

Российское общество профилактики
неинфекционных заболеваний
Российское кардиологическое общество
Национальный медицинский исследовательский
центр терапии и профилактической медицины

КАРДИОВАСКУЛЯРНАЯ ТЕРАПИЯ И ПРОФИЛАКТИКА

Cardiovascular Therapy and Prevention (Russian)

SCOPUS 1,7

- Cardiovascular medicine
- Education



РОССИЙСКОЕ
КАРДИОЛОГИЧЕСКОЕ
ОБЩЕСТВО



Официальный сайт журнала

<https://cardiovascular.elpub.ru>

№ 11, 2024

НАУЧНО-ПРАКТИЧЕСКИЙ РЕЦЕНЗИРУЕМЫЙ МЕДИЦИНСКИЙ ЖУРНАЛ

Российское общество
профилактики
неинфекционных
заболеваний

Российское
кардиологическое общество
Национальный медицинский
исследовательский центр
терапии и профилактической
медицины

**Научно-практический
рецензируемый
медицинский журнал**

Журнал зарегистрирован Министерством РФ
по делам печати, телерадиовещания и средств
массовых коммуникаций 30.11.2001 г.
(Свидетельство ПИ № 77-11335)

Журнал с открытым доступом

Журнал включен в Перечень ведущих научных
журналов и изданий ВАК, K1

Журнал включен в Scopus, DOAJ
Российский индекс научного цитирования (ядро),
RSCI (Russian Science Citation Index)

Полнотекстовые версии всех номеров размещены
на сайте Научной Электронной Библиотеки:
www.elibrary.ru

Правила публикации авторских материалов
и архив номеров: <https://cardiovascular.elpub.ru>

Информация о подписке:
www.rosradio.ru/ru/subscription

Объединенный каталог "Пресса России":
42434 — для индивидуальных подписчиков
42524 — для предприятий и организаций

Перепечатка статей возможна только
с письменного разрешения издательства

Ответственность за достоверность рекламных
публикаций несет рекламодатель

Периодичность: 12 раз в год

Установочный тираж: 5 000 экз.

Отдел рекламы и распространения
Гусева А. Е.
e-mail: guseva.silicea@yandex.ru

Ответственный переводчик
Клещеногов А. С.

Компьютерная верстка
Добрынина Е. Ю.
Звёздкина В. Ю.
Старцев Д. С.

Отпечатано: типография "OneBook",
ООО "Сам Полиграфист",
129090, Москва, Протопоповский пер., д. 6
www.onebook.ru

Лицензия на шрифты № 180397 от 21.03.2018

Номер подписан в печать: 09.12.2024

Цена свободная

©КАРДИОВАСКУЛЯРНАЯ ТЕРАПИЯ И ПРОФИЛАКТИКА

КАРДИОВАСКУЛЯРНАЯ ТЕРАПИЯ И ПРОФИЛАКТИКА

Основан в 2002 г.

Том 23 11'2024

Главный редактор

Драпкина О. М. (Москва, Россия)

Заместители главного редактора

Голухова Е. З. (Москва, Россия)
Карпов Ю. А. (Москва, Россия)
Шальнова С. А. (Москва, Россия)

Редакционная коллегия

Научный редактор

Метельская В. А. (Москва, Россия)

Ответственный секретарь

Кутишенко Н. П. (Москва, Россия)

Рабочая группа

Бернс С. А. (Москва, Россия)
Горшков А. Ю. (Москва, Россия)
Киселев А. Р. (Москва, Россия)
Таратухин Е. О. (Москва, Россия)
Шепель Р. Н. (Москва, Россия)
Явлов И. С. (Москва, Россия)

Авксентьева М. В. (Москва, Россия)
Джозеф С. Альперт (Тусон, Аризона, США)
Бадтиева В. А. (Москва, Россия)
Бойцов С. А. (Москва, Россия)
Бубнова М. Г. (Москва, Россия)
Бузиашвили Ю. И. (Москва, Россия)
Васюк Ю. А. (Москва, Россия)
Габинский Я. Л. (Екатеринбург, Россия)
Галивич А. С. (Казань, Россия)
Глезер М. Г. (Москва, Россия)
Горбунов В. М. (Москва, Россия)
Гринштейн Ю. И. (Красноярск, Россия)
Джигоева О. Н. (Москва, Россия)
Калинина А. М. (Москва, Россия)
Кобалава Ж. Д. (Москва, Россия)

Комаров А. Л. (Москва, Россия)
Концевая А. В. (Москва, Россия)
Томас Люшер (Лондон, Великобритания)
Мамедов М. Н. (Москва, Россия)
Марцевич С. Ю. (Москва, Россия)
Небиеридзе Д. В. (Москва, Россия)
Недогода С. В. (Волгоград, Россия)
Ойроткинова О. Ш. (Москва, Россия)
Пекка Пуска (Хельсинки, Финляндия)
Подзолков В. И. (Москва, Россия)
Редько М. В. (Краснодар, Россия)
Скрипникова И. А. (Москва, Россия)
Толпыгина С. Н. (Москва, Россия)
Шляхто Е. В. (Санкт-Петербург, Россия)

Профессиональное образование

Заместитель главного редактора

Астанина С. Ю. (Москва, Россия)

Абдуганиева Д. И. (Казань, Россия)
Авдеева Е. А. (Красноярск, Россия)
Алисов Е. А. (Москва, Россия)
Андреева Н. Д. (Санкт-Петербург, Россия)
Ванчакова Н. П. (Санкт-Петербург, Россия)
Жарылкасынова Г. Ж. (Бухара, Узбекистан)

Кузнецова О. Ю. (Санкт-Петербург, Россия)
Мазуров В. И. (Санкт-Петербург, Россия)
Ниязов Л. Н. (Бухара, Узбекистан)
Плугина М. И. (Ставрополь, Россия)
Теремов А. В. (Москва, Россия)
Чумаков В. И. (Волгоград, Россия)

Редакция журнала

Заведующий редакцией

Минина Ю. В.

Корректор

Чекрыгина Л. Л.

Выпускающие редакторы

Родионова Ю. В.

Рыжов Е. А.

Рыжова Е. В.

Адрес редакции: 101990, Москва, Петроверигский пер., д. 10, стр. 3,
e-mail: cardiovasc.journal@yandex.ru, Тел. +7 (499) 553 67 78

Издатель: ООО "Силица-Полиграф", e-mail: cardio.nauka@yandex.ru
Тел. +7 (985) 768 43 18, www.rosradio.ru

Russian Society for Prevention
of Noncommunicable Diseases
Russian Society of Cardiology
National Medical Research
Center for Therapy
and Preventive Medicine

**Scientific peer-reviewed
medical journal**

Mass media registration certificate
ПИ № 77-11335 dated 30.11.2001

Open Access

The Journal is in the List of the leading
scientific journals and publications
of the Supreme Examination Board (VAK)

The Journal is included in Scopus, DOAJ,
Russian Science Citation Index (RSCI)

Complete versions of all issues are published:
www.elibrary.ru

Instructions for authors:
<https://cardiovascular.elpub.ru>

Submit a manuscript:
<https://cardiovascular.elpub.ru>

Subscription:
www.rosradio.ru/ru/subscription

United catalogue "Pressa of Russia":
42434 — for individual subscribers
42524 — for enterprises and organizations

For information on how to request permissions
to reproduce articles/information from this journal,
please contact with publisher

The mention of trade names, commercial products
or organizations, and the inclusion of advertisements
in the journal do not imply endorsement by editors,
editorial board or publisher

Periodicity: 12 issues per year

Circulation: 5 000 copies

Advertising and Distribution department
Guseva Anna
e-mail: guseva.silicea@yandex.ru

Translator
Kleschenogov A. S.

Design, desktop publishing
Dobrynina E. Yu.
Zvezdkina V. Yu.
Startsev D. S.

Printed: OneBook, Sam Poligraphist, Ltd.
129090, Moscow, Protopopovsky per., 6
www.onebook.ru

Font's license № 180397 or 21.03.2018

©CARDIOVASCULAR THERAPY AND PREVENTION

CARDIOVASCULAR THERAPY AND PREVENTION

founded in 2002

Vol.23 11'2024

Editor-In-Chief

Oxana M. Drapkina (Moscow, Russia)

Deputy Chief Editors

Elena Z. Golukhova (Moscow, Russia)
Yuri A. Karpov (Moscow, Russia)
Svetlana A. Shalnova (Moscow, Russia)

Editorial Board

Senior editor

Victoria A. Metelskaya (Moscow, Russia)

Executive Secretary

Natalia P. Kutishenko (Moscow, Russia)

Content Editors

Svetlana A. Berns (Moscow, Russia)
Alexandr Yu. Gorshkov (Moscow, Russia)
Anton R. Kiselev (Moscow, Russia)
Evgeny O. Taratukhin (Moscow, Russia)
Ruslan N. Shepel (Moscow, Russia)
Igor S. Yavelov (Moscow, Russia)

Maria V. Avksentieva (Moscow, Russia)
Josef S. Alpert (Tucson, Arizona, USA)
Victoria A. Badtieva (Moscow, Russia)
Sergey A. Boytsov (Moscow, Russia)
Marina G. Bubnova (Moscow, Russia)
Yuri I. Buziashvili (Moscow, Russia)
Yuri A. Vasyuk (Moscow, Russia)
Yan L. Grinshteyn (Krasnoyarsk, Russia)
Albert S. Galyavich (Kazan, Russia)
Maria G. Glezer (Moscow, Russia)
Vladimir M. Gorbunov (Moscow, Russia)
Yuri I. Grinshteyn (Krasnoyarsk, Russia)
Olga N. Dzhirova (Moscow, Russia)
Anna M. Kalinina (Moscow, Russia)
Zhanna D. Kobalava (Moscow, Russia)

Andrei L. Komarov (Moscow, Russia)
Anna V. Kontsevaya (Moscow, Russia)
Thomas Lüscher (London, The United Kingdom)
Mekhman N. Mamedov (Moscow, Russia)
Sergey Yu. Martsevich (Moscow, Russia)
David V. Nebieridze (Moscow, Russia)
Sergey V. Nedogoda (Volgograd, Russia)
Olga Sh. Oynotkina (Moscow, Russia)
Valery I. Podzolkov (Moscow, Russia)
Pekka Puska (Helsinki, Finland)
Michael V. Redko (Krasnodar, Russia)
Irina A. Skripnikova (Moscow, Russia)
Svetlana N. Tolpygina (Moscow, Russia)
Evgeny V. Shlyakhto (St. Petersburg, Russia)

Professional education

Deputy Chief Editor

Svetlana Y. Astanina (Moscow, Russia)
Diana I. Abduganieva (Kazan, Russia)
Elena A. Avdeeva (Krasnoyarsk, Russia)
Evgeny A. Alisov (Moscow, Russia)
Natalia D. Andreeva (St. Petersburg, Russia)
Nina P. Vanchakova (St. Petersburg, Russia)
Gauhar Zh. Zharylkasynova (Bukhara, Uzbekistan)

Olga Yu. Kuznetsova (St. Petersburg, Russia)
Vadim I. Mazurov (St. Petersburg, Russia)
Laziz N. Niyazov (Bukhara, Uzbekistan)
Maria I. Plugina (Stavropol, Russia)
Alexander V. Teremov (Moscow, Russia)
Vyacheslav I. Chumakov (Volgograd, Russia)

Editorial office

Editorial Assistant

Yulia V. Minina (Moscow, Russia)

Proofreader

Chekrygina L. L. (Moscow, Russia)

Managing editors

Rodionova Yu. V. (Moscow, Russia)
Ryzhov E. A. (Moscow, Russia)
Ryzhova E. V. (Moscow, Russia)

Address: Petroverigsky per., 10, str. 3; Moscow 101990, Russia
e-mail: cardioasc.journal@yandex.ru; +7 (499) 553 67 78

Publisher: Silicea-Poligraf, e-mail: cardio.nauka@yandex.ru
Tel. +7 (985) 768 43 18, www.rosradio.ru

Содержание

Вступительное слово

5

Передовая статья

Покровская М. С., Борисова А. Л., Киселева А. В.,
Ершова А. И., Мешков А. Н., Драпкина О. М.

6

Роль биобанкирования в развитии
персонализированной медицины в России
и в мире

Оригинальные статьи

Копылова О. В., Ершова А. И., Мешков А. Н.,
Покровская М. С., Ефимова И. А., Лимонова А. С.,
Блохина А. В., Серебрянская З. З., Сметнев С. А.,
Михайлина В. И., Мясников Р. П., Киселева А. В.,
Гарбузова Е. В., Метельская В. А., Борисова А. Л.,
Драпкина О. М.

17

Формирование коллекции биообразцов
в биобанке для решения задач
персонализированной медицины

Омельчук Е. П., Тимошкина Н. Н., Гвалдин Д. Ю.,
Петрусенко Н. А., Росторгуев Э. Е., Новикова И. А.,
Кит О. И.

29

Создание коллекции образцов плазмы для поиска
диагностических биомаркеров глиальных опухолей

Воробьев А. С., Донников М. Ю., Глотов О. С.,
Коваленко Л. В., Николаев К. Ю., Урванцева И. А.,
Дренина Ю. А., Морозкина А. В., Чернышева Г. Н.

37

Исследование маркеров транспорта и обмена
липопротеинов у больных инфарктом миокарда
в коллекции образцов крови лаборатории
"Биобанк Югры"

Семененко Т. А., Акимкин В. Г., Соломай Т. В.

44

Банк данных геномных последовательностей
патогенных микроорганизмов и его роль
в осуществлении эпидемиологического надзора

Балановская Е. В., Потанина А. Ю., Кошель С. М.,
Адамов Д. С., Евсюков И. В., Борисова А. Л.,
Покровская М. С., Мешков А. Н.

52

Технология оценки частот ДНК-маркеров
в многонациональных административных
единицах по данным о коренном народонаселении
в связи с заболеваемостью (на примере
сердечно-сосудистых заболеваний)

Барбитов Ю. А., Лазарева Т. Е., Насыхова Ю. А.,
Беспалова О. Н., Глотов А. С.

