадией IV — не более 6 %. В связи с этим своевременная диагностика — залог сохранения жизни пациенту. Одним из перспективных направлений исследований является поиск неинвазивных молекулярных маркеров, обнаруживаемых в крови, кале и других доступных биоматериалах.

В 2008 г. Tewari и соавт. обнаружили, что некоторые микроРНК присутствуют в плазме крови человека в удивительно стабильной форме, которая защищает их от действия эндогенных РНКаз [1]. Это стало отправной точкой начала исследований циркулирующих микроРНК в качестве потенциальных биомаркеров. МикроРНК обнаружены в плазме крови, слюне, моче, желчи, грудном молоке и других жидкостях организма человека. Накоплены многочисленные данные о специфическом изменении профиля экспрессии циркулирующих микроРНК при различных патологических состояниях, таких как онкологические, сердечно-сосудистые, воспалительные заболевания, старение и др. [2–5].

Для опухолей различного происхождения характерны как специфические, так и неспецифические изменения экспрессии микроРНК. Например, большинство опухолей ассоциировано с увеличением экспрессии микроРНК miR-21 и снижением экспрессии микроРНК семейства let-7. Специфическими могут быть изменения для различных гистологических типов новообразований, профилей экспрессии генов в клетках опухоли, стадии TNM.

В исследованиях разных исследователей для колоректального рака значимыми в патогенезе и прогнозе описаны опухоль-специфичные микроРНК miR-21, miR-9, miR-155, miR-17, miR-19, let-7 и miR-24, а также циркулирующие miR-181b, miR-21, miR-183, let-7g, miR-17 и miR-126 [6]. Первое исследование изменения профиля экспрессии микроРНК при колоректальном раке, выполненное в 2003 г., показало снижение экспрессии опухоль-супрессорных

микроРНК miR-143 и miR-145 и при аденоматозе, и в злокачественных новообразованиях в сравнении с нормой [7]. К настоящему времени описано несколько десятков микроРНК, экспрессия которых изменяется при КРР [8].

Возможность использования мониторинга микроРНК в плазме крови в качестве неинвазивной диагностики КРР была показана в 2008–2009 гг. [9, 10]. Исследования в этой области остаются крайне актуальными и сегодня [11, 12].

Ранее нами были проанализированы данные проекта SysCol (Systems Biology of Colorectal cancer) [13], содержащие результаты профилирования микроРНК с помощью секвенирования нового поколения (next generation sequencing, NGS), в результате чего для miR-146a (ENSG00000253522) было получено статистически значимое увеличение уровня экспрессии в ткани колоректальной аденокарциномы ($\log FC = 1,742$ для изменения экспрессии микроРНК в опухолях против контрольных образцов, скорректированное значение $p = 5,57E^{-79}$). Целью настоящей работы являлась оценка диагностической значимости определения уровня miR-146a в плазме крови человека для диагностики колоректального рака.

ПАЦИЕНТЫ И МЕТОДЫ

В исследование были включены пациенты, проходившие обследование по поводу заболевания толстого кишечника в Городской клинической больнице № 1 (Новосибирск), Центре новых медицинских технологий (Новосибирск) и Городской больнице № 40 (Санкт-Петербург). В экспериментальную группу включили 102 человека с аденокарциномой толстой кишки стадий I–III, в контрольную — 100 человек с воспалительными заболеваниями кишечника (хронический колит, неспецифический язвенный колит, болезнь Крона, $n = 58$) или без патологий ($n = 42$). Включение в контрольную группу пациентов с воспалением кишечника обусловлено тем, что прогрессия опухоли всегда сопровождается воспалением в прилегающих тканях. Обе группы подробно охарактеризованы в табл. 1 и 2. Исследование было одобрено этическим комитетом Центра

Таблица 1. Характеристика выборки пациентов с колоректальным раком ($n = 102$)

Стадия заболевания	Пол	Возраст, лет	Число пациентов
I–II	М	54,3 ± 16,4	13
	Ж	62,1 ± 11,2	8
III	М	59,3 ± 14,2	49
	Ж	58,9 ± 14,0	32

Таблица 2. Характеристика выборки пациентов без онкологических заболеваний кишечника ($n = 100$)

Заболевание	Пол	Возраст, лет	Число пациентов
Хронический колит	М	36,5 ± 19,3	10
	Ж	38,4 ± 10,8	16
Неспецифический язвенный колит	М	26,5 ± 8,3	4
	Ж	42,2 ± 11,7	20
Болезнь Крона	М	31,5 ± 6,3	4
	Ж	28,4 ± 4,8	4
Без патологии кишечника	М	46,5 ± 17,1	15
	Ж	49,4 ± 19,2	27

новых медицинских технологий в Новосибирске (протокол № 18 от 24.10.2014). Все пациенты дали письменное информированное согласие на участие в эксперименте.

Для исследования получали периферическую кровь. Кровь (около 10 мл) отбирали из вены в пробирки Vacutainer с антикоагулянтом ЭДТА, тщательно, но мягко перемешивали и центрифугировали в течение 10 мин при 1 600 g и комнатной температуре. Полученную плазму (около 4–5 мл) осторожно отбирали, не захватывая осадка, и переносили в пробирки с коническим дном объемом 15 мл. Центрифугировали еще раз, плазму переносили в пробирки объемом 1,5 мл, замораживали и хранили при –80 °С. Для получения пулов объединяли по 50 мкл 10 образцов плазмы из одной группы.

МикроРНК для анализа выделяли из замороженной плазмы крови. Перед этим к каждому образцу добавляли внутренний контроль — синтетическую микроРНК cel-238, 5 x 10⁷ копий на образец. Он позволял следить за качеством экстракции РНК и полимеразной цепной реакции (ПЦР), например за отсутствием в образце ингибиторов реакции. Количество копий cel-238 использовали в качестве нормировочного коэффициента при вычислении количества копий тестируемых микроРНК в образце.

Количество микроРНК определяли при помощи добавления поли-А тракта поли-А-полимеразой и ПЦР с обратной транскрипцией (ОТ-ПЦР) с детекцией результатов в «реальном времени». Для реакции ОТ использовали праймер, содержащий на 3'-конце 5–6 оснований, комплементарных 3'-концу микроРНК, затем последовательность из 11 тиминов и области для посадки гидролизующего флуоресцентно меченного зонда и универсального обратного праймера (табл. 3).

Полученные в реакции обратной транскрипции кДНК, разведенные в 5 раз для исключения ингибирования, амплифицировали методом ПЦР с детекцией результатов в «реальном времени» при помощи специфичного прямого и универсального обратного праймеров и универсального зонда. Использовали термоциклер с оптическим блоком для детекции флуоресценции CFX96 (Bio-Rad, США). Схема амплификации: первичная денатурация — 15 мин при 96 °С; амплификационный цикл (x40): денатурация — 10 с при 96 °С, отжиг праймеров — 20 с при 56 °С, элонгация — 10 с при 72 °С, съём сигнала — 10 с. Реакционная смесь объемом 20 мкл содержала 65 mM Tris-HCl (pH 8,9), 3 mM MgCl₂, 16 mM (NH₄)₂SO₄, 0,2 mM dNTP, 300 nM праймеров и 100 nM гидролизующего флуоресцентно меченного зонда, 0,5 ед. акт. Taq-полимеразы с «горячим стартом» (Biosan, ИХБФМ СО РАН) и 2 мкл кДНК.

Представленность микроРНК определяли в условных единицах по калибровочной кривой, построенной на основе 4 последовательных 4-кратных разведений тестовой кДНК, представляющей собой сконцентрированную в 5 раз смесь кДНК 5 случайных образцов (при этом наименьшая концентрация образцов калибровочной кривой принята за 1 усл. ед.). Коэффициент корреляции между ожидаемым и эмпирическим уравнениями калибровочной кривой был не менее 0,99. Эффективность ПЦР рассчитывали как угол наклона калибровочной кривой. Эффективность ПЦР, определенная методом построения калибровочной кривой для miR-146a, составила 82 %, а для cel-238 — 93 %. Во всех случаях измеряемые значения попадали в линейную область калибровочной кривой. Для оценки воспроизводимости значений порогового цикла (Ct) образец кДНК с каждой парой праймеров амплифицировался в двух повторностях. В целом мы старались не проводить измерений при Ct > 37.

Нормальность распределения полученных нормированных значений концентрации микроРНК проверяли с помощью Anderson–Darling Normality Test. Для определения статистической значимости различий значений концентрации микроРНК в группах использовали непараметрический U-критерий Манна–Уитни. Для ROC-анализа воспользовались программным обеспечением Web-based Calculator for ROC Curves [14].

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Нами было проведено выделение микроРНК, синтез кДНК и определение концентраций микроРНК miR-146a и cel-238 в индивидуальных образцах плазмы крови и в их пулах. Для удобства мы обозначили опытную группу буквой Т, а контрольную — К.

Медиана нормированного уровня miR-146a в условных единицах составила 9,7 в группе Т против 4,65 в группе К при анализе пулов (табл. 4, рис. 1) и 7,6 против 2,5 соответственно при анализе индивидуальных образцов (табл. 4, рис. 2). Уровень miR-146a был достоверно выше как в пулах, так и в индивидуальных образцах пациентов с колоректальным раком.

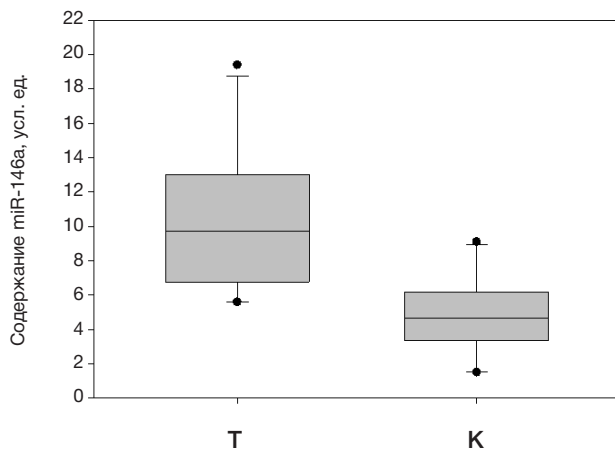
Для оценки диагностического потенциала теста нами был проведен ROC-анализ, который показал следующие значения: AUC = 0,79, SD = 0,018, оптимальные значения диагностической чувствительности — 47,3 %, специфичности — 91,5 % при выставлении порогового уровня miR-146a 4 условных единицы (рис. 3).

Таблица 3. Нуклеотидные последовательности олигонуклеотидных праймеров и гидролизующихся флуоресцентно меченных зондов использованных в работе.

МикроРНК	Олигонуклеотид	Последовательность
miR-146a	U	5'- ggctgagaactgaattccat-3'
	R	5'-gagcagggtccgaggt-3'
	Зонд	5'-HEX-accaccgcaccacgcc-BHQ-3'
	RT	5'-gagcagggtccgaggtataccaccgcaccacgccttttttttaaccga-3'
cel-238	U	5' -ttgtactccgatgcc-3'
	R	5'-gagcagggtccgaggt-3'
	Зонд	5'-FAM-tcgacacgaccacccgc-BHQ-3'
	RT	5'-gagcagggtccgaggtatcgacacgaccacccgccttttttttctgaa-3'

Таблица 4. Анализ ассоциации концентрации микроРНК miR-146a в плазме крови пациентов с колоректальным раком (Т) и пациентов контрольной группы (К)

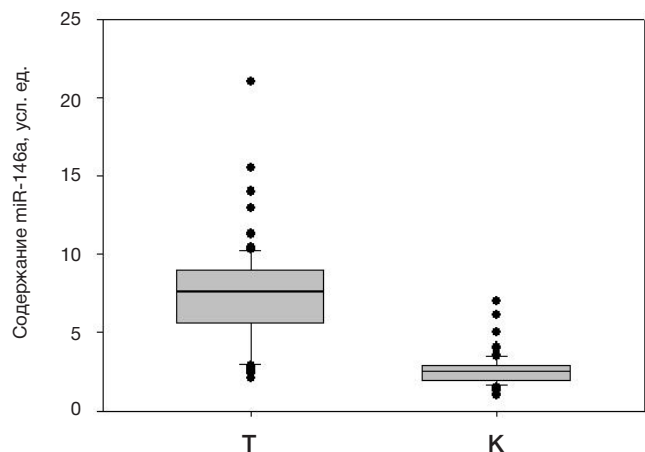
Показатель	Т (пул)	К (пул)	Т	К
Размер выборки	10	10	102	100
Среднее значение	10,28	4,8	7,40	2,58
Стандартное отклонение	3,98	2,23	3,04	0,97
Медиана	9,7	4,65	7,6	2,5
P-value (критерий Манна–Уитни)	0,0019		< 0,0001	

**Рис. 1.** Распределение нормированных значений содержания miR-146a в условных единицах в 10-ти пулах плазм от пациентов с колоректальным раком (Т) и без него (К)

Сравнение группы условно здоровых людей ($n = 42$) и пациентов с гранулематозным и язвенным колитом ($n = 58$) показало, что пациенты с воспалительными заболеваниями кишечника имеют повышенный уровень miR-146a в плазме крови (в среднем $3,1 \pm 1,61$ против $2,33 \pm 0,67$ соответственно), однако различия менее выраженные и имеют значительно меньшую статистическую значимость (критерий Манна–Уитни, $p = 0,01$).

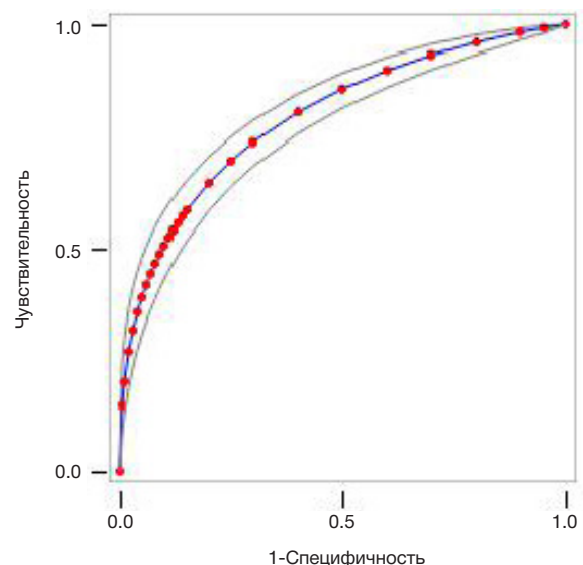
ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Циркулирующие микроРНК как биомаркеры колоректального рака находятся в фарватере поиска новых методов диагностики онкологических заболеваний [15]. МикроРНК miR-146a рассматривалась в этом аспекте только однажды и не показала диагностической значимости [16]. В то же время есть несколько причин для включения этой микроРНК в список потенциальных биомаркеров для диагностики КРР. Ранее рядом авторов было показано, что miR-146a вовлечена в супрессию воспаления посредством угнетения сигнального пути NF- κ B [17], по крайней мере — за счет супрессии генов *TRAF6* и *IRAK1* [18]. Повышенная концентрация miR-146a в плазме крови наблюдается при ряде воспалительных заболеваний, например при сепсисе [19]. Это может быть следствием сверхстимуляции молекулярных механизмов, ограничивающих воспаление. Вместе с тем пока мы не можем определенно указать как типы клеток, так и конкретные молекулярные механизмы, приводящие к увеличению количества miR-146a в циркуляции при некоторых онкологических заболеваниях, в том числе колоректальном раке. Ассоциативные исследования показали, что полиморфный вариант *rs2910164* в гене miR-

**Рис. 2.** Распределение нормированных значений содержания miR-146a в условных единицах в плазме пациентов с колоректальным раком (Т) и без него (К)

146a ассоциирован с ростом риска развития рака пищеварительной системы различных типов [19, 20], что также обосновывает наш выбор.

В нашем исследовании показана статистически значимая ассоциация ($p < 0,0001$) повышенной концентрации miR-146a с раком толстого кишечника. Более того, измерение количества miR-146a в пулах показало меньшую, но также статистически значимую ассоциацию. Формирование пулов образцов ранее неоднократно было

**Рис. 3.** ROC — кривая (голубой цвет), построенная на данных распределения измеренного уровня miR-146a в условных единицах в плазме пациентов с колоректальным раком и без него. Доверительные интервалы представлены в виде кривых серого цвета

использовано в качестве метода прескрининга для повышения производительности и снижения стоимости исследований [21, 22]. Однако работ по валидации такого подхода немного. В настоящем исследовании мы показали возможность редукции тестируемых образцов с помощью формирования пулов по 10 образцов плазмы крови для первичного скрининга.

Несмотря на статистически значимое повышенное содержание miR-146a в плазме крови пациентов с колоректальным раком в сравнении с пациентами без этой онкопатологии, ROC-анализ показал довольно умеренный AUC, равный $0,79 \pm 0,018$, с неудовлетворительной диагностической чувствительностью (47,3 %). Более того, концентрация miR-146a была достоверно повышена и у пациентов с воспалительными заболеваниями кишечника, что неудивительно, учитывая важную роль miR-146a в регуляции воспаления. Ранее увеличение количества miR-146 в плазме крови наблюдали у пациентов с аутоиммунным

тиреоидитом [24], при сепсисе [19] и других заболеваниях с воспалительным компонентом.

ВЫВОДЫ

По результатам исследования можно сделать вывод о достаточно низкой специфичности изолированной количественной детекции miR-146a в плазме крови как метода диагностики при колоректальном раке. Специфичность и чувствительность использованного подхода могут быть уточнены только в проспективных исследованиях, которых сейчас крайне мало. Вместе с тем функциональная связь miR-146a, воспаления и колоректального канцерогенеза, а также высокая значимость полученной ассоциации повышенной концентрации miR-146a в плазме крови и КРР, делают эту микроРНК кандидатом на включение в состав диагностических профилей на основе нескольких микроРНК с улучшенной специфичностью.

Литература

- Mitchell PS, Parkin RK, Kroh EM, Fritz BR, Wyman SK, Pogosova-Agadjanyan EL et al. Circulating microRNAs as stable blood-based markers for cancer detection. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2008 Jul 29; 105 (30): 10513–8. DOI: 10.1073/pnas.0804549105.
- Olivieri F, Rippo MR, Monsurro V, Salvioli S, Capri M, Procopio AD, Franceschi C. MicroRNAs linking inflamm-aging, cellular senescence and cancer. *Ageing Res Rev*. 2013 Sep; 12 (4): 1056–68. DOI: 10.1016/j.arr.2013.05.001.
- Dlouhý D, Hubáček JA. Regulatory RNAs and cardiovascular disease - with a special focus on circulating microRNAs. *Physiol Res*. 2017 Apr 5; 66 (Supplementum 1): S21–S38.
- Giral H, Kratzer A, Landmesser U. MicroRNAs in lipid metabolism and atherosclerosis. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab*. 2016 Oct; 30 (5): 665–76. DOI: 10.1016/j.beem.2016.11.010.
- Victoria B, Nunez Lopez YO, Masternak MM. MicroRNAs and the metabolic hallmarks of aging. *Mol Cell Endocrinol*. 2017 Jan 5; 455: 131–47. DOI: 10.1016/j.mce.2016.12.021.
- Moridikia A, Mirzaei H, Sahebkar A, Salimian J. MicroRNAs: Potential candidates for diagnosis and treatment of colorectal cancer. *J Cell Physiol*. 2017 Jan 16. DOI: 10.1002/jcp.25801.
- Michael MZ, O' Connor SM, van Holst Pellekaan NG, Young GP, James RJ. Reduced accumulation of specific microRNAs in colorectal neoplasia. *Mol Cancer Res*. 2003 Oct; 1 (12): 882–91.
- Li HG, Zhao LH, Bao XB, Sun PC, Zhai BP. Meta-analysis of the differentially expressed colorectal cancer-related microRNA expression profiles. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*. 2014; 18 (14): 2048–57.
- Chen X, Ba Y, Ma L, Cai X, Yin Y, Wang K, Guo J et al. Characterization of microRNAs in serum: a novel class of biomarkers for diagnosis of cancer and other diseases. *Cell Res*. 2008 Oct; 18 (10): 997–1006. DOI: 10.1038/cr.2008.282.
- Ng EK, Chong WW, Jin H, Lam EK, Shin VY, Yu J et al. Differential expression of microRNAs in plasma of patients with colorectal cancer: a potential marker for colorectal cancer screening. *Gut*. 2009 Oct; 58 (10): 1375–81. DOI: 10.1136/gut.2008.167817.
- Clancy C, Joyce MR, Kerin MJ. The use of circulating microRNAs as diagnostic biomarkers in colorectal cancer. *Cancer Biomark*. 2015; 15 (2): 103–13. DOI: 10.3233/CBM-140456.
- Yuan Z, Baker K, Redman MW, Wang L, Adams SV, Yu M et al. Dynamic plasma microRNAs are biomarkers for prognosis and early detection of recurrence in colorectal cancer. *Br J Cancer*. Epub 2017 Aug 15. DOI: 10.1038/bjc.2017.266.
- SysCol [Internet]. Huddinge, Sweden: Karolinska Institutet [cited 2017 Aug]. Available from: <http://syscol-project.eu>.
- Eng J. ROC analysis: web-based calculator for ROC curves. Baltimore: Johns Hopkins University [updated 2014 Mar 19; cited 2017 Aug]. Available from: <http://www.jrocf.it.org>.
- Yang Y, Gu X, Zhou M, Xiang J, Chen Z. Serum microRNAs: A new diagnostic method for colorectal cancer. *Biomed Rep*. 2013 Jul; 1 (4): 495–8. DOI: 10.3892/br.2013.109.
- Zekri AR, Youssef AS1, Lotfy MM, Gabr R, Ahmed OS, Nassar A et al. Circulating Serum miRNAs as Diagnostic Markers for Colorectal Cancer. *PLoS One*. 2016 May 2; 11 (5): e0154130. DOI: 10.1371/journal.pone.0154130.
- Rusca N, Monticelli S. MiR-146a in immunity and disease. *Mol Biol Int*. 2011; 2011: 437301. DOI: 10.4061/2011/437301.
- Magilnick N, Reyes EY, Wang WL, Vonderfecht SL, Gohda J, Inoue JI et al. miR-146a-Traf6 regulatory axis controls autoimmunity and myelopoiesis, but is dispensable for hematopoietic stem cell homeostasis and tumor suppression. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2017 Aug 22; 114 (34): E7140–9. DOI: 10.1073/pnas.1706833114.
- Han Y, Li Y, Jiang Y. The Prognostic Value of Plasma MicroRNA-155 and MicroRNA-146a Level in Severe Sepsis and Sepsis-Induced Acute Lung Injury Patients. *Clin Lab*. 2016 Dec 1; 62 (12): 2355–60. DOI: 10.7754/Clin.Lab.2016.160511.
- Xie M, Li Y, Wu J, Wu J. A risk of digestive tract neoplasms susceptibility in miR-146a and miR-196a2. *Fam Cancer*. 2015 Jun; 14 (2): 229–39. DOI: 10.1007/s10689-014-9776-6.
- Sun Y, Li M. Genetic polymorphism of miR-146a is associated with gastric cancer risk: a meta-analysis. *Eur J Cancer Care (Engl)*. 2017 Mar; 26 (2). DOI: 10.1111/ecc.12355.
- Zhou X, Zhu W, Li H, Wen W, Cheng W, Wang F et al. Diagnostic value of a plasma microRNA signature in gastric cancer: a microRNA expression analysis. *Sci Rep*. 2015 Jun 10; 5: 11251.
- Pihlström L, Rengmark A, Björnarå KA, Toft M. Effective variant detection by targeted deep sequencing of DNA pools: an example from Parkinson's disease. *Ann Hum Genet*. 2014 May; 78 (3): 243–52. DOI: 10.1111/ahg.12060.
- Otsu H, Watanabe M, Inoue N, Masutani R, Iwatani Y. Intraindividual variation of microRNA expression levels in plasma and peripheral blood mononuclear cells and the associations of these levels with the pathogenesis of autoimmune thyroid diseases. *Clin Chem Lab Med*. 2017 May 1; 55 (5): 626–35. DOI: 10.1515/cclm-2016-0449.

References

- Mitchell PS, Parkin RK, Kroh EM, Fritz BR, Wyman SK, Pogosova-Agadjanyan EL et al. Circulating microRNAs as stable blood-based markers for cancer detection. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2008 Jul 29; 105 (30): 10513–8. DOI: 10.1073/pnas.0804549105.
- Olivieri F, Rippo MR, Monsurro V, Salvioli S, Capri M, Procopio AD, Franceschi C. MicroRNAs linking inflamm-aging, cellular senescence and cancer. *Ageing Res Rev*. 2013 Sep; 12 (4): 1056–68. DOI: 10.1016/j.arr.2013.05.001.
- Dlouhá D, Hubáček JA. Regulatory RNAs and cardiovascular disease - with a special focus on circulating microRNAs. *Physiol Res*. 2017 Apr 5; 66 (Supplementum 1): S21–S38.
- Giral H, Kratzer A, Landmesser U. MicroRNAs in lipid metabolism and atherosclerosis. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab*. 2016 Oct; 30 (5): 665–76. DOI: 10.1016/j.beem.2016.11.010.
- Victoria B, Nunez Lopez YO, Masternak MM. MicroRNAs and the metabolic hallmarks of aging. *Mol Cell Endocrinol*. 2017 Jan 5; 455: 131–47. DOI: 10.1016/j.mce.2016.12.021.
- Moridikia A, Mirzaei H, Sahebkar A, Salimian J. MicroRNAs: Potential candidates for diagnosis and treatment of colorectal cancer. *J Cell Physiol*. 2017 Jan 16. DOI: 10.1002/jcp.25801.
- Michael MZ, O' Connor SM, van Holst Pellekaan NG, Young GP, James RJ. Reduced accumulation of specific microRNAs in colorectal neoplasia. *Mol Cancer Res*. 2003 Oct; 1 (12): 882–91.
- Li HG, Zhao LH, Bao XB, Sun PC, Zhai BP. Meta-analysis of the differentially expressed colorectal cancer-related microRNA expression profiles. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*. 2014; 18 (14): 2048–57.
- Chen X, Ba Y, Ma L, Cai X, Yin Y, Wang K, Guo J et al. Characterization of microRNAs in serum: a novel class of biomarkers for diagnosis of cancer and other diseases. *Cell Res*. 2008 Oct; 18 (10): 997–1006. DOI: 10.1038/cr.2008.282.
- Ng EK, Chong WW, Jin H, Lam EK, Shin VY, Yu J et al. Differential expression of microRNAs in plasma of patients with colorectal cancer: a potential marker for colorectal cancer screening. *Gut*. 2009 Oct; 58 (10): 1375–81. DOI: 10.1136/gut.2008.167817.
- Clancy C, Joyce MR, Kerin MJ. The use of circulating microRNAs as diagnostic biomarkers in colorectal cancer. *Cancer Biomark*. 2015; 15 (2): 103–13. DOI: 10.3233/CBM-140456.
- Yuan Z, Baker K, Redman MW, Wang L, Adams SV, Yu M et al. Dynamic plasma microRNAs are biomarkers for prognosis and early detection of recurrence in colorectal cancer. *Br J Cancer*. Epub 2017 Aug 15. DOI: 10.1038/bjc.2017.266.
- SysCol [Internet]. Huddinge, Sweden: Karolinska Institutet [cited 2017 Aug]. Available from: <http://syscol-project.eu>.
- Eng J. ROC analysis: web-based calculator for ROC curves. Baltimore: Johns Hopkins University [updated 2014 Mar 19; cited 2017 Aug]. Available from: <http://www.jrocf.it.org>.
- Yang Y, Gu X, Zhou M, Xiang J, Chen Z. Serum microRNAs: A new diagnostic method for colorectal cancer. *Biomed Rep*. 2013 Jul; 1 (4): 495–8. DOI: 10.3892/br.2013.109.
- Zekri AR, Youssef AS1, Lotfy MM, Gabr R, Ahmed OS, Nassar A et al. Circulating Serum miRNAs as Diagnostic Markers for Colorectal Cancer. *PLoS One*. 2016 May 2; 11 (5): e0154130. DOI: 10.1371/journal.pone.0154130.
- Rusca N, Monticelli S. MiR-146a in immunity and disease. *Mol Biol Int*. 2011; 2011: 437301. DOI: 10.4061/2011/437301.
- Magilnick N, Reyes EY, Wang WL, Vonderfecht SL, Gohda J, Inoue JI et al. miR-146a-Traf6 regulatory axis controls autoimmunity and myelopoiesis, but is dispensable for hematopoietic stem cell homeostasis and tumor suppression. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2017 Aug 22; 114 (34): E7140–9. DOI: 10.1073/pnas.1706833114.
- Han Y, Li Y, Jiang Y. The Prognostic Value of Plasma MicroRNA-155 and MicroRNA-146a Level in Severe Sepsis and Sepsis-Induced Acute Lung Injury Patients. *Clin Lab*. 2016 Dec 1; 62 (12): 2355–60. DOI: 10.7754/Clin.Lab.2016.160511.
- Xie M, Li Y, Wu J, Wu J. A risk of digestive tract neoplasms susceptibility in miR-146a and miR-196a2. *Fam Cancer*. 2015 Jun; 14 (2): 229–39. DOI: 10.1007/s10689-014-9776-6.
- Sun Y, Li M. Genetic polymorphism of miR-146a is associated with gastric cancer risk: a meta-analysis. *Eur J Cancer Care (Engl)*. 2017 Mar; 26 (2). DOI: 10.1111/ecc.12355.
- Zhou X, Zhu W, Li H, Wen W, Cheng W, Wang F et al. Diagnostic value of a plasma microRNA signature in gastric cancer: a microRNA expression analysis. *Sci Rep*. 2015 Jun 10; 5: 11251.
- Pihlström L, Rengmark A, Bjørnå KA, Toft M. Effective variant detection by targeted deep sequencing of DNA pools: an example from Parkinson's disease. *Ann Hum Genet*. 2014 May; 78 (3): 243–52. DOI: 10.1111/ahg.12060.
- Otsu H, Watanabe M, Inoue N, Masutani R, Iwatani Y. Intraindividual variation of microRNA expression levels in plasma and peripheral blood mononuclear cells and the associations of these levels with the pathogenesis of autoimmune thyroid diseases. *Clin Chem Lab Med*. 2017 May 1; 55 (5): 626–35. DOI: 10.1515/cclm-2016-0449.

СЕМЕЙНЫЙ СЛУЧАЙ СИНДРОМА КОЭНА: КЛИНИЧЕСКОЕ НАБЛЮДЕНИЕ

О. А. Левченко¹, Р. А. Зинченко^{1,2}, А. В. Лавров^{1,2} ✉¹ Лаборатория мутагенеза,
Медико-генетический научный центр, Москва² Кафедра молекулярной и клеточной генетики, медико-биологический факультет,
Российский национальный исследовательский медицинский университет имени Н. И. Пирогова, Москва

Синдром Коэна — редкое аутосомно-рецессивное заболевание, характеризующееся умственной отсталостью, миопией, гипотонией, ожирением и деформацией костей. Заболевание имеет выраженный меж- и внутрисемейный клинический полиморфизм, что затрудняет его клиническую диагностику. Ген *VPS13B*, мутации в котором приводят к развитию синдрома, имеет 62 экзона, и полный его анализ в практике не применяется. Нами описан семейный случай синдрома Коэна. Брат и сестра из метисированного абазин-черкесского брака имеют диагноз «умственная отсталость в стадии имбецильности». У обоих пробандов с рождения отмечена задержка психомоторного развития. В школе учиться не смогли, писать, читать, считать не научились. Несмотря на некоторые общие неспецифические признаки, различия в фенотипе не позволили установить диагноз, и был назначен полноэкзомный анализ. Найдена однонуклеотидная замена с.7603C>T, приводящая к образованию преждевременного стоп-кодона R2535* в гене *VPS13B*. Носителями мутации оказались мать, больные сибсы и один из двух здоровых сибсов. Вторую мутацию найти не удалось. По итогам детального анализа фенотипа и с учетом выявленной мутации установлен синдром Коэна у обоих пациентов.

Ключевые слова: умственная отсталость, семейная неспецифическая умственная отсталость, полноэкзомный анализ, синдром Коэна, несиндромальная умственная отсталость

✉ **Для корреспонденции:** Лавров Александр Вячеславович
ул. Москворечье, д. 1, г. Москва, 115478; alexandervlavrov@gmail.com

Статья получена: 02.08.2017 **Статья принята к печати:** 15.08.2017

COHEN SYNDROME IN FAMILY MEMBERS: A CASE REPORT

Levchenko OA¹, Zinchenko RA^{1,2}, Lavrov AV^{1,2} ✉¹ Laboratory of Mutagenesis,
Research Centre for Medical Genetics, Moscow, Russia² Department of Molecular and Cellular Genetics, Biomedical Faculty,
Pirogov Russian National Research Medical University, Moscow, Russia

Cohen syndrome is a rare autosomal-recessive disorder characterized by intellectual disability, myopia, hypotonia, and skeletal malformations. Its clinical diagnosis is impeded by marked inter- and intrafamilial phenotypic variability. Gene *VPS13B* that carries disease-associated mutations has 62 exons, making Sanger sequencing of the entire gene unsuitable for routine clinical use due to high costs. In this work we report a case of Cohen syndrome in a brother and sister born to a mixed Abazin-Circassian marriage and diagnosed with moderate mental retardation. Both patients had psychomotor retardation, were unable to study at school, and never learned to read, write and count. Although the patients shared a few nonspecific phenotypic characteristics, phenotypic differences made it impossible to arrive at a clear diagnosis. Therefore, whole exome sequencing was performed revealing the single nucleotide variant c.7603C>T that results in the premature stop codon R2535* in *VPS13B*. This mutation was found in the mother, the affected sibs and one of the two other healthy sibs. The second mutation remained undetected. Considering the identified mutation and the analyzed phenotypic traits, we concluded Cohen syndrome in both patients.

Keywords: intellectual disability, familial nonspecific intellectual disability, whole exome sequencing, Cohen syndrome, nonsyndromic intellectual disability

✉ **Correspondence should be addressed:** Alexander Lavrov
ul. Moskvorechie, d. 1, Moscow, Russia, 115478; alexandervlavrov@gmail.com

Received: 02.08.2017 **Accepted:** 15.08.2017

Синдром Коэна — генетически обусловленное заболевание с аутосомно-рецессивным типом наследования (OMIM 216550).

Впервые синдром описали Cohen и соавт. в 1973 г.: у пациентов были отмечены гипотония, ожирение, умственная отсталость, дисморфии лица и конечностей, офтальмологические проблемы [1]. Ген *VPS13B* (*COH1*) картировали на хромосоме 8 в 1994 г. финские исследователи [2], но только в 2003 г., также в Финляндии, было установлено,

что синдром вызывают мутации именно в этом гене [3]. Была проведена самая масштабная на тот момент работа по поиску мутаций в гене *COH1* у 76 пациентов из 59 семей с предварительным диагнозом синдрома Коэна [4]. Авторам удалось описать 22 мутации, 19 из которых были описаны впервые. Во многих важных работах изучали пациентов из Финляндии и Великобритании [4, 5], но всего в литературе описано несколько сотен случаев синдрома Коэна в разных странах и разных популяциях, в том

числе в Германии и Польше [6], Италии [7], Греции [8], Бельгии [9]), на Ближнем Востоке и в Африке [6, 10, 11], Японии [10, 12] и Америке [6, 11, 13]. Тем не менее уровень заболеваемости оценить сложно, т. к. в большинстве стран описаны единичные случаи, и заболевание считается редким. Выраженный межсемейный и внутрисемейный клинический полиморфизм затрудняет диагностику патологии, что может приводить к недооценке ее истинной встречаемости. Например, Rauch и соавт. [14] установили синдром Коэна у 0,7 % пациентов с недифференцированной умственной отсталостью. А при секвенировании клинического экзона у пациентов с признаками наследственной патологии синдром Коэна был выявлен в 0,1 % случаев [15].

Синдром Коэна является наследственным расстройством, которое поражает многие части тела и, кроме описанных Коэном проявлений, характеризуется неярко выраженной микроцефалией, миопией высокой степени, прогрессирующей дистрофией сетчатки, гипермобильностью суставов и особым лицевым фенотипом. Черепно-лицевые аномалии обычно включают в себя толстые волосы на голове и бровях, длинные ресницы, глаза необычной формы (антимонголоидные и дугообразные), закругленный кончик носа, гладкую или укороченную область между носом и верхней губой (фильтр), гипоплазию верхней челюсти и выступающие верхние резцы. Сочетание последних трех признаков нередко приводит к приоткрытию рта, несмотря на полное смыкание челюстей [16]. Дополнительные признаки и симптомы у некоторых людей с этим расстройством включают узкие кисти и стопы и длинные пальцы. Из лабораторных показателей отмечают низкий уровень лейкоцитов (нейтропению), что приводит к частым рецидивирующим инфекционным заболеваниям [17]. Отдельные симптомы сочетаются у больных в различных комбинациях, и их одновременное наличие необязательно при синдроме Коэна.

Дифференциальная диагностика синдрома Коэна затруднена из-за выраженного клинического полиморфизма, в том числе при возрастных изменениях, и проводится в качестве комплексной диагностики при выявлении сразу нескольких синдромов: Прадера-Вилли, Барде-Бидля, Альстрема, Ангельмана, Марфана, Сотоса. Редкий синдром Мирхоссеини-Холмса-Уолтона (OMIM 268050) считается аллельным вариантом синдрома Коэна и во многом имеет схожую клиническую картину [18, 19].

Генетической причиной синдрома являются мутации в гене *VPS13B* (COH1) [3]. Кроме синдрома Коэна мутации в этом гене могут приводить к несиндромальной умственной отсталости [20] или аутизму [21]. Продукт гена *VPS13B* — трансмембранный белок, являющийся частью аппарата Гольджи. Его основная роль — это регуляция везикулярного транспорта, а также внутриклеточная сортировка белков. Помимо этого, *VPS13B* участвует в гликозилровании. Экспрессионный анализ показал наивысшую экспрессию белка в нейронах коры головного мозга [22].

При синдроме Коэна чаще всего находят мутации, приводящие к укорочению белка и, соответственно, потере его функции. В экспериментах сниженная экспрессия белка приводит к уменьшению количества нейронов в культуре клеток гиппокампа, чем можно объяснить микроцефалию и умственную отсталость при синдроме Коэна. А нарушения гликозилрования могут являться причиной аномального распределения жира [23].

Для диагностики синдрома в популяциях с частыми мутациями целесообразно проводить их таргетное секвенирование. Например, в Финляндии 75 % мутантных аллелей

представлены делецией с.3348_3349delCT [3], а в изоляте американских амишей сцепленные мутации с.8459T>C и 9258_9259insT составляют 99 % всех аллелей при синдроме Коэна. Возможно также применение метода множественной лигазозависимой амплификации (multiplex ligation-dependent probe amplification, MLPA) или хромосомного микроматричного анализа, т. к. до 30 % случаев обусловлены делециями/дупликациями [24]. Секвенирование по Сэнгеру целого гена нецелесообразно, поскольку в нем 62 экзона, и себестоимость анализа достаточно высока. Альтернативой являются NGS-панели и секвенирование экзона, которое все чаще используют в диагностике умственной отсталости [25]. При синдроме Коэна с его помощью удается установить молекулярный диагноз в 70 % случаев [5].

Описание клинического случая

За консультацией врача-генетика обратилась семья из метисированного абазино-черкесского брака. В семье два здоровых родителя и четверо детей, из которых двое, старший сын 29 лет и дочь 23 лет (рисунок), имеют инвалидность с детства и диагноз «умственная отсталость в стадии имбецильности». У обоих пробандов с рождения отмечена задержка психомоторного развития. В школе учиться не смогли, писать, читать, считать не научились. Речь односложная, больше фразовая. Умственное развитие соответствует 3–5 годам. При осмотре у обоих пробандов отмечена умственная отсталость, микроцефалия (52,5 см у мужчины и 53 см у женщины). Черепно-лицевые аномалии также включали толстые объемные волосы, низкую линию роста волос на лбу и шее, густые брови, миопию высокой степени, короткий фильтр, тонкую верхнюю губу с гипоплазией верхней челюсти (более выражена у мужчины), клювовидный нос с закругленным кончиком. У пациентов выраженный поясничный сколиоз, плоскостопие, деформация стоп, длинные пальцы рук. У мужчины удлинённый проксимальный отдел мизинца, низко посаженные оттопыренные уши, синофриз. У женщины более выраженная умственная отсталость, ожирение 1–2 степени при росте 158–160 см, «приросшие» мочки ушей, мыс вдовы, открытый рот с видными выступающими передними резцами, кариозные зубы, гипотония мышц, стрии на всем теле, отсутствие менархе.

Ввиду значительного клинического полиморфизма заболевания у сибсов клинический диагноз поставлен не был. Мужчине провели массовое параллельное секвенирование полного экзона, в результате чего у него была найдена ранее описанная мутация *rs386834107* [6, 26] — однонуклеотидная замена с.7603C>T, приводящая к образованию преждевременного стоп-кодона



Сибсы с синдромом Коэна: сестра, 23 года (слева) и брат, 29 лет (справа)

R2535* в экзоне 42 гена *VPS13B*. Поскольку в гене 62 экзона, вследствие данной мутации белок оказывается усечен на треть своей длины. Затем провели валидацию данной мутации у всех членов семьи секвенированием по Сэнгеру. Носителями оказались мать, больные сибсы и один из двух здоровых сибсов, что не противоречит типу аутосомно-рецессивного наследования.

Для поиска второй мутации изучили все другие найденные при экзомном секвенировании варианты в данном гене (SNV), а также провели вручную поиск возможных автоматически не определенных мутаций в секвенированной части гена. Были выявлены следующие варианты: M3265*, G3432R, D903N. Данные варианты не являются патогенными либо не подтверждены секвенированием по Сэнгеру. Анализ равномерности покрытия данного региона и наличие гетерозиготных вариантов не позволяют заподозрить делецию одного из аллелей по данным полноэкзомного анализа.

Фенотип обоих пациентов был дополнительно проанализирован с помощью приложения Face2Gene (FDNA, США). По совокупности выявленных признаков (умственная отсталость, микроцефалия, миопия, толстые волосы, низкая линия роста волос, закругленный кончик носа, выступающие передние резцы) также в первую очередь был предположен синдром Коэна.

По итогам комплексного обследования мы считаем подтвержденным диагноз синдрома Коэна у данных пациентов.

Обсуждение клинического случая

Значительный клинический полиморфизм синдрома Коэна затрудняет его диагностику, особенно при невозможности проведения немедленных дополнительных лабораторных исследований, например при экспедиционном сборе материала и медико-генетическом консультировании. В таких случаях высокопроизводительные методы молекулярно-генетической диагностики могут являться единственным решением, позволяющим установить диагноз. Молекулярно-генетическая диагностика открыла значительную аллельную гетерогенность синдрома, которую ав-

торы соотносили с клиническим полиморфизмом [6, 16]. При этом внутрисемейному полиморфизму особое внимание не уделяли (OMIM 216550), а по опубликованным фотографиям пациентов можно сделать заключение о преобладающем сходстве фенотипов у сибсов [6, 16].

В описанной нами семье наблюдается ярко выраженный клинический полиморфизм при сохранении множества общих черт. Возможное объяснение клинической гетерогенности можно было бы получить, обнаружив вторую мутацию у обоих сибсов. Для продолжения диагностического поиска целесообразно осуществить поиск делеций/дупликаций в гене, что затруднительно, учитывая большую длину гена и отсутствие разработанных методов его анализа. Делеции и дупликации одного-двух экзонов, а также инверсии описаны у многих пациентов с синдромом Коэна — 9 (53%) из 17 случаев [27]. Вместе с тем известно несколько случаев синдрома Коэна, при которых также были выявлены мутации (включая обнаруженную нами) в гетерозиготном состоянии, а вторые мутации найдены не были [6]. Соответственно, молекулярно-генетическая диагностика синдрома Коэна требует применения разных молекулярно-генетических методов для определения как точечных, так и протяженных мутаций, а также инверсий. Ранее мы предлагали диагностический алгоритм при умственной отсталости, предусматривающий выбор полноэкзомного или хромосомного микроматричного анализа [25]. Однако в некоторых случаях возникает необходимость использовании обоих методов, и даже в таких ситуациях вторая мутация может быть не найдена.

Выводы

Синдром Коэна проявляет значительную вариабельность фенотипа даже в пределах одной семьи, что может значительно затруднять клиническую диагностику. Надежным помощником в такой ситуации является массовое параллельное секвенирование, которое позволяет не только установить верный диагноз, но и произвести дифференциальную диагностику с другими трудно отличимыми синдромами с умственной отсталостью.

Литература

1. Cohen MM Jr, Hall BD, Smith DW, Graham CB, Lampert KJ. A new syndrome with hypotonia, obesity, mental deficiency, and facial, oral, ocular, and limb anomalies. *J Pediatr*. 1973 Aug; 83 (2): 280–4.
2. Tahvanainen E, Norio R, Karila E, Ranta S, Weissenbach J, Sistonen P, et al. Cohen syndrome gene assigned to the long arm of chromosome 8 by linkage analysis. *Nat Genet*. 1994 Jun; 7 (2): 201–4.
3. Kolehmainen J, Black GC, Saarinen A, Chandler K, Clayton-Smith J, Träskelin AL, et al. Cohen syndrome is caused by mutations in a novel gene, COH1, encoding a transmembrane protein with a presumed role in vesicle-mediated sorting and intracellular protein transport. *Am J Hum Genet*. 2003 Jun; 72 (6): 1359–69.
4. Kolehmainen J, Wilkinson R, Lehesjoki AE, Chandler K, Kivitie-Kallio S, Clayton-Smith J, et al. Delineation of Cohen syndrome following a large-scale genotype-phenotype screen. *Am J Hum Genet*. 2004 Jul; 75 (1): 122–7.
5. Balikova I, Lehesjoki AE, de Ravel TJ, Thienpont B, Chandler KE, Clayton-Smith J, et al. Deletions in the *VPS13B* (COH1) gene as a cause of Cohen syndrome. *Hum Mutat*. 2009 Sep; 30 (9): E845–54.
6. Hennies HC, Rauch A, Seifert W, Schumi C, Moser E, Al-Taji E, et al. Allelic Heterogeneity in the COH1 Gene Explains Clinical Variability in Cohen Syndrome. 2004 Jul; 75 (1): 138–45.
7. Katzaki E, Pescucci C, Uliana V, Papa FT, Ariani F, Meloni I, et al. Clinical and molecular characterization of Italian patients affected by Cohen syndrome. *J Hum Genet*. 2007; 52 (12): 1011–7.
8. Bugiani M, Gyftodimou Y, Tsimpouka P, Lamantea E, Katzaki E, d'Adamo P, et al. Cohen syndrome resulting from a novel large intragenic COH1 deletion segregating in an isolated Greek island population. *Am J Med Genet A*. 2008 Sep 1; 146A (17): 2221–6.
9. Peeters K, Willekens D, Steyaert J, Fryns JP. The long term evolution of 6 adult patients with Cohen syndrome and their behavioral characteristics. *Genet Couns*. 2008; 19 (1): 1–14.
10. Mochida GH, Rajab A, Eyaid W, Lu A, Al-Nouri D, Kosaki K, et al. Broader geographical spectrum of Cohen syndrome due to COH1 mutations. *J Med Genet*. 2004 Jun; 41 (6): e87.
11. Taban M, Memoracion-Peralta DS, Wang H, Al-Gazali LI, Traboulsi EI. Cohen syndrome: Report of nine cases and review of the literature, with emphasis on ophthalmic features. *J AAPOS*. 2007 Oct; 11 (5): 431–7.
12. Kondo I, Shimizu A, Asakawa S, Miyamoto K, Yamagata H, Tabara Y, et al. COH1 analysis and linkage study in two Japanese

- families with Cohen syndrome. *Clin Genet*. 2005 Mar; 67 (3): 270–2.
13. Falk MJ, Feiler HS, Neilson DE, Maxwell K, Lee JV, Segall SK, et al. Cohen syndrome in the Ohio Amish. *Am J Med Genet A*. 2004 Jul 1; 128A (1): 23–8.
 14. Rauch A, Hoyer J, Guth S, Zweier C, Kraus C, Becker C, et al. Diagnostic Yield of Various Genetic Approaches in Patients with Unexplained Developmental Delay or Mental Retardation. *Am J Med Genet A*. 2006 Oct 1; 140A (18): 2063–74.
 15. Yang Y, Muzny DM, Xia F, Niu Z, Person R, Ding Y, et al. Molecular Findings Among Patients Referred for Clinical Whole-Exome Sequencing. *JAMA*. 2014 Nov 12; 312 (18): 1870–9.
 16. Seifert W, Holder-Espinasse M, Spranger S, Hoeltzenbein M, Rossier E, Dollfus H, et al. Mutational spectrum of COH1 and clinical heterogeneity in Cohen syndrome. *J Med Genet*. 2006 May; 43 (5): e22.
 17. Wang H, Falk MJ, Wensel C, Traboulsi EI. Cohen syndrome. B: Pagon RA, Adam MP, Ardinger HH, Wallace SE, Amemiya A, Bean LJH и др., редакторы. *GeneReviews®* [Интернет]. Seattle (WA): University of Washington, Seattle; 1993–2017. 29 августа 2006 г. [дополнено: 21 июля 2016 г.].
 18. Norio R, Raitta C. Are the Mirhosseini-Holmes-Walton Syndrome and the Cohen Syndrome Identical? *Am J Med Genet*. 1986 Oct; 25 (2): 397–8.
 19. Horn D, Krebsová A, Kunze J, Reis A. Homozygosity mapping in a family with microcephaly, mental retardation, and short stature to a Cohen syndrome region on 8q21.3-8q22.1: Redefining a clinical entity. *Am J Med Genet*. 2000 Jun 5; 92 (4): 285–92.
 20. Karaca E, Harel T, Pehlivan D, Jhangiani SN, Gambin T, Coban Akdemir Z, et al. Genes that Affect Brain Structure and Function Identified by Rare Variant Analyses of Mendelian Neurologic Disease. *Neuron*. 2015 Nov 4; 88 (3): 499–513.
 21. Yu TW, Chahrour MH, Coulter ME, Jiralerspong S, Okamura-Ikeda K, Ataman B, et al. Using whole-exome sequencing to identify inherited causes of autism. *Neuron*. 2013 Jan 23; 77 (2): 259–73.
 22. Seifert W, Kühnisch J, Maritzen T, Horn D, Haucke V, Hennies HC. Cohen syndrome-associated protein, COH1, is a novel, giant Golgi matrix protein required for Golgi integrity. *J Biol Chem*. 2011 Oct 28; 286 (43): 37665–75.
 23. Seifert W, Kühnisch J, Maritzen T, Lommatzsch S, Hennies HC, Bachmann S, et al. Cohen syndrome-associated protein COH1 physically and functionally interacts with the small GTPase RAB6 at the Golgi complex and directs neurite outgrowth. *J Biol Chem*. 2015 Feb 6; 290 (6): 3349–58.
 24. El Chehadeh-Djebbar S, Faivre L, Moncla A, Aral B, Missirian C, Popovici C, et al. The power of high-resolution non-targeted array-CGH in identifying intragenic rearrangements responsible for Cohen syndrome. *J Med Genet*. 2011 Nov; 48 (11): e1.
 25. Лавров А. В., Банников А. В., Чаушева А. И., Дадали Е. Л. Генетика умственной отсталости. *Рос. вестн. перинатол. и педиатр*. 2016; 61 (6): 13–20.
 26. Xiong HY, Alipanahi B, Lee LJ, Bretschneider H, Merico D, Yuen RK, et al. RNA splicing. The human splicing code reveals new insights into the genetic determinants of disease. *Science*. 2015 Jan 9; 347 (6218): 1254806.
 27. El Chehadeh-Djebbar S, Blair E, Holder-Espinasse M, Moncla A, Frances AM, Rio M, et al. Changing facial phenotype in Cohen syndrome: towards clues for an earlier diagnosis. *Eur J Hum Genet*. 2013 Jul; 21 (7): 736–42.