74

Использование масштабных коллекций образцов
для оценки частоты носительства вариантов,
связанных с невынашиванием беременности

Мальченкова А. А., Кособокова Е. Н.

80

Артефакты анализа при идентификации
клеточных линий методом профилирования
на основе коротких tandemных повторов

Практический опыт

Пачулия О. В., Илларионов Р. А., Вашукова Е. С.,
Постникова Т. Б., Мальцева А. Р., Попова А. К.,
Корнюшина Е. А., Беспалова О. Н., Глотов А. С.

92

Стратегии создания биоресурсных коллекций
в акушерстве: опыт Биобанка "Генофонд"

Contents

Address to the readers

Editorial

*Pokrovskaya M. S., Borisova A. L., Kiseleva A. V.,
Ershova A. I., Meshkov A. N., Drapkina O. M.*

Role of biobanking in the development of personalized
medicine in Russia and the world

Original articles

*Kopylova O. V., Ershova A. I., Meshkov A. N.,
Pokrovskaya M. S., Efimova I. A., Limonova A. S.,
Blokhina A. V., Serebryanskaya Z. Z., Smetnev S. A.,
Mikhailina V. I., Myasnikov R. P., Kiseleva A. V.,
Garbuzova E. V., Metelskaya V. A., Borisova A. L.,
Drapkina O. M.*

Biosample collection in a biobank to solve problems
of personalized medicine

*Omelchuk E. P., Timoshkina N. N., Gvaldin D. Yu.,
Petrusenko N. A., Rostorguev E. E., Novikova I. A.,
Kit O. I.*

Creation of a plasma collection for the search
of diagnostic biomarkers of glial tumors

*Vorobyov A. S., Donnikov M. Yu., Glotov O. S.,
Kovalenko L. V., Nikolaev K. Yu., Urvantseva I. A.,
Drenina Yu. A., Morozkina A. V., Chernysheva G. N.*

Lipoprotein transport and metabolism markers
in patients with myocardial infarction in the Biobank
of Yugra blood sample collection

Semenenko T. A., Akimkin V. G., Solomay T. V.

Databank of genomic sequences of pathogenic
microorganisms and its role in the implementation
of epidemiological surveillance

*Balanovskaya E. V., Potanina A. Yu., Koshel S. M.,
Adamov D. S., Evsyukov I. V., Borisova A. L.,
Pokrovskaya M. S., Meshkov A. N.*

Assessment of the frequency and association
with morbidity of DNA markers in multinational
administrative divisions based on indigenous population
data (based on cardiovascular diseases)

*Barbitov Yu. A., Lazareva T. E., Nasykhova Yu. A.,
Bespalova O. N., Glotov A. S.*

Use of large-scale sample collections to estimate
the carriage rate of miscarriage-related variants

Malchenkova A. A., Kosobokova E. N.

Artifacts of analysis in cell line identification
by short tandem repeat profiling

Practical experience

*Pachulia O. V., Illarionov R. A., Vashukova E. S.,
Postnikova T. B., Maltseva A. R., Popova A. K.,
Kornyushina E. A., Bespalova O. N., Glotov A. S.*

Strategies for bioresource collection in obstetrics:
the experience of the "Genofund" biobank

Приходько Е. М., Супильникова О. В.,
Масленникова И. В., Енукашвили Н. И.,
Котова А. В., Багаева В. В., Золина Т. Л.,
Конкина А. И., Яцемирский Г. С.
Создание банка клеточных культур: опыт Центра
клеточных технологий "Покровский"

Апалько С. В., Шиманский В. С., Кель А.,
Сушенцева Н. Н., Тюкавина Н. В., Коваленко С. А.,
Щербак С. Г.

Анализ возможности применения результатов
секвенирования транскриптома
при выборе лекарственной терапии
пациентов с колоректальным раком

Уланова П. В., Антоненко А. Н., Доморацкая Е. А.,
Белов Р. О., Золотопуп А. А., Леонова В. С.,
Криницына А. А., Беленикин М. С.

Влияние многоциклического замораживания-
оттаивания плазмы крови на результаты
проведения неинвазивного пренатального
тестирования

Обзоры литературы

Сотникова Е. А., Киселева А. В., Мешков А. Н.
Влияние условий хранения плазмы и сыворотки
на уровни циркулирующих микроРНК

Гусакова А. М., Кравченко Е. С., Суслова Т. Е.,
Попов С. В., Бощенко А. А.
Биобанки в исследованиях сердечно-сосудистых
заболеваний

Сотникова Е. А., Киселева А. В., Мешков А. Н.
Факторы преаналитического этапа, влияющие
на уровни циркулирующих микроРНК плазмы
и сыворотки крови

Жарикова А. А., Вяткин Ю. В., Киселева А. В.,
Мешков А. Н.
Биоинформатический подход к обработке данных
высокопроизводительного секвенирования
молекул малых РНК

97 Prikhodko E. M., Supilnikova O. V.,
Maslennikova I. V., Yenukashvili N. I.,
Kotova A. V., Bagaeva V. V., Zolina T. L.,
Konkina A. I., Yatsemirsky G. S.
Creation of a cell culture bank: experience
of the Pokrovsky Cell Technology Center

108 Apalko S. V., Shimansky V. S., Kel A.,
Sushentseva N. N., Tyukavina N. V.,
Kovalenko S. A., Shcherbak S. G.
Potential of using transcriptome sequencing data
in choosing therapy for patients with colorectal
cancer

117 Ulanova P. V., Antonenko A. N., Domoratskaya E. A.,
Belov R. O., Zolotopup A. A., Leonova V. S.,
Krinitzyna A. A., Belenikin M. S.
Effect of multiple plasma freeze-thaw cycles
on non-invasive prenatal testing

Literature reviews

126 Sotnikova E. A., Kiseleva A. V., Meshkov A. N.
Effect of plasma and serum storage conditions
on circulating microRNA levels

136 Gusakova A. M., Kravchenko E. S., Suslova T. E.,
Popov S. V., Boshchenko A. A.
Biobanks in cardiovascular disease research

150 Sotnikova E. A., Kiseleva A. V., Meshkov A. N.
Preanalytical factors affecting the plasma and serum
levels of circulating microRNAs

160 Zharikova A. A., Vyatkin Yu. V., Kiseleva A. V.,
Meshkov A. N.
Bioinformatics approach to processing data from
high-throughput sequencing of small RNA
molecules

Ответственный редактор номера: Метельская В. А. (Москва)

Executive editor of the issue: Victoria A. Metelskaya (Moscow)



текст доступен в электронной версии
text is available in electronic version

Уважаемые читатели,

биобанкирование — важный элемент инфраструктуры современных биомедицинских исследований, который требует высококвалифицированных специалистов. Наш журнал традиционно и ежегодно готовит свой одиннадцатый номер, целиком посвященный задачам биобанкирования, и этот выпуск, который вы сейчас читаете, — уже пятый!

Биобанкирование вносит значительный вклад в развитие персонализированной медицины в России и в мире. В обзоре *Покровской М. С. и др.* на конкретных примерах показано, что современные биобанки стали необходимой структурой, способной накапливать, хранить и использовать биобразцы и связанные с ними данные в необходимом количестве для проведения генетических исследований в России и в мире. На основании собранных коллекций и баз данных с ассоциированной клинической информацией в биобанках, созданных в разных странах, проводят различные масштабные генетические исследования. Эффективность генетических разработок напрямую зависит от количества биобанков, от развития сотрудничества между ними в рамках консорциумов, от возможности совместного использования цифровых платформ, объединяющих базы данных.

В номер вошли семь оригинальных статей, описывающих новейшие научные достижения. Например, *группой экспертов* разработаны 15 коллекций биобразцов пациентов с редкими и представляющими научный интерес клиническими ситуациями для решения задач персонализированной медицины. Предлагаемый подход позволяет решать широкий спектр клинических и научно-практических задач: это своевременная постановка или уточнение диагноза; формирование когорт пациентов для изучения генетических аспектов заболеваний; выявление новых генетических вариантов наследственных заболеваний; разработка генети-



ческих диагностических панелей; изучение редких заболеваний; сокращение времени для создания выборки пациентов при возникновении новой научной идеи.

В четырех статьях представлен и объединен в одноименном разделе практический опыт научных коллективов.

Обзорные статьи посвящены влиянию условий хранения плазмы и сыворотки крови на уровни циркулирующих микроРНК, факторам преаналитического этапа, влияющим на правильность определения их концентрации в плазме и сыворотке, биоинформатическому подходу к обработке данных высокопроизводительного секвенирования молекул малых РНК, роли биобанков в исследованиях сердечно-сосудистых заболеваний.

Приятного чтения,
Главный редактор,
д.м.н., профессор, академик РАН
Драпкина Оксана Михайловна

Роль биобанкирования в развитии персонализированной медицины в России и в мире

Покровская М.С., Борисова А.Л., Киселева А.В., Ершова А.И., Мешков А.Н., Драпкина О.М.

ФГБУ "Национальный медицинский исследовательский центр терапии и профилактической медицины" Минздрава России.
Москва, Россия

Для внедрения в практическое здравоохранение современного персонализированного подхода к лечению многих патологических состояний необходимо развитие новейших биомедицинских технологий и проведение генетических исследований. Изучение распространенности генетических факторов риска развития различных заболеваний, генов лекарственной устойчивости, разработка генетических панелей для определения индивидуального риска развития патологий, а также создание шкал генетического риска, требуют анализа большого количества данных. В обзоре на конкретных примерах показано, что современные биобанки стали необходимой структурой, способной накапливать, хранить и использовать биообразцы и связанные с ними данные в необходимом количестве для проведения генетических исследований в России и в мире. На основании собранных коллекций и баз данных с ассоциированной клинической информацией в биобанках, созданных в разных странах, проводят различные масштабные генетические исследования. Эффективность генетических разработок, в частности, для ранней диагностики заболеваний, прямо зависит от количества биобанков, от развития сотрудничества между ними в рамках консорциумов, от возможности совместного использования

цифровых платформ, объединяющих базы данных. Биобанки и биобанкирование стали основой для развития персонализированной медицины.

Ключевые слова: биобанк, биобанкирование, генетические исследования, персонализированная медицина, секвенирование, шкалы генетического риска.

Отношения и деятельность: нет.

Поступила 25/09-2024

Рецензия получена 22/10-2024

Принята к публикации 26/10-2024



Для цитирования: Покровская М.С., Борисова А.Л., Киселева А.В., Ершова А.И., Мешков А.Н., Драпкина О.М. Роль биобанкирования в развитии персонализированной медицины в России и в мире. *Кардиоваскулярная терапия и профилактика*. 2024; 23(11):4214. doi: 10.15829/1728-8800-2024-4214. EDN PTPSGI

Role of biobanking in the development of personalized medicine in Russia and the world

Pokrovskaya M. S., Borisova A. L., Kiseleva A. V., Ershova A. I., Meshkov A. N., Drapkina O. M.
National Medical Research Center for Therapy and Preventive Medicine. Moscow, Russia

To implement a modern personalized approach in practical healthcare, the latest biomedical technologies should be developed and genetic research should be performed. The analysis of a substantial quantity of data is essential for the investigation of the prevalence of genetic risk factors for various diseases, drug resistance genes, the development of genetic panels to determine the individual risk of pathologies, as well as the creation of genetic risk scores. The review demonstrates through the use of illustrative examples that contemporary biobanks have become a vital component in the field of genetics research, both in Russia and globally. These specialized institutions are capable of accumulating, storing, and utilizing a substantial quantity of biological samples and related data, which is essential for advancing genetic research. The data collected in biobanks and associated clinical information form the basis for large-scale genetic studies conducted in different countries. The efficacy of genetic advancements, such

as the early diagnosis of diseases, is contingent upon the number of biobanks, the establishment of collaborative networks among them, and the capacity to leverage digital platforms uniting diverse databases. Biobanks and biobanking have emerged as the foundation for the advancement of personalized medicine.

Keywords: biobank, biobanking, genetic research, personalized medicine, sequencing, genetic risk score.

Relationships and Activities: none.

Pokrovskaya M. S. ORCID: 0000-0001-6985-7131, Borisova A. L.* ORCID: 0000-0003-4020-6647, Kiseleva A. V. ORCID: 0000-0002-7876-9325, Ershova A. I. ORCID: 0000-0001-7989-0760, Meshkov A. N. ORCID: 0000-0001-5989-6233, Drapkina O. M. ORCID: 0000-0002-4453-8430.

*Автор, ответственный за переписку (Corresponding author):

e-mail: a.borisova0108@gmail.com

[Покровская М.С. — к.б.н., в.н.с. лаборатории "Банк биологического материала" Института персонализированной терапии и профилактики, ORCID: 0000-0001-6985-7131, Борисова А.Л.* — н.с., руководитель лаборатории "Банк биологического материала" Института персонализированной терапии и профилактики, ORCID: 0000-0003-4020-6647, Киселева А.В. — в.н.с., к.б.н., руководитель лаборатории "Молекулярной генетики" Института персонализированной терапии и профилактики, ORCID: 0000-0002-7876-9325, Ершова А.И. — д.м.н., зам. директора по фундаментальной науке, руководитель лаборатории клиномики, ORCID: 0000-0001-7989-0760, Мешков А.Н. — д.м.н., руководитель Института персонализированной терапии и профилактики, ORCID: 0000-0001-5989-6233, Драпкина О.М. — д.м.н., профессор, академик РАН, директор, ORCID: 0000-0002-4453-8430].