References

1. Cohen MM Jr, Hall BD, Smith DW, Graham CB, Lampert KJ. A new syndrome with hypotonia, obesity, mental deficiency, and facial, oral, ocular, and limb anomalies. *J Pediatr*. 1973 Aug; 83 (2): 280–4.
2. Tahvanainen E, Norio R, Karila E, Ranta S, Weissenbach J, Sistonen P, et al. Cohen syndrome gene assigned to the long arm of chromosome 8 by linkage analysis. *Nat Genet*. 1994 Jun; 7 (2): 201–4.
3. Kolehmainen J, Black GC, Saarinen A, Chandler K, Clayton-Smith J, Träskelin AL, et al. Cohen syndrome is caused by mutations in a novel gene, COH1, encoding a transmembrane protein with a presumed role in vesicle-mediated sorting and intracellular protein transport. *Am J Hum Genet*. 2003 Jun; 72 (6): 1359–69.
4. Kolehmainen J, Wilkinson R, Lehesjoki AE, Chandler K, Kivitie-Kallio S, Clayton-Smith J, et al. Delineation of Cohen syndrome following a large-scale genotype-phenotype screen. *Am J Hum Genet*. 2004 Jul; 75 (1): 122–7.
5. Balikova I, Lehesjoki AE, de Ravel TJ, Thienpont B, Chandler KE, Clayton-Smith J, et al. Deletions in the VPS13B (COH1) gene as a cause of Cohen syndrome. *Hum Mutat*. 2009 Sep; 30 (9): E845–54.
6. Hennies HC, Rauch A, Seifert W, Schumi C, Moser E, Al-Taji E, et al. Allelic Heterogeneity in the COH1 Gene Explains Clinical Variability in Cohen Syndrome. 2004 Jul; 75 (1): 138–45.
7. Katzaki E, Pescucci C, Uliana V, Papa FT, Ariani F, Meloni I, et al. Clinical and molecular characterization of Italian patients affected by Cohen syndrome. *J Hum Genet*. 2007; 52 (12): 1011–7.
8. Bugiani M, Gyftodimou Y, Tsimponika P, Lamantea E, Katzaki E, d'Adamo P, et al. Cohen syndrome resulting from a novel large intragenic COH1 deletion segregating in an isolated Greek island population. *Am J Med Genet A*. 2008 Sep 1; 146A (17): 2221–6.
9. Peeters K, Willekens D, Steyaert J, Fryns JP. The long term evolution of 6 adult patients with Cohen syndrome and their behavioral characteristics. *Genet Couns*. 2008; 19 (1): 1–14.
10. Mochida GH, Rajab A, Eyaid W, Lu A, Al-Nouri D, Kosaki K, et al. Broader geographical spectrum of Cohen syndrome due to COH1 mutations. *J Med Genet*. 2004 Jun; 41 (6): e87.
11. Taban M, Memoracion-Peralta DS, Wang H, Al-Gazali LI, Traboulsi EI. Cohen syndrome: Report of nine cases and review of the literature, with emphasis on ophthalmic features. *J AAPOS*. 2007 Oct; 11 (5): 431–7.
12. Kondo I, Shimizu A, Asakawa S, Miyamoto K, Yamagata H, Tabara Y, et al. COH1 analysis and linkage study in two Japanese families with Cohen syndrome. *Clin Genet*. 2005 Mar; 67 (3): 270–2.
13. Falk MJ, Feiler HS, Neilson DE, Maxwell K, Lee JV, Segall SK, et al. Cohen syndrome in the Ohio Amish. *Am J Med Genet A*. 2004 Jul 1; 128A (1): 23–8.
14. Rauch A, Hoyer J, Guth S, Zweier C, Kraus C, Becker C, et al. Diagnostic Yield of Various Genetic Approaches in Patients with Unexplained Developmental Delay or Mental Retardation. *Am J Med Genet A*. 2006 Oct 1; 140A (18): 2063–74.
15. Yang Y, Muzny DM, Xia F, Niu Z, Person R, Ding Y, et al. Molecular Findings Among Patients Referred for Clinical Whole-Exome Sequencing. *JAMA*. 2014 Nov 12; 312 (18): 1870–9.
16. Seifert W, Holder-Espinasse M, Spranger S, Hoeltzenbein M, Rossier E, Dollfus H, et al. Mutational spectrum of COH1 and clinical heterogeneity in Cohen syndrome. *J Med Genet*. 2006 May; 43 (5): e22.
17. Wang H, Falk MJ, Wensel C, Traboulsi EI. Cohen syndrome. In: Pagon RA, Adam MP, Ardinger HH, Wallace SE, Amemiya A, Bean LJH, et al, editors. *GeneReviews®* [Internet]. Seattle (WA): University of Washington, Seattle; 1993–2017. 2006 Aug 29 [updated 2016 Jul 21].
18. Norio R, Raitta C. Are the Mirhosseini-Holmes-Walton Syndrome and the Cohen Syndrome Identical? *Am J Med Genet*. 1986 Oct; 25 (2): 397–8.
19. Horn D, Krebsová A, Kunze J, Reis A. Homozygosity mapping in a family with microcephaly, mental retardation, and short stature to a Cohen syndrome region on 8q21.3-8q22.1: Redefining a clinical entity. *Am J Med Genet*. 2000 Jun 5; 92 (4): 285–92.

20. Karaca E, Harel T, Pehlivan D, Jhangiani SN, Gambin T, Coban Akdemir Z, et al. Genes that Affect Brain Structure and Function Identified by Rare Variant Analyses of Mendelian Neurologic Disease. *Neuron*. 2015 Nov 4; 88 (3): 499–513.
21. Yu TW, Chahrour MH, Coulter ME, Jiralerspong S, Okamura-Ikeda K, Ataman B, et al. Using whole-exome sequencing to identify inherited causes of autism. *Neuron*. 2013 Jan 23; 77 (2): 259–73.
22. Seifert W, Kühnisch J, Maritzen T, Horn D, Haucke V, Hennies HC. Cohen syndrome-associated protein, COH1, is a novel, giant Golgi matrix protein required for Golgi integrity. *J Biol Chem*. 2011 Oct 28; 286 (43): 37665–75.
23. Seifert W, Kühnisch J, Maritzen T, Lommatzsch S, Hennies HC, Bachmann S, et al. Cohen syndrome-associated protein COH1 physically and functionally interacts with the small GTPase RAB6 at the Golgi complex and directs neurite outgrowth. *J Biol Chem*. 2015 Feb 6; 290 (6): 3349–58.
24. El Chehadeh-Djebbar S, Faivre L, Moncla A, Aral B, Missirian C, Popovici C, et al. The power of high-resolution non-targeted array-CGH in identifying intragenic rearrangements responsible for Cohen syndrome. *J Med Genet*. 2011 Nov; 48 (11): e1.
25. Lavrov AV, Bannikov AV, Chausheva AI, Dadali EL. [Genetics of mental retardation]. *Rossiyskiy vestnik perinatologii i pediatrii*. 2016; 61 (6): 13–20. Russian.
26. Xiong HY, Alipanahi B, Lee LJ, Bretschneider H, Merico D, Yuen RK, et al. RNA splicing. The human splicing code reveals new insights into the genetic determinants of disease. *Science*. 2015 Jan 9; 347 (6218): 1254806.
27. El Chehadeh-Djebbar S, Blair E, Holder-Espinasse M, Moncla A, Frances AM, Rio M, et al. Changing facial phenotype in Cohen syndrome: towards clues for an earlier diagnosis. *Eur J Hum Genet*. 2013 Jul; 21 (7): 736–42.

ОПРЕДЕЛЕНИЕ ЧАСТОТЫ ВСТРЕЧАЕМОСТИ МУТАЦИЙ В ГЕНЕ *PAH* С ПРИМЕНЕНИЕМ КОМБИНАЦИИ ТЕХНОЛОГИЙ ПЦР «В РЕАЛЬНОМ ВРЕМЕНИ» И ВЫСОКОПРОИЗВОДИТЕЛЬНОГО СЕКВЕНИРОВАНИЯ У БОЛЬНЫХ ФЕНИЛКЕТОНУРИЕЙ МОСКОВСКОГО РЕГИОНА

А. И. Никифорова¹✉, Д. Д. Абрамов¹, В. В. Кадочникова¹, Г. Ю. Зобкова¹, К. А. Огурцова², Н. О. Брюханова², Е. А. Шестопалова², Т. О. Кочеткова³, Е. С. Шубина³, А. Е. Донников^{1,3}, Д. Ю. Трофимов^{1,3}

¹ ООО «НПФ ДНК-Технология», Москва

² Морозовская детская городская клиническая больница, Москва

³ Лаборатория молекулярно-генетических методов,

Национальный медицинский исследовательский центр акушерства, гинекологии и перинатологии имени академика В. И. Кулакова, Москва

Определена частота встречаемости мутаций в гене фенилаланингидроксилазы (*PAH*) у неродственных детей ($n = 71$) с диагнозом «фенилкетонурия», наблюдавшихся в Морозовской детской городской клинической больнице (г. Москва) в 2015–2016 гг. Для выявления частых вариантов мутаций в гене *PAH* была применена оригинальная технология определения нуклеотидных замен на основе ПЦР в режиме «реального времени» (real-time PCR), выполнено дополнительное исследование гена методом целевого секвенирования нового поколения (NGS). Эффективность диагностирования методом ПЦР при выявлении носительства патогенного аллеля в выборке составила 83 %. При проведении комбинированной диагностики мутации в двух аллелях были выявлены в 66 случаях из 71. Всего определено 26 патогенных мутаций в гене *PAH*, наиболее часто представлены мутации p.R408W (47,9 %) и p.R261Q (9,9 %). Распространенные в России IVS10nt546, IVS12+1G>A, p.R158Q, p.Y414C, IVS4+5G>T выявлены с частотами от 4,2 до 2,8 %. Суммарная частота встречаемости половины определенных вариантов мутаций составила менее 10 %. По итогам секвенирования гена *PAH* обнаружен ряд ранее не описанных для Московского региона мутаций различного функционального типа: p.D222Terfs, p.R111Ter, p.F161S, p.G188D, p.R270K, p.L311P, p.F55L, p.F55Leufs, IVS1+5G>T, IVS8-7A>G. Мутации p.D222Terfs и p.R111Ter (с частотами 2,1 % каждая) являются потенциальными кандидатами на включение в состав скрининговой панели. Полученные данные могут быть использованы для разработки схем генодиагностики фенилкетонурии.

Ключевые слова: фенилкетонурия, ген фенилаланингидроксилазы, *PAH*, генетическая диагностика

✉ Для корреспонденции: Никифорова Алёна Игоревна
Каширское ш., д. 24, г. Москва, 115478; nikiforova@dna-technology.ru

Статья получена: 07.08.2017 Статья принята к печати: 16.08.2017

DETERMINING THE FREQUENCY OF *PAH* MUTATIONS IN MOSCOW REGION RESIDENTS WITH PHENYLKETONURIA USING A COMBINATION OF REAL-TIME PCR AND NEXT-GENERATION SEQUENCING

Nikiforova AI¹✉, Abramov DD¹, Kadochnikova VV¹, Zobkova GU¹, Ogurtsova KA², Brjuchanova NO², Shestopalova EA², Kochetkova TO³, Shubina ES³, Donnikov AE^{1,3}, Trofimov DY^{1,3}

¹ DNA-Technology LLC, Moscow, Russia

² Morozovskaya Children's City Clinical Hospital, Moscow, Russia

³ Laboratory of Molecular Genetic Methods,

Kulakov National Medical Research Center for Obstetrics, Gynecology and Perinatology, Moscow, Russia

The present study aimed to determine frequencies of mutations in the phenylalanine hydroxylase gene (*PAH*) in unrelated children ($n = 71$) diagnosed with phenylketonuria, who presented to Morozovskaya Children's City Clinical hospital (Moscow) over the period from 2015 to 2016. The patients were tested for the most common *PAH* mutations using the original real-time PCR-based technique for the identification of nucleotide variants; additionally, next generation sequencing (NGS) was performed on the unidentified genotypes. The original PCR-based technique allowed us to effectively identify 83 % of the pathogenic allelic variants in the sample. Using the combination approach (real-time PCR + NGS), we found mutations in both alleles of *PAH* in 66 of total 71 patients. Altogether, 26 pathogenic *PAH* mutations were identified, the most common being p.R408W (47.9 %) and p.R261Q (9.9 %). Frequencies of mutations common for the Russian population, such as IVS10nt546, IVS12+1G>A, p.R158Q, p.Y414C, and IVS4+5G>T, ranged from 4.2 to 2.8 %. Half of the identified variants accounted for the total frequency of < 10 %. Sequencing of *PAH* revealed a few functional mutations previously unreported for Moscow region residents, including p.D222Terfs, p.R111Ter, p.F161S, p.G188D, p.R270K, p.L311P, p.F55L, p.F55Leufs, IVS1+5G>T, and IVS8-7A>G. It could be reasonable to include mutations p.D222Terfs and p.R111Ter (carrier frequency of 2.1 %) in PCR testing panels. The data obtained in our study can also be used in the development of genetic tests for phenylketonuria.

Keywords: phenylketonuria, phenylalanine hydroxylase gene, *PAH*, real-time PCR genotyping

✉ Correspondence should be addressed: Alyona Nikiforova
Kashirskoe shosse, d. 24, Moscow, Russia, 115478; nikiforova@dna-technology.ru

Received: 07.08.2017 Accepted: 16.08.2017

Патогенные мутации в гене фенилаланингидроксилазы (*PAH*) являются причиной тяжелого заболевания — фенилкетонурии (ФАГ-зависимой ФКУ, фенилкетонурии I типа). Данное заболевание имеет аутосомно-рецессивный тип наследования и входит в число распространенных наследственных заболеваний, рекомендовано ВОЗ для ранней диагностики у новорожденных. В России средняя частота фенилкетонурии составляет 1 : 7000 [1]. Заболевание обусловлено недостаточной активностью фермента печени фенилаланингидроксилазы (ФАГ), отвечающего за превращение фенилаланина (ФА) в тирозин. В результате нарушения работы ФАГ в организме повышается уровень содержания ФА и его производных, снижается уровень содержания тирозина, нарушается обмен других аминокислот [1, 2]. При отсутствии лечения признаки поражения ЦНС появляются в первом полугодии жизни. Своевременная диагностика и терапия позволяют избежать драматических последствий фенилкетонурии.

С целью ранней диагностики ФКУ у всех новорожденных в РФ биохимическими методами определяют уровень содержания ФА в крови [1, 2]. При выявлении гиперфенилаланинемии (ГФА), т. е. при содержании ФА выше 2 мг/дл (0,12 ммоль/л), проводится повторная и дифференциальная диагностика форм заболевания. Генетическая диагностика больных ФКУ выполняется с целью уточнения клинического диагноза, определения варианта генотипа по гену *PAH*. Мутации гена *PAH* в зависимости от их локализации и функционального типа по-разному влияют на свойства фермента ФАГ [1, 3–6]. Тяжелые формы заболевания обусловлены изменениями в последовательности гена *PAH*, приводящими к нарушению синтеза белка или образованию фермента с нулевой остаточной активностью. Мутация p.R408W/c.1222C>T — наиболее распространенная среди населения России [1, 3, 6–10] — является примером «тяжелой» мутации гена *PAH*, в гомозиготном состоянии p.R408W/c.1222C>T приводит к синтезу ФАГ с минимальной остаточной активностью. Недавно было установлено, что препараты из группы синтетических аналогов тетрагидробиоптерина (природного кофермента ФАГ, НВ₄), применяемые при терапии НВ₄-зависимых форм ГФА, понижают уровень содержания ФА в крови пациентов с классической формой заболевания, но при условии сохранения остаточной активности фермента. Медикаментозное лечение в этом случае позволяет смягчить клинические проявления заболевания, расширить диету пациента. Таким образом, генетическая диагностика больных ФКУ является условием выбора стратегии индивидуальной терапии.

Существуют различные подходы генетической диагностики ФКУ. В целях выявления частых мутаций в гене *PAH* применяют методы выборочной диагностики, основанные на различных вариантах ПЦР и ПЦР-ПДРФ (полимеразная цепная реакция с последующим анализом полиморфизма длины рестрикционных фрагментов) [6–8]. Перспективными являются разработки на основе метода мультиплексной лигазозависимой амплификации зондов (multiplex ligation-dependent probe amplification, MLPA) [9], а также ПЦР в режиме «реального времени» (real-time PCR), в частности, на основе метода примыкающих проб (adjacent probes) [10]. Данные подходы позволяют проводить единовременную идентификацию десятков вариантов изменений последовательности гена. Тем не менее диагностическая эффективность методов выборочной генетической диагностики, как правило, не превышает 70–80 % [7, 8]. Поиск редких мутаций (с частотой встре-

чаемости менее 1 %) и новых вариантов гена эффективно осуществляется с помощью методов секвенирования [3, 4, 6, 11], обеспечивающих максимальную информативность при исследовании целевого региона последовательности гена. Актуальной проблемой является разработка и внедрение в практику рутинного применения отечественных решений для диагностирования ФКУ и других форм ГФА с использованием технологий секвенирования нового поколения (next-generation sequencing, NGS).

Целью настоящей работы стало определение мутаций в гене *PAH* у 71 ребенка из Московского региона с диагнозом «классическая фенилкетонурия» или «гиперфенилаланинемия». Для выявления частых вариантов мутации в гене была применена оригинальная технология определения нуклеотидных замен на основе метода real-time PCR с анализом кривых плавления, редкие и неучтенные генетические варианты в ПЦР-исследовании определяли методом таргетного секвенирования нового поколения (NGS).

ПАЦИЕНТЫ И МЕТОДЫ

В исследовании участвовали дети ($n = 71$) с клиническим диагнозом «классическая фенилкетонурия» или «гиперфенилаланинемия» (69 и 2 пациента соответственно), наблюдавшиеся в Морозовской детской городской клинической больнице (г. Москва) в 2015–2016 гг. Диагнозы пациентов были установлены по результатам клинических наблюдений и данных биохимического анализа крови. Пациенты не состояли в родстве. На момент проведения исследования все пациенты были резидентами Московского региона. В этническом отношении исследованная группа больных более чем на 85 % была представлена русскими, около 15 % составили другие национальности, включая выходцев с Южного Кавказа, из Средней Азии, а также Восточной Азии (среди пациентов присутствовал этнический китаец). Исследование соответствовало требованиям Хельсинкской декларации 2003 г., родители дали письменное информированное согласие на участие детей в нем.

В исследовании использована цельная венозная кровь пациентов, из которой с помощью комплекта реагентов «ПРОБА-ГС-ГЕНЕТИКА» («НПО ДНК-Технология», Россия) выделяли геномную ДНК. Полученные образцы ДНК сразу использовали для генотипирования или хранили при -20°C .

Примененная технология ПЦР-генотипирования является модификацией метода примыкающих проб (adjacent probes, kissing probes) [12]. В основе технологии лежит использование двух типов сиквенс-специфичных олигонуклеотидных зондов, гибридизующихся на ДНК-матрицу при низкой температуре в непосредственной близости друг от друга. Один из зондов несет источник флюоресценции, другой — гаситель флюоресценции. Зонд с источником флюоресценции является типизирующим, для повышения надежности генотипирования одновременно используются два варианта типизирующих зондов (соответствующих вариантам полиморфизма), меченных разными флуорофорами. После проведения серии ПЦР — амплификации целевой последовательности ДНК — температура реакционной смеси понижается, в результате зонды гибридизуются на матрице. Генотипирование осуществляется при температурной денатурации дуплексов олигонуклеотидных зондов и фрагментов ДНК путем измерения уровня флуоресценции в режиме «реального времени». На рисунке представлены кривые, характерные для

определенных генотипов (подробно технология описана в работе Сергеева и соавт. [13])

Для проведения исследования были использованы ранее апробированные праймеры и зонды для определения 16 мутаций гена *PAH*: p.R408W, p.R261Q, p.R158Q, IVS10nt546\с.1066-11G>A, IVS12+1G>A, p.Y414C, IVS4+5G>T, p.R252W, p.L48S, p.R261Ter, p.P281L, p.G188D, p.E280K, p.F331S, p.P279L, IVS2+5G>C. В перечень выявляемых мутаций вошли 8 вариантов, наиболее распространенных в России и рекомендованных к диагностированию [1]. ПЦР и определение температуры плавления олигонуклеотидных зондов проводили с помощью детектирующего амплификатора DTprime («НПО ДНК-Технология», Россия) по описанной ранее методике [10]. Продолжительность исследования составила 1,5 ч.

Образцы ДНК пациентов с неустановленным в результате поиска частых мутаций вариантом генотипа были исследованы методом таргетного высокопроизводительного секвенирования по технологии Ion Torrent (Thermo Fisher Scientific, США). Панель целевых участков гена *PAH* покрывала области экзонов (покрытие кодирующей последовательности гена составило 100 %), экзон-интронные границы, частично нетранслируемые регуляторные области гена. Суммарная длина исследуемых участков гена *PAH* составила 3 337 п. н. Целевые фрагменты гена амплифицировали в условии мультиплексной ПЦР. Для проведения реакции амплификации использовали не менее 10 нг геномной ДНК. Лигирование адаптеров к продуктам амплификации проводили с использованием T4 ДНК лигазы (Thermo Fisher Scientific, США) в соответствии с рекомендациями производителя. Контроль качества приготовления библиотек фрагментов ДНК для NGS-секвенирования осуществляли с помощью системы Agilent 2100 Bioanalyzer и набора Agilent High Sensitivity DNA Kit (Agilent Technologies, США). Секвенирование выполняли на приборе для проведения высокопроизводительного секвенирования Ion PGM System for Next-Generation Sequencing (Thermo Fisher Scientific) с использованием набора Ion PGM Template OT2 400 Kit того же производителя.

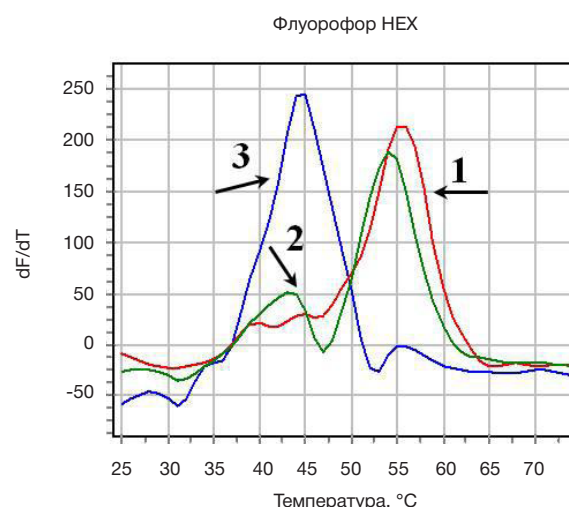
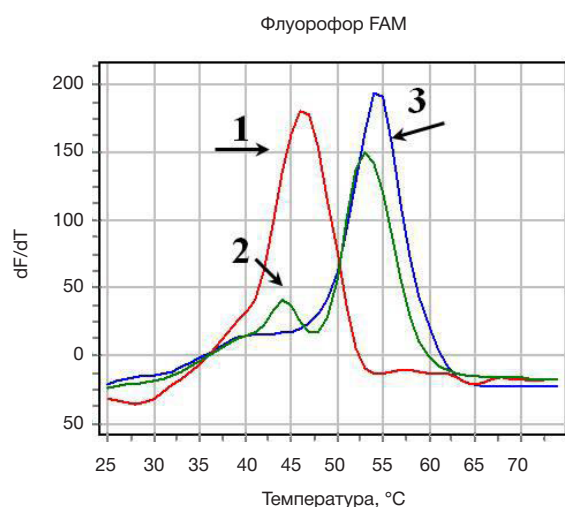
Первичный анализ данных осуществляли с помощью программного обеспечения Torrent Server 4.4.3. Выравнивание на референсный геном версии GRCh37/hg19 проводили с помощью программного модуля TMAP, для идентификации генетических вариантов был использован

программный модуль Torrent Variant Caller 4.4. (Все перечисленное программное обеспечение произведено Thermo Fisher Scientific) Последующий анализ проводили с помощью программных модулей, разработанных авторами. Среднее покрытие целевых фрагментов составило 7 300 прочтений, минимальное покрытие — 590, среднее количество прочтений на образец составило 95 500. Интерпретация патогенности генетических вариантов основана на анализе информации баз dbSNP Build 147, PAHvdb, BIOPKUdb [14] и данных литературы. В качестве подтверждающего метода проводили выборочное секвенирование ДНК по Сэнгеру на автоматическом секвенаторе ABI PRISM 310 Genetic Analyzer (Applied Biosystems, США), использовали реактивы и рекомендации производителя. Во всех случаях были получены идентичные результаты генотипирования.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

На первом этапе исследования генотипирование пациентов проводили методом поиска частых мутаций в гене *PAH* с применением технологии real-time PCR. Из 16 вариантов, определяемых методом ПЦР-генотипирования, были выявлены 13: p.R408W, p.R261Q, p.R158Q, p.L48S, p.G188D, p.Y414C, p.R252W, IVS4+5G>T, p.R261Ter, IVS10nt546/\с.1066-11G>A, p.E280K, IVS12+1G>A, p.P281L (табл. 1). В 70,4 % случаев были идентифицированы мутации, затрагивающие оба аллеля гена *PAH*, у 25,4 % пациентов обнаружена мутация в одном из двух аллелей, в 4,2 % случаев патогенных мутаций обнаружено не было.

Для 21 одного случая с неустановленными изменениями в двух аллелях гена было выполнено исследование клинически значимых участков последовательности гена *PAH* методом высокопроизводительного секвенирования. В результате проведения секвенирования список патогенных вариантов гена *PAH* выборки был существенно расширен. Дополнительно обнаружены следующие варианты: p.D222Terfs, p.R111Ter, IVS11+1G>C, p.F161S, p.E390G, p.A300S, p.F55L, p.F55Leufs, p.R176Ter, p.L311P, p.R270K, IVS1+5G>T, IVS8-7A>G (табл. 1). Данные мутации описаны в мировой литературе, входят в реестр патогенных вариантов международной базы данных PAHvdb. Результаты исследования были подтверждены методом прямого секвенирования по Сэнгеру.



Кривые плавления для разных вариантов генотипа, полученные при определении мутации p.R408W\с.1222C>T. Кривые: 1 — гомозигота по мутации p.R408W\с.1222C>T; 2 — гетерозигота по мутации p.R408W\с.1222C>T, заметны характерные двойные пики на кривых плавления; 3 — гомозигота дикого типа

С помощью комбинированного подхода при проведении генетической диагностики *PAH* у 66 пациентов (93 % случаев) были выявлены 2 патогенные мутации, у 4 (5,6 %) пациентов — 1 мутация, у 1 (1,4 %) пациента мутаций не обнаружено.

Результаты по частотам встречаемости 26 патогенных вариантов выборки представлены в табл. 1. Мутации p.R408W и p.R261Q зарегистрированы с наибольшими частотами (соответственно выявлены у 54 и 12 пациентов в гомо- или гетерозиготном состоянии). Сравнительно частыми вариантами были IVS10nt546\c.1066-11G>A, IVS12+1G>A, p.R158Q, индивидуальные частоты встречаемости аллелей которых составили от 4,2 до 3,5 %, при этом данные мутации отмечены только в гетерозиготном состоянии. Половина патогенных вариантов, выявленных в исследованной выборке, зарегистрирована с суммарной частотой встречаемости менее 10 %. По итогам исследования описано 34 варианта генотипа гена *PAH*, у 21 пациента в одном или двух аллелях этого гена обнаружены мутации, при которых фермент ФАГ сохраняет более 10 % остаточной активности (табл. 2).

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Частота встречаемости наиболее распространенной в России мутации p.R408W в исследованной нами выборке

больных ФКУ составила 47,9 %. Данный показатель близок к среднему значению по регионам [9], существенно ниже значений для Ростовской [15], Кемеровской [11], Новосибирской [3] областей и Дальнего Востока [7, 9] России. Мутация p.R261Q, вторая по встречаемости в выборке (9,9 %), входит список наиболее распространенных на территории России [1, 3, 6–8, 15], является преобладающей в Карачаево-Черкесской Республике [16]. Оба варианта распространены в Европе, мутация p.R408W более характерна для стран Восточной Европы, мутация p.R261Q — одна из наиболее частых в странах Южной Европы, распространена в Нидерландах и Швейцарии [5]. В отличие от p.R408W мутация p.R261Q относится к числу «мягких» мутаций гена *PAH*.

Сравнительно часто в генотипах были выявлены распространенные в России мутации IVS10nt546, IVS12+1G>A, p.R158Q, p.Y414C, IVS4+5G>T, p.L48S, p.R252W (индивидуальные частоты встречаемости аллелей составили от 4,2 до 2,1 %). Мутация p.P281L была идентифицирована в гетерозиготном состоянии у 1 пациента выборки русского происхождения. В некоторых регионах России мутация p.P281L является одной из наиболее частых [3, 15, 17].

Мутации p.D222Terfs, p.R111Ter были выявлены в 3 генотипах каждая (частота аллелей составила 2,1 %) в состоянии компаунда с другими мутациями. Генетический вариант p.D222Terfs представляет собой делецию двух

Таблица 1. Спектр и частоты встречаемости патогенных вариантов (мутаций) гена *PAH* среди пациентов Морозовской ДГКБ, n = 71

Патогенная мутация		Локализация мутации	Домен ФАГ	Частота встречаемости, %
<i>PAH</i>	ФАГ			
c.1222C>T	p.R408W	экзон 12	КАТ	47,9
c.782G>A	p.R261Q	экзон 7	КАТ	9,9
c.1066-11G>A	IVS10nt546	интрон 10	–	4,2
c.1315+1G>A	IVS12+1G>A	интрон 12	–	4,2
c.473G>A	p.R158Q	экзон 5	КАТ	3,5
c.1241A>G	p.Y414C	экзон 12	ТЕТ	2,8
c.441+5G>T	IVS4+5G>T	интрон 4	–	2,8
c.143T>C	p.L48S	экзон 2	РЕГ	2,1
c.754C>T	p.R252W	экзон 7	КАТ	2,1
c.664_665delGA	p.D222Terfs	экзон 6	КАТ	2,1
c.331C>T	p.R111Ter	экзон 3	КАТ	2,1
c.781C>T	p.R261Ter	экзон 7	КАТ	1,4
c.1199+1G>C	IVS11+1G>C	интрон 11	–	1,4
c.563G>A	p.G188D	экзон 6	КАТ	0,7
c.838G>A	p.E280K	экзон 7	КАТ	0,7
c.842C>T	p.P281L	экзон 7	КАТ	0,7
c.482T>C	p.F161S	экзон 5	КАТ	0,7
c.1169A>G	p.E390G	экзон 11	КАТ	0,7
c.898G>T	p.A300S	экзон 8	КАТ	0,7
c.165T>G	p.F55L	экзон 2	РЕГ	0,7
c.165delT	p.F55Leufs	экзон 2	РЕГ	0,7
c.526C>T	p.R176Ter	экзон 6	КАТ	0,7
c.932T>C	p.L311P	экзон 7	КАТ	0,7
c.809G>A	p.R270K	экзон 7	КАТ	0,7
c.60+5G>T	IVS1+5G>T	интрон 1	–	0,7
c.913-7A>G	IVS8-7A>G	интрон 8	–	0,7
Неустановленный вариант	–	–	–	4,2

Примечание. КАТ — каталитический домен ФАГ, РЕГ — регуляторный, ТЕТ — тетрамеризующий.

нуклеотидов GA в 664–665-м положениях, делеция приводит к сдвигу рамки считывания и синтезу более короткого белка. Данную мутацию ранее регистрировали в Европе [18]. Генетический вариант p.R111Ter представляет собой стоп-мутацию, также приводящую к синтезу укороченной молекулы ФАГ. Данная мутация сравнительно редко выявляется в странах Европы [5], но распространена среди больных ФКУ в КНР [19].

Мутации p.R261Ter и IVS11+1G>C представлены в выборке с частотой более 1 %. Мутация p.R261Ter была ранее зарегистрирована в различных регионах РФ [3, 11]. Нарушающая сплайсинг мутация IVS11+1G>C, редкая в РФ, ранее была выявлена у больных ФКУ в Кемеровской [11] и Ростовской [15] областях.

Другие мутации гена *PAH* (12 вариантов) были обнаружены в гетерозиготном состоянии по одному разу. Выявленные в выборке миссенс-мутации p.E280K, p.E390G, p.A300S и стоп-мутация p.R176Ter были ранее зарегистрированы в двух регионах РФ [3, 11]. Миссенс-мутация p.R270K ранее идентифицирована в Татарстане [20]. Мутация p.F161S впервые зарегистрирована в Северном Китае [21], по современным данным, выявляется среди больных ФКУ в КНР сравнительно редко [19]. Варианты p.L311P, p.F55L, p.F55Leufs, IVS1+5G>T, IVS8-7A>G описаны в европейских популяциях [18, 22–25]. Редкий вариант p.G188D ранее зарегистрирован в КНР [26].

Разнообразие вариантов аллелей гена *PAH* в выборке, установленное в результате проведения целевого

Таблица 2. Результаты генотипирования пациентов Морозовской ДГКБ, n = 71

Генотип		Число носителей генотипа	Остаточная активность ФАГ*, %	
аллель 1	аллель 2		мутация 1	мутация 2
p.R408W	p.R408W	14	2	2
p.R158Q	p.R408W	4	10	2
IVS10nt546	p.R408W	3	5	2
IVS12+1G>A	p.R408W	3	0	2
X	p.R408W	3	–	2
p.Y414C	p.R408W	2	57	2
IVS4+5G>T	p.R408W	2	0	2
p.L48S	p.R408W	2	39	2
p.R252W	p.R408W	2	0	2
p.R261Ter	p.R408W	2	0	2
p.R111Ter	p.R408W	2	0	2
p.D222Terfs	p.R408W	1	0	2
p.G188D	p.R408W	1	Нет данных	2
p.E280K	p.R408W	1	2	2
p.F55Leufs	p.R408W	1	0	2
p.L311P	p.R408W	1	1	2
p.R270K	p.R408W	1	11	2
IVS1+5G>T	p.R408W	1	0	2
IVS8-7A>G	p.R408W	1	0	2
p.R261Q	p.R408W	7	44	2
p.R261Q	p.R261Q	2	44	44
IVS10nt546	p.Y414C	1	5	57
IVS10nt546	IVS4+5G>T	1	5	0
IVS10nt546	p.L48S	1	5	39
IVS12+1G>A	p.R111Ter	1	0	0
IVS12+1G>A	p.R158Q	1	0	10
IVS12+1G>A	IVS4+5G>T	1	0	0
IVS11+1G>C	p.F161S	1	0	7
IVS11+1G>C	p.R261Q	1	0	44
p.D222Terfs	p.Y414C	1	0	57
p.D222Terfs	p.R252W	1	0	0
p.R261Q	p.F55L	1	44	Нет данных
p.R261Q	p.R176Ter	1	44	0
p.E390G	p.A300S	1	62	31
p.P281L	X	1	2	–
X	X	1	–	–

Примечание. X — неустановленный патогенный вариант.

* — приводится на основе данных базы BLOPKUdb [14].

секвенирования гена, сопоставимо с данными литературы по Ростовской [15], Новосибирской [3] и Кемеровской [11] областям. Частоты встречаемости аллелей с «тяжелыми» и «мягкими» мутациями составили 73,8 и 20,4 % соответственно. Показатель встречаемости в генотипах пациентов «мягких» мутаций согласуется с данными Гундоровой и соавт. по Москве и Московской области на 2017 г. [9], полученное значение превышает усредненные показатели по регионам.

В исследовании представлен пилотный опыт применения адаптированной технологии real-time PCR определения нуклеотидных замен на основе метода примыкающих проб для выявления частых мутаций гена *PAH* в выборке больных ФКУ Московского региона. Метод не представляет сложности в использовании (все реакции и регистрация флуоресцентного сигнала выполняются на одном приборе отечественного производства), позволяет одновременно осуществлять диагностирование образца на наличие широкого ряда генетических вариантов за сравнительно короткие сроки. Технология перспективна для проведения как научных исследований, так и для внедрения в практику рутинного медицинского диагностирования. По итогам исследования выборки диагностическая эффективность метода в отношении выявления носительства патогенного аллеля превысила 80 %. Список определяемых мутаций в гене *PAH*, включивший 16 вариантов, не окончательный, преимуществом технологии является возможность оперативного введения новых вариантов в состав диагностической панели.

Мутации с низкой частотой встречаемости в популяции не диагностируются методами выборочной генодиагностики. Спектр редких вариантов в конкретной популяции может быть достаточно широким, на сегодняшний день в гене *PAH* описано более 800 вариантов, при этом только несколько из них выявляются с частотой более 1 %. Применение целевого высокопроизводительного секвенирования при исследовании выборки позволило дополнительно идентифицировать 12,6 % патогенных аллелей. Были выявлены не описанные в России на момент проведения исследования мутации: p.D222Terfs, p.R111Ter, p.F161S, p.G188D, p.L311P, p.F55L, p.F55Leufs, IVS1+5G>T, IVS8-

7A>G. Отметим, что варианты p.D222Terfs и p.R111Ter являются потенциальными кандидатами на включение в состав панели ПЦР-скрининга для проведения генотипирования в Московском регионе (мутации обнаружены у 3 разных пациентов русской национальности). В 7 % случаев нам не удалось обнаружить патогенные изменения в обоих аллелях гена *PAH*. Эти случаи требуют дополнительных генетических тестов, прежде всего, более глубокого исследования гена *PAH*, а также проведения диагностики с *PAH*-независимыми формами ФКУ, на долю которых приходится до 2–3 % случаев заболевания [1, 4].

ВЫВОДЫ

В результате исследования выборки неродственных больных с фенилкетонурией, наблюдавшихся в Морозовской ДГКБ (г. Москва) в 2015–2016 гг., выявлено широкое разнообразие патогенных мутаций, а также вариантов генотипов по гену *PAH*. Применение ПЦР для определения нуклеотидных замен в гене *PAH* в рамках исследования на 16 типах мутаций гена позволило идентифицировать 83 % патогенных аллелей в выборке. Технологический потенциал метода real-time PCR делает возможным его применение в практике для рутинного диагностирования частых мутаций в гене *PAH* у больных ФКУ и выявления носительства патогенных мутаций. Мутация p.R408W представляет мажорный вариант, полученное значение аллельной частоты по данной мутации соответствует современным данным для Москвы и Московской области. Выявленный спектр частых мутаций выборки совпадает с данными по России. Процент аллелей с «мягкими» мутациями в выборке больных ФКУ превышает средние значения по России. Мутации p.D222Terfs и p.R111Ter, выявленные в нескольких независимых случаях, являются потенциальными кандидатами на включение в состав панели тестов ПЦР-скрининга при проведении генотипирования в Московском регионе. В результате использования метода целевого высокопроизводительного секвенирования выявлен ряд не описанных ранее для региона мутаций различного функционального типа: p.D222Terfs, p.R111Ter, p.F161S, p.G188D, p.R270K, p.L311P, p.F55L, p.F55Leufs, IVS1+5G>T, IVS8-7A>G.

Литература

1. Клинические рекомендации по диагностике и лечению фенилкетонурии и нарушений обмена тетрагидробиоптерина. М.: Академиздат; 2014. 70 с.
2. Бушуева Т. В. Современный взгляд на проблему фенилкетонурии у детей: диагностика, клиника, лечение. *Вопр. соврем. педиатр.* 2010; 9 (1): 157–60.
3. Baturina OA, Tupikin AE, Lukjanova TV, Sosnitskaya SV, Morozov IV. *PAH* and QDPR Deficiency Associated Mutations in the Novosibirsk Region of the Russian Federation: Correlation of Mutation Type with Disease Manifestation and Severity. *J Med Biochem.* 2014; 33 (4): 333–40.
4. Blau N, Shen N, Carducci C. Molecular genetics and diagnosis of phenylketonuria: state of the art. *Expert Rev Mol Diagn.* 2014 Jul; 14 (6): 655–71.
5. Zschocke J. Phenylketonuria mutations in Europe. *Hum Mutat.* 2003 Apr; 21 (4): 345–56.
6. Амелина М. А., Зинченко Р. А., Степанова А. А., Гундорова П., Поляков А. В., Амелина С. С. Изучение взаимосвязи генотипов (*PAH*) и фенотипов у больных фенилкетонурией Ростовской области. *Мед. ген.* 2016; 15 (6): 3–10.
7. Касимов Д. А., Сикора Н. В., Чешева Н. Н. Результаты исследования детей на фенилкетонурию в Хабаровском крае. *Здравоохранение Дальнего Востока.* 2014; 3 (61): 26–8.
8. Аничкина А. А., Гаврилюк А. П., Тверская С. М., Поляков А. В. Анализ наиболее часто встречающихся мутаций в гене фенилаланингидроксилазы у больных фенилкетонурией. *Мед. ген.* 2003; 2 (4): 175–81.
9. Гундорова П., Степанова А. А., Бушуева Т. В., Беляшова Е. Ю., Зинченко Р. А., Амелина С. С. и др. Генотипирование больных фенилкетонурией из различных регионов Российской Федерации с целью определения чувствительности к препаратам ВН4. *Генетика.* 2017; 53 (6): 732–9.
10. Абрамов Д. Д., Кадочникова В. В., Якимова Е. Г., Белоусова М. В., Маерле А. В., Сергеев И. В. и др. Высокая частота носительства в российской популяции мутаций гена *CFTF*, ассоциированных с муковисцидозом, и мутаций гена *PAH*, ассоциированных с фенилкетонурией. *Вестн. РГМУ.* 2015; (4): 32–5.
11. Батурина О. А., Бондарь А. А., Тупикин А. Е., Жабин С. Г., Морозов И. В. Анализ мутаций гена фенилаланингидроксилазы

- у больных фенилкетонурией Кемеровской области и Республики Саха. Цитол. и ген. 2012; 46 (4): 40–7.
12. Кофиади И. А., Ребриков Д. В. Методы детекции однонуклеотидных полиморфизмов: аллель-специфичная ПЦР и гибридизация с олигонуклеотидной пробой. Генетика. 2006; 42 (1): 22–32.
 13. Сергеев И. В., Хайтов М. Р., Трофимов Д. Ю., Абрамов Д. Д., Груданова Е. Г., Гончарова Е. В. и др. Разработка методов для проведения широкомасштабных исследований полиморфизма генов, регулирующих различные компоненты иммунного ответа. Физиол. и патол. иммун. системы. 2009; 13 (4): 21–6.
 14. Blau N, Yue W, Perez B, database managers. PAHvdb: Phenylalanine Hydroxylase Gene Locus-Specific Database [Интернет]. [Дата обращения: 14 августа 2017 г.]. Доступно по: <http://www.biopku.org/pah/home.asp>
 15. Амелина М. А., Степанова А. А., Поляков А. В., Амелина С. С., Зинченко Р. А. Спектр и частота встречаемости мутаций в гене PAH у больных фенилкетонурией Ростовской области. Мед. ген. 2015; 14 (8): 30–6.
 16. Гундорова П., Степанова А. А., Макаов А. Х., Зинченко Р. А., Абайханова З. М., Поляков А. В. Особенности спектра мутаций в гене PAH у больных фенилкетонурией из Карачаево-Черкесской Республики. Генетика. 2016; 52 (12): 1448–57.
 17. Зинченко Л. В., Матулевич С. А., Кучер А. Н. Территориальная распространенность и этническое разнообразие мутаций гена фенилаланин-гидроксилазы в Краснодарском крае. Кубанск. науч. мед. вестн. 2006; (3–4): 39–42.
 18. Guldberg P, Henriksen KF, Güttler F. Molecular analysis of phenylketonuria in Denmark: 99 % of the mutations detected by denaturing gradient gel electrophoresis. Genomics. 1993 Jul; 17 (1): 141–6.
 19. Liu N, Kong XD, Zhao DH, Wu QH, Li XL, Guo HF, et al. Prenatal diagnosis of Chinese families with phenylketonuria. Genet Mol Res. 2015 Nov 19; 14 (4): 14615–28.
 20. Kuzmin AI, Eisensmith RC, Goltsov AA, Sergeeva NA, Schwartz EI, Woo SL. Complete spectrum of PAH mutations in Tataria: presence of Slavic, Turkic and Scandinavian mutations. Eur J Hum Genet. 1995; 3 (4): 246–55.
 21. Li J, Eisensmith RC, Wang T, Lo WH, Huang SZ, Zeng YT, et al. Identification of three novel missense PKU mutations among Chinese. Genomics. 1992 Jul; 13 (3): 894–5.
 22. Zekanowski C, Cabalska B, Borsuk P, Bal J. Mutations of the phenylalanine hydroxylase gene in mild hyperphenylalaninemia: a novel mutation in exon 3. Hum Mutat. 1997; 10 (3): 258–9.
 23. Eigel A, Dworniczak B, Kalaydjieva L, Horst J. A frameshift mutation in exon 2 of the phenylalanine hydroxylase gene linked to RFLP haplotype 1. Hum Genet. 1991 Oct; 87 (6): 739–41.
 24. Lichter-Konecki U, Konecki DS, DiLella AG, Brayton K, Marvit J, Hahn TM, et al. Phenylalanine hydroxylase deficiency caused by a single base substitution in an exon of the human phenylalanine hydroxylase gene. Biochemistry. 1988 Apr 19; 27 (8): 2881–5.
 25. Pérez B, Desviat LR, Ugarte M. Analysis of the phenylalanine hydroxylase gene in the Spanish population: mutation profile and association with intragenic polymorphic markers. Am J Hum Genet. 1997 Jan; 60 (1): 95–102.
 26. Song F, Qu YJ, Yang YL, Jin YW, Zhang YM, Wang H, et al. [The mutant spectrum of phenylalanine hydroxylase gene in Northern Chinese]. Zhonghua Yi Xue Yi Chuan Xue Za Zhi. 2007 Jun; 24 (3): 241–6. Chinese.

References

1. Klinicheskie rekomendatsii po diagnostike i lecheniyu fenilketonurii i narusheniy obmena tetragidriopterina. Moscow: Akademizdat; 2014. 70 p. Russian.
2. Bushuyeva TV. [Phenylketonuria in children: diagnostics, clinic, treatment]. Voprosy sovremennoy pediatrii. 2010; 9 (1): 157–60. Russian.
3. Baturina OA, Tupikin AE, Lukjanova TV, Sosnitskaya SV, Morozov IV. PAH and QDPR Deficiency Associated Mutations in the Novosibirsk Region of the Russian Federation: Correlation of Mutation Type with Disease Manifestation and Severity. J Med Biochem. 2014; 33 (4): 333–40.
4. Blau N, Shen N, Carducci C. Molecular genetics and diagnosis of phenylketonuria: state of the art. Expert Rev Mol Diagn. 2014 Jul; 14 (6): 655–71.
5. Zschocke J. Phenylketonuria mutations in Europe. Hum Mutat. 2003 Apr; 21 (4): 345–56.
6. Amelina MA, Zinchenko RA, Stepanova AA, Gundorova P, Polyakov AV, Amelina SS. [Examine the relationship genotypes (PAH) and phenotype in patients with phenylketonuria Rostov region]. Meditsinskaya genetika. 2016; 15 (6): 3–10. Russian.
7. Kasimov DA, Sikora NV, Checheva NN. [Incidence and structure of phenylketonuria in children of Khabarovsk territory]. Zdravookhraneniye Dal'nego Vostoka. 2014; 3 (61): 26–8. Russian.
8. Anichkina AA, Gavriluc AP, Tverskaya SM, Polyakov AV. [Analysis of most prevalent mutations of PAH gene in phenylketonuria patients]. Meditsinskaya genetika. 2003; 2 (4): 175–81. Russian.
9. Gundorova P, Stepanova AA, Bushueva TV, Belyashova EYu, Zinchenko RA, Amelina SS, et al. Genotyping of Patients with Phenylketonuria from Different Regions of Russia for Determining BH4 Responsiveness. Russ J Genet. 2017; 53 (6): 712–8.
10. Abramov DD, Kadochnikova VV, Yakimova EG, Belousova MV, Maerle AV, Sergeev IV, et al. [High carrier frequency of CFTR gene mutations associated with cystic fibrosis, and PAH gene mutations associated with phenylketonuria in Russian population]. Bulletin of RSMU. 2015; (4): 32–5. Russian.
11. Baturina OA, Bondar AA, Tupikin AE, Zhabin SG, Morozov IV. Analysis of phenylalanine hydroxylase gene mutations in phenylketonuria patients from Kemerovo oblast and the Sakha Republic. Cytol Genet. 2012 Jul; 46 (4): 227–32. DOI: 10.3103/S0095452712040032.
12. Kofiadi IA, Rebrikov DV. Methods for detecting single nucleotide polymorphisms: Allele-specific PCR and hybridization with oligonucleotide probe. Russ J Genet. 2006 Jan; 42 (1): 16–26.
13. Sergeev IV, Khaitov MR, Trofimov DYU, Abramov DD, Grudakova EG, Goncharova EV, et al. Razrabotka metodov dlya provedeniya shirokomasshtabnykh issledovaniy polimorfizma genov, reguliruyushchikh razlichnye komponenty immunnogo otveta. Fiziologiya i patologiya immunnogo sistema. 2009; 13 (4): 21–6. Russian.
14. Blau N, Yue W, Perez B, database managers. PAHvdb: Phenylalanine Hydroxylase Gene Locus-Specific Database [Internet]. [cited 2017 Aug 14]. Available from: <http://www.biopku.org/pah/home.asp>
15. Amelina MA, Stepanova AA, Polyakov AV, Amelina SS, Zinchenko RA. [Spectrum and frequency of mutations in PAH gene in patients with phenylketonuria from Rostov region]. Meditsinskaya genetika. 2015; 14 (8): 30–6. Russian.
16. Gundorova P, Stepanova AA, Makaov AKh, Zinchenko RA, Abaykhanova ZM, Polyakov AV. Mutation spectrum of the PAH gene in phenylketonuria patients in the Karachay-Cherkess Republic (Russia). Russ J Genet. 2016; 52 (12): 1282–90.
17. Zinchenko LN, Matulevich SA, Kucher AN. [Territorial and ethnic specificity of mutations in a gene phenylalanine-hydroxylase in Krasnodar territory]. Kubanskiy nauchnyy meditsinskiy vestnik. 2006; (3–4): 39–42. Russian.
18. Guldberg P, Henriksen KF, Güttler F. Molecular analysis of phenylketonuria in Denmark: 99 % of the mutations detected by denaturing gradient gel electrophoresis. Genomics. 1993 Jul; 17 (1): 141–6.
19. Liu N, Kong XD, Zhao DH, Wu QH, Li XL, Guo HF, et al. Prenatal

- diagnosis of Chinese families with phenylketonuria. *Genet Mol Res.* 2015 Nov 19; 14 (4): 14615–28.
20. Kuzmin AI, Eisensmith RC, Goltsov AA, Sergeeva NA, Schwartz EI, Woo SL. Complete spectrum of PAH mutations in Tataria: presence of Slavic, Turkic and Scandinavian mutations. *Eur J Hum Genet.* 1995; 3 (4): 246–55.
 21. Li J, Eisensmith RC, Wang T, Lo WH, Huang SZ, Zeng YT, et al. Identification of three novel missense PKU mutations among Chinese. *Genomics.* 1992 Jul; 13 (3): 894–5.
 22. Zekanowski C, Cabalska B, Borsuk P, Bal J. Mutations of the phenylalanine hydroxylase gene in mild hyperphenylalaninemia: a novel mutation in exon 3. *Hum Mutat.* 1997; 10 (3): 258–9.
 23. Eigel A, Dworniczak B, Kalaydjieva L, Horst J. A frameshift mutation in exon 2 of the phenylalanine hydroxylase gene linked to RFLP haplotype 1. *Hum Genet.* 1991 Oct; 87 (6): 739–41.
 24. Lichter-Konecki U, Konecki DS, DiLella AG, Brayton K, Marvit J, Hahn TM, et al. Phenylalanine hydroxylase deficiency caused by a single base substitution in an exon of the human phenylalanine hydroxylase gene. *Biochemistry.* 1988 Apr 19; 27 (8): 2881–5.
 25. Pérez B, Desviat LR, Ugarte M. Analysis of the phenylalanine hydroxylase gene in the Spanish population: mutation profile and association with intragenic polymorphic markers. *Am J Hum Genet.* 1997 Jan; 60 (1): 95–102.
 26. Song F, Qu YJ, Yang YL, Jin YW, Zhang YM, Wang H, et al. [The mutant spectrum of phenylalanine hydroxylase gene in Northern Chinese]. *Zhonghua Yi Xue Yi Chuan Xue Za Zhi.* 2007 Jun; 24 (3): 241–6. Chinese.