*Corresponding author: a.borisova0108@gmail.com

Received: 25/09-2024

Revision Received: 22/10-2024

Accepted: 26/10-2024

For citation: Pokrovskaya M. S., Borisova A. L., Kiseleva A. V., Ershova A. I., Meshkov A. N., Drapkina O. M. Role of biobanking in the development of personalized medicine in Russia and the world. *Cardiovascular Therapy and Prevention*. 2024;23(11):4214. doi: 10.15829/1728-8800-2024-4214. EDN PTPSGI

АКШ — аортокоронарное шунтирование, ВНП — вариант нуклеотидной последовательности, ДНК — дезоксирибонуклеиновая кислота, ИБС — ишемическая болезнь сердца, РНК — рибонуклеиновая кислота, СД — сахарный диабет, ССЗ — сердечно-сосудистые заболевания, ШГР — шкала генетического риска, ЭДТА — этилендиаминтетрауксусная кислота, ЭССЕ-РФ — Эпидемиология сердечно-сосудистых заболеваний в регионах Российской Федерации, СКВ — China Kadoorie Biobank, COVID-19 — COrona Virus Disease 2019, GWAS — genome-wide association study, UKB — UK Biobank, WGS — whole genome sequencing.

Ключевые моменты

Что известно о предмете исследования?

- Медико-генетические исследования, направленные на выявление генетической обусловленности или предрасположенности к заболеваниям, стали актуальны в последнее время в связи с тенденцией к развитию персонализированной медицины.
- Создание биобанков и сетей биобанков в различных областях биомедицины — современные инструменты, повышающие эффективность и качество научных исследований.

Что добавляют результаты исследования?

- В обзоре обобщены данные многочисленных публикаций на тему проведения генетических исследований на основе коллекций биообразцов и баз данных биобанков. Описана роль российских биобанков в развитии этого направления. Именно благодаря биобанкам проведены масштабные проекты, позволяющие создавать шкалы генетического риска развития заболеваний, диагностические системы, получать данные об ассоциациях генетических вариантов с патологическими состояниями — реализовывать персонализированные подходы к медицине.

Key messages

What is already known about the subject?

- Medical genetic research aimed at identifying genetic conditioning or predisposition to diseases has become relevant recently due to the trend towards personalized medicine.
- Establishment of biobanks and biobank networks in various fields of biomedicine are modern tools that increase the efficiency and quality of scientific research.

What might this study add?

- The review summarizes the data of numerous publications on genetic research based on biosample collections and biobank databases. The role of Russian biobanks in the development of this area is described. It is due to biobanks that large-scale projects have been carried out, allowing to create genetic risk scores, diagnostic systems, to obtain data on associations of genetic variants with pathological conditions in order to implement personalized approaches to medicine.

Введение

Роль биобанков в проведении современных биомедицинских исследований определилась как важнейшая в связи с тем, что именно биобанки предоставляют исследователям необходимое количество биоматериала высокого качества в сочетании с обширной и накапливающейся со временем информацией, сопровождающей образцы. Применение технологии биобанкирования значительно увеличивает надежность и воспроизводимость результатов исследований, делает возможным проведение масштабных проектов [1].

Возникают биобанки различных типов, развиваются способы их взаимодействия между собой и с научно-медицинским сообществом, уже существуют и планируются объединения биобанков в сети с созданием централизованных баз данных. В настоящее время развитие генетических исследований, новейших технологий и подходов

к решению различных биомедицинских задач, как диагностических, прогностических, так и терапевтических, стало чрезвычайно актуальным и многообещающим направлением, призванным вывести медицину на новый персонализированный уровень. Биобанки и биобанкирование становятся основой для этого развития. Поэтому от того, как эффективно развивается биобанкирование, зависит и успех генетических исследований на национальном и мировом уровне.

Можно выделить несколько ключевых современных направлений молекулярно-генетических исследований в области медицины, в которых успешно используются ресурсы биобанков:

- популяционные исследования, направленные на изучение распространенности генетических факторов риска развития различных заболеваний, генов лекарственной устойчивости, создание шкал генетического риска;

- поиск генетических маркеров различных заболеваний для ранней диагностики;
- разработка генетических панелей (тест-систем) с целью определения индивидуального риска развития патологий для внедрения в практическое здравоохранение и развития персонализированной медицины;
- разработка тест-систем для дифференциальной и ранней диагностики моногенных заболеваний;
- разработка неинвазивных методов диагностики онкологических заболеваний, пренатальной диагностики патологий плода.

Для проведения генетических исследований с использованием разных методов наиболее часто в биобанках формируют коллекции биоматериала следующих типов: цельная кровь с этилендиаминтетрауксусной кислотой (ЭДТА), плазма крови с ЭДТА, ткани, клетки, кал.

Важное значение для проведения генетических исследований имеют размеры выборок [2]. Для изучения распространенности в популяциях вариантов нуклеотидной последовательности (ВНП), ответственных за различные патологические состояния, необходимы большие репрезентативные выборки. Для изучения генетической предрасположенности к заболеваниям, генетически обусловленных заболеваний, в частности, многофакторных, таких как атеросклероз, артериальная гипертония и др., а также для подтверждения участия генов-кандидатов в развитии определенных патологий, необходимо по критериям включения постепенно набирать биоматериал и клиническую информацию от большого количества пациентов (ориентировочно от 1 до 10 тыс. человек). Делать это возможно исключительно с помощью технологии биобанкирования, которая позволяет собрать и хранить необходимое количество качественного биоматериала и информации для подтверждения связи экспрессии комплекса генов и фенотипа человека.

На основе коллекций и баз данных с ассоциированной клинической информацией современных биобанков проводят масштабные генетические исследования. Тенденция к объединению биобанков в сети способствует повышению эффективности научных исследований, связанных с генетическими разработками и их внедрением в практическое здравоохранение.

Цель обзора — анализ вклада биобанков в реализацию различных генетических исследований в России и в мире для развития персонализированной медицины.

Методологические подходы

Поиск литературных источников для обзора проводился на русском и английском языках в базах данных eLIBRARY и PubMed, при этом рас-

сматривалась литература, преимущественно опубликованная не ранее 2019г. Поиск проводился по ключевым словам, представленным в статье. Для написания обзора было выбрано 60 полнотекстовых оригинальных статей.

Результаты

Мировая практика участия биобанков в генетических исследованиях

Актуальность развития медико-генетических исследований неуклонно возрастает в связи с внедрением в практику здравоохранения персонализированного подхода к диагностике, профилактике и лечению заболеваний человека.

Направления генетических исследований, тесно связанных и даже зависимых от биобанков, их баз данных и наличия необходимых образцов, достаточно подробно представлены в обзоре Лазаревой Т. Е. и др. [1]. Собранные в масштабах биобанков генетические данные позволяют определять популяционные частоты генетических вариантов. Сбор информации об аллельной частоте был одним из первых мотивов для создания биобанков и коллекций генетических данных. Популяционные аллельные частоты особенно важны для молекулярной диагностики наследственных заболеваний и интерпретации результатов секвенирования следующего поколения (next generation sequencing, NGS) клиническими генетиками. Хранящиеся в биобанках коллекции генотипированных биобразцов могут быть использованы исследователями в различных видах высокопроизводительных анализов, в т.ч. в качестве внешнего контроля при проведении полногеномного поиска ассоциаций (GWAS, genome-wide association study) для редких и распространенных заболеваний. Данные полногеномного секвенирования (WGS, whole genome sequencing), имеющиеся в биобанках, могут быть использованы для создания панелей референсных генотипов [3].

Информация, собранная в биобанках, включая данные анкетирования, клинических обследований, физических измерений, больших баз данных из национальных реестров здоровья, является платформой для выявления генетических ассоциаций с заболеваниями. Результаты таких исследований позволяют разрабатывать шкалы генетического риска (ШГР). Внедрение ШГР в клиническую практику для прогнозирования индивидуального риска является основой современной персонализированной медицины [4].

В целом биобанкирование активно способствует переходу к точной (персонализированной) медицине. Развивается геномно-информированный подход к лечению при взаимодействии врача и пациента путем обсуждения геномных результатов с интерпретацией специалиста.

Биобанк Великобритании (UKB, UK Biobank)¹ является наиболее активно используемым биобанком в области геномных исследований человека. UKB — это большая проспективная популяционная пополняемая база данных, открытая для мирового научного сообщества, в т.ч. для изучения возникновения и развития заболеваний среди лиц среднего и пожилого возраста. В период 2006–2010 гг. были собраны биообразцы и первичные данные 500 тыс. жителей Великобритании в возрасте 40–69 лет. До настоящего времени генетические данные (экзомных, полногеномных исследований) UKB широко используются для GWAS [5], выявления ассоциаций на уровне фенома (PheWAS) [6], ассоциативных [7] и проспективных [8] исследований, менделевской рандомизации [9]. Причем реализуется поиск генетической обусловленности самых разных патологических состояний и их сочетаний. Так, например, были получены данные о связи более короткой длины теломер лейкоцитов с повышенным риском развития деменции и болезни Альцгеймера [8]. В другой работе показано, что при наличии генетической предрасположенности к деменции возрастает риск сердечно-сосудистых заболеваний (CC3) [10]. Актуальное масштабное исследование показало значимую связь между генетической предрасположенностью к пассивному образу жизни и повышенным риском депрессии [9]. Изучение плейотропного действия генов дало новое представление о генетической связи между мигренью и другими заболеваниями [6].

FinnGen² — это совместный проект университетов, медицинских клиник и биобанков Финляндии, собравший генотип-фенотипные данные 392 тыс. участников. Этот биобанк активно сотрудничает по генетическим направлениям с другими биобанками в мире. После годичного эмбарго сводная статистика GWAS публикуется в открытом доступе на сайте проекта.

В совместном проекте UKB и FinnGen результаты GWAS по тысячам фенотипов находятся в открытом доступе для научного сообщества. Общедоступность таких данных позволяет проводить широкомасштабные PheWAS и выявлять плейотропные гены, влияющие на несколько признаков или заболеваний [11]. Одним из примеров полученных результатов является недавнее выявление генетических предикторов осложнений ожирения: стеатоза, цирроза, гепатоцеллюлярной карциномы [12].

LifeLines³ — биобанк и многопоколенное когортное исследование жителей северной части Нидерландов, целью которого является изучение

здорового старения и этиологии хронических заболеваний, актуальных для европейского населения. Каждые полтора года участники заполняют анкету и каждые 5 лет приглашаются на медицинское обследование. Одно из направлений генетических исследований, связанных с изучением ассоциаций заболеваний с составом микробиоты кишечника, проводят в рамках когортного исследования Digestive Health, являющегося частью проекта LifeLines. Среди прочих получены данные о влиянии микробиома кишечника человека на регуляцию белков крови, связанных с CC3 [13].

Интересным примером разнообразия направлений генетических исследований, основанных на коллекциях биобанков, является применение близнецового метода в Karolinska Biobank⁴, который был создан в 2004 г. в Каролинском институте в Швеции. Когорта TwinGene включает фенотипические данные и биологические образцы близнецов, родившихся до 1958 г. [14].

Японский биобанк (BioBank Japan, BBJ)⁵ также предоставляет доступ к масштабным геномным данным для выявления ассоциаций генов и вариантов с распространенными заболеваниями. Данные о ВВП доступны примерно для 200 тыс. участников. Объединенные данные WGS из ориентированной на заболевания когорты BBJ и популяционной когорты ТоММО позволили создать GEM-J WGA — общедоступную панель частот вариантов для японской популяции [15].

Китайский биобанк Кадори (China Kadoorie Biobank, СКВ)⁶ — это совместное когортное исследование хронических заболеваний, вклад которых в смертность и инвалидность среди китайцев в последнее время существенно возрос. В СКВ получены масштабные данные генотипирования более чем 100 тыс. участников. В настоящее время проводится WGS всей когорты, анализируются метаболиты и результаты метилирования дезоксирибонуклеиновой кислоты (ДНК). Имеющиеся результаты уже позволили провести крупномасштабные GWAS для популяций неевропейского происхождения [16].

Еще один известный восточноазиатский биобанк был создан на Тайване (Taiwan Biobank, TWB)⁷ в 2012 г. Формируемая когорта представляет структуру населения и включает граждан в возрасте 20–70 лет. TWB расширяет информационное сопровождение сбором медицинских данных об участниках

¹ UK Biobank. <https://www.ukbiobank.ac.uk/> (19 September 2024).

² FinnGen Biobank. <https://www.finnngen.fi/en> (19 September 2024).

³ LifeLines Biobank. <https://www.lifelines-biobank.com/> (19 September 2024).

⁴ KI Biobank Core Facility (KIBB). <https://ki.se/en/research/research-infrastructure-and-environments/core-facilities-for-research/ki-biobank-core-facility-kibb> (19 September 2024).

⁵ BioBank Japan (BBJ). <https://biobankjp.org/en/> (19 September 2024).

⁶ China Kadoorie Biobank (CKB). <https://www.ckbiobank.org/> (19 September 2024).

⁷ Taiwan Biobank (TWB). <https://taiwanview.twbiobank.org.tw/about.php> (19 September 2024).

проекта каждые 2-4 года и делится результатами геномных исследований на веб-сайте Taiwan View.

Национальный биобанк Кореи (National Biobank of Korea, NBK)⁸ — платформа биобанков (Корейское исследование генома и эпидемиологии (KoGES), Корейское национальное обследование здоровья и питания), в которой хранятся образцы и база данных популяционных когорт, а также региональных больничных коллекций (от 439602 и 612185 участников, соответственно). На основе крупномасштабных данных NBK был разработан и оптимизирован массив генотипирования для идентификации вариаций, связанных с особенностями корейской популяции [17].

Бангладешский биобанк атеросклероза собрал коллекцию ДНК и провел исследование ассоциаций по всему геному (GWAS) для выявления генетических факторов риска, связанных с ишемической болезнью сердца (ИБС) у пациентов, перенесших операцию аортокоронарного шунтирования (АКШ). Выявление новых локусов генов у пациентов с АКШ призвано помочь обнаружить специфические терапевтические мишени для пациентов с ИБС в Бангладеш, разработать национальные рекомендации по лечению ИБС и повысить стандарты здравоохранения в стране [18].