АССОЦИАЦИЯ ПОЛИМОРФНЫХ ВАРИАНТОВ ГЕНОВ *ACE* И *BDKRB2* С ПАРАМЕТРАМИ ВАРИАБЕЛЬНОСТИ СЕРДЕЧНОГО РИТМА У СПОРТСМЕНОВ РЕСПУБЛИКИ КАРЕЛИИ

С. Н. Коломейчук¹✉, Р. В. Алексеев², А. А. Путилов³, А. Ю. Мейгал²

¹Лаборатория генетики, Институт биологии, Карельский научный центр РАН, Петрозаводск

²Кафедра физиологии человека и животных, патофизиологии, гистологии, медицинский институт, Петрозаводский государственный университет, Петрозаводск

³Группа математического моделирования биомедицинских систем, Научно-исследовательский институт молекулярной биологии и биофизики, Новосибирск

Целью настоящего исследования было изучение распределения частоты аллелей гена ангиотензинпревращающего фермента *ACE* и рецептора β_2 брадикинина у спортсменов различной спортивной специализации, а также выявление взаимосвязи генотипа с параметрами вариабельности сердечного ритма. Методом ПЦР в группе атлетов ($n = 75$, мужчины) исследован полиморфизм генов *ACE* I/D и *BDKRB2* +9/-9. Показано достоверное отличие между группами спортсменов по частоте генотипа -9/-9 гена *BDKRB2*. Уровень парасимпатической активности преобладает у носителей аллеля I гена *ACE*. В группе спортсменов с генотипом D/D регистрируются низкие значения временных параметров вариабельности сердечного ритма. Согласно полученным данным, временные параметры ритма сердца спортсменов с генотипом *ACE* I/I отличаются от значений групп *ACE* I/D и *ACE* D/D. У гомозигот по аллелю -9 гена *BDKRB2* отмечены самые низкие значения ЧСС, что указывает на усиление парасимпатических влияний в системе регуляции сердечного ритма. Аллель -9 гена *BDKRB2* ассоциирован с минимальной продолжительностью последовательных сокращений сердца. Полиморфные локусы *ACE* I/D и *BDKRB2* +9/-9 можно рассматривать как контрольные показатели процесса регуляции параметров сердечной деятельности при проведении первичного отбора спортсменов в Республике Карелии.

Ключевые слова: тренировочный процесс, спортивная специализация, вариабельность сердечного ритма, генетический полиморфизм, *ACE*, *BDKRB2*

Финансирование: исследование было поддержано Фондом содействия развитию малых форм предприятий в научно-технической сфере (программа «УМНИК») и бюджетной темой № 0221-2014-0034.

Благодарности: авторы благодарят к. б. н. Федоренко Ольгу Михайловну из Института биологии Карельского научного центра РАН за ценные замечания.

✉ **Для корреспонденции:** Коломейчук Сергей Николаевич
ул. Невского, д. 50, г. Петрозаводск, 185910; sergey_kolomeychuk@rambler.ru

Статья получена: 25.08.2017 **Статья принята к печати:** 29.08.2017

ASSOCIATION OF POLYMORPHIC VARIANTS OF *ACE* AND *BDKRB2* WITH HEART RATE VARIABILITY IN ATHLETES OF THE REPUBLIC OF KARELIA

Kolomeichuk SN¹✉, Alekseev RV², Putilov AA³, Meigal AY²

¹Laboratory of Genetics, Institute of Biology, KarRC RAS, Petrozavodsk, Russia

²Department of Human and Animal Physiology, Pathophysiology and Histology, Medical Institute, Petrozavodsk State University, Petrozavodsk, Russia

³Research Group for Math-Modeling of Biomedical Systems, Research Institute for Molecular Biology and Biophysics, Novosibirsk, Russia

This work aims to study distribution of allele frequencies of the *ACE* and *BDKRB2* genes coding for the angiotensin-converting enzyme and the bradykinin receptor β_2 , respectively, in athletes specializing in different sports and to establish the associations between the studied genotypes and heart rate variability. The study included 75 male athletes. Polymorphisms of *ACE* and *BDKRB2* (I/D and +9/-9, respectively) were studied by PCR. A significant difference was revealed in the -9/-9 genotype frequency between the studied groups of athletes. Parasympathetic nerve activity prevailed in the athletes with the I allele of the *ACE* gene. Time-domain parameters of heart rate variability had low values in the carriers of the D/D genotype. In the athletes with the *ACE* I/I genotype the time-domain parameters differed from those typical for the I/D and D/D genotype carriers. Participants homozygous for -9 *BDKRB2* had the lowest heart rate in the studied sample, implying an increased contribution of parasympathetic activity to heart rate regulation. The -9 allele of *BDKRB2* was found to be associated with the minimal $R - R$ interval between consecutive heart beats. We conclude that polymorphisms I/D of *ACE* and +9/-9 of *BDKRB2* can indicate individual patterns of heart rate regulation in athletes from the Republic of Karelia.

Keywords: training, sport specialization, heart rate variability, genetic polymorphism, *ACE*, *BDKRB2*

Funding: this work was supported by the Russian Foundation for Assistance to Small Innovative Enterprises (the *Umnik* program) and the state-funded Project No. 0221-2014-0034.

Acknowledgements: the authors thank Olga Fedorenko, CSc, of the Institute of Biology, KarRC RAS, for her valuable comments.

✉ **Correspondence should be addressed:** Sergey Kolomeichuk
ul. Nevskogo, d. 50, Petrozavodsk, Russia, 185910; sergey_kolomeychuk@rambler.ru

Received: 25.08.2017 **Accepted:** 29.08.2017

Современный уровень развития спорта с учетом его резкого «омоложения» требует поддержания высокой соревновательной формы спортсмена в течение длительного времени подготовки [1]. Своевременный отбор, рациональная организация тренировочного и соревновательного режимов, учет индивидуальных особенностей и функциональных возможностей организма занимающихся спортом обычно не приводят к снижению работоспособности и развитию предпатологических и патологических изменений. Если же требования, предъявляемые к организму спортсмена, превышают текущий уровень развития его функциональных возможностей, и если нагрузки имеют выраженный форсированный характер, то вегетативные системы могут ответить на них развитием патологических отклонений.

Сердечно-сосудистую систему многие исследователи рассматривают в качестве индикатора индивидуальных приспособительных возможностей организма [1, 2]. В связи с этим исследованию состояния системы кровообращения спортсменов уделяется особое внимание. Постоянный контроль функционирования системы кровообращения позволяет не только оптимизировать тренировочный процесс и оценить переносимость нагрузок различного характера, но и предвидеть в ней структурно-морфологические и функциональные изменения. Согласно данным литературных источников, основной причиной внезапной смерти спортсменов являются отклонения в работе системы кровообращения [2–5]. В настоящее время большой прогностический вес имеют генетические методы исследования. Обнаружение генетических маркеров, значимых для функционирования кровеносной и мышечной систем, обуславливает поиск их корреляционных связей с различными фенотипами (данными антропометрии, результатами тестирования при нагрузках, кардиоинтервалометрии и т. д.) [6, 7].

Спортивная геномика, описывающая организацию и функционирование генома спортсменов, является относительно новой научной дисциплиной [8–11]. Первый генетический маркер, связанный с выносливостью, был идентифицирован в конце 1990-х гг. [12]. Важность полиморфных вариантов генов и их ассоциации с характеристиками атлета широко обсуждаются в спортивной научной литературе [11, 13, 14]. Было предложено несколько методологических подходов, чтобы найти связь между полиморфизмом генов и уровнем спортивных достижений спортсмена. В популяционных исследованиях смотрят ассоциацию с определенным генотипом или аллелем различных показателей фенотипа спортсмена (например, максимального потребления кислорода $\text{VO}_2 \text{ max}$) по сравнению с показателями остальных спортсменов [8, 11]. Другим подходом являются геномные исследования полиморфных маркеров ДНК всего генома, которые могут быть ассоциированы с определенными физическими характеристиками [10, 12]. Изучение ассоциаций с определенными признаками остается наиболее распространенным видом исследований в области спортивной геномики. Они основаны на предположении, что один аллель гена, называемый кандидатом из-за его известной функции, имеет отношение к изучаемому признаку, более или менее распространен в группе элитных спортсменов в сравнении с общей популяцией и, следовательно, повышает производительность [10–12].

Обзор литературы за период с 1997 по 2014 г. показал, что, по крайней мере, 120 генетических маркеров ассоциированы со статусом элитного спортсмена (77 генетических маркеров, связанных с выносливостью, и

43 — связанных с силовыми факторами). Однако только 11 (9 %) этих маркеров показали такую ассоциацию в трех или более исследованиях. К маркерам выносливости, ассоциированным со статусом спортсмена, относят *ACE I*, *ACTN3 577X*, *PPARA rs4253778 G* и *PPARGC1A Gly482*, тогда как к маркерам мощности/силы: *ACE D*, *ACTN3 R577*, *AMPD1 Gln12*, *HIF1A 582Ser*, *MTHFR rs1801131 C*, *NOS3 rs2070744 T* и *PPARG 12A/a* [8].

Целью проведенного исследования было изучение распределения частоты аллелей генов *ACE* и *BDKRB2* у спортсменов различной спортивной специализации, а также поиск связи между вариантами этих генов и параметрами сердечного ритма у спортсменов Республики Карелии, занятых различными видами спорта.

ПАЦИЕНТЫ И МЕТОДЫ

Работа была проведена с октября 2015 г. по май 2016 г. в г. Петрозаводске Республики Карелии. Данное исследование было одобрено комитетом по биоэтике ИБ КарНЦ РАН (протокол № 21/20/187 от 26.02.2015). Каждый испытуемый дал письменное согласие на участие в эксперименте. В исследование были включены 75 спортсменов различных специализаций, имеющих квалификацию от 1-го спортивного разряда до мастера спорта, в возрасте от 18 до 30 лет. Спортсмены в зависимости от преимущественной направленности тренировочного процесса были разделены на 3 группы по специализации тренируемого спортивного качества: «сила» ($n = 25$) (бодибилдинг, пауэрлифтинг, бокс, борьба), «быстрота» ($n = 23$) (легкоатлетический спринт, бег на средние дистанции), «выносливость» ($n = 27$) (лыжный спорт, бег на длинные дистанции). Критерии включения в исследование: стаж занятий спортом более 5 лет, возраст старше 18 лет, мужской пол, отсутствие хронических заболеваний.

Исследования проводили в утренние часы в два этапа. В состоянии покоя у спортсменов изучали характеристики сердечного ритма и функциональное состояние сердечно-сосудистой системы. В качестве данных антропометрии и биоимпедансного анализа были выбраны следующие показатели: рост (см), вес (кг), жировая масса (кг), мышечная масса (кг), количество воды в организме (кг), костная масса (кг), индекс массы тела (ИМТ, отношение массы тела к квадрату роста в м), импеданс. Рост определяли на ростомере, вес и показатели биоимпедансного анализа — на весах Tanita SC-330 S (Tanita, Япония).

На втором этапе исследования у спортсменов изучали характеристики сердечного ритма в покое, а также были взяты образцы крови для проведения генетических исследований. Работа выполнена на образцах ДНК, выделенных из лимфоцитов периферической крови, на оборудовании Центра коллективного пользования ИБ КарНЦ РАН. Геномную ДНК выделяли из 200 мкл венозной крови с помощью набора AxyPrep Blood Genomic DNA Miniprep Kit (Axygen, США) согласно инструкции производителя. Методом полимеразной цепной реакции и анализом полиморфизма длины рестрикционных фрагментов исследован полиморфизм генов *ACE I/D*, *BDKRB2* +9/-9 в группе спортсменов ($n = 75$, мужчины).

Для амплификации фрагментов гена *ACE* (прямой праймер 5'-CTGGAGACCACTCCCATCCTTCT-3, обратный праймер 5'-ATGTGGCCATCACATTCGTACAGAT-3) и гена *BDKRB2* (прямой праймер 5'-TCTGGCTTCTGGGCTCCGAG-3', обратный праймер 5'-AGCGGCATGGGCACTTTCAGT-3)

проводили ПЦР при следующих условиях: предварительная денатурация — 94 °C (7 мин), 30 циклов амплификации — 94 °C (1 мин), 62 °C (1 мин), 72 °C (1 мин 10 с). Заключительный синтез — 72 °C, 5 мин. Размер продукта гена *ACE*: I аллель — 477 п. о. и D аллель — 190 п. о.; гена *BDKRB2*: +9 аллель — 100 п. о. и -9 аллель — 90 п. о. Для проведения ПЦР использовали смесь для амплификации ScreenMix-HS («Евроген», Россия) вместе с геноспецифическими праймерами в конечном объеме 25 мкл. Для амплификации использовали программируемый термоциклер MaxyGene II (Applied Biosystems, США).

После амплификации продукты реакции анализировали электрофорезом в 6,0 % полиакриламидном геле (в случае *BDKRB2* — 8 %) с последующей окраской этидиумбромидом и визуализацией в проходящем УФ на трансиллюминаторе ECH-F20 с длиной волны 312 нм (Vilber Lourmat, Франция). Электрокардиограмму записывали с помощью программно-аппаратного комплекса «Поли-Спектр-8/Е» («Нейрософт», Россия) согласно общепринятой методике. Временные ($R - R \min$, $R - R \max$, RRNN, SDNN, RMSSD, pNN50 и CV) и спектральные (TP, VLF, LF norm и HF norm) параметры variability сердечно-рhythmic (BPC) рассчитывали в среде «Поли-Спектр-Ритм» («Нейрософт», Россия).

Определение достоверности различий популяционных частот производили методом χ^2 по стандартной формуле с помощью программы Microsoft Excel. Межгрупповые различия и влияние факторов на параметры BPC определяли с помощью анализа ANOVA и множественных сравнений (H-тест) (STATGRAPHICS Centurion XVI; Statpoint Technologies Inc., США).

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

В исследовании приняли участие 75 спортсменов. Участники исследования были разделены на 3 группы в зависимости от спортивной специализации. Сравнение групп «Сила» и «Скорость» позволило заключить, что достоверно ($p < 0,05$) выше вес, содержание жировой и мышечной массы, индекс массы тела у спортсменов силовой специализации (табл. 1). У спортсменов-силовиков при переходе

из подготовительного периода к соревновательному этапу отмечается относительно высокое содержание жировой массы, т. к. в этот период рацион питания спортсменов довольно широк.

Большим количеством достоверных различий ($p < 0,05$) характеризуется сравнение показателей группы «Сила» и «Выносливость». Недостоверными оказались только различия по росту атлетов и костной массе. Достоверность различий по весу, уровню жировой и мышечной массы, содержанию воды в организме и, соответственно, индексу массы тела объясняется резким расхождением фенотипов, характерных для спортсменов указанных специализаций. Для спортсменов, тренирующих силовые качества, часто характерен гиперстенический тип телосложения, т. е. преобладание поперечных размеров тела над продольными. Для атлетов, тренирующих преимущественно качество выносливости, характерен астенический тип телосложения с выраженным преобладанием продольных размеров тела над поперечными.

Согласно полученным данным, временные показатели сердечного ритма спортсменов группы «Выносливость» заметно отличаются от значений групп «Сила» и «Быстрота» (табл. 2).

Согласно полученным данным наибольшее число достоверных отличий обнаружено между группами «Сила» и «Выносливость» (значения ср. ЧСС, $R - R \min$ и $R - R \max$, RRNN). В этом отношении регуляция сердечного ритма у спортсменов-силовиков и спортсменов-стайеров представляет собой два крайних варианта: регуляция на фоне повышенных симпатических воздействий и регуляция ритма с преобладанием влияний блуждающего нерва на сердце соответственно.

По значениям спектрального анализа можно также судить о степени утомления спортсмена и делать прогнозы динамики функционального состояния в течение подготовительного и соревновательного периода макроцикла (табл. 3).

Согласно средним значениям данных спектрального анализа, суммарная общая мощность спектра (суммарный эффект всех механизмов регуляции) отличается большими значениями в группах «Быстрота» и «Выносливость». Считается, что чем выше значения общей мощности спектра,

Таблица 1. Биоимпедансный анализ состава тела юношей

Специализация	n	Рост, см	Вес, кг	Жировая масса, кг	Мышечная масса, кг	Содержание воды, кг	Костная масса, кг	ИМТ, кг/м ²	Импеданс
Выносливость	27	178,9	72,2*	6,4*	62,6*	46,1*	3,3	22,5*	481,5*
Быстрота	23	178,6	72,9*	6,5*	63,1*	46,6*	3,4	22,8*	475,4*
Сила	25	177,3	85,1	11,6	69,9	51,4	3,7	26,8	447,9

Примечание. * — достоверные различия с соответствующими значениями группы «Сила» ($p < 0,05$).

Таблица 2. Временные показатели variability сердечного ритма спортсменов

Специализация	n	ср. ЧСС	$R - R \min$, мс	$R - R \max$, мс	RRNN, мс	SDNN, мс	RMSSD, мс	pNN50, %	CV, %
Сила	25	66,0	747,8	1124,9	945,6	60,7	59,7	32,8	6,2
Быстрота	23	59,7	836,3*	1226,2	1020,8	70,0	64,9	37,8	6,9
Выносливость	27	57,3*	835,7*	1258,0*	1068,9*	75,6	66,5	39,5	6,9

Примечание. ср. ЧСС — средняя частота сердечных сокращений; $R - R \min$ и $R - R \max$ — минимальная и максимальная продолжительность последовательных $R - R$ интервалов; RRNN — средняя длительность интервалов $R - R$; SDNN — стандартное отклонение величин нормальных интервалов $R - R$; RMSSD — квадратный корень из среднего квадратов разностей величин последовательных пар интервалов NN; pNN50, % — процент последовательных интервалов NN, различие между которыми превышает 50 мс; CV — коэффициент вариации.

* — достоверные различия с соответствующими значениями группы «Сила» ($t_{\text{крит.}} = 2,008$; $p < 0,05$). Определение различий между временными показателями ритма сердца среди групп проводили по непараметрическому U-критерию Манна-Уитни.

тем ниже степень напряжения систем регуляции. В то же время, на этот показатель может влиять величина парасимпатического спектра (HF), зависящая от частоты и глубины дыхания испытуемого при записи.

Достоверных различий между спектральными параметрами ритма сердца в группах спортсменов не установлено (табл. 3).

Несмотря на отсутствие достоверных различий между группами спортсменов, показатели спектрального анализа в целом соответствуют общим закономерностям адаптации к физическим нагрузкам различной направленности. Отмечается тенденция к увеличению общей мощности спектра в группах «Быстрота» и «Выносливость» за счет преобладания симпатических и парасимпатических влияний на ритм соответственно. При этом сохраняется высокая активность гуморально-метаболических воздействий на сердце. Преобладание парасимпатических влияний на главный водитель ритма в группе «Сила», возможно, объясняется началом подготовительного периода спортсменов-силовиков, т. е. низким уровнем общего утомления организма и напряжения регуляторных систем.

Полученные значения частот аллелей для четырех потенциальных маркеров взаимосвязи между генами спортсмена и артериальным давлением согласуются с данными, ранее описанными для популяций других регионов России и ряда европейских стран [8, 10, 11]. Частота встречаемости генотипов полиморфного маркера I/D гена ACE у карельских спортсменов различалась в зависимости от специализации (рис. 1). Так, группы «Сила» и «Скорость» статистически значимо не различались ($\chi^2 = 0,35$; d.f. = 2, $p = 0,72$). Не было выявлено статистически значимых различий и между группами «Сила» и «Выносливость» ($\chi^2 = 1,71$; d.f. = 2, $p = 0,43$). Частота встречаемости ге-

нотипов инсерционно-делеционного полиморфизма гена *BDKRB2* у карельских спортсменов также различалась в зависимости от спортивной специализации (рис. 2). Однако достоверных различий между группами спортсменов не обнаружено.

Средние значения временных показателей variability сердечного ритма групп спортсменов, разделенных по генотипам гена ACE (I/I, I/D, D/D), позволяют судить о различиях в зависимости от носительства I или D аллеля (табл. 4).

Согласно полученным данным, временные параметры ритма сердца спортсменов с генотипом ACE I/I отличаются от значений групп ACE I/D и ACE D/D. Прежде всего, средние значения ЧСС находятся на верхней границе брадикардии (минимальная ЧСС была зарегистрирована на отметке 41 уд/мин у мастера спорта по лыжным гонкам, генотип I/I).

Параметры сердечного ритма носителей генотипа I/D занимают среднее положение между группами I/I и D/D, представляя тем самым промежуточный вариант регуляции работы сердца.

Применение двухфакторного ANOVA-анализа (факторы: спортивная специализация и распределение генотипов I/I, I/D, D/D гена ACE) позволило обнаружить статистически значимое различие по параметру HF между носителями генотипов I/D и D/D ($p < 0,05$). На генеральной выборке спортсменов ($n = 75$) однофакторный анализ ANOVA показал различия временных параметров BPC по степени изменчивости.

Средние значения спектральных показателей variability сердечного ритма групп спортсменов, разделенных по генотипам гена ACE (I/I, I/D, D/D), дают основание говорить о величине симпатических, парасимпатических

Таблица 3. Спектральные показатели variability сердечного ритма спортсменов

Специализация	n	TP, мс ²	VLF, мс ²	LF, мс ²	HF, мс ²	LF norm	HF norm	LF/HF
Сила	25	4167,7	1229,8	1059,4	1878,2	46,3	53,7	1,2
Быстрота	23	5688,4	1737,8	2076,8	1866,9	46,8	53,2	1,2
Выносливость	27	5443,8	2201,2	1460,3	1782,4	44,0	56,1	1,2

Примечание. TP — общая мощность спектра; VLF — колебания очень низкой частоты; LF — низкочастотные колебания; HF — высокочастотные колебания; LF norm и HF norm — нормализованные низкочастотные и высокочастотные колебания соответственно.

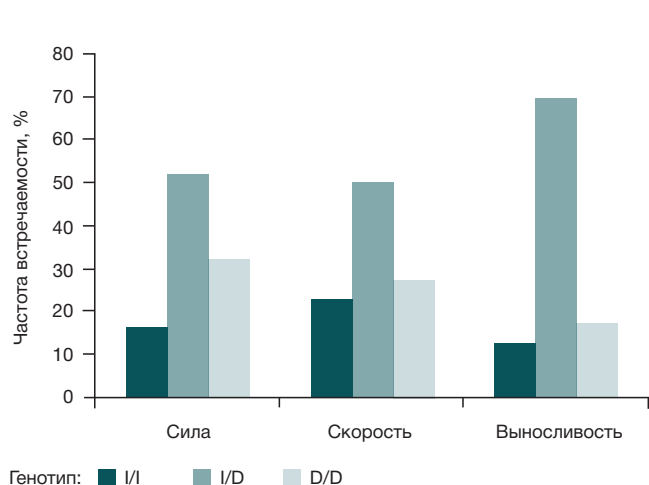


Рис. 1. Распределение частот встречаемости генотипов гена ACE у спортсменов Республики Карелии разной специализации

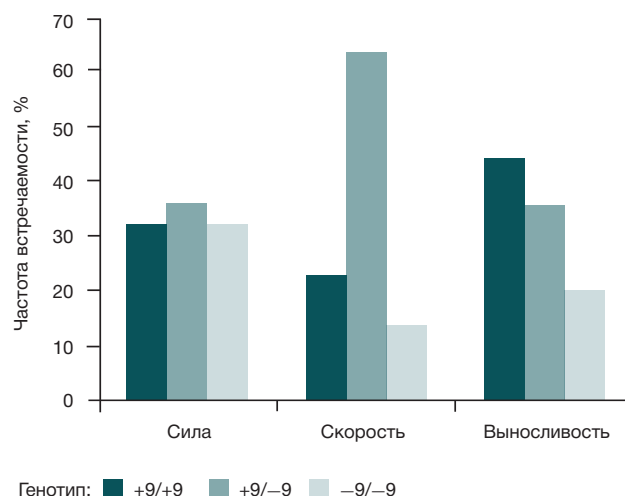


Рис. 2. Распределение частот встречаемости генотипов гена *BDKRB2* у спортсменов Республики Карелии разной специализации

и гуморально-метаболических влияний на ритм сердца в зависимости от носительства I или D аллеля (табл. 5).

В группе спортсменов с D/D генотипом, наоборот, регистрируются низкие значения TP, VLF, LF и HF. Описанные изменения параметров ВРС в группе генотипа D/D согласуются с представлениями о регуляции сердечного ритма в силовых и скоростных видах спорта.

Различия спектральных параметров ВРС по степени изменчивости были выявлены с применением однофакторного ANOVA-анализа.

Согласно полученным данным, статистически значимо различаются значения HF между группами I/I–I/D и I/D–D/D, LF — между группами I/D–D/D, TP — между I/I–I/D и I/D–D/D. Уровень парасимпатической активности преобладает в группах спортсменов, имеющих I аллель. Это согласуется с положениями молекулярной генетики спорта об ассоциации I аллеля с развитием выносливости.

Нами также было показано ранее, что уровень парасимпатической активности выше в группе спортсменов, тренирующих выносливость. Для спортсменов с генотипом D/D характерны относительно низкие значения вагусных влияний и снижение общей мощности спектра. Подобные изменения ритма часто регистрируются у представителей силовых и скоростно-силовых дисциплин.

Таким образом, мы можем заключить, что снижение основных спектральных параметров ВРС (TP, LF, HF) указывает на потенциальную готовность индивида к выполнению нагрузок скоростного или силового характера, а их более высокие значения — к выполнению нагрузок на выносливость.

Средние значения временных показателей variability сердечного ритма групп спортсменов, разделенных по генотипам гена *BDKRB2* (+9/+9, +9/–9, –9/–9), позволяют судить о различиях в зависимости от носительства +9 или –9 аллеля (табл. 6).

Различия временных параметров ВРС по степени изменчивости были выявлены с применением однофакторного ANOVA-анализа. Показана значимость различий по параметру $R - R \min$ между группами *BDKRB2* –9/–9 и *BDKRB2* +9/+9, что указывает на ассоциацию аллеля –9 гена *BDKRB2* с минимальной продолжительностью последовательных сокращений сердца.