Еще одна сложная задача — исследование редких заболеваний, где систематизированный доступ к данным по клиническому фенотипу, геномным данным, а также к биоматериалу может быть существенно ограничен. Объединение данных нескольких учреждений позволяет получать более полное представление о заболевании и интересующей популяции пациентов, корректно сравнивать и анализировать полученные результаты исследований и делать новые выводы. Финансируемый Седьмой рамочной программой Европейского союза в рамках Международного консорциума по исследованию редких заболеваний (IRDiRC), RD-Connect является глобальным инфраструктурным проектом, начатым в ноябре 2012г, который связывает геномные данные с реестрами, биобанками и инструментами клинической биоинформатики для создания центрального исследовательского ресурса по редким заболеваниям [19].

Таким образом, краткий обзор направлений развития генетических исследований показывает неразрывную связь достижений в области изучения генетики заболеваний человека с ресурсами биобанков в мире.

Развитие генетических исследований на основе биобанков в России

В настоящее время наблюдается стремительный рост количества российских биобанков, свя-

занных с формированием коллекций биоматериала для проведения научных исследований. В 2018г была создана Национальная ассоциация биобанков и специалистов по биобанкированию — НАСБИО [20]. К настоящему времени в нее вошли 43 ведущих научно-медицинских организации, организовавших биобанки различного профиля.

За последние десятилетия значительно увеличилось количество данных о генетических механизмах развития многих распространенных заболеваний, можно наблюдать и значительное ускорение внедрения генетических методов диагностики в клиническую практику. Для поиска генетических полиморфизмов, которые вносят вклад в развитие тех или иных заболеваний, проводятся GWAS [3]. Значительное число GWAS, как было показано выше, основываются на полученных в биобанках генетических данных пациентов. Информационные технологии позволяют обрабатывать все большие объемы данных, что открывает возможности для запуска все более масштабных проектов с использованием ресурсов биобанков и их объединений.

Примеры российских биобанков, обеспечивающих проведение генетических исследований

Биобанк ФГБУ "НМИЦ ТПМ" Минздрава России (далее Биобанк НМИЦ ТПМ) был организован в 2014г по мировым стандартам международной организации ISBER (International Society for Biological and Environmental Repositories). К настоящему времени в нем собрана и активно используется коллекция биоматериала (цельная кровь, сыворотка крови, плазма крови с ЭДТА и с цитратом натрия) >880 тыс. образцов от ~100 тыс. человек. Биобанк является исследовательским, популяционным, нозологическим. С помощью Биобанка НМИЦ ТПМ реализуются все научно-медицинские проекты, связанные с использованием биоматериала. Стандартизованный преаналитический этап, надежное хранение биообразцов в необходимых условиях обеспечивают возможность эффективного качественного проведения исследований, в т.ч. проспективных и генетических [21].

Использование технологии биобанкирования, сбор масштабных коллекций биоматериала в рамках проекта "Интересные случаи в клинике НМИЦ ТПМ", эпидемиологического исследования ЭССЕ-РФ (Эпидемиология сердечно-сосудистых заболеваний в регионах Российской Федерации) и других научных проектов Центра дали возможность провести различные генетические исследования, в т.ч. с целью разработки и внедрения в медицинскую практику диагностических тестов для ранней диагностики и обнаружения рисков развития заболеваний. В работе 2019г были описаны аспекты работы биобанка, дающего возможность развивать направление персонализированной медицины в крупном медицинском центре. К настоя-

⁸ National Biobank of Korea (NBK). <https://biobank.nih.go.kr/cadaver/cmm/main/engMainPage.do?jsessionid=86000B10837C5F7E29D98D4A6DB04E5A> (19 September 2024).

шему времени наличие биобанка стало платформой для создания в ФГБУ "НМИЦ ТПМ" Минздрава России Института персонализированной терапии и профилактики. Материал, собранный в рамках трех этапов крупномасштабного эпидемиологического проекта ЭССЕ-РФ, основанный на обследовании представительной выборки из 41 региона РФ, послужил основой для большого количества научных исследований. Проспективное наблюдение за когортой, сформированной из участников одномоментных исследований, позволяет изучать вклад факторов риска развития заболеваний и их биохимических маркеров в выживаемость в РФ, а также оценить целесообразность дополнения ШГР новыми биомаркерами [22–24].

Помимо исследований, связанных с изучением распространенности хронических неинфекционных заболеваний и факторов риска их развития в российской популяции, собранный биоматериал и база данных позволяют проводить генетические исследования, связанные с изучением распространенности ВНП, ассоциированных с развитием различных заболеваний. Так, на основе популяционной коллекции ЭССЕ-РФ были проведены исследования по распространенности гетерозиготной семейной гиперхолестеринемии [25], дисбеталипопротеидемии [26], а также определение частоты носительства таких заболеваний, как муковисцидоз, фенилкетонурия, дефицит α -1-антитрипсина и нейросенсорная тугоухость [27–29]. Кроме того, была выявлена распространенность известных патогенных и новых или редких ВНП усечения белка (protein-truncating) в полном наборе генов ACMG59 [30]. В рамках других исследований с использованием разных коллекций Биобанка НМИЦ ТПМ были охарактеризованы спектры генетических вариантов таких заболеваний, как ИБС [31], семейная гиперхолестеринемия [32], некомпактный миокард левого желудочка [33–38].

Важным аспектом является расширение базы данных результатами новых исследований, выполненных на собранном биоматериале, а также возможность проведения проспективных исследований, позволяющих отслеживать состояние здоровья участников проекта и оценивать конечные точки. На таком обширном материале можно разрабатывать ШГР, которые служат основным инструментом современной генной диагностики. Они формируются преимущественно на основании результатов GWAS крупномасштабных исследований с участием сотен тысяч пациентов, в которых анализируются миллионы ВНП. Масштабы генетических исследований, а вместе с ними и предсказательная точность ШГР, постоянно увеличиваются. Накоплено значительное количество научных данных, демонстрирующих повышение эффективности профилактических мероприятий при исполь-

зовании ШГР для стратификации риска. В группах высокой наследственной предрасположенности возможно реализовать более раннее интенсивное профилактическое вмешательство. Определяющую роль в реализации этого направления играют биобанки и развитие биобанкирования, обеспечивающие единые стандарты сбора и хранения биобразцов необходимого количества и качества [39]. В этой связи развивается отдельное направление исследований — валидация ШГР различных заболеваний на российской популяции: ожирение [40], сахарный диабет (СД) 2 типа [41], остеопороз [42], артериальная гипертензия [43], ИБС [44], а также поиск и репликация ассоциаций вариантов генома с уровнями липидов в выборке из представителей российской популяции [3].

Новым направлением стало пилотное исследование по изучению ассоциации уровней микроРНК (рибонуклеиновая кислота) плазмы крови с различной выраженностью коллатерального кровообращения при хронической окклюзии коронарной артерии у пациентов с ИБС [45].

Приведенные примеры наглядно демонстрируют высокую востребованность собранного биоматериала от репрезентативной выборки населения регионов России для генетических исследований.

Биобанк Северной Евразии. По мере развития персонализированной и геномной медицины популяционно-генетические исследования начинают играть все более важную роль в сфере здравоохранения. Деятельность популяционных биобанков не ограничивается сферой фундаментальной науки: популяционная генетика накапливает данные и о генетических маркерах, ассоциированных с заболеваниями, об их частоте в разных популяциях. Популяционные биобанки могут использоваться в медицине для формирования контрольных выборок при изучении различных заболеваний, для оценки в разных группах населения частот генетических маркеров, ассоциированных с заболеваниями или воздействием лекарственных средств [46–48].

Важным шагом перехода к персонализированной медицине служит "персонализированная медицина популяций". Если пациенты происходят из определенной популяции, то их индивидуальные геномы отражают и особенности популяционного генофонда, т.к. популяции различаются по частотам аллелей, ассоциированных с заболеваниями. Каталог ассоциаций с заболеваниями показывает, что 35% геномных вариаций не являются общими для населения даже в пределах одного континента [47]. Проект "1000 геномов" выявил необходимость организации региональных биобанков.

На базе Биобанка Северной Евразии выполнены различные исследования. Изучение распространенности онкогена *MDM2* было проведено авторами вместе с норвежскими коллегами. В работе сле-

лан вывод, что популяционные частоты SNP285C важны при оценке риска развития определенных видов рака в популяции.

На коллекции биобанка коренного населения Северной Евразии изучают полиморфизмы генов биотрансформации ксенобиотиков I и II, генов репарации ДНК для исследований генетической адаптации популяций, для анализа подверженности коренного населения мультифакториальным заболеваниям, в т.ч. заболеваниям сердечно-сосудистой системы и т.д. Формирование референсных баз данных для ДНК-идентификации возможно также только с использованием коллекций популяционных биобанков.

Для дальнейшего развития популяционных биобанков России необходимо интенсивно пополнять коллекции репрезентативными выборками, проводить молекулярно-генетические исследования и биоинформатический анализ, расширяя базу данных. Потенциал использования биобанков как ресурсов информации о генофондах будет постоянно расти, способствуя развитию как фундаментальных исследований, так и прикладных медицинских направлений, в т.ч. персонализированной медицины.

РФ является крупнейшей и одной из самых этнически разнообразных стран в мире. Проект "Геном России" объединяет усилия разных биобанков и направлен на проведение полного геномного секвенирования и анализа народов России, которые являются носителями как известных, так и новых генетических вариантов адаптивного, клинического и функционального значения. В исследовании 2020г представлены результаты популяционно-специфической геномной изменчивости в России, важные для медицинской генетики [49].

Совместный генетический проект Биобанка Санкт-Петербургского государственного университета и Биобанка НМИЦ ТПМ дал мощный толчок проекту изучения генетической основы развития СД 2 типа. Исследование было посвящено открытию новых генных мишеней, связанных с ожирением и СД 2 типа. Было обнаружено несколько высокоспецифичных для конкретного случая вариантов в генах, ранее напрямую несвязанных с СД 2 типа и/или ожирением (например, *TMC8*, *PCDH1*, *PLEKHA5*, *HBQ1*, *VAV3* и *ADAMTS13*). Фармакогенетические открытия могут помочь в выявлении новых лекарственных мишеней, разработать алгоритм для персонализированного подхода к лечению СД 2 типа [1, 50].

С использованием коллекции биоматериала и базы данных Биобанка ФГБНУ "НИИ акушерства, гинекологии и репродуктологии им. Д. О. Отта" проводят приоритетные исследования генетической предрасположенности к осложнениям течения беременности [51]. В работе этого коллектива с использованием коллекций биоматериала Биобанка

в проспективном исследовании микроРНК в плазме крови в течение 1-го и 2-го триместров у беременных женщин с высоким риском преждевременных родов показали, что профиль микроРНК на ранних сроках беременности может предсказывать высокий риск преждевременных родов [52].

Важным аспектом в успехах современной медицинской генетики является возможность взаимодействия мировых биобанков. Российские исследователи провели систематическое сравнение сводной статистики GWAS для 679 сложных признаков в когортах UKB и FinnGen и продемонстрировали эффективность объединения данных крупных биобанков [53]. В следующем исследовании авторы собрали и проанализировали сводную статистику GWAS из когорты FinnGen и UKB по 24 осложнениям беременности. Было обнаружено 6 локусов, достигающих общегеномной значимости в мета-анализе для гипертонии беременных, гестационного СД и преждевременных родов. Анализ результатов GWAS выявил также причинно-следственную связь между экспрессией генов в шейке матки и гестационной АГ, а также известные и ранее неохарактеризованные генетические корреляции между осложнениями беременности и другими признаками. Для того, чтобы получить представление о молекулярных путях и отдельных генах, связанных с осложнениями течения беременности, включая наиболее изученные из них: преэклампсию, гестационный СД, преждевременные роды и отслойку плаценты, были использованы общедоступные базы данных (каталог GWAS Национального института исследований генома человека, HuGE Navigator и набор генетических и фенотипических данных UKB). Проведенный анализ позволил выделить центральные молекулярные пути для признаков, связанных с беременностью, и предполагает необходимость использования более точных и сложных стратегий анализа ассоциаций для надежного определения генетических факторов риска осложнений беременности [54].

Пандемия COVID-19 (COrona Virus Disease 2019) привлекла внимание многих исследователей к теме взаимодействия между геномами вируса и человека. Было проведено множество исследований для выявления генетических факторов риска, которые предсказывают тяжесть и исход COVID-19. Однако такой анализ был затруднен в когортах ограниченного размера и/или в случае ограниченной широты покрытия генома. В следующей работе авторы попытались обойти эти проблемы путем поиска генов-кандидатов и генетических вариантов, связанных с различными количественными и бинарными признаками в когорте из 840 пациентов с COVID-19 из России, собранной в Биобанке СПб ГБУЗ Городская Больница № 40. Хотя ассоциаций на уровне отдельных генов с тяжестью и исходом за-

болевание обнаружить не удалось, было показано, что 11 независимых локусов-кандидатов связаны с количественными признаками у пациентов с COVID-19. Один из выявленных вариантов был успешно подтвержден в независимом исследовании, а три варианта оказались связанными с количественными признаками, согласно данным UKB. Более того, показано, что оценка риска, основанная на этих вариантах, может предсказать тяжесть и исход госпитализации в изученной российской когорте пациентов. Учитывая эти результаты, авторы считают важной концепцию изучения количественных признаков и обширного фенотипирования для выявления генетических факторов риска тяжелого течения COVID-19 [55].

Биобанк ФГБНУ "Медико-генетический научный центр им. академика Н. П. Бочкова" (организован в формате центра коллективного пользования (ЦКП "Биобанк") и работает с уникальным биоматериалом пациентов с генетическими заболеваниями: кровь/компоненты крови и витальные клеточные линии различного тканевого происхождения. Сохранение такого материала дает возможность глубокого и комплексного его исследования в течение длительного времени, в т.ч. в рамках научной кооперации [56]. Для проведения исследований по установлению и изучению маркеров генетической патологии в Биобанке ежегодно депонируют ~10-11 тыс. образцов периферической (венозной) крови пациентов. Первичный биопсийный, аутопсийный, операционный материалы подвергаются специальному процессингу с целью получения целевых клеточных линий, несущих маркеры исследуемых заболеваний. Научные и диагностические исследования, проводимые в ФГБНУ "МГНЦ" Минздрава России на моделях мутантных диплоидных линий фибробластов, охватывают широкий спектр наследственных болезней: геномные и хромосомные аномалии, наследственные болезни обмена, нарушения транскрипции и сплайсинга, митохондриальные болезни, множество изменений структурно-функционального гомеостаза тела человека, начиная от молекулярного и до организменного. Кроме того, ряд лабораторий центра с использованием методов направленной дифференцировки индуцированных плюрипотентных стволовых клеток, полученных из фибробластов кожи пациентов, разрабатывают прикладные технологии редактирования генома (CRISPR/CAS9 — Clustered Regularly Interspaced Palindromic Repeats/CRISPR-Associated nuclease 9) для лечения моногенных заболеваний [57].

В настоящее время в сотрудничестве с научными лабораториями активно внедряются методы изучения тканеспецифической экспрессии ряда генов в первичных культурах Т-лимфобластов и диплоидных линиях уринальных клеток. Общая стратегия развития ЦКП "Биобанк" предполагает расшире-

ние сохраняемых видов биоматериала с целью наиболее полного охвата структур организма, подверженных разнообразной генетической патологии. Перспективное направление работы биобанка связано с применением клеточных технологий для исследования молекулярных механизмов нарушений функционирования мутантного генома в клетках и тканях пациентов.

ФГБУ "НМИЦ онкологии" Минздрава России (Ростов-на-Дону) является крупнейшим центром в Южном федеральном округе России, оказывающим медицинскую помощь пациентам из более чем 15 регионов. Наличие Биобанка и собираемой биоресурсной коллекции образцов опухолей и метастазов, а также базы медицинских данных больных раком желудка, обеспечивает проведение генетических исследований, в частности NGS (next generation sequencing) анализа, позволяющего строить новые схемы молекулярной классификации, и экстраполировать полученные результаты на популяцию Юга России. Различные коллекции образцов формируются в криохранилище в зависимости от задач и исследований ФГБУ "НМИЦ онкологии" Минздрава России и включают образцы свежемороженых опухолевых тканей и коллекции клеточных линий, а также цельную кровь, сыворотку и плазму крови. Базу данных использовали для проведения различных генетических и молекулярных исследований, включающих корреляции генотип-фенотип, перекрестные исследования, исследования "случай-контроль" и когортные исследования. На материале образцов тканей нейроэндокринных опухолей поджелудочной железы и глиальных опухолей различной степени злокачественности были выполнены исследования по выявлению прогностических биомаркеров и потенциальных мишеней для таргетной терапии методом высокопроизводительного секвенирования. Таким образом, данные коллекций биобанка играют важную роль для развития персонализированной медицины, обеспечивая раннюю диагностику и эффективные методы лечения каждому пациенту [58].

В биобанке "НМИЦ онкологии им. Н. Н. Блохина" создают и хранят клеточные линии — воспроизводимый ресурс для научных исследований и практического применения. Генетическая характеристика клеточных линий входит в рутинную практику биобанков [59]. Перед пользователями открываются широкие возможности целенаправленного подбора для своих исследований панели клеточных линий с определенными мутациями или их комбинациями. Такой подход выводит на новый уровень исследования фундаментальных механизмов чувствительности и резистентности клеток к противоопухолевым препаратам, что крайне важно для персонализированного подхода к лечению. Генетически охарактеризованные клеточные линии

служат неизменным инструментом для скрининга и доклинического изучения противоопухолевых препаратов, поиска новых мишеней, а также фундаментальных исследований. Сейчас биобанки предлагают панели клеточных линий, как готовые решения для научных исследований [60].

Заключение

Обобщив результаты мировой практики и российских достижений в области медицинской генетики, можно смело утверждать, что на современном этапе биобанки и их базы данных являются основой для развития различных направлений генетических исследований и, соответственно, развития персонализированной профилактики и медицины.

Примеры эффективного использования коллекций биобанков в генетических исследованиях, приведенные в данной публикации, отражают лишь малую часть направлений исследовательских работ, проводимых в настоящий момент в России и в мире. Становится очевидным, что объединение усилий разных биобанков, совместные большие проекты дают возможность получения прорывных

результатов в этой области. Единая сеть биобанков на уровне страны или на международном уровне может обеспечить стандартизацию и гармонизацию деятельности отдельных биобанков, в т.ч. в области использования информационных систем, позволяющих решить проблему доступности, согласованности и полноты данных. Масштабные базы данных, создаваемые в рамках сетей биобанков, дают возможность проводить метаанализ геномных ассоциаций, обнаруженных в разных популяциях, что имеет решающее значение для проведения геномных исследований и разработки генетических диагностических тест-систем.

Таким образом, применение технологий биобанкирования, масштабирование коллекций биоматериала, расширение и объединение баз данных дает возможность эффективного развития медико-генетических исследований и персонализированной медицины.

Отношения и деятельность: все авторы заявляют об отсутствии потенциального конфликта интересов, требующего раскрытия в данной статье.

Литература/References

1. Lazareva TE, Barbitoff YA, Changelidis AI, et al. Biobanking as a Tool for Genomic Research: From Allele Frequencies to Cross-Ancestry Association Studies. *J Pers Med*. 2022;12(12):2040. doi:10.3390/jpm12122040.
2. Choi SW, Mak TSH, O'Reilly PF. Tutorial: a guide to performing polygenic risk score analyses. *Nat Protoc*. 2020;15:2759-72. doi:10.1038/s41596-020-0353-1.
3. Zaichenoka M, Ershova AI, Kiseleva AV, et al. Search and replication of associations of genome variants with lipid levels in a Russian sample. *Cardiovascular Therapy and Prevention*. 2023;22(12):3871. (In Russ.) Зайченко М., Ершова А. И., Киселева А. В. и др. Поиск и репликация ассоциаций вариантов генома с уровнями липидов в выборке из представителей российской популяции. *Кардиоваскулярная терапия и профилактика*. 2023;22(12):3871. doi:10.15829/1728-8800-2023-3871.
4. Li R, Chen Y, Ritchie MD, Moore JH. Electronic health records and polygenic risk scores for predicting disease risk. *Nat Rev Genet*. 2020;21:493-502. doi:10.1038/s41576-020-0224-1.
5. Brandenburg JT, Chen WC, Boua PR, et al. Genetic association and transferability for urinary albumin-creatinine ratio as a marker of kidney disease in four Sub-Saharan African populations and non-continental individuals of African ancestry. *Front Genet*. 2024;15:1372042. doi:10.3389/fgene.2024.1372042.
6. Ouyang D, Huang C, Liu H, et al. Comprehensive analysis of genetic associations and single-cell expression profiles reveals potential links between migraine and multiple diseases: a phenome-wide association study. *Front Neurol*. 2024;15:1301208. doi:10.3389/fneur.2024.1301208.
7. Zhao P, Ying Z, Yuan C, et al. Shared genetic architecture highlights the bidirectional association between major depressive disorder and fracture risk. *Gen Psychiatr*. 2024;37(3):e101418. doi:10.1136/gpsych-2023-101418.
8. Cao Z, Hou Y, Xu C. Leucocyte telomere length, brain volume and risk of dementia: a prospective cohort study. *Gen Psychiatr*. 2023;36(4):e101120. doi:10.1136/gpsych-2023-101120.
9. Ba H, Zhang L, Peng H, et al. Causal links between sedentary behavior, physical activity, and psychiatric disorders: a Mendelian randomization study. *Ann Gen Psychiatry*. 2024;23:9. doi:10.1186/s12991-024-00495-0.
10. Cao Y, Zhu G, Feng C, et al. Cardiovascular risk burden, dementia risk and brain structural imaging markers: a study from UK Biobank. *Gen Psychiatry*. 2024;37(1):e101209. doi:10.1136/gpsych-2023-101209.
11. Shikov AE, Skitchenko RK, Predeus AV, Barbitoff YA. Phenome-wide functional dissection of pleiotropic effects highlights key molecular pathways for human complex traits. *Sci Rep*. 2020;10:1037. doi:10.1038/s41598-020-58040-4.
12. De Vincentis A, Tavaglione F, Spagnuolo R, et al. Metabolic and genetic determinants for progression to severe liver disease in subjects with obesity from the UK Biobank. *Int J Obes*. 2022;46:486-93. doi:10.1038/s41366-021-01015-w.
13. Zhernakova DV, Le TH, Kurilshikov A, et al. Individual variations in cardiovascular-disease-related protein levels are driven by genetics and gut microbiome. *Nat Genet*. 2018;50(12):1524-32. doi:10.1038/s41588-018-0224-7.
14. Magnusson PKE, Almqvist C, Rahman I, et al. The Swedish Twin Registry: Establishment of a Biobank and Other Recent Developments. *Twin Res Hum Genet*. 2013;16(1):317-29. doi:10.1017/thg.2012.104.
15. Mitsuhashi N, Toyo-Oka L, Katayama T, et al. TogoVar: A comprehensive Japanese genetic variation database. *Hum Genome Var*. 2022;9(1):44. doi:10.1038/s41439-022-00222-9.
16. Walters RG, Millwood IY, Lin K, et al. Genotyping and population characteristics of the China Kadoorie Biobank. *Cell Genom*. 2023;3(8):100361. doi:10.1016/j.xgen.2023.100361.
17. Moon S, Kim YJ, Han S, et al. The Korea Biobank Array: Design and Identification of Coding Variants Associated with Blood Biochemical Traits. *Sci Rep*. 2019;9(1):1382. doi:10.1038/s41598-018-37832-9.
18. Ranjan R, Hasan MK, Adhikary AB. Bangladeshi Atherosclerosis Biobank and Hub: The BANGABANDHU Study. *Int J Gen Med*. 2024;17:2507-12. doi:10.2147/IJGM.S466706.