Средние значения спектральных показателей variability сердечного ритма групп спортсменов, разделенных по генотипам гена *BDKRB2* (+9/+9, +9/–9, –9/–9), дают основание говорить о величине симпатических, парасимпатических и гуморально-метаболических влияний на ритм сердца в зависимости от носительства +9 или –9 аллеля (табл. 7).

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

В нашем исследовании приняли участие спортсмены различных специализаций, что позволило разделить их на три группы в зависимости от преимущественной направленности тренировочного процесса. По сравнению с другими спортсменами представители группы силовой специализации отличались по морфометрическим характеристикам, что можно объяснить особенностями тренировок.

Таблица 4. Временные показатели variability сердечного ритма спортсменов, разделенных по генотипам гена *ACE*

Генотип гена <i>ACE</i>	n	ср. ЧСС	$R - R \min$, мс	$R - R \max$, мс	RRNN, мс	SDNN, мс	RMSSD, мс	pNN50, %	CV, %
I/I	14	60,0	843,4	1210,7	1028,4	67,1	60,0	34,4	6,4
I/D	40	60,4	800,8	1220,2	1019,5	71,8	69,4	39,2	6,9
D/D	21	62,3	792,0	1158,3	990,6	62,3	54,6*	33,1	6,1*

Примечание. * — достоверные различия с соответствующими значениями группы *ACE* I/I ($p < 0,05$).

Таблица 5. Спектральные показатели variability сердечного ритма спортсменов, разделенных по генотипам гена *ACE*

Генотип гена <i>ACE</i>	n	TP, мс ²	VLF, мс ²	LF, мс ²	HF, мс ²	LF norm	HF norm	LF/HF
I/I	14	4862,7*	1635,8	1719,0	1507,9*	47,2	52,8	1,3
I/D	40	5723,2	1797,7	1668,1	2257,3	43,0	57,0	1,0
D/D	21	3727,9*	1408,1	1104,5*	1207,6*	48,8	51,2	1,3

Примечание. * — достоверные различия с соответствующими значениями группы *ACE* I/D ($p < 0,05$).

Таблица 6. Временные показатели variability сердечного ритма спортсменов, разделенных по генотипам гена *BDKRB2*

Генотип гена <i>BDKRB2</i>	n	ср. ЧСС	$R - R \min$, мс	$R - R \max$, мс	RRNN, мс	SDNN, мс	RMSSD, мс	pNN50, %	CV, %
+9/+9	26	60,6	796,6*	1186,4	1016,8	66,1	61,5	36,43	6,35
+9/–9	32	61,7	794,9*	1213,6	1003,4	70,3	66,25	37,27	6,89
–9/–9	17	59,7	842,9	1199,4	1025,3	67,5	61,6	35,64	6,53

Примечание. * — достоверные различия с соответствующими значениями группы *BDKRB2* –9/–9 ($p < 0,05$).

Таблица 7. Спектральные показатели variability сердечного ритма спортсменов, разделенных по генотипам гена *BDKRB2*

Генотип гена <i>BDKRB2</i>	n	TP, мс ²	VLF, мс ²	LF, мс ²	HF, мс ²	LF norm	HF norm	LF/HF
+9/+9	26	4597,1	1664,3	1242,7*	1690,1	45,2	54,8	1,08
+9/–9	32	5437,3	1602,1	1902,6	1927,4	47,3*	52,7*	1,43*
–9/–9	17	4806,8	1762,6	1192,0	1852,2	41,9	58,2	0,77

Примечание. * — достоверные различия с соответствующими значениями группы *BDKRB2* –9/–9 ($p < 0,05$).

Определенный вид спортивной деятельности накладывает свой отпечаток на организм спортсмена, что проявляется в особенностях его телосложения, пропорций тела, траектории развития основных функциональных систем (сердечно-сосудистой, дыхательной, опорно-двигательного аппарата). При длительных занятиях спортом происходит не только формирование отдельных морфологических признаков и телосложения в целом, но и отбор индивидуумов, обладающих наиболее благоприятными для данного вида спорта морфологическими признаками и физическими качествами [2, 10, 11].

Средние данные временных показателей вариабельности ритма сердца исследуемых групп спортсменов позволяют определить, насколько она велика и какие закономерные изменения проявляются в ходе адаптации сердечной деятельности к нагрузкам специфической направленности. Сердечный ритм спортсменов, тренирующих выносливость, разрежен, что вызвано усилением парасимпатических влияний на водителя ритма первого порядка в ответ на систематические нагрузки умеренной интенсивности. Результатом этого также является увеличение величины минимальной и максимальной продолжительности $R - R$ интервалов. Интервал между последовательными сокращениями сердца у таких спортсменов составляет от 1 до 1,5 с. Такое явление получило название «брадикардия». Как следствие, значения средней продолжительности и стандартного отклонения сердечных интервалов в этой группе тоже выше значений для групп «Быстрота» и «Сила». Показатели RMSSD, pNN50 и CV увеличиваются в связи с усилением тонуса блуждающего нерва и вызванным этим отрицательным хронотропным эффектом [1, 3, 4].

Частота сердечных сокращений у спортсменов группы «Сила» отличается большими по сравнению с другими группами значениями. Принято считать, что при тренировке силовых и скоростно-силовых качеств усиливаются симпатические влияния на сердечный ритм. В связи с этим сердце в состоянии покоя сокращается сравнительно часто, о чем также свидетельствуют меньшие значения минимальной и максимальной продолжительности $R - R$ интервалов. На наш взгляд, усиление симпатических влияний обуславливает и меньшие значения средней продолжительности последовательных сердечных интервалов, их стандартного отклонения, а также RMSSD, pNN50 и CV.

Сравнение показателей спектральных составляющих сердечного ритма спортсменов различных специализаций дает основание говорить о величине вклада симпатических, парасимпатических и гуморально-метаболических влияний на сердечный ритм. Принято считать, что в ходе адаптации к нагрузкам различной направленности повышается активность одних механизмов регуляции и снижается активность других.

Согласно средним спектральным значениям, суммарная общая мощность спектра (суммарный эффект всех механизмов регуляции) была выше в группах «Быстрота» и «Выносливость». Считается, что чем выше значения общей мощности спектра, тем ниже степень напряжения систем регуляции. Кроме того, на этот показатель может влиять мощность парасимпатического компонента спектра, зависящая от частоты и глубины дыхания испытуемого при записи. В группе «Выносливость» было отмечено высокое значение гуморально-метаболического компонента спектра (VLF и VLF%). Обычно сильное влияние мозга на сердечный ритм проявляется в увеличении напряжения механизмов регуляции и указывает на снижение уровня адаптации спортсмена. Вероятно, эта величина в группе

«Выносливость» объясняется относительным утомлением спортсменов в ходе соревновательного сезона. Возможно, что по этой же причине мощность парасимпатического спектра преобладает в группах «Сила» и «Быстрота». С другой стороны, нормализованные значения (без учета в общем спектре волн VLF) симпатического и парасимпатического спектра у спортсменов, тренирующих выносливость, соответствуют общепринятым характеристикам адаптации в этих видах спорта.

Достоверное отличие во временных показателях между группами «Сила» и «Быстрота» выявлено для показателя $R - R \min$. Мы считаем, что это связано с включением в тренировочный и соревновательный процесс спортсменов-спринтеров циклической беговой работы, которая дополнительно вызывает увеличение парасимпатических влияний на сердце. По этой же причине средняя частота сердечных сокращений у спринтеров меньше, чем у силовиков. Однако это отличие было недостоверным. Возможно, для получения достоверных отличий необходимо изучить большую выборку.

Достоверных различий по временным показателям ритма сердца между группами «Быстрота» и «Выносливость» обнаружить не удалось. Вероятно, это связано с тем, что регуляция ритма подвержена схожим адаптационным сдвигам в ответ на физическую нагрузку, поскольку основу тренировочного и соревновательного процесса спортсменов обеих специализаций составляют циклические нагрузки максимальной, субмаксимальной, большой и умеренной интенсивности. Стоит отметить наличие тренда в регуляции сердечного ритма спортсменов-спринтеров: по временным показателям эта группа занимает промежуточное положение между «Силой» и «Выносливостью».

Белок, кодируемый геном *ACE*, является важным компонентом ренин-ангиотензиновой системы. Мутация в интроне 16 гена *ACE* ведет к двум аллельным вариантам: D — отсутствие фрагмента ДНК длиной 287 п. о. (Alu-последовательность), I — наличие данного фрагмента ДНК. Данные об ассоциациях I/D полиморфизма гена *ACE* варьируют в различных популяциях и исследованиях [15]. У спортсменов с генотипами I/I и I/D по гену *ACE* ИМТ, жировая и мышечная масса оказались выше по сравнению со спортсменами-носителями генотипа D/D ($p < 0,05$). Генотип I/I по гену *ACE* ассоциирован с проявлением выносливости, генотип D/D — скоростно-силовых качеств. Генотип I/D по гену *ACE* связан как с выносливостью, так и со скоростно-силовыми качествами. Преобладание I аллеля (или генотипа *ACE* I/I) в сравнении с контрольной группой было выявлено у атлетов российской популяции, занимающихся различными видами спорта (борьба, спортивные игры, бег на средние дистанции) [12], российских гребцов-академистов [11], элитных альпинистов [13], пловцов-марафонцев [14]. В ряде работ также подтверждена ассоциация генотипа *ACE* I/I с преобладанием «красных» (медленных) мышечных волокон в мышцах бедра [15], высокими показателями аэробной производительности, временем восстановления ЧСС после физических нагрузок, устойчивостью к мышечному утомлению [13], величиной сердечного выброса [16], высокими значениями вентиляции легких [17].

Следовательно, I аллель гена *ACE* можно считать генетическим маркером выносливости, что подтверждено рядом зарубежных и отечественных исследований [11, 13, 18, 19].

Согласно полученным данным, временные параметры ритма сердца спортсменов с генотипом *ACE* I/I отличаются

от значений групп *ACE I/D* и *ACE D/D*, но эти различия статистически недостоверны. В группе спортсменов с генотипом *D/D* обнаружены низкие значения временных параметров variability сердечного ритма. На фоне низкой частоты сокращений сердца закономерно увеличиваются $R - R_{min}$, $R - R_{max}$, $RRNN$. Это указывает на роль *I* аллеля в регуляции ритмической активности сердца и усилении парасимпатических влияний на синусовый узел.

Обладатели *ACE D/D* генотипа отличались более высокими значениями средней ЧСС, минимальными значениями $R - R_{min}$, $R - R_{max}$, $RRNN$, $RMSSD$, $pNN50$ и CV . На наш взгляд, это объясняется активностью ангиотензинпревращающего фермента, связанного с этим генотипом. Такая активность фермента, по всей видимости, сопряжена с повышением активности симпатического отдела вегетативной нервной системы. Согласно полученным данным, статистически значимо различаются параметры $RMSSD$ и CV групп спортсменов носителей *I/D* и *D/D* генотипов. Носители *ACE D/D* генотипа отличаются меньшими значениями как $RMSSD$, так и CV , что указывает, на наш взгляд, на уменьшение активности парасимпатического отдела вегетативной нервной системы.

Таким образом, можно заключить, что меньшие значения $RMSSD$ и CV указывают на потенциальную готовность индивида к выполнению нагрузок скоростного или силового характера, а более высокие — к выполнению нагрузок на выносливость.

Для носителей генотипа *I/I* были получены высокие значения общей мощности спектра (TP), высокая доля гуморально-метаболических и симпатических влияний на сердечный ритм (VLF; LF). Мы предполагаем, что такие изменения связаны с малой представительностью носителей *I/I* в общей выборке спортсменов (в частности, в группе «Выносливость»).

Высокие значения спектральных параметров ритма сердца в группе атлетов с генотипом *I/D* указывают на высокий вклад парасимпатических и гуморально-метаболических влияний в общую мощность спектра.

Брадикинин входит в группу кининов в качестве полипептида, который образуется при активации калликреин-кининовой системы крови. Данный полипептид снижает тонус сосудов и артериальное давление, повышает проницаемость капиллярной стенки, а также модулирует передачу импульсов в центральную и периферическую нервную систему. Опосредует свое действие брадикинин через два типа рецепторов: β_1 и β_2 [8, 20]. Брадикиновый рецептор β_2 — один из основных медиаторов эффекта брадикина, кодируется геном *BDKRB2*. Экспрессия данного рецептора обнаружена в различных тканях и органах, а также в эндотелии сосудов. В 1-м экзоне гена *BDKRB2* обнаружен инсерционно-делеционный полиморфизм (вставка или делеция 9 нуклеотидов; +9/–9 или *I/D*), который является функциональным и активно изучается спортивными генетиками. Делеционный вариант аллеля (–9) ассоциирован с повышенной экспрессией гена [19, 20]. В работе Williams и соавт. также было показано, что –9 аллель *BDKRB2* ассоциируется с высокой эффективностью мышечного сокращения и положительно коррелирует с силовыми признаками [9].

Например, в группе российских стайеров, достигших высокого уровня мастерства, (бег и плавание на длинные дистанции, лыжные гонки) частота *BDKRB2* –9/–9 генотипа достигала 39,1 %, а в группе элитных гребцов-байдарочников наличие этого генотипа давало спортсменам преимущество над соперниками: они заканчивали дистанцию

на 5 с раньше обладателей +9/+9 генотипа [11]. *BDKRB2* –9 аллель также ассоциируется с высокими параметрами эффективности мышечного сокращения [10], с максимальной произвольной силой мышц-разгибателей бедра [8]. *BDKRB2* +9 аллель связывают с риском развития гипертрофии миокарда левого желудочка в ответ на физические нагрузки в течение 10 нед. [20–22].

Таким образом, согласно данным литературных источников –9 аллель гена *BDKRB2* можно также считать генетическим маркером выносливости. Нами не обнаружено достоверных различий между группами спортсменов, тренирующих выносливость и силу, по этому маркеру, что можно объяснить небольшой выборкой.

Гомозиготы по аллелю –9 гена *BDKRB2* отличаются самыми низкими значениями ЧСС, что указывает на усиление парасимпатических влияний в системе регуляции сердечного ритма. Аллель –9 гена *BDKRB2* достоверно ассоциирован с минимальной продолжительностью последовательных сокращений сердца. Параметры, характеризующие частоту ритма, в группе носителей +9/+9 указывают на некоторое увеличение доли симпатической регуляции (значение $R - R_{min}$ ниже в сравнении с остальными группами). В совокупности показателей группа +9/–9 занимает промежуточное положение между описанными группами и представляет «сбалансированный» вариант регуляции ритма сердца по влияниям обоих отделов вегетативной нервной системы.

Было отмечено увеличение в группе *BDKRB2* –9/–9 роли парасимпатического нерва. Одноименный компонент спектра был выше как в ненормированных, так и в нормализованных величинах (HF, HF norm). Это согласуется с представлениями об ассоциации –9 аллеля с развитием выносливости [21–23]. Для группы *BDKRB2* +9/+9, наоборот, были характерны относительно низкие значения TP и HF, высокие значения LF. Низкие значения TP указывают на усиление централизации в управлении сердечным ритмом (с учетом относительно высокого показателя VLF-спектра). Подобные изменения BPC характерны для лиц, тренирующих скорость или силу. Различия спектральных параметров BPC по степени изменчивости были выявлены с применением однофакторного ANOVA-анализа. Значимыми оказались различия по параметрам LF, LF norm, HF norm и по симпатовагальному балансу. Обращает на себя внимание высокое значение HF norm в группе *BDKRB2* –9/–9, сниженное значение LF norm и LF. Это указывает на превалирование парасимпатических влияний на сердечный ритм в группе *BDKRB2* –9/–9. Обратные изменения перечисленных параметров (высокие значения LF norm, LF и низкие HF norm) говорят о предрасположенности к скоростным и скоростно-силовым видам спорта.

Расширение спектра анализируемых генов и увеличение выборки тестируемых спортсменов позволит нам подробнее изучить механизмы регуляции сердечной деятельности при занятиях спортом.

ВЫВОДЫ

В результате проведенного исследования обнаружено, что уровень парасимпатической активности преобладает в группах спортсменов, имеющих *I* аллель гена *ACE*. Было также показано увеличение роли парасимпатической нервной системы при генотипе *BDKRB2* –9/–9. Эти особенности свидетельствуют о потенциальной готовности системы кровообращения у обладателей этих генотипов

справляться с нагрузками динамического характера различной интенсивности. Полученные результаты согласуются с положениями молекулярной генетики спорта об ассоциации данных аллелей с успехами в соревнованиях.

Генетические маркеры повышенной физической работоспособности могут быть использованы для увеличения надежности и эффективности системы индивидуального

отбора и подготовки высококвалифицированных спортсменов. В частности, полученные результаты позволяют заключить, что при проведении первичного отбора спортсменов полиморфные локусы *ACE I/D* и *BDKRB2 +9/-9* могут служить в качестве генетических маркеров индивидуальных особенностей регуляции параметров сердечной деятельности.

Литература

1. Морман Д., Хеллер Л. Физиология сердечно-сосудистой системы. СПб.: Изд-во «Питер»; 2000. 256 с.
2. Дембо А. Г., Земцовский Э. В. Спортивная кардиология: Руководство для врачей. Л.: Медицина; 1989. 464 с.
3. Линде Е. В., Ахметов И. И., Орджоникидзе З. Г., Астратенкова И. В., Федотова А. Г. Клинико-генетические аспекты формирования «патологического спортивного сердца» у высококвалифицированных спортсменов. Вестн. спорт. науки. 2009; (2): 32–7.
4. Похачевский А. Л., Михайлов В. М., Груздев А. А., Петровицкий А. А., Садков А. В., Колесов Н. В. и др. Функциональное состояние и адаптационные резервы организма. Вестн. НовГУ. 2006; (35): 11–5.
5. Aubert AE, Seps B, Beckers F. Heart Rate Variability in Athletes. Sports Med. 2003; 33 (12): 889–919.
6. Белова Е. Л., Румянцева Л. В. Взаимосвязь показателей ритма сердца и некоторых характеристик тренировочных и соревновательных нагрузок квалифицированных лыжников-гонщиков. Вестн. спорт. науки. 2009; (5): 22–5.
7. Белоцерковский З. Б. Эргометрические и кардиологические критерии физической работоспособности у спортсменов. М.: Советский спорт; 2009. Гл. 6; с. 191–217.
8. Ahmetov II, Fedotovskaya ON. Sports genomics: Current state of knowledge and future directions. Cell Mol Exerc Physiol. 2012 Sept; 1 (1): e1. doi:10.7457/cmep.v1i1.e1.
9. Williams AG, Dhamrait SS, Wootton PT, Day SH, Hawe E, Payne JR, et al. Bradykinin receptor gene variant and human physical performance. J Appl Physiol (1985). 2004 Mar; 96 (3): 938–42.
10. Williams AG, Folland JP. Similarity of polygenic profiles limits the potential for elite human physical performance. J Physiol. 2008 Jan 1; 586 (1): 113–21.
11. Ахметов И. И. Молекулярная генетика спорта. М.: Советский спорт; 2009. Гл. IV; с. 109–13.
12. Рогозкин В. А. Расшифровка генома человека и спорт. Теор. и практ. физ. культ. 2001; (6): 60–3.
13. Montgomery HE, Clarkson P, Dollery CM, Prasad K, Losi MA, Hemingway H, et al. Association of angiotensin-converting enzyme gene I/D polymorphism with change in left ventricular mass in response to physical training. Circulation. 1997 Aug 5; 96 (3): 741–7.
14. Tsianos G, Sanders J, Dhamrait S, Humphries S, Grant S, Montgomery H. The ACE gene insertion/deletion polymorphism and elite endurance swimming. Eur J Appl Physiol. 2004 Jul; 92 (3): 360–2.
15. Montgomery HE, Marshall R, Hemingway H, Myerson S, Clarkson P, Dollery C, et al. Human gene for physical performance. Nature. 1998 May 21; 393 (6682): 221–2.
16. Nazarov IB, Woods DR, Montgomery HE, Shneider OV, Kazakov VI, Tomilin NV, et al. The angiotensin converting enzyme I/D polymorphism in Russian athletes. Eur J Hum Genet. 2001 Oct; 9 (10): 797–801.
17. Patel S, Woods DR, Macleod NJ, Brown A, Patel KR, Montgomery HE, et al. Angiotensin-converting enzyme genotype and the ventilatory response to exertional hypoxia. Eur Respir J. 2003 Nov; 22 (5): 755–60.
18. Zhang X, Wang C, Dai H, Lin Y, Zhang J. Association between angiotensin-converting enzyme gene polymorphisms and exercise performance in patients with COPD. Respirology. 2008 Sep; 13 (5): 683–8.
19. Myerson S, Hemingway H, Budget R, Martin J, Humphries S, Montgomery H. Human angiotensin I-converting enzyme gene and endurance performance. J Appl Physiol (1985). 1999 Oct; 87 (4): 1313–6.
20. Braun A, Kammerer S, Maier E, Böhme E, Roscher AA. Polymorphisms in the gene for the human B2-bradykinin receptor. New tools in assessing a genetic risk for bradykinin-associated diseases. Immunopharmacology. 1996 Jun; 33 (1–3): 32–5.
21. Ostrander EA, Huson HJ, Ostrander GK. Genetics of athletic performance. Annu Rev Genomics Hum Genet. 2009; 10: 407–29.
22. Ahmetov II, Fedotovskaya ON. Current Progress in Sports Genomics. Adv Clin Chem. 2015; 70: 247–314.
23. Brull D, Dhamrait S, Myerson S, Erdmann J, Woods D, World M, et al. Bradykinin B2BKR receptor polymorphism and left-ventricular growth response. Lancet. 2001 Oct 6; 358 (9288): 1155–6.
1. Mohrman DE, Heller LJ. Cardiovascular Physiology. 4th ed. Minnesota: McGraw-Hill, Inc.; 1997.
2. Dembo AG, Zemstovskiy EV. Sportivnaya kardiologiya: Rukovodstvo dlya vrachey. Leningrad: Meditsina; 1989. 464 p. Russian.
3. Linde EV, Ahmetov II, Orjonikidze ZY, Asratenkova IV, Fedotova AG. [Clinical and genetic aspects for «pathologic sport heart» pathogenesis in elite athletes]. Vestnik sportivnoy nauki. 2009; (2): 32–7. Russian.
4. Pokhachevskiy AL, Mikhaylov VM, Gruzdev AA, Petrovitskiy AA, Sadkov AV, Kolesov NV, et al. Funktsional'noe sostoyanie i adaptatsionnye rezervy organizma. Vestnik Novgorodskogo gosudarstvennogo universiteta. 2006; (35): 11–5. Russian.
5. Aubert AE, Seps B, Beckers F. Heart Rate Variability in Athletes. Sports Med. 2003; 33 (12): 889–919.
6. Belova EL, Rumyantzeva NV. [Interrelation of parameters of a rhythm of heart and some characteristics of training and competitive loadings of the elite ski-racers]. Vestnik sportivnoy nauki. 2009; (5): 22–5. Russian.
7. Belotserkovskiy ZB. Ergometricheskie i kardiologicheskie kriterii fizicheskoy rabotosposobnosti u sportsmenov. Moscow: Sovetskiy sport; 2009. Chapter 6; p. 191–217. Russian.
8. Ahmetov II, Fedotovskaya ON. Sports genomics: Current state of knowledge and future directions. Cell Mol Exerc Physiol. 2012 Sept; 1 (1): e1. doi:10.7457/cmep.v1i1.e1.
9. Williams AG, Dhamrait SS, Wootton PT, Day SH, Hawe E, Payne JR, et al. Bradykinin receptor gene variant and human physical performance. J Appl Physiol (1985). 2004 Mar; 96 (3): 938–42.
10. Williams AG, Folland JP. Similarity of polygenic profiles limits the

- potential for elite human physical performance. *J Physiol*. 2008 Jan 1; 586 (1): 113–21.
11. Akhmetov II. *Molekulyarnaya genetika sporta*. Moscow: Sovetskiy sport; 2009. Chapter IV; p. 109–13. Russian.
 12. Rogozkin VA. [Decipher of human genome and sport]. *Teoriya i praktika fizicheskoy kul'tury*. 2001; (6): 60–3. Russian.
 13. Montgomery HE, Clarkson P, Dollery CM, Prasad K, Losi MA, Hemingway H, et al. Association of angiotensin-converting enzyme gene I/D polymorphism with change in left ventricular mass in response to physical training. *Circulation*. 1997 Aug 5; 96 (3): 741–7.
 14. Tsianos G, Sanders J, Dhamrait S, Humphries S, Grant S, Montgomery H. The ACE gene insertion/deletion polymorphism and elite endurance swimming. *Eur J Appl Physiol*. 2004 Jul; 92 (3): 360–2.
 15. Montgomery HE, Marshall R, Hemingway H, Myerson S, Clarkson P, Dollery C, et al. Human gene for physical performance. *Nature*. 1998 May 21; 393 (6682): 221–2.
 16. Nazarov IB, Woods DR, Montgomery HE, Shneider OV, Kazakov VI, Tomilin NV, et al. The angiotensin converting enzyme I/D polymorphism in Russian athletes. *Eur J Hum Genet*. 2001 Oct; 9 (10): 797–801.
 17. Patel S, Woods DR, Macleod NJ, Brown A, Patel KR, Montgomery HE, et al. Angiotensin-converting enzyme genotype and the ventilatory response to exertional hypoxia. *Eur Respir J*. 2003 Nov; 22 (5): 755–60.
 18. Zhang X, Wang C, Dai H, Lin Y, Zhang J. Association between angiotensin-converting enzyme gene polymorphisms and exercise performance in patients with COPD. *Respirology*. 2008 Sep; 13 (5): 683–8.
 19. Myerson S, Hemingway H, Budget R, Martin J, Humphries S, Montgomery H. Human angiotensin I-converting enzyme gene and endurance performance. *J Appl Physiol* (1985). 1999 Oct; 87 (4): 1313–6.
 20. Braun A, Kammerer S, Maier E, Böhme E, Roscher AA. Polymorphisms in the gene for the human B2-bradykinin receptor. New tools in assessing a genetic risk for bradykinin-associated diseases. *Immunopharmacology*. 1996 Jun; 33 (1–3): 32–5.
 21. Ostrander EA, Huson HJ, Ostrander GK. Genetics of athletic performance. *Annu Rev Genomics Hum Genet*. 2009; 10: 407–29.
 22. Ahmetov II, Fedotovskaya ON. Current Progress in Sports Genomics. *Adv Clin Chem*. 2015; 70: 247–314.
 23. Brull D, Dhamrait S, Myerson S, Erdmann J, Woods D, World M, et al. Bradykinin B2BKR receptor polymorphism and left-ventricular growth response. *Lancet*. 2001 Oct 6; 358 (9288): 1155–6.