19. Thompson R, Johnston L, Taruscio D, et al. RD-Connect: an integrated platform connecting databases, registries, biobanks and clinical bioinformatics for rare disease research. *J Gen Intern Med.* 2014;29(Suppl 3):780-7. doi:10.1007/s11606-014-2908-8.
20. Anisimov SV, Meshkov AN, Glotov AS, et al. National Association of Biobanks and Biobanking Specialists: New Community for Promoting Biobanking Ideas and Projects in Russia. *Biopreserv Biobank.* 2021;19(1):73-82. doi:10.1089/bio.2020.0049.
21. Pokrovskaya MS, Sivakova OV, Efimova IA, et al. Biobanking as a Necessary Tool for Research in the Field Of Personalized Medicine in the Scientific Medical Center. *Pers Med.* 2019;16(6):501-9. doi:10.2217/pme-2019-0049.
22. Shalnova SA, Imaeva AE, Kutsenko VA, et al. Hyperuricemia and hypertension in working-age people: results of a population study. *Cardiovascular Therapy and Prevention.* 2023;22(9S):3783. (In Russ.) Шальнова С.А., Имаева А.Э., Куценко В.А. и др. Гиперурикемия и артериальная гипертония у лиц трудоспособного возраста: результаты популяционного исследования. *Кардиоваскулярная терапия и профилактика.* 2023;22(9S):3783. doi:10.15829/1728-8800-2023-3783.
23. Shalnova SA, Drapkina OM, Kontsevaya AV, et al. A pilot project to study troponin I in a representative sample of the region from the ESSE-RF study: distribution among population and associations with risk factors. *Cardiovascular Therapy and Prevention.* 2021;20(4):2940. (In Russ.) Шальнова С.А., Драпкина О.М., Концевая А.В. и др. Пилотный проект по изучению тропонина I в представительной выборке одного из регионов участников исследования ЭССЕ-РФ: распределение в популяции и ассоциации с факторами риска. *Кардиоваскулярная терапия и профилактика.* 2021;20(4):2940. doi:10.15829/1728-8800-2021-2940.
24. Kontsevaya AV, Shalnova SA, Drapkina OM. ESSE-RF study: epidemiology and public health promotion. *Cardiovascular Therapy and Prevention.* 2021;20(5):2987. (In Russ.) Концевая А.В., Шальнова С.А., Драпкина О.М. Исследование ЭССЕ-РФ: эпидемиология и укрепление общественного здоровья. *Кардиоваскулярная терапия и профилактика.* 2021;20(5):2987. doi:10.15829/1728-8800-2021-2987.
25. Meshkov AN, Ershova AI, Kiseleva AV, et al. The prevalence of heterozygous familial hypercholesterolemia in selected regions of the Russian federation: The FH-ESSE-RF study. *J Pers Med.* 2021;11(6):464. doi:10.3390/jpm11060464.
26. Blokhina AV, Ershova AI, Kiseleva AV, et al. Applicability of diagnostic criteria and high prevalence of familial dysbetalipoproteinemia in Russia: A pilot study. *Int J Mol Sci.* 2023;24(17):13159. doi:10.3390/ijms241713159.
27. Sotnikova EA, Kiseleva AV, Kutsenko VA, et al. Identification of Pathogenic Variant Burden and Selection of Optimal Diagnostic Method Is a Way to Improve Carrier Screening for Autosomal Recessive Diseases. *J Pers Med.* 2022;12(7):1132. doi:10.3390/jpm12071132.
28. Kiseleva AV, Klimushina MV, Sotnikova EA, et al. A data-driven approach to carrier screening for common recessive diseases. *J Pers Med.* 2020;10(3):140. doi:10.3390/jpm10030140.
29. Kiseleva A, Klimushina M, Sotnikova E, et al. Cystic Fibrosis Polymorphic Variants in a Russian Population. *PGPM.* 2020;13:679-86. doi:10.2147/PGPM.S278806.
30. Ramensky VE, Ershova AI, Zaichenok M, et al. Targeted Sequencing of 242 Clinically Important Genes in the Russian Population from the Ivanovo Region. *Front Genet.* 2021;12:709419. doi:10.3389/fgene.2021.709419.
31. Meshkov AN, Kiseleva AV, Ershova AI, et al. ANGPTL3, ANGPTL4, APOA5, APOB, APOC2, APOC3, LDLR, PCSK9, LPL gene variants and coronary artery disease risk. *Russian Journal of Cardiology.* 2022;27(10):5232. (In Russ.) Мешков А.И., Киселева А.В., Ершова А.И. и др. Варианты генов ANGPTL3, ANGPTL4, APOA5, APOB, APOC2, APOC3, LDLR, PCSK9, LPL и риск ишемической болезни сердца. *Российский кардиологический журнал.* 2022;27(10):5232. doi:10.15829/1560-4071-2022-5232.
32. Meshkov A, Ershova A, Kiseleva A, et al. The LDLR, APOB, and PCSK9 variants of index patients with familial hypercholesterolemia in Russia. *Genes (Basel).* 2021;12(1):66. doi:10.3390/genes12010066.
33. Meshkov AN, Myasnikov RP, Kiseleva AV, et al. Genetic landscape in Russian patients with familial left ventricular noncompaction. *Front Cardiovasc Med.* 2023;10. doi:10.3389/fcvm.2023.1205787.
34. Myasnikov RP, Kulikova OV, Meshkov AN, et al. A splice variant of the MYH7 gene is causative in a family with isolated left ventricular noncompaction cardiomyopathy. *Genes (Basel).* 2022;13(10):1750. doi:10.3390/genes13101750.
35. Myasnikov R, Bukaeva A, Kulikova O, et al. A case of severe left-ventricular noncompaction associated with splicing altering variant in the FHOD3 gene. *Genes (Basel).* 2022;13(2):309. doi:10.3390/genes13020309.
36. Myasnikov R, Brodehl A, Meshkov A, et al. The double mutation DSG2-p.S363X and TBX20-p.D278X is associated with left ventricular non-compaction cardiomyopathy: Case report. *Int J Mol Sci.* 2021;22:6775. doi:10.3390/ijms22136775.
37. Marakhonov AV, Brodehl A, Myasnikov RP, et al. Noncompaction cardiomyopathy is caused by a novel in-frame desmin (DES) deletion mutation within the 1A coiled-coil rod segment leading to a severe filament assembly defect. *Hum Mutat.* 2019;40(6):734-41. doi:10.1002/humu.23747.
38. Brodehl A, Meshkov A, Myasnikov R, et al. Hemi- and homozygous loss-of-function mutations in DSG2 (desmoglein-2) cause recessive arrhythmic cardiomyopathy with an early onset. *Int J Mol Sci.* 2021;22(7):3786. doi:10.3390/ijms22073786.
39. Ershova AI, Ivanova AA, Kiseleva AV, et al. From biobanking to personalized prevention of obesity, diabetes and metabolic syndrome. *Cardiovascular Therapy and Prevention.* 2021;20(8):3123. (In Russ.) Ершова А.И., Иванова А.А., Киселева А.В. и др. От биобанкирования к персонализированной профилактике ожирения, сахарного диабета и метаболического синдрома. *Кардиоваскулярная терапия и профилактика.* 2021;20(8):3123. doi:10.15829/1728-8800-2021-3123.
40. Kiseleva AV, Soplenkova AG, Kutsenko VA, et al. Validation of genetic risk scores for obesity on a sample of the population of Russian regions. *Cardiovascular Therapy and Prevention.* 2023;22(10):3755. (In Russ.) Киселева А.В., Сопленкова А.Г., Куценко В.А. и др. Валидация шкал генетического риска ожирения на выборке населения регионов России. *Кардиоваскулярная терапия и профилактика.* 2023;22(10):3755. doi:10.15829/1728-8800-2023-3755.
41. Kiseleva AV, Soplenkova AG, Kutsenko VA, et al. Validation of genetic risk scores for type 2 diabetes on a Russian population sample from the biobank of the National Medical Research Center for Therapy and Preventive Medicine. *Cardiovascular Therapy and Prevention.* 2023;22(11):3746. (In Russ.) Киселева А.В., Сопленкова А.Г., Куценко В.А. и др. Валидация шкал генетического риска развития сахарного диабета 2 типа на выборке населения регионов России из биобанка "НМИЦ ТПМ". *Кардиоваскулярная терапия и профилактика.* 2023;22(11):3746. doi:10.15829/1728-8800-2023-3746.
42. Kolchina MA, Skripnikova IA, Meshkov AN, et al. Associations of bone mass and polygenic risk of osteoporosis with indicators of arterial wall condition. *Osteoporosis and Bone Diseases.* 2022;25(2):21-30. (In Russ.) Колчина М.А., Скрипникова И.А., Мешков А.И. и др. Ассоциации костной массы и полиген-

- ного риска остеопороза с показателями состояния артериальной стенки. Остеопороз и остеопатии. 2022;25(2):21-30. doi:10.14341/osteo12951.
43. Limonova AS, Ershova AI, Kiseleva AV, et al. Validation of genetic risk scores for hypertension in the Central Russian population. Cardiovascular Therapy and Prevention. 2023;22(12):3801. (In Russ.) Лимонова А. С., Ершова А. И., Киселева А. В. и др. Валидация шкал генетического риска развития артериальной гипертензии на популяции региона Центральной России. Кардиоваскулярная терапия и профилактика. 2023;22(12):3801. doi:10.15829/1728-8800-2023-3801.
44. Ershova AI, Meshkov AN, Kutsenko VA, et al. Validation of genetic risk scores for coronary artery disease, developed on European population samples, in Russian population. Cardiovascular Therapy and Prevention. 2023;22(12):3856. (In Russ.) Ершова А. И., Мешков А. Н., Куценко В. А. и др. Валидация шкал генетического риска ишемической болезни сердца, разработанных на европейских популяционных выборках, у представителей российской популяции. Кардиоваскулярная терапия и профилактика. 2023;22(12):3856. doi:10.15829/1728-8800-2023-3856.
45. Kiseleva AV, Vasilyev DK, Soplenkova AG, et al. Association of plasma microRNA levels with different collateral circulation degree in chronic total occlusion patients with coronary artery disease: a pilot study. Cardiovascular Therapy and Prevention. 2024;23(7):4086. (In Russ.) Киселева А. В., Васильев Д. К., Сопленкова А. Г. и др. Ассоциация уровней циркулирующих микроРНК плазмы с различной выраженностью коллатерального кровообращения при хронической окклюзии коронарной артерии у пациентов с ИБС: пилотное исследование. Кардиоваскулярная терапия и профилактика. 2024;23(7):4086. doi:10.15829/1728-8800-2024-4086.
46. Balanovskaya EV, Balanovsky OP. Human population genetics. Hereditary diseases: a national guide. Edited by Academicians of RAMS Bochkov NP, Ginter EK and Puzyrev VP. Moscow: GEOTAR-Media, 2012:199-243. (In Russ.) Балановская Е. В., Балановский О. П. Популяционная генетика человека. Наследственные болезни: национальное руководство. Под ред. Академиков РАМН Бочкова Н. П., Гинтера Е. К. и Пузырева В. П. М.: ГЕОТАР-Медиа, 2012:199-243. ISBN 978-5-9704-2231-1.
47. Pylev VYu, Agdzhoyan AT, Gorin IO, et al. Population biobank as a basis for determining spatial variation of clinically relevant pharmacogenetic biomarkers of cardiovascular diseases. Cardiovascular Therapy and Prevention. 2022;21(11):3430. (In Russ.) Пылёв В. Ю., Агджоян А. Т., Горин И. О. и др. Популяционный биобанк как основа для выявления пространственной изменчивости клинически значимых фармакогенетических биомаркеров сердечно-сосудистых заболеваний. Кардиоваскулярная терапия и профилактика. 2022;21(11):3430. doi:10.15829/1728-8800-2022-3430.
48. Mirzaev KB, Fedorinov DS, Ivashchenko DV, et al. ADME pharmacogenetics: future outlook for Russia. Pharmacogenomics. 2019;20(11):847-65. doi:10.2217/pgs-2019-0013.
49. Zhernakova DV, Brukhin V, Malov S, et al. Genome-wide sequence analyses of ethnic populations across Russia. Genomics. 2020;112(1):442-58. doi:10.1016/j.ygeno.2019.03.007.
50. Nasykhova YA, Tonyan ZN, Mikhailova AA, et al. Pharmacogenetics of Type 2 Diabetes—Progress and Prospects. Int J Mol Sci. 2020;21(18):6842. doi:10.3390/ijms21186842.
51. Glotov AS, Kazakov SV, Vashukova ES, et al. Targeted sequencing analysis of ACVR2A gene identifies novel risk variants associated with preeclampsia. J Matern Fetal Neonatal Med. 2019;32(17):2790-6. doi:10.1080/14767058.2018.1449204.
52. Illarionov RA, Pachuliia OV, Vashukova ES, et al. Plasma miRNA Profile in High Risk of Preterm Birth during Early and Mid-Pregnancy. Genes. 2022;13(11):2018. doi:10.3390/genes13112018.
53. Tkachenko AA, Changalidis AI, Maksutenko EM, et al. Replication of Known and Identification of Novel Associations in Biobank-Scale Datasets: A Survey Using UK Biobank and FinnGen. Genes. 2024;15(7):931. doi:10.3390/genes15070931.
54. Changalidis AI, Maksutenko EM, Barbitoff YA, et al. Aggregation of Genome-Wide Association Data from FinnGen and UK Biobank Replicates Multiple Risk Loci for Pregnancy Complications. Genes. 2022;13(12):2255. doi:10.3390/genes13122255.
55. Shcherbak SG, Changalidi AI, Barbitoff YA, et al. Identification of Genetic Risk Factors of Severe COVID-19 Using Extensive Phenotypic Data: A Proof-of-Concept Study in a Cohort of Russian Patients. Genes. 2022;13(3):534. doi:10.3390/genes13030534.
56. Tabakov VYu. Management of biobanking for medical genetics research. Cardiovascular Therapy and Prevention. 2021;20(8):3027. (In Russ.) Табаков В. Ю. Организация биобанкирования для обеспечения медико-генетических исследований. Кардиоваскулярная терапия и профилактика. 2021;20(8):3027. doi:10.15829/1728-8800-2021-3027.
57. Kondratyeva E, Demchenko A, Slesarenko Y, et al. Derivation of iPSC line (RCMGI002-A) from dermal fibroblasts of a cystic fibrosis female patient with homozygous F508del mutation. Stem Cell Res. 2021;53:102251. doi:10.1016/j.scr.2021.102251.
58. Kit OI, Timofeeva SV, Sitkovskaya AO, et al. The biobank of the National Medical Research Centre for Oncology as a resource for research in the field of personalized medicine: A review. Journal of Modern Oncology. 2022;24(1):6-11. (In Russ.) Кит О. И., Тимофеева С. В., Ситковская А. О. и др. Биобанк ФГБУ "НМИЦ онкологии" Минздрава России как ресурс для проведения исследований в области персонифицированной медицины. Современная онкология. 2022;24(1):6-11. doi:10.26442/18151434.2022.1201384.
59. Kosobokova EN, Kalinina NA, Baryshnikova MA, et al. Bioresource collections: algorithms for development and functioning; basic and applied significance. Cardiovascular Therapy and Prevention. 2023;22(11):3654. (In Russ.) Кособокова Е. Н., Калинина Н. А., Барышников М. А. и др. Биоресурсные коллекции: алгоритмы формирования и функционирования, фундаментальная и прикладная значимость (на примере НМИЦ онкологии им. Н. Н. Блохина). Кардиоваскулярная терапия и профилактика. 2023;22(11):3654. doi:10.15829/1728-8800-2023-3654.
60. Kosobokova EN, Kalinina NA, Konoplina KM, et al. Human Metastatic Melanoma Cell Lines Panel for In Vitro and In Vivo Investigations. J Mol Pathol. 2024;5(1):11-27. doi:10.3390/jmp5010002.

Формирование коллекции биообразцов в биобанке для решения задач персонализированной медицины

Копылова О.В.¹, Ершова А.И.¹, Мешков А.Н.¹, Покровская М.С.¹, Ефимова И.А.¹, Лимонова А.С.¹, Блохина А.В.¹, Серебрянская З.З.¹, Сметнев С.А.¹, Михайлина В.И.¹, Мясников Р.П.¹, Киселева А.В.¹, Гарбузова Е.В.¹, Метельская В.А.^{1,2}, Борисова А.Л.¹, Драпкина О.М.¹

¹ФГБУ "Национальный медицинский исследовательский центр терапии и профилактической медицины" Минздрава России. Москва; ²ФГБОУ ДПО "РМАНПО" Минздрава России. Москва, Россия

Цель. Представить подход к формированию коллекции биообразцов пациентов с редкими и представляющими научный интерес клиническими ситуациями для решения задач персонализированной медицины; проанализировать результаты применения данного подхода в течение 8 лет.

Материал и методы. Разработка подхода и формирование коллекции биообразцов крови и ее производных выполняется на базе ФГБУ "НМИЦ ТПМ" Минздрава России в рамках проекта "Интересные случаи в клинике НМИЦ ТПМ". Сбор биоматериала у пациентов проекта осуществляется планомерно в рамках работы стационара, а также по направлению врачей амбулаторного приема. Для всех включаемых пациентов проводится процедура подписания информированного согласия. Каждый биообразец сопровождается обширной аннотацией, включающей социально-демографические, клинические, генетические и другие виды данных. В статье представлены результаты проекта по состоянию на 12.08.2024.

Результаты. Группой экспертов разработаны 15 клинико-нозологических групп и критерии включения в эти группы. На момент анализа в проект включено 4525 стационарных и амбулаторных пациентов. Отмечается положительная динамика количества ежегодно включаемых лиц. Генетическое тестирование проведено более чем 2500 пациентам. Предлагаемый подход позволяет решать широкий спектр клинических и научно-практических задач в области персонализированной медицины: это своевременная постановка или уточнение диагноза; формирование когорт пациентов для изучения генетических аспектов заболеваний; выявление новых генетических вариантов наследственных заболеваний; разработка генетических диагностических панелей; изучение редких заболеваний; сокращение времени для создания выборки пациентов при возникновении новой научной идеи.

Заключение. Предложенный подход к сбору и сохранению биообразцов и ассоциированных с ними клинических, социально-де-

мографических, генетических и других видов данных у пациентов с представляющими научный интерес и редкими клиническими случаями является важным и эффективным для решения практических и научных задач персонализированной медицины. Алгоритм работы хорошо проработан, стандартизован и легко реализуем в рамках научно-медицинских клиник, независимо от их размера. Стандартизация преаналитического этапа при формировании коллекции биообразцов создает предпосылки для развития многоцентрового сотрудничества на национальном и международном уровне.

Ключевые слова: персонализированная медицина, биобанкирование, наследственные заболевания, редкие заболевания, генетическое тестирование, коллекция биообразцов.

Отношения и деятельность. Исследование выполнено за счет гранта Российского Научного Фонда № 22-15-00507.

Поступила 04/10-2024

Рецензия получена 21/10-2024

Принята к публикации 19/11-2024



Для цитирования: Копылова О.В., Ершова А.И., Мешков А.Н., Покровская М.С., Ефимова И.А., Лимонова А.С., Блохина А.В., Серебрянская З.З., Сметнев С.А., Михайлина В.И., Мясников Р.П., Киселева А.В., Гарбузова Е.В., Метельская В.А., Борисова А.Л., Драпкина О.М. Формирование коллекции биообразцов в биобанке для решения задач персонализированной медицины. *Кардиоваскулярная терапия и профилактика*. 2024;23(11):4227. doi: 10.15829/1728-8800-2024-4227. EDN QPJBVT

*Автор, ответственный за переписку (Corresponding author):

e-mail: sivoksana@yandex.ru

[Копылова О.В.* — к.м.н., с.н.с. лаборатории клиномики, ORCID: 0000-0001-5397-5387, Ершова А.И. — д.м.н., руководитель лаборатории клиномики, зам. директора по фундаментальной науке, ORCID: 0000-0001-7989-0760, Мешков А.Н. — д.м.н., директор Института персонализированной терапии и профилактики, руководитель отдела персонализированной диагностики, профилактики и терапии атеросклеротических сердечно-сосудистых заболеваний, ORCID: 0000-0001-5989-6233, Покровская М.С. — к.б.н., в.н.с. лаборатории "Банк биологического материала", ORCID: 0000-0001-6985-7131, Ефимова И.А. — ведущий эксперт лаборатории "Банк биологического материала", ORCID: 0000-0002-3081-8415, Лимонова А.С. — н.с. лаборатории клиномики, ORCID: 0000-0003-1500-3696, Блохина А.В. — н.с. лаборатории клиномики, ORCID: 0000-0002-3019-3961, Серебрянская З.З. — лаборант лаборатории "Банк биологического материала", ORCID: 0000-0002-8691-1395, Сметнев С.А. — м.н.с. отдела персонализированной диагностики, терапии и профилактики атеросклеротических сердечно-сосудистых заболеваний Института персонализированной терапии и профилактики, ORCID: 0000-0002-8493-4761, Михайлина В.И. — м.н.с. отдела персонализированной диагностики, терапии и профилактики атеросклеротических сердечно-сосудистых заболеваний Института персонализированной терапии и профилактики, ORCID: 0000-0002-5375-7328, Мясников Р.П. — к.м.н., в.н.с. отдела клинической кардиологии, ORCID: 0000-0002-9024-5364, Киселева А.В. — к.б.н., в.н.с., руководитель лаборатории молекулярной генетики Института персонализированной терапии и профилактики, ORCID: 0000-0003-4765-8021, Гарбузова Е.В. — лаборант-исследователь лаборатории клиномики, ORCID: 0009-0002-3184-7573, Метельская В.А. — д.б.н., профессор, г.н.с. лаборатории изучения биохимических маркеров риска хронических неинфекционных заболеваний им. Н.В. Перовой, профессор кафедры, ORCID: 0000-0001-8665-9129, Борисова А.Л. — н.с., руководитель лаборатории "Банк биологического материала", ORCID: 0000-0003-4020-6647, Драпкина О.М. — д.м.н., профессор, руководитель отдела фундаментальных прикладных аспектов ожирения, директор, ORCID: 0000-0002-4453-8430].

Biosample collection in a biobank to solve problems of personalized medicine

Kopylova O. V.¹, Ershova A. I.¹, Meshkov A. N.¹, Pokrovskaya M. S.¹, Efimova I. A.¹, Limonova A. S.¹, Blokhina A. V.¹, Serebryanskaya Z. Z.¹, Smetnev S. A.¹, Mikhailina V. I.¹, Myasnikov R. P.¹, Kiseleva A. V.¹, Garbuzova E. V.¹, Metelskaya V. A.^{1,2}, Borisova A. L.¹, Drapkina O. M.¹

¹National Medical Research Center for Therapy and Preventive Medicine. Moscow; ²Russian Medical Academy of Continuous Professional Education. Moscow, Russia

Aim. To present an approach to collection of biosamples of patients with rare and scientifically interesting clinical situations for solving the problems of personalized medicine, as well as to analyze related 8-year experience.

Material and methods. The approach and a collection of biosamples of blood and its derivatives is developed at the National Medical Research Center for Therapy and Preventive Medicine within the project "Interesting Cases at the National Medical Research Center for Therapy and Preventive Medicine". The collection of biomaterial from project patients was carried out on a planned basis with the inpatient department, as well as upon referral from outpatient doctors. All included patients signed informed consent. Each biosample is accompanied by an extensive annotation, including socio-demographic, clinical, genetic and other types of data. The article presents the project results as of August 12, 2024.

Results. An expert group developed 15 disease groups and related inclusion criteria. At the time of analysis, 4525 inpatients and outpatients were included in the project. Positive changes in the number of people included annually is noted. Genetic testing was performed on >2500 patients. The proposed approach allows solving a wide range of clinical and research problems in personalized medicine as follows: timely diagnosis or clarification; formation of patient cohorts to study the genetic aspects of diseases; identification of new genetic variants of hereditary diseases; development of genetic diagnostic panels; study of rare diseases; reduction of sample creation time in case of novel scientific ideas.

Conclusion. The proposed approach to the collection and preservation of biosamples and related clinical, socio-demographic, genetic and other types of data in patients with rare clinical cases of scientific interest is important and effective for solving practical and research problems of personalized medicine. The algorithm is well developed, standardized and easily implemented within the clinics, regardless of their size. Preanalytical phase standardization creates the prerequisites for multi-center national and international cooperation.

Keywords: personalized medicine, biobanking, hereditary diseases, rare diseases, genetic testing, biosample collection.

Relationships and Activities. The study was supported by a grant from the Russian Science Foundation № 22-15-00507.

Kopylova O. V. * ORCID: 0000-0001-5397-5387, Ershova A. I. ORCID: 0000-0001-7989-0760, Meshkov A. N. ORCID: 0000-0001-5989-6233, Pokrovskaya M. S. ORCID: 0000-0001-6985-7131, Efimova I. A. ORCID: 0000-0002-3081-8415, Limonova A. S. ORCID: 0000-0003-1500-3696, Blokhina A. V. ORCID: 0000-0002-3019-3961, Serebryanskaya Z. Z. ORCID: 0000-0002-8691-1395, Smetnev S. A. ORCID: 0000-0002-8493-4761, Mikhailina V. I. ORCID: 0000-0002-5375-7328, Myasnikov R. P. ORCID: 0000-0002-9024-5364, Kiseleva A. V. ORCID: 0000-0003-4765-8021, Garbuzova E. V. ORCID: 0009-0002-3184-7573, Metelskaya V. A. ORCID: 0000-0001-8665-9129, Borisova A. L. ORCID: 0000-0003-4020-6647, Drapkina O. M. ORCID: 0000-0002-4453-8430.

*Corresponding author:
sivoksana@yandex.ru

Received: 04/10-2024

Revision Received: 21/10-2024

Accepted: 19/11-2024

For citation: Kopylova O. V., Ershova A. I., Meshkov A. N., Pokrovskaya M. S., Efimova I. A., Limonova A. S., Blokhina A. V., Serebryanskaya Z. Z., Smetnev S. A., Mikhailina V. I., Myasnikov R. P., Kiseleva A. V., Garbuzova E. V., Metelskaya V. A., Borisova A. L., Drapkina O. M. Biosample collection in a biobank to solve problems of personalized medicine. *Cardiovascular Therapy and Prevention*. 2024;23(11):4227. doi: 10.15829/1728-8800-2024-4227. EDN QPJIBT

ВНП — вариант нуклеотидной последовательности, ИБС — ишемическая болезнь сердца, НАСБИО — Национальная ассоциация биобанков и специалистов по биобанкированию, НМИЦ ТПМ — ФГБУ "Национальный медицинский исследовательский центр терапии и профилактической медицины" Минздрава России, СГХС — семейная гиперхолестеринемия, СД — сахарный диабет, СПбГУ — Санкт-Петербургский государственный университет, ШГР — шкала генетического риска, IPPM — Interesting Patients Preventive Medicine (проект "Интересные случаи в клинике НМИЦ ТПМ").

Введение

Развивающиеся в настоящее время технологии биобанкирования открывают новые возможности для проведения клинических и эпидемиологических исследований¹ [1-4]. Одним из подходов к формированию коллекций биообразцов является сбор биоматериала для изучения конкретного заболевания; биобанки подобного рода называются нозологическими биобанками. При таком подходе в рамках конкретного проекта осуществляется сбор биообразцов от пациентов с тем или иным заболе-

ванием [2, 5, 6]. Особую сложность представляет изучение редко встречающихся заболеваний, что обусловлено трудностями формирования когорты пациентов необходимого для исследования размера [7]. В таком случае биобанкирование может играть особую роль, позволяя длительно сохранять пригодные для анализа биообразцы по мере набора необходимой для анализа когорты пациентов. Подобный подход, к примеру, применяется в клинике Мейо, где в центре индивидуализированной медицины создана Программа для редких и недиагностированных заболеваний (the Program for Rare and Undiagnosed Diseases, PRaUD), целями которой являются улучшение выявляемости редких заболеваний, в т.ч.: надлежащее направление к специалистам по медицинской генетике; совершенствование

¹ Pokrovskaya M, Sivakova O, Meshkov A, et al. Biobanking of biospecimens for the epidemiology of cardiovascular risk factors and diseases in regions of the Russian Federation study (ESSE-RF). In: Biospecimen Research Symposium. 2018:30.

Ключевые моменты

Что известно о предмете исследования?

- Научное изучение редких и необычных клинических случаев связано с рядом сложностей, обусловленных трудностями формирования когорты пациентов необходимого для исследования размера.
- Развивающиеся в настоящее время технологии биобанкирования открывают новые возможности для проведения клинических и эпидемиологических исследований.

Что добавляют результаты исследования?

- Предложенный подход к сохранению биообразцов и ассоциированных с ними данных у пациентов с представляющими научный интерес и редкими клиническими случаями является важным и эффективным для решения целого ряда задач персонализированной медицины.
- Предлагаемый подход позволяет решать широкий спектр клинических и научно-практических задач: своевременная постановка или уточнение диагноза; формирование когорт пациентов для изучения генетических аспектов заболеваний; выявление новых генетических вариантов наследственных заболеваний; разработка генетических диагностических панелей; изучение редких заболеваний; сокращение времени для создания выборки пациентов при возникновении новой научной идеи.

Key messages

What is already known about the subject?

- Study of rare and unusual clinical cases is associated with a number of difficulties due to complicated creation of a cohort of the size required for the study.
- Currently developing biobanking technologies give new opportunities for clinical and epidemiological research.

What might this study add?

- The proposed approach to preserving biospecimens and related data in patients with rare clinical cases of scientific interest is important and effective for solving a number of personalized medicine problems.
- The proposed approach allows solving a wide range of clinical and research problems in personalized medicine as follows: timely diagnosis or clarification; formation of patient cohorts to study the genetic aspects of diseases; identification of new genetic variants of hereditary diseases; development of genetic diagnostic panels; study of rare diseases; reduction of sample creation time in case of novel scientific ideas.

системы оказания медицинской помощи в тесном сотрудничестве с узкоспециализированными подразделениями и использованием генетического тестирования; содействие исследованиям путем разработки регистров и биорепозиториев для хранения образцов пациентов с редкими заболеваниями, а также развитие научного сетевого взаимодействия; повышение осведомленности пациентов, их семей, медицинских работников и общественности о редких заболеваниях [8].

Другим подходом к формированию коллекций биообразцов с целью изучения заболеваний и предикторов их развития является сбор биоматериала от широкого круга лиц в рамках популяционных исследований. Ярким примером может служить Биобанк Великобритании (UK Biobank), который объединил биообразцы и данные >500 тыс. чел. населения Великобритании [9]. При сборе биоматериала осуществлялась фиксация целого ряда клинических, социально-демографических и других видов параметров. Кроме того, благодаря использованию данных из электронных медицинских карт национальной системы здравоохранения, информация, ассоциированная с биообразцами, по-

стоянно пополняется, что позволяет осуществлять проспективное наблюдение включенных в проект участников. Всем участникам было проведено полноэкзомное или полногеномное секвенирование, что позволяет изучать генетику как распространенных, так и редких заболеваний [9, 10].

Цель настоящей статьи — представление разработанного в ФГБУ "Национальный медицинский исследовательский центр терапии и профилактической медицины" Минздрава России (НМИЦ ТПМ) уникального подхода к отбору пациентов с интересными для научного изучения клиническими ситуациями и биобанкированию их образцов крови и ее производных в рамках реализации научного проекта "Интересные случаи в клинике НМИЦ ТПМ" (IPPM, Interesting Patients Preventive Medicine), анализ результатов применения данного подхода в течение 8 лет.