ИДЕНТИФИКАЦИЯ НЕТИПИЧНОГО БАКТЕРИАЛЬНОГО ВИДА *STREPTOCOCCUS INTERMEDIUS*, ВЫЗВАВШЕГО АБСЦЕСС ГОЛОВНОГО МОЗГА, СЕКВЕНИРОВАНИЕМ ПО СЭНГЕРУ ГЕНА 16S РРНК ИЗ ДНК ОБРАЗЦА ГНОЯ

М. А. Гордукова¹✉, Ю. В. Дивилина¹, О. В. Мишукова², Е. В. Галеева¹, А. П. Продеус¹, М. Л. Филипенко²

¹ Клиническая диагностическая лаборатория,
Детская городская клиническая больница № 9 им. Г. Н. Сперанского, Москва

² Лаборатория фармакогеномики,
Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, Новосибирск

Представлено описание клинического случая: наблюдали девочку в возрасте 14 лет 11 мес с абсцессом головного мозга, для которого не удалось установить возбудителя стандартными микробиологическими методами. До и в течение периода госпитализации у ребенка отсутствовала лихорадка, а многие антибиотики вызывали аллергические реакции, в связи с чем диагностика и терапия инфекции были затруднены. Пациентке были выполнены три операции. Четырежды производили посев гноя из абсцесса, но ни разу не наблюдали роста культуры. Дважды проводили ПЦР-анализ, но в обоих случаях результаты исследования были отрицательными. Тогда был амплифицирован и секвенирован по Сэнгеру ген 16S рРНК из образца ДНК, экстрагированной из гноя. С помощью программы BLAST была показана высокая гомология (99 %) определенной последовательности с последовательностью гена 16S рРНК бактерии *Streptococcus intermedius* (штамм ChDC B589, KF733728.1), для которой ранее была описана роль в развитии абсцессов головного мозга. Терапия *ex juvantibus* против этого микроорганизма, начатая еще до получения результатов секвенирования, привела к положительной динамике и купированию процесса у ребенка. Таким образом, в отдельных случаях секвенирование может являться практически единственным способом идентификации потенциального возбудителя.

Ключевые слова: абсцесс головного мозга, *Streptococcus intermedius*, 16S рРНК, секвенирование по Сэнгеру, лабораторная диагностика

✉ **Для корреспонденции:** Гордукова Мария Александровна
Шмитовский пр-д, д. 29, г. Москва, 123317; ma.gordukova@dgkb-9.ru

Статья получена: 04.07.2017 Статья принята к печати: 04.08.2017

IDENTIFICATION OF THE ATYPICAL BACTERIAL STRAIN *STREPTOCOCCUS INTERMEDIUS* THAT CAUSED BRAIN ABSCESS IN THE PATIENT USING SANGER SEQUENCING OF THE 16S RRNA GENE FROM THE DNA EXTRACTED FROM A PUS SAMPLE

Gordukova MA¹✉, Divilina YuV¹, Mishukova OV², Galeeva EV¹, Prodeus AP¹, Filipenko ML²

¹ Clinical Diagnostic Laboratory,
Speransky Children's Clinical Hospital No. 9, Moscow, Russia

² Laboratory of Pharmacogenomics,
Institute of Chemical Biology and Fundamental Medicine SB RAS, Novosibirsk, Russia

In this article we present a clinical case of brain abscess in a girl aged 14 years and 11 months caused by a pathogen that could not be identified by routine microbiological testing. Before admission and during her stay in the hospital, the teenager did not have fever. Diagnosis and treatment were impeded by allergic responses to a wide range of antibiotics. The patient underwent three surgical interventions. Pus culture was performed 4 times, showing no growth. A PCR assay was run twice, but both times the results came out negative. Therefore, a decision was made to amplify and Sanger-sequence the 16S rRNA gene from the DNA extracted from patient's pus. BLAST showed a 99 % homology of the obtained nucleotide sequence to the sequence of the 16S rRNA gene of *Streptococcus intermedius* (strain ChDC B589, KF733728.1) which had been previously shown to play a role in brain abscess development. Treatment *ex juvantibus* against the pathogen was started before sequencing results were available. The patient responded positively, the symptoms were alleviated and the condition improved. Thus, we conclude that in some cases sequencing may be the only diagnostic technique capable of identifying the pathogen.

Keywords: brain abscess, *Streptococcus intermedius*, 16S rRNA, Sanger sequencing, laboratory diagnosis

✉ **Correspondence should be addressed:** Maria Gordukova
Shmitovskiy proezd, d. 29, Moscow, Russia, 123317; ma.gordukova@dgkb-9.ru

Received: 04.07.2017 Accepted: 04.08.2017

Первым шагом в борьбе с инфекционным заболеванием является быстрое и точное определение одного или нескольких патогенов, являющихся причиной инфекции. Идентификация возбудителей способствует выбору надлежащей антибиотикотерапии не только при клинических синдромах, таких как сепсис, но также и в случае инфекций, вызванных множественными патогенами, например инфекций верхних дыхательных путей.

Как правило, методы идентификации и выявление устойчивости патогенных микроорганизмов к антимикробным препаратам в большинстве микробиологических лабораторий основаны на культивировании микроорганизмов. Такие подходы затратны по времени и не всегда эффективны для труднокультивируемых микроорганизмов и для микроорганизмов с ослабленной жизнеспособностью, например в результате лекарственной терапии. Современное молекулярное тестирование позволяет идентифицировать большое число патогенов с высокой специфичностью и чувствительностью напрямую из клинических образцов [1].

Перечень выявляемых с помощью доступных тест-систем возбудителей ограничен наиболее частыми бактериальными видами, поэтому иногда мы наблюдаем признаки инфекции при наличии отрицательных результатов культуральных и молекулярно-генетических тестов. Для таких случаев еще в начале 1990-х гг. был предложен подход, включающий амплификацию на ДНК клинического образца или чистой бактериальной культуры фрагмента гена, кодирующего 16S рРНК, определение его нуклеотидной последовательности и идентификацию бактерии на основании анализа полученной последовательности, а также ее сравнения с последовательностями, описанными для известных патогенов [2].

Использование гена 16S рРНК в качестве мишени для идентификации бактерий возможно за счет его наличия у всех бактерий и его высокой консервативности [3]. Высококонсервативные участки перемежаются вариабельными областями, их комбинации видоспецифичны. Амплификация гена 16S рРНК выполняется с помощью олигонуклеотидных праймеров, соответствующих консервативным участкам гена [4]. Бактерии могут быть идентифицированы путем анализа нуклеотидной последовательности продукта полимеразной цепной реакции (ПЦР) с последующим сравнением этой последовательности с известными последовательностями, хранящимися в базе данных, например RiboDB. К настоящему времени описаны десятки тысяч нуклеотидных последовательностей гена 16S рРНК разнообразных бактериальных видов.

Амплификация и секвенирование гена 16S рРНК возможны для ДНК, полученной как из клинических образцов, так и из бактериальных изолятов, в тех случаях, когда список потенциальных возбудителей достаточно длинный. Метод также может быть применен для обнаружения бактерий, которые трудно культивировать, или при работе с клиническими образцами от пациентов, получавших антибиотики [5–7]. Некоторые исследователи использовали его для анализа образцов спинномозговой жидкости, гноя, жидкости в суставах и тканей [8]. Например, Xia и соавт. [9] секвенировали ген 16S рРНК одновременно с проведением стандартного анализа бактериальной культуры для выявления инфекционных агентов у пациентов с пневмониями. С помощью секвенирования были идентифицированы бактерии родов *Prevotella*, *Proteus*, *Aquabacter* и *Sphingomonas*, которые не были обнаружены при стандартном исследовании. Бактерии 7 видов —

Streptococcus, *Neisseria*, *Corynebacterium*, *Acinetobacter*, *Staphylococcus*, *Pseudomonas* и *Klebsiella* — были обнаружены обоими методами, но метод секвенирования гена 16S рРНК обладал значительно большей чувствительностью при обнаружении бактерий родов *Streptococcus* и *Pseudomonas*. В работе Daroy и соавт. [10] секвенирование гена 16S рРНК позволило выявить бактерии *Haemophilus influenzae*, *Sphingomonas* sp., *Klebsiella pneumoniae*, *Staphylococcus haemolyticus*, *Morganella morganii*, *Mycobacterium* sp., *Chryseobacterium* sp., *Pseudomonas saccharophila* (*Xanthomonas*) и грибы *Phaeoacremonium inflatipes* в 19 образцах слезной жидкости пациентов с инфекциями глаз, хотя для всех из них были получены отрицательные результаты при культуральном исследовании.

Нами описан клинический случай идентификации патогена, вызвавшего абсцесс головного мозга, амплификацией и секвенированием гена 16S рРНК.

Описание клинического случая

В Детской городской клинической больнице № 9 им. Г. Н. Сперанского (Москва) с 6 июня по 15 июля 2016 г. находилась на стационарном лечении девочка в возрасте 14 лет 11 мес. с диагнозом «абсцесс головного мозга». Отсутствие лихорадки до и в течение периода госпитализации и постоянные аллергические реакции на различные антибиотики затрудняли как диагностику инфекции (в связи с этим ребенок был достаточно поздно госпитализирован), так и терапию.

С января 2016 г. девочку беспокоили боли в правом ухе, с 25 мая она перенесла правосторонний острый средний катаральный отит. После вызова бригады скорой медицинской помощи была доставлена в стационар из-за тошноты и рвоты, не лихорадила. На следующий день развились ригидность затылочных мышц и симптомы Кернига, верхний и нижний симптомы Брудзинского и атаксия. Была проведена компьютерная томография головного мозга, которая выявила абсцесс правой гемисферы с перифокальным отеком.

7 июня ребенку была выполнена трепанация черепа, дренирование абсцесса головного мозга правой теменной области, удалено 2 мл гноя, поставлен дренаж, назначена антибиотикотерапия. После введения ванкомицина развилась аллергическая сыпь, и препарат был отменен с заменой на комбинированную антибиотикотерапию меропенемом в дозе 2 г/сут. и линезолидом в дозе 600 мг каждые 12 ч. 9 июня возникла аллергическая реакция на линезолид: тошнота, рвота, затруднение дыхания. Этот препарат был заменен на амикацин в дозе 400 мг дважды в день. 13 июня был удален дренаж, а с 19 июня по просьбе матери ребенка было прекращено введение меропенема из-за аллергических реакций.

21 июня была проведена контрольная КТ с контрастным усилением, которая выявила рецидив абсцесса в смежных отделах головного мозга. Был назначен цефепим в дозе 2 г трижды в день и метронидазол внутривенно по 0,5 г/сут. В тот же день была проведена повторная операция, при которой было эвакуировано 20 мл гноя. Ребенок не лихорадил. Отделяемого по дренажу не было. 25 июня — снова операция, эвакуировано 12 мл гноя. Субфебрилитета не было. К цефепиму и метронидазолу был добавлен ванкомицин, а с 30 июня — цефотакс в дозе 2 г трижды в день вместо цефепима. Таким образом, за

время нахождения в стационаре ребенку были выполнены 3 операции по удалению содержимого абсцесса.

Четыре посева гноя из абсцесса не показали роста культуры ни в одном случае. Результаты биохимических анализов крови с определением содержания С-реактивного белка и скорости оседания эритроцитов приведены в таблице.

Дважды, 14 и 22 июня, на ДНК и кДНК из содержимого абсцесса головного мозга был проведен ПЦР-анализ для определения вируса простого герпеса I и II типа, цитомегаловируса, вируса Эпштейн–Барра, вируса простого герпеса VI типа, энтеровирусов, *Toxoplasma gondii*, *Streptococcus pyogenes*, *Neisseria meningitidis*, *Haemophilus influenza*, *Streptococcus pneumoniae*, метициллин-чувствительных и метициллин-резистентных штаммов *Staphylococcus aureus*, метициллин-резистентных коагулонегативных штаммов *S. aureus*, *Streptococcus agalactiae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Candida albicans*, *C. glabrata*, *C. krusei* и *Streptococcus spp.* Оба раза результаты были отрицательными. При этом внутренним контролем в данном наборе реагентов служил ген актина, и по этой причине кривая амплификации пересекала линию трешхолда при Ct = 23,39, что свидетельствовало о нормальном качестве ДНК, экстрагированной из гноя.

Образец ДНК был передан в лабораторию фармакогеномики Института химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН (Новосибирск) для амплификации фрагмента гена 16S рННК. В результате секвенирования была получена нуклеотидная последовательность, включавшая высоковариабельные участки гена v2–v4. Сравнительный анализ полученной нуклеотидной последовательности с использованием программы BLAST (NCBI, США) показал высокую гомологию (99 %) с последовательностью гена 16S рННК бактерии *Streptococcus intermedius* (штамм ChDC B589, KF733728.1).

Обсуждение клинического случая

В научной литературе и международных клинических рекомендациях описана роль комменсала *Streptococcus intermedius* в развитии абсцессов головного мозга [11]. Также описан случай абсцесса ГМ у пожилой женщины, посева аспирата из которого не приводили к росту культуры, а инфекционный агент, как и в описываемом нами случае, был установлен с помощью секвенирования гена 16S рННК [12]. *Streptococcus intermedius* и *Streptococcus constellatus* составляют группу, которую в зависимости от применяемой классификации иногда называют *Streptococcus milleri group*, демонстрируют серологическое и гемолитическое разнообразие, обладают разной иммуногенностью. Вероятно, *S. intermedius* в данном случае не запускал развитие адекватного иммунного ответа у пациентки, что приводило к отсутствию как лихорадки, так и маркеров воспаления (таблица). Соответственно, никакие методы лабораторной диагностики, имеющиеся в распоряжении многопрофиль-

ного стационара, не могли помочь в установлении этиологии заболевания, кроме примененного нами секвенирования по Сэнгеру.

Ошибочные результаты ПЦР-анализа были связаны, вероятно, с отсутствием данного референсного штамма у разработчиков использованного набора реагентов. Терапия *ex juvantibus* против *S. intermedius*, начатая еще до получения результатов секвенирования, привела к положительной динамике и купированию процесса у ребенка, что стало косвенным подтверждением данных секвенирования. Таким образом, описанный клинический случай указывает на то, что в случае дискордантных результатов двух молекулярных методов — ПЦР и секвенирования по Сэнгеру — стоит опираться на второй как на «золотой стандарт» в молекулярной биологии.

Выводы

Амплификация и полное секвенирование гена 16S рННК или секвенирование его фрагментов непосредственно из клинических образцов имеет свои ограничения. В качестве образца для анализа является предпочтительным материал из стерильных локусов. При полимикробных инфекциях или взятии материала из нестерильных локусов обычно возникают трудности с интерпретацией результатов секвенирования. Кроме того, даже получение ампликона ДНК микроорганизма из клинического образца необязательно свидетельствует о том, что именно идентифицированный организм является возбудителем инфекции. Секвенирование гена 16S рННК — трудоемкая процедура, требующая хорошего оснащения лаборатории и высокой квалификации персонала. Тем не менее в отдельных случаях данный метод может являться практически единственным способом идентификации потенциального патогена. В приведенном клиническом случае секвенирование гена 16S рННК позволило выявить нетипичный бактериальный вид, а анализ доступных литературных данных позволил предположить его этиологическую роль в развитии абсцесса мозга и предположить причины нетипичного течения заболевания.

Содержание С-реактивного белка (СРБ) и скорость оседания эритроцитов (СОЭ) по результатам нескольких биохимических анализов крови пациента

Дата	СРБ, мг/л	СОЭ, мм, ч
07.06.2016	55,8	—
14.06.2016	3,1	46
20.06.2016	2,2	—
27.06.2016	0,9	—
01.07.2016	0,6	19
12.07.2016	0,5	19

Примечание. СРБ в норме — 0,1–8,2 мг/л; СОЭ в норме — 0–20 мм/ч. Полужирным выделены значения показателей за пределами нормы.

Литература

- Lehmann LE, Hunfeld KP, Emrich T, Haberhausen G, Wissing H, Hoefft A et al. A multiplex real-time PCR assay for rapid detection and differentiation of 25 bacterial and fungal pathogens from whole blood samples. *Med Microbiol Immunol*. 2008 Sep; 197 (3): 313–24. DOI: 10.1007/s00430-007-0063-0.
- Bruce IJ. Nucleic acid amplification mediated microbial identification. *Sci Prog*. 1993–1994; 77 (Pt 3–4): 183–206.
- Woese CR. Bacterial evolution. *Microbiol Rev*. 1987 Jun; 51 (2): 221–71.
- Relman DA. The search for unrecognized pathogens. *Science*. 1999 May 21; 284 (5418): 1308–10.
- Schmidt TM, Relman DA. Phylogenetic identification of uncultured

- pathogens using ribosomal RNA sequences. *Methods Enzymol.* 1994; 235: 205–22.
6. Brouqui P, Raoult D. Endocarditis due to rare and fastidious bacteria. *Clin Microbiol Rev.* 2001 Jan; 14 (1): 177–207. DOI: 10.1128/CMR.14.1.177-207.2001.
 7. Harris KA, Fidler KJ, Hartley JC, Vogt J, Klein NJ, Monsell F et al. Unique case of *Helicobacter* sp. osteomyelitis in an immunocompetent child diagnosed by broad-range 16S PCR. *J Clin Microbiol.* 2002 Aug; 40 (8): 3100–3.
 8. Harris KA, Hartley JC. Development of broad-range 16S rDNA PCR for use in the routine diagnostic clinical microbiology service. *J Med Microbiol.* 2003 Aug; 52 (Pt 8): 685–91. DOI: 10.1099/jmm.0.05213-0.
 9. Xia LP, Bian LY, Xu M, Liu Y, Tang AL, Ye WQ. 16S rRNA gene sequencing is a non-culture method of defining the specific bacterial etiology of ventilator-associated pneumonia. *Int J Clin Exp Med.* 2015 Oct 15; 8 (10): 18560–70.
 10. Daroy ML, Lopez JS, Torres BC, Loy MJ, Tuano PM, Matias RR. Identification of unknown ocular pathogens in clinically suspected eye infections using ribosomal RNA gene sequence analysis. *Clin Microbiol Infect.* 2011 May; 17 (5): 776–9. DOI: 10.1111/j.1469-0691.2010.03369.x.
 11. Mishra AK, Fournier PE. The role of *Streptococcus intermedius* in brain abscess. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 2013 Apr; 32 (4): 477–83. DOI: 10.1007/s10096-012-1782-8.
 12. Saito N, Hida A, Koide Y, Ooka T, Ichikawa Y, Shimizu J et al. Culture-negative brain abscess with *Streptococcus intermedius* infection with diagnosis established by direct nucleotide sequence analysis of the 16s ribosomal RNA gene. *Intern Med.* 2012; 51 (2): 211–6.

References

1. Lehmann LE, Hunfeld KP, Emrich T, Haberhausen G, Wissing H, Hoefft A et al. A multiplex real-time PCR assay for rapid detection and differentiation of 25 bacterial and fungal pathogens from whole blood samples. *Med Microbiol Immunol.* 2008 Sep; 197 (3): 313–24. DOI: 10.1007/s00430-007-0063-0.
2. Bruce IJ. Nucleic acid amplification mediated microbial identification. *Sci Prog.* 1993–1994; 77 (Pt 3–4): 183–206.
3. Woese CR. Bacterial evolution. *Microbiol Rev.* 1987 Jun; 51 (2): 221–71.
4. Relman DA. The search for unrecognized pathogens. *Science.* 1999 May 21; 284 (5418): 1308–10.
5. Schmidt TM, Relman DA. Phylogenetic identification of uncultured pathogens using ribosomal RNA sequences. *Methods Enzymol.* 1994; 235: 205–22.
6. Brouqui P, Raoult D. Endocarditis due to rare and fastidious bacteria. *Clin Microbiol Rev.* 2001 Jan; 14 (1): 177–207. DOI: 10.1128/CMR.14.1.177-207.2001.
7. Harris KA, Fidler KJ, Hartley JC, Vogt J, Klein NJ, Monsell F et al. Unique case of *Helicobacter* sp. osteomyelitis in an immunocompetent child diagnosed by broad-range 16S PCR. *J Clin Microbiol.* 2002 Aug; 40 (8): 3100–3.
8. Harris KA, Hartley JC. Development of broad-range 16S rDNA PCR for use in the routine diagnostic clinical microbiology service. *J Med Microbiol.* 2003 Aug; 52 (Pt 8): 685–91. DOI: 10.1099/jmm.0.05213-0.
9. Xia LP, Bian LY, Xu M, Liu Y, Tang AL, Ye WQ. 16S rRNA gene sequencing is a non-culture method of defining the specific bacterial etiology of ventilator-associated pneumonia. *Int J Clin Exp Med.* 2015 Oct 15; 8 (10): 18560–70.
10. Daroy ML, Lopez JS, Torres BC, Loy MJ, Tuano PM, Matias RR. Identification of unknown ocular pathogens in clinically suspected eye infections using ribosomal RNA gene sequence analysis. *Clin Microbiol Infect.* 2011 May; 17 (5): 776–9. DOI: 10.1111/j.1469-0691.2010.03369.x.
11. Mishra AK, Fournier PE. The role of *Streptococcus intermedius* in brain abscess. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 2013 Apr; 32 (4): 477–83. DOI: 10.1007/s10096-012-1782-8.
12. Saito N, Hida A, Koide Y, Ooka T, Ichikawa Y, Shimizu J et al. Culture-negative brain abscess with *Streptococcus intermedius* infection with diagnosis established by direct nucleotide sequence analysis of the 16s ribosomal RNA gene. *Intern Med.* 2012; 51 (2): 211–6.

ВОЗМОЖНОСТЬ ПРОВЕДЕНИЯ ФОТОН-ЗАХВАТНОЙ ТЕРАПИИ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ 6 МВ ФОТОННОГО ИЗЛУЧЕНИЯ

Е. С. Воробьева¹, А. А. Липенгольц^{1,2,3} ✉, А. А. Черепанов², Е. Ю. Григорьева², И. Н. Нечкина², Н. С. Калыгина², А. В. Сокоиков⁴, В. Н. Кулаков¹, И. Н. Шейно¹

¹ Лаборатория методов и технологий лучевой терапии, отдел радиационных технологий медицинского назначения, Федеральный медицинский биофизический центр имени А. И. Бурназяна, Москва

² Лаборатория радионуклидных и лучевых технологий в экспериментальной онкологии, НИИ клинической и экспериментальной радиологии, Национальный медицинский исследовательский центр онкологии имени Н. Н. Блохина, Москва

³ Национальный исследовательский ядерный университет «МИФИ», Москва

⁴ ООО «МедСервис», Москва

Фотон-захватная терапия (ФЗТ) — метод лучевой терапии, который обеспечивает повышение поглощенной дозы в опухоли без дополнительной лучевой нагрузки на окружающие нормальные ткани. В работе представлены результаты экспериментального исследования возможности увеличения поглощенной дозы при ФЗТ за счет использования 6 МВ фотонного излучения. При помощи водных растворов ферросульфатных дозиметров было проведено прямое измерение величины поглощенной дозы в воде, содержащей йод (дозоповышающий агент) в концентрации от 2,5 до 50 мг/мл. Облучение растворов проводили на линейном медицинском терапевтическом ускорителе СЛ75-5-МТ (Россия) в дозе 5 Гр без учета возможного увеличения поглощенной дозы за счет присутствия атомов йода. Для концентраций йода 2,5–20 мг/мл достоверного увеличения поглощенной дозы зарегистрировано не было. Для концентрации йода 50 мг/мл увеличение поглощенной дозы составило $13 \pm 5\%$ ($p < 0,05$). Поскольку типичные концентрации дозоповышающих агентов при введении в организм пациентов, как правило, находятся в диапазоне 2,5–15 мг/мл, использование 6 МВ фотонного излучения для достижения терапевтически значимого противоопухолевого эффекта не представляется целесообразным.

Ключевые слова: фотон-захватная терапия, ферросульфатная дозиметрия, мегавольтное излучение, фактор повышения дозы

✉ **Для корреспонденции:** Липенгольц Алексей Андреевич
Каширское шоссе, д. 24, г. Москва, 115478; lipengolts@mail.ru

Статья получена: 25.08.2017 **Статья принята к печати:** 30.08.2017

FEASIBILITY OF USING 6 MV PHOTON BEAMS IN CONTRAST-ENHANCED RADIOTHERAPY

Vorobyeva ES¹, Lipengolts AA^{1,2,3} ✉, Cherepanov AA², Grigorieva EYu², Nechkina IN², Kalygina NS², Sokovikov AV⁴, Kulakov VN¹, Sheino IN¹

¹ Laboratory of radiotherapy methods and technologies, Department of Medical Radiation Technologies, A. I. Burnazyan Federal Medical Biophysical Center, Moscow, Russia

² Laboratory of radionuclide and radiation technologies in experimental oncology, Research Institute of Clinical and Experimental Radiology, N. N. Blokhin National Medical Research Center of Oncology, Moscow, Russia

³ National Research Nuclear University MEPh, Moscow, Russia

⁴ MedService Ltd., Moscow, Russia

Contrast-enhanced radiotherapy (CERT) is a type of radiation therapy used to enhance the radiation dose absorbed by the tumor while sparing surrounding healthy tissues. The present study aims to assess feasibility of using 6 MV photons to increase radiation absorption in CERT. The dose absorbed by iodinated water was directly measured by ferrosulphate dosimetry. Concentrations of iodine (a dose-enhancing agent) ranged from 2.5 to 50 mg/ml. Solutions were exposed to 5 Gy radiation generated by the clinical linear accelerator SL75-5MT (Russia). The radiation dose applied did not account for increased absorbance due to the presence of iodine atoms. No reliable increase in the absorbed dose was observed for iodine concentrations ranging from 2.5 to 20 mg/ml. For 50 mg/ml concentrations the absorbed dose increased by $13\% \pm 5\%$ ($p < 0.05$). Normally, dose-enhancing concentrations observed in CERT studies range from 2.5 to 15 mg/ml, therefore, as demonstrated by our findings, employing 6 MV photon energy spectra in order to reach a therapeutically significant effect is unreasonable.