Проект IPPM инициирован в 2016г. Идея создания данной коллекции принадлежала группе экспертов, включая руководство НМИЦ ТПМ и биобанка, и продиктована спецификой клинической работы НМИЦ ТПМ. Особенностью НМИЦ ТПМ является наличие крупного стационара с отделе-

ниями различного профиля, принимающего пациентов со всей страны. Кроме того, НМИЦ ТПМ обслуживает большое количество амбулаторных пациентов. Важной особенностью учреждения является наличие таких специализированных структур, как Институт персонализированной терапии и профилактики, аритмологический центр, липидная клиника, клиника сердечной недостаточности, отдел остеопороза, клиника коррекции веса и сна и др. В рамках работы учреждения возможно проведение различных видов генетического тестирования. Перечисленные факторы способствуют тому, что в НМИЦ ТПМ направляются и обращаются как в референсный центр большое количество пациентов с необычными, сложными и редкими патологиями, неясным диагнозом для получения помощи самого высокого экспертного уровня с применением новейших клинических алгоритмов и подходов. С появлением в структуре учреждения биобанка стало возможным централизованно собирать, хранить и использовать для дальнейших научных исследований биоматериал и ассоциированную клиническую информацию.

Материал и методы

После одобрения идеи проекта IPPM руководством НМИЦ ТПМ и успешного прохождения процедуры рассмотрения Независимым этическим комитетом в 2016г была создана экспертная комиссия, включившая ведущих специалистов учреждения по различным клиническим направлениям. Данной группой экспертов были разработаны критерии включения пациентов в проект, а также основные нозологические группы, потенциально интересные для дальнейших исследований. С течением времени осуществляется периодический пересмотр и дополнение критериев.

Сбор биоматериала у пациентов проекта осуществляется планоно в рамках работы стационара, а также по направлению врачей амбулаторного приема. Для отбора пациентов квалифицированным врачом проводится анализ историй болезни всех поступающих пациентов. В случае соответствия клинической картины критериям включения с пациентом проводится беседа, и, при согласии пациента к участию в проекте, осуществляются процедуры подписания информированного согласия, оформления, сбора, обработки и размещения на хранение биоматериала. Комплект документов, необходимых для биобанкирования (информированное согласие, направление, талон с указанием вида и количества пробирок для взятия крови, маркированные пробирки), оформляется в день поступления пациента в стационар, а забор крови осуществляется на следующее утро и совмещается с плановым забором крови в рамках лечебно-диагностического процесса. При направлении пациента врачом амбулаторного звена с пациентом проводится беседа, в случае согласия участвовать в проекте проводится процедура подписания информированного согласия, и пациент приглашается для сдачи крови в ближайший удобный ему день.

С июня 2016г по октябрь 2022г осуществлялся сбор и размещение на хранение 8-и алиquot сыворотки крови

по 0,5-1 мл, 4-х алиquot плазмы с этилендиаминтетрауксусной кислотой (ЭДТА) по 0,5 мл, 4-х алиquot плазмы крови с цитратом натрия по 0,5 мл, 2-х пробирок цельной крови по 4 мл. С ноября 2022г стандартный набор пробирок был пересмотрен и в настоящее время осуществляется хранение 6-и алиquot сыворотки по 0,5 мл, 3-х алиquot плазмы с ЭДТА по 0,5 мл, 3-х алиquot цитратной плазмы по 0,5 мл, 1-й пробирки цельной крови объемом 4 мл. Изменение объемов сохраняемого биоматериала связано с оптимизацией хранения, автоматизацией ряда процессов.

Информация о биообразцах сохраняется в базе данных биообразцов при помощи специального программного обеспечения "FreezerPro", информация о пациенте, включая данные лабораторных, инструментальных и других методов исследования — в медицинской информационной системе "Медиалог", а также в специально созданной базе данных проекта IPPM.

В настоящее время проект продолжается, коллекция биообразцов и данных ежедневно пополняется. В статье представлены результаты проекта по состоянию на 12.08.2024.

Результаты и обсуждение

Разработанные критерии включения пациентов в проект IPPM

Учитывая профиль поступающих больных, основными группами интереса явились пациенты с подозрением на наследственные патологии: с ранней манифестацией ишемической болезни сердца (ИБС) и атеросклероза, фибрилляции предсердий в молодом возрасте, с кардиомиопатиями, дислипидемиями, аномалиями развития. В 2020 и 2024гг критерии были расширены и дополнены: добавлены группы ранней манифестации сахарного диабета (СД) 2 типа, острого нарушения мозгового кровообращения, артериальной гипертензии в молодом возрасте (при исключении вторичных форм) и др. Полный список актуальных групп пациентов и подробных критериев представлен в таблице 1.

Количество пациентов, включенных в проект IPPM

С момента начала включения пациентов в июне 2016г проанализировано >50 тыс. историй болезни стационарных больных. Всего, согласно представленным в таблице 1 критериям, включено 4525 стационарных и амбулаторных пациентов. Отмечается постепенный рост количества пациентов, включаемых за год (рисунок 1). Подобный рост может быть обусловлен большей осведомленностью лечащих врачей о критериях отбора, расширением спектра критериев и увеличением количества сложных случаев в клинике.

Распределение пациентов по группам в проекте IPPM

Распределение по группам представлено на рисунке 2. Наибольшее количество пациентов относится к группам "Кардиомиопатии", "Аритмии", "ИБС", "Дислипидемии".

Таблица 1

Критерии отбора и группы пациентов по проекту IPPM

Название группы (код)	Критерии отбора																									
Дислипидемии	1. Уровень общего ХС >8 ммоль/л 2. Уровень ТГ >5,6 ммоль/л (как минимум в 1-м анализе, в т.ч. в анамнезе) 3. Уровень ХС ЛНП >4,9 ммоль/л 4. Уровень ХС ЛНП <1,5 ммоль/л без гиполипидемической терапии 5. Уровень ХС ЛВП <0,7 ммоль/л у мужчин и <0,8 ммоль/л у женщин 6. Уровень ХС ЛВП ≥2,5 ммоль/л у мужчин или ≥3,0 ммоль/л у женщин 7. Уровень липопротеина(а) >30 г/л 8. У пациента есть кожные или сухожильные ксантомы 9. Другое (уточнить)																									
Атеросклероз	1. Отсутствие атеросклеротических бляшек >35% в коронарных (КАГ или МСКТ с контрастом), сонных и бедренных (УЗИ) артериях для мужчин >70 лет и женщин >75 лет 2. Аневризмы коронарных артерий, аорты, периферических артерий Критерии аневризмы аорты: — восходящий грудной отдел аорты ≥45 мм — нисходящий грудной отдел аорты ≥40 мм — брюшной отдел ≥35 мм 3. Ранний атеросклероз периферических артерий (>90-го перцентиля максимального стеноза для соответствующего пола и возраста):																									
	<table><tr><th>Возраст</th><th colspan="2">Мужчины</th><th colspan="2">Женщины</th></tr><tr><td></td><th>СА</th><th>БА</th><th>СА</th><th>БА</th></tr><tr><td><40 лет</td><td>≥30%</td><td>≥25%</td><td>≥30%</td><td>≥25%</td></tr><tr><td>40-49 лет</td><td>≥35%</td><td>≥35%</td><td>≥30%</td><td>≥30%</td></tr><tr><td>50-54 лет</td><td>≥45%</td><td>≥45%</td><td>≥40%</td><td>≥35%</td></tr></table>	Возраст	Мужчины		Женщины			СА	БА	СА	БА	<40 лет	≥30%	≥25%	≥30%	≥25%	40-49 лет	≥35%	≥35%	≥30%	≥30%	50-54 лет	≥45%	≥45%	≥40%	≥35%
Возраст	Мужчины		Женщины																							
	СА	БА	СА	БА																						
<40 лет	≥30%	≥25%	≥30%	≥25%																						
40-49 лет	≥35%	≥35%	≥30%	≥30%																						
50-54 лет	≥45%	≥45%	≥40%	≥35%																						
ИБС	1. Возраст развития доказанной ИБС <55 лет для мужчин или <60 лет для женщин																									
Аритмии	1. Первичные электрические болезни сердца (синдром удлинённого интервала QT, синдром укороченного интервала QT, синдром Бругада, катехоламин-зависимая желудочковая тахикардия, идиопатическая фибрилляция желудочков, болезнь Ленегре) 2. ФП неклапанной этиологии, возникшая в возрасте <50 лет 3. Другое (уточнить)																									
Ожирение	1. Морбидное ожирение (ИМТ ≥40 кг/м²) 2. Ожирение без метаболических нарушений (сочетание всех признаков): • ИМТ ≥35 • глюкоза крови <5,5 ммоль/л • ТГ <1,7 ммоль/л • ЛВП ≥1,03 у мужчин или ≥1,3 у женщин																									
Стентирование	1. Тромбоз стента 2. Рецидивирующий рестеноз в ранее имплантированных стентах (=повторный рестеноз в той же или другой артерии) 3. Другое (уточнить)																									
Кардиомиопатии	1. Кардиомиопатии (не ИБС): — гипертрофическая кардиомиопатия — дилатационная кардиомиопатия — аритмогенная дисплазия правого желудочка — некомпактный миокард — рестриктивная кардиомиопатия 2. Болезни накопления 3. Другое (уточнить)																									
Пациенты с ранним ОНМК	1. Возраст развития ОНМК <55 лет для мужчин, <60 лет для женщин																									
Дисплазии соединительной ткани	1. Синдром дисплазии соединительной ткани 2. Другое (уточнить)																									
Долгожители	1. Возраст ≥90 лет																									
Редкий диагноз	1. Любые редко встречающиеся диагнозы и клинические состояния, в т.ч.: • Спонтанная диссекция коронарных, СА • Аномалии строения артерий, выявляемые при ангиографии • Миопатии • Наследственные моногенные заболевания, которые не указаны в других группах IPPM • Другое (уточнить)																									
Раннее развитие АГ	1.1. Сочетание двух факторов: — возраст до 35 лет — исключен вторичный генез																									

Таблица 1. Продолжение

Название группы (код)	Критерии отбора
Раннее развитие СД 2 типа	1. Развитие СД 2 типа в возрасте до 45 лет
Фармакогенетика	1. Непредусмотренный фармакотерапией эффект, возникающий при использовании лекарственного препарата в терапевтической дозе 2. Отсутствие эффекта при назначении лекарственного препарата в терапевтической дозе 3. Другое (уточнить)
CONTROL	1. Контрольная группа (нет данных о наличии каких-либо заболеваний)

Примечание: БА — бедренные артерии, ИБС — ишемическая болезнь сердца, ИМТ — индекс массы тела, КАГ — коронароангиография, ЛВП — липопротеины высокой плотности, ЛНП — липопротеины низкой плотности, МСКТ — мультиспиральная компьютерная томография, ОНМК — острое нарушение мозгового кровообращения, СА — сонные артерии, СД — сахарный диабет, ТГ — триглицериды, УЗИ — ультразвуковое исследование, ФП — фибрилляция предсердий, ХС — холестерин, IPPM — Interesting Patients Preventive Medicine (проект "Интересные случаи в клинике НМИЦ ТПМ").

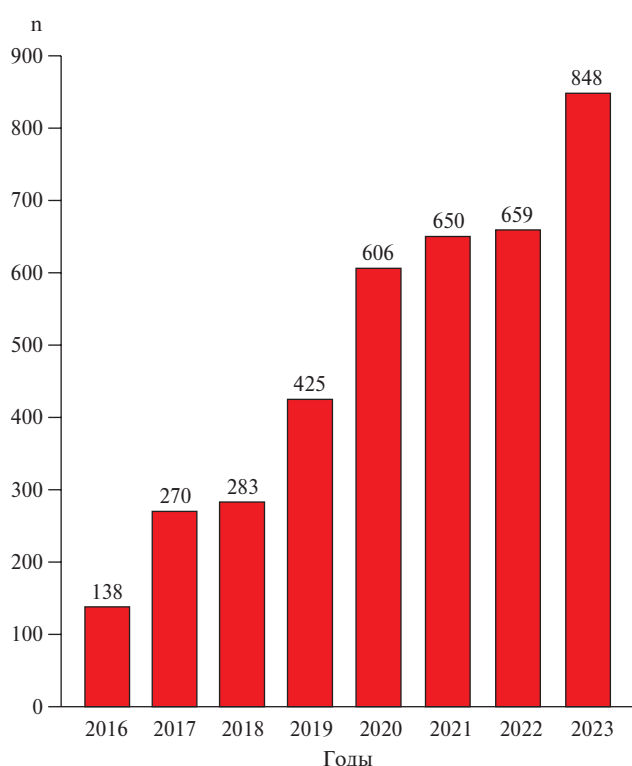


Рис. 1 Количество пациентов, включенных в проект IPPM в разные годы.

Общая схема проекта IPPM

Каждый биообразец сопровождается подробной информацией, включающей клинические, социально-демографические, лабораторные, инструментальные, генетические и другие виды данных (рисунок 3). Благодаря такому подходу формируется коллекция биообразцов с качественной клинической аннотацией, которая служит основой для новых научных идей и реализации исследовательских проектов в области изучения диагностики, профилактики и лечения хронических неинфекционных, в т.ч. редких и наследственных заболеваний.

Генетическое тестирование биоматериала в проекте IPPM

Значительному количеству пациентов (>2500 чел.) проведено генетическое тестирование. В част-



Рис. 2 Распределение пациентов, включенных в проект IPPM, по группам.

Примечание: АГ — артериальная гипертензия, ИБС — ишемическая болезнь сердца, ОНМК — острое нарушение мозгового кровообращения, СД — сахарный диабет.

ности, секвенирование по Сенгеру выполнено 416 чел., таргетное секвенирование — 1178 чел., полноэкзомное секвенирование — 186 чел., полногеномное секвенирование — 763 чел.

Клиническое и научно-практическое приложение проекта IPPM

Подход к сбору биоматериала и информации, реализованный в проекте IPPM, открывает новые возможности в решении ряда важных клинических и научно-практических задач.

1) Своевременная постановка или уточнение диагноза

Одной из задач, которые позволяет решить сбор биоматериала и данных от пациентов с интересными и редкими клиническими случаями, является своевременная постановка