Keywords: contrast-enhanced radiotherapy, ferrosulphate dosimetry, megavolts radiation, dose enhancement factor

✉ **Correspondence should be addressed:** Alexey Lipengolts
Kashirskoe shosse, d. 24, Moscow, Russia, 115478; lipengolts@mail.ru

Received: 25.08.2017 **Accepted:** 30.08.2017

Фотон-захватная терапия (ФЗТ) — это новый бинарный метод лучевой терапии. Особенностью ФЗТ является возможность локального увеличения поглощенной дозы в опухоли без сопутствующего повышения облучения

окружающих нормальных тканей. Это достигается за счет использования специальных препаратов, содержащих элементы с порядковым номером $Z > 52$ (I, Gd, Au, Bi и др.). Такие элементы имеют большую поглощающую

способность, чем элементы, составляющие биологические мягкие ткани, и при ФЗТ выступают в роли дозоповышающего агента (ДПА).

По графику массовых коэффициентов поглощения энергии μ_{en} для различных элементов (рис. 1) видно, что разница в поглощающей способности существует лишь для ионизирующего фотонного излучения в диапазоне энергий от 30 до 300–500 кэВ в зависимости от порядкового номера Z -элемента [1]. Данный диапазон относится к ортовольтовому рентгеновскому излучению, и в большинстве работ по исследованию ФЗТ используют источники ионизирующего фотонного излучения именно этого диапазона [2–7].

Очевидно, что для фотонного излучения с энергией более 500 кэВ разница в поглощающей способности между ДПА и мягкими тканями пренебрежимо мала. Однако в ряде экспериментальных работ (как *in vitro*, так и *in vivo*) было показано, что увеличение противоопухолевого эффекта облучения после предварительного введения определенных химических соединений, содержащих ДПА, наблюдалось и для излучений мегавольтового диапазона — 6 МВ и более [8–13]. Такие результаты были получены главным образом для соединений платины, наночастиц золота и наноструктур с гадолинием. Основываясь на этих данных, некоторые исследователи описали возможные механизмы увеличения поглощенной дозы за счет взаимодействия 6 МВ излучения с ДПА [14–16]. В этих работах предполагается, что за счет рассеяния первичного излучения в объеме опухоли создается достаточное количество низкоэнергетических фотонов, способных заметно взаимодействовать с ДПА, находящимися в опухоли. В соответствии с расчетами авторов в результате взаимодействия ортовольтового излучения с ДПА происходит интенсивная ионизация среды, окружающей атом ДПА, на расстоянии порядка нескольких нанометров от атома. Такая ионизация приводит к образованию большого количества активных радикалов, способных воздействовать на биологические структуры на существенно большем расстоянии от атома (порядка нескольких миллиметров).

Другими исследователями было проведено экспериментальное измерение возможного увеличения поглощенной дозы на атомах ДПА при облучении 6 МВ излучением при помощи полимерных гелевых дозиметров и ЭПР-дозиметров (ЭПР — электронный парамагнитный резонанс), в состав которых вводились атомы ДПА. В работе [17] наличие золота в концентрации 18 мг/мл в составе полимерного гелевого дозиметра не позволило достоверно зафиксировать увеличение поглощенной дозы. В работе [18] измерения при помощи аланинового ЭПР-дозиметра, содержащего золото в концентрации 30 мг/мл, показали увеличение поглощенной дозы на 10 %.

Таким образом, возникает вопрос: чем объяснить терапевтический эффект ФЗТ с 6 МВ излучением — физическим увеличением поглощенной дозы или радиомодификацией опухолевых клеток? В поисках ответа на него нами было проведено исследование увеличения поглощенной дозы в водной среде, содержащей атомы йода в качестве ДПА, при облучении 6 МВ фотонным излучением. В отличие от предыдущих экспериментальных исследований — с использованием полимерных гелевых дозиметров и аланиновых ЭПР-дозиметров, в которых мобильность активных радикалов может быть снижена по сравнению с водой — в данном исследовании измерение дозы осуществлялось в водном растворе, где распространению образующихся активных радикалов не препятствуют никакие крупные молекулы, поэтому они могут быть более эффективно зарегистрированы.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Для измерения повышения дозы в водном растворе, содержащем йод, был использован метод ферросульфатной дозиметрии. Основная сложность количественной оценки поглощенной дозы в присутствии ДПА заключается в том, что вторичное излучение является короткопробежным (от нескольких нанометров для Оже-излучения до нескольких микрометров для фотоэлектронов и характеристического излучения), что накладывает ограничения на применение традиционных методов дозиметрии. Решение проблемы возможно при помощи жидкостной ферросульфатной дозиметрии. В основе метода лежит окисление ионов Fe^{2+} до Fe^{3+} высокорекреационными продуктами радиолиза воды, образующимися под воздействием ионизирующего излучения. Количество образовавшихся ионов Fe^{3+} зависит от величины поглощенной дозы ионизирующего излучения и позволяет эту величину определить количественно. Раствор дозиметра можно модифицировать путем

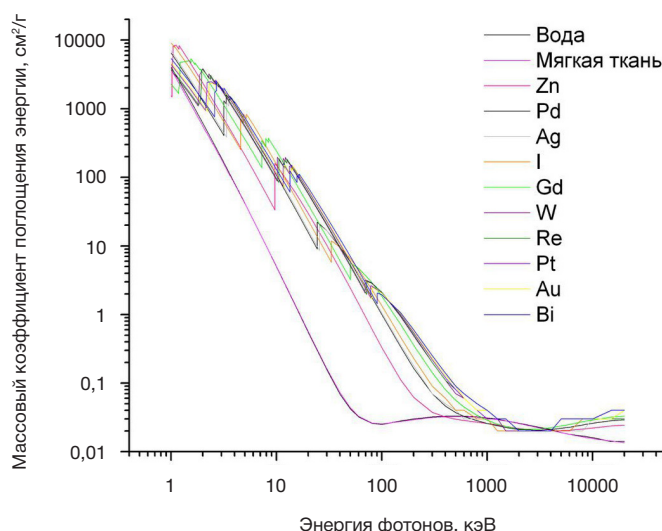


Рис. 1. Зависимость массового коэффициента поглощения энергии от энергии падающего фотонного излучения

добавления в его состав препарата с ДПА. При этом детектирующий агент (ионы трехвалентного железа) располагается в непосредственной близости от атомов ДПА, что позволяет оценить влияние вторичного излучения на суммарную поглощенную дозу.

В качестве дозоповышающего агента был использован йод ($Z = 53$). Раствор йодсодержащего соединения в форме контрастного средства «Ультравист-370» (Bayer, Германия) в различных концентрациях йода был добавлен непосредственно в раствор ферросульфатного дозиметра. Концентрации йода при этом составили 2,5, 5, 10, 20 и 50 мг/мл. Приготовление раствора ферросульфатного дозиметра осуществлялось по ранее разработанной нами методике [19].

Спектрофотометрическое измерение оптической плотности раствора на пике поглощения света ионами Fe^{3+} производится на длине волны 303 нм. Собственный спектр оптического поглощения иопромиды не позволяет детектировать пик поглощения железа, по этой причине состав дозиметра был модифицирован путем добавления в него раствора роданида (тиоцианата) аммония NH_4SCN . При взаимодействии ионов трехвалентного железа с роданидом возникает тиоцианатный комплекс Fe^{3+} , имеющий оранжево-красную окраску и обладающий пиком оптического поглощения на длине волны 460 нм. Для каждой концентрации йода в облученный йодсодержащий раствор дозиметра в объеме 2 мл был добавлен раствор роданида аммония с концентрацией 0,1 г/мл в объеме 100 мкл, после чего была произведена спектрофотометрическая оценка спектра поглощения и величины пика оптической плотности роданида железа с помощью спектрофотометра Cary 50 (Varian Australia Pty, Австралия).

Увеличение поглощенной дозы выражается через фактор повышения дозы (ФПД): $\text{ФПД} = D_{\text{contrast}}/D$, где D_{contrast} — значение поглощенной дозы в присутствии дозоповышающего агента, полученное по результатам спектрофотометрии облученного дозиметра, и D — поглощенная доза в отсутствие ДПА. Величина поглощенной дозы определялась по предварительно построенной градуировочной кривой для диапазона доз 2,5–20 Гр.

Облучение растворов дозиметра производилось на клиническом линейном 6 МВ ускорителе электронов СЛ75-5-МТ (НИИЭФА, Россия), используемом в отделении

радиотерапии Национального медицинского исследовательского центра онкологии им. Н. Н. Блохина. Ускоритель генерирует тормозное излучение с энергией фотонов до 6 МэВ. Облучение дозиметра производилось в пластиковых чашках Петри диаметром 40 мм. Объем дозиметра составлял 2,5 мл в каждой чашке. Время облучения составляло 100 с, что соответствовало величине поглощенной дозы в воде, не содержащей йода, 5 Гр. При облучении намеренно не использовали тканеэквивалентные рассеиватели до и вокруг раствора ферросульфатного дозиметра, т. к. главной целью исследования являлось моделирование условий поверхностного облучения, характерных для исследований *in vitro* и *in vivo* (на мышах и крысах с трансплантированными опухолями).

Для каждой концентрации ДПА было выполнено 6 измерений. Для каждой концентрации вычислялась средняя величина поглощенной дозы и ошибка среднего с учетом коэффициента Стьюдента. Статистическая достоверность различий оценивалась с помощью U-критерия Манна-Уитни.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Градуировочный график зависимости оптической плотности ферросульфатного дозиметра от величины поглощенной дозы в диапазоне 2,5–20 Гр приведен на рис. 2. По нему видно, что зависимость — линейная.

Средние значения фактора повышения дозы для каждой исследованной концентрации представлены в таблице. Для концентрации йода 50 мг/мл наблюдали увеличение поглощенной дозы на 13 %, тогда как для меньших концентраций ФПД статистически достоверно не превышал 1.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Полученные результаты показывают, что для типичных при ФЗТ концентраций ДПА в опухолевых тканях (2–50 мг/мл) клинически значимого увеличения поглощенной дозы при использовании 6 МВ излучения не происходит. При концентрациях йода до 20 мг/мл включительно увеличение

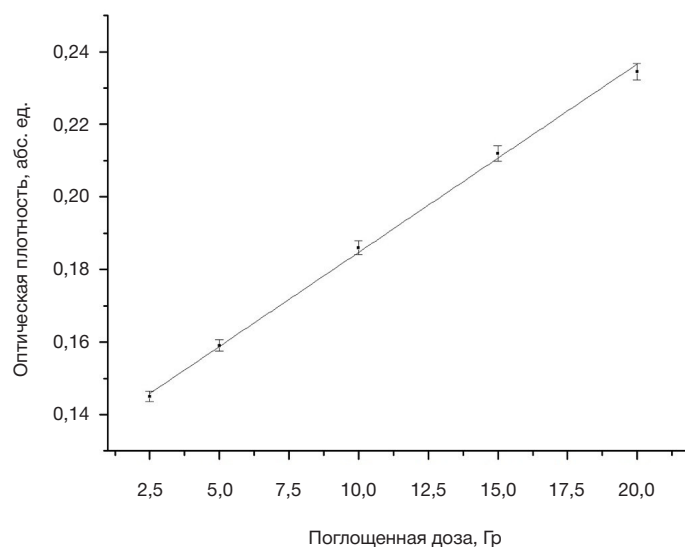


Рис. 2. График зависимости оптической плотности ферросульфатного дозиметра от величины поглощенной дозы излучения

поглощенной дозы не превышает неопределенности метода. Для концентрации 50 мг/мл зарегистрировано достоверное увеличение поглощенной дозы на $13 \pm 5\%$. Полученные результаты хорошо согласуются с результатами измерений, выполненных другими авторами [17, 18]. Необходимо отметить, что концентрации более 20 мг/мл достижимы лишь при внутриопухолевом способе введения ДПА, который не приветствуется медицинским сообществом. Для системного введения препаратов с ДПА типичная их концентрация составляет от 2 до 15 мг/мл [2, 20]. Таким образом, измерения поглощенной дозы при облучении фотонами 6 МВ ускорителя не показали ее заметного увеличения для значимых концентраций йода, что не позволяет ожидать достижения требуемого противоопухолевого эффекта.

ВЫВОДЫ

На основании полученных данных можно утверждать, что применение стандартных клинических терапевтических источников с 6 МВ излучением для фотон-захватной терапии не может обеспечить терапевтически значимого

увеличения поглощенной дозы. Наблюдаемый противоопухолевый эффект 6 МВ фотонного излучения при наличии в опухоли атомов дозоповышающих агентов относится скорее к биологическому явлению радиосенсибилизации, чем к физическому увеличению поглощенной дозы в опухоли. Вопрос о возможности применения при ФЗТ 6 МВ излучения без выравнивающего фильтра, отсекающего часть излучения киловольтного и ортовольтного диапазона, требует дополнительных исследований.

Измеренные значения фактора повышения дозы (ФПД) для различных концентраций йода

Концентрация йода, мг/мл	ФПД
$2,50 \pm 0,08$	$1,00 \pm 0,05$
$5,0 \pm 0,1$	$0,90 \pm 0,08$
$10,0 \pm 0,3$	$1,00 \pm 0,05$
$20,0 \pm 0,6$	$1,00 \pm 0,05$
$50,0 \pm 1,5$	$1,13 \pm 0,05^*$

Примечание. * — различия статистически достоверны ($p < 0,05$).

Литература

- Kulakov VN, Lipengol'ts AA, Grigor'eva EY, Shimanovskii NL. Pharmaceuticals for Binary Radiotherapy and Their Use for Treatment of Malignancies (A Review). Pharm Chem J. 2016; 50 (6): 388–93.
- Hainfeld JF, Smilowitz HM, O'Connor MJ, Dilmann FA, Slatkin DN. Gold nanoparticle imaging and radiotherapy of brain tumors in mice. Nanomedicine. 2013; 8 (10): 1601–9. DOI: 10.2217/nnm.12.165.
- Butterworth KT, Nicol JR, Ghita M, Rosa S, Chaudhary P, McGarry CK et al. Preclinical evaluation of gold-DTDTA nanoparticles as theranostic agents in prostate cancer radiotherapy. Nanomedicine. 2016; 11 (16): 2035–47. DOI: 10.2217/nnm-2016-0062.
- Lipengol'ts AA, Cherepanov AA, Kulakov VN, Grigorieva EY, Sheino IN, Klimanov VA. Antitumor efficacy of extracellular complexes with gadolinium in Binary Radiotherapy. Appl Radiat Isot. 2015 Dec 1; 106: 233–6. DOI: 10.1016/j.apradiso.2015.07.051.
- Rose JH, Norman A, Ingram M, Aoki C, Solberg T, Mesa A. First radiotherapy of human metastatic brain tumors delivered by a computerized tomography scanner (CTRx). Int J Radiat Oncol Biol Phys. 1999; 45 (5): 1127–32.
- Черепанов А. А., Липенгольц А. А., Насонова Т. А., Добрынина О. А., Кулаков В. Н., Шейно И. Н. и др. Увеличение противоопухолевого эффекта рентгеновского облучения при помощи гадолиний-содержащего препарата на примере мышей с трансплантированной меланомой B16F10. Медицинская физика. 2014; (3): 66–9.
- Bobyk L, Edouard M, Deman P, Vautrin M, Pernet-Gallay K, Delaroche J et al. Photoactivation of gold nanoparticles for glioma treatment. Nanomedicine. 2013 Oct; 9 (7): 1089–97. DOI: 10.1016/j.nano.2013.04.007.
- Wolfe T, Chatterjee D, Lee J, Grant JD, Bhattarai S, Taylor R et al. Targeted gold nanoparticles enhance sensitization of prostate tumors to megavoltage radiation therapy in vivo. Nanomedicine. 2015 Jul; 11 (5): 1277–83. DOI: 10.1016/j.nano.2014.12.016.
- Detappe A, Kunjachan S, Drané P, Kotb S, Myronakis M, Biancur DE, et al. Key clinical beam parameters for nanoparticle-mediated radiation dose amplification. Sci Rep. 2016 Sep 23; 6 (1): 34040. DOI: 10.1038/srep34040.
- Rahman WN, Bishara N, Ackerly T, He CF, Jackson P, Wong C et al. Enhancement of radiation effects by gold nanoparticles for superficial radiation therapy. Nanomedicine. 2009 Jun; 5 (2) : 136–42.
- Chang MY, Shiao AL, Chen YH, Chang CJ, Chen HHW, Wu CL. Increased apoptotic potential and dose-enhancing effect of gold nanoparticles in combination with single-dose clinical electron beams on tumor-bearing mice. Cancer Sci. 2008 Jul; 99 (7): 1479–84. DOI: 10.1111/j.1349-7006.2008.00827.x.
- Rousseau J, Boudou C, Barth RF, Balosso J, Estève F, Elleaume H. Enhanced survival and cure of F98 glioma-bearing rats following intracerebral delivery of carboplatin in combination with photon irradiation. Clin Cancer Res. 2007 Sep; 13 (17): 5195–201. DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-07-1002.
- Detappe A, Kunjachan S, Rottmann J, Robar J, Tsiamas P, Korideck H, et al. AGuX nanoparticles as a promising platform for image-guided radiation therapy. Cancer Nanotechnol. 2015; 6 (1): 4. DOI: 10.1186/s12645-015-0012-3.
- McMahon SJ, Hyland WB, Muir MF, Coulter JA, Jain S, Butterworth KT, et al. Nanodosimetric effects of gold nanoparticles in megavoltage radiation therapy. Radiother Oncol. 2011 Sep; 100 (3): 412–6. DOI: 10.1016/j.radonc.2011.08.027.
- Lin Y, McMahon SJ, Scarpelli M, Paganetti H, Schuermann J. Comparing gold nano-particle enhanced radiotherapy with protons, megavoltage photons and kilovoltage photons: a Monte Carlo simulation. Phys Med Biol. 2014 Dec 21; 59 (24): 7675–89. DOI: 10.1088/0031-9155/59/24/7675.
- Tsiamas P, Liu B, Cifter F, Ngwa WF, Berbeco RI, Kappas C, et al. Impact of beam quality on megavoltage radiotherapy treatment techniques utilizing gold nanoparticles for dose enhancement. Phys Med Biol. 2013 Feb 7; 58 (3): 451–64. DOI: 10.1088/0031-9155/58/3/451.
- Kakade NR, Sharma SD. Dose enhancement in gold nanoparticle-aided radiotherapy for the therapeutic photon beams using Monte Carlo technique. J Cancer Res Ther. 2015 Jan–Mar; 11 (1): 94–7. DOI: 10.4103/0973-1482.147691.
- Smith CL, Ackerly T, Best SP, Gagliardi F, Kie K, Little PJ, et al. Determination of dose enhancement caused by gold-nanoparticles irradiated with proton, X-rays (kV and MV) and electron beams, using alanine/EPR dosimeters. Radiat Meas. 2015; 82: 122–8.
- Черепанов А. А., Липенгольц А. А., Воробьева Е. С., Кула-

ков В. Н., Климанов В. А., Григорьева Е. Ю. Исследование увеличения энерговыделения в среде за счет присутствия тяжелого элемента с использованием дозиметра Фрике. Медицинская физика. 2016; 72 (4): 38–41.

20. Obeid L, Deman P, Tessier A, Balosso J, Estève F, Adam J-F.

Absolute perfusion measurements and associated iodinated contrast agent time course in brain metastasis: a study for contrast-enhanced radiotherapy. J Cereb Blood Flow Metab. 2014 Apr; 34 (4) :638–45. DOI: 10.1038/jcbfm.2013.239.

References

1. Kulakov VN, Lipengol'ts AA, Grigor'eva EY, Shimanovskii NL. Pharmaceuticals for Binary Radiotherapy and Their Use for Treatment of Malignancies (A Review). Pharm Chem J. 2016; 50 (6): 388–93.
2. Hainfeld JF, Smilowitz HM, O'Connor MJ, Dilmanian FA, Slatkin DN. Gold nanoparticle imaging and radiotherapy of brain tumors in mice. Nanomedicine. 2013; 8 (10): 1601–9. DOI: 10.2217/nnm.12.165.
3. Butterworth KT, Nicol JR, Ghita M, Rosa S, Chaudhary P, McGarry CK et al. Preclinical evaluation of gold-DTTPA nanoparticles as therapeutic agents in prostate cancer radiotherapy. Nanomedicine. 2016; 11 (16): 2035–47. DOI: 10.2217/nnm-2016-0062.
4. Lipengol'ts AA, Cherepanov AA, Kulakov VN, Grigorieva EY, Sheino IN, Klimanov VA. Antitumor efficacy of extracellular complexes with gadolinium in Binary Radiotherapy. Appl Radiat Isot. 2015 Dec 1; 106: 233–6. DOI: 10.1016/j.apradiso.2015.07.051.
5. Rose JH, Norman A, Ingram M, Aoki C, Solberg T, Mesa A. First radiotherapy of human metastatic brain tumors delivered by a computerized tomography scanner (CTRx). Int J Radiat Oncol Biol Phys. 1999; 45 (5): 1127–32.
6. Cherepanov AA, Lipengol'ts AA, Nasonova TA, Dobrynina OA, Kulakov VN, Sheino IN et al. [Increasing of antineoplastic effect of x-ray irradiation in mice with transplanted melanoma B16F10 by use of gadolinium containing drug]. Meditsinskaya fizika. 2014; (3): 66–9. Russian.
7. Bobyk L, Edouard M, Deman P, Vautrin M, Pernet-Gallay K, Delaroche J et al. Photoactivation of gold nanoparticles for glioma treatment. Nanomedicine. 2013 Oct; 9 (7): 1089–97. DOI: 10.1016/j.nano.2013.04.007.
8. Wolfe T, Chatterjee D, Lee J, Grant JD, Bhattarai S, Tailor R et al. Targeted gold nanoparticles enhance sensitization of prostate tumors to megavoltage radiation therapy in vivo. Nanomedicine. 2015 Jul; 11 (5): 1277–83. DOI: 10.1016/j.nano.2014.12.016.
9. Detappe A, Kunjachan S, Drané P, Kotb S, Myronakis M, Biancur DE, et al. Key clinical beam parameters for nanoparticle-mediated radiation dose amplification. Sci Rep. 2016 Sep 23; 6 (1): 34040. DOI: 10.1038/srep34040.
10. Rahman WN, Bishara N, Ackerly T, He CF, Jackson P, Wong C et al. Enhancement of radiation effects by gold nanoparticles for superficial radiation therapy. Nanomedicine. 2009 Jun; 5 (2) : 136–42.
11. Chang MY, Shiau AL, Chen YH, Chang CJ, Chen HHW, Wu CL. Increased apoptotic potential and dose-enhancing effect of gold nanoparticles in combination with single-dose clinical electron beams on tumor-bearing mice. Cancer Sci. 2008 Jul; 99 (7): 1479–84. DOI: 10.1111/j.1349-7006.2008.00827.x.
12. Rousseau J, Boudou C, Barth RF, Balosso J, Estève F, Elleaume H. Enhanced survival and cure of F98 glioma-bearing rats following intracerebral delivery of carboplatin in combination with photon irradiation. Clin Cancer Res. 2007 Sep; 13 (17): 5195–201. DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-07-1002.
13. Detappe A, Kunjachan S, Rottmann J, Robar J, Tsiamas P, Korideck H, et al. AGuX nanoparticles as a promising platform for image-guided radiation therapy. Cancer Nanotechnol. 2015; 6 (1): 4. DOI: 10.1186/s12645-015-0012-3.
14. McMahon SJ, Hyland WB, Muir MF, Coulter JA, Jain S, Butterworth KT, et al. Nanodosimetric effects of gold nanoparticles in megavoltage radiation therapy. Radiother Oncol. 2011 Sep; 100 (3): 412–6. DOI: 10.1016/j.radonc.2011.08.027.
15. Lin Y, McMahon SJ, Scarpelli M, Paganetti H, Schuemann J. Comparing gold nano-particle enhanced radiotherapy with protons, megavoltage photons and kilovoltage photons: a Monte Carlo simulation. Phys Med Biol. 2014 Dec 21; 59 (24): 7675–89. DOI: 10.1088/0031-9155/59/24/7675.
16. Tsiamas P, Liu B, Cifter F, Ngwa WF, Berbeco RI, Kappas C, et al. Impact of beam quality on megavoltage radiotherapy treatment techniques utilizing gold nanoparticles for dose enhancement. Phys Med Biol. 2013 Feb 7; 58 (3): 451–64. DOI: 10.1088/0031-9155/58/3/451.
17. Kakade NR, Sharma SD. Dose enhancement in gold nanoparticle-aided radiotherapy for the therapeutic photon beams using Monte Carlo technique. J Cancer Res Ther. 2015 Jan–Mar; 11 (1): 94–7. DOI: 10.4103/0973-1482.147691.
18. Smith CL, Ackerly T, Best SP, Gagliardi F, Kie K, Little PJ, et al. Determination of dose enhancement caused by gold-nanoparticles irradiated with proton, X-rays (kV and MV) and electron beams, using alanine/EPR dosimeters. Radiat Meas. 2015; 82: 122–8.
19. Cherepanov AA, Lipengol'ts AA, Vorobyeva ES, Kulakov VN, Klimanov VA, Grigorieva EYu. [Experimental study of x-rays absorbed dose increase in medium containing high-Z element using Fricke dosimeter]. Meditsinskaya fizika. 2016; 72 (4): 38–41. Russian.
20. Obeid L, Deman P, Tessier A, Balosso J, Estève F, Adam J-F. Absolute perfusion measurements and associated iodinated contrast agent time course in brain metastasis: a study for contrast-enhanced radiotherapy. J Cereb Blood Flow Metab. 2014 Apr; 34 (4) :638–45. DOI: 10.1038/jcbfm.2013.239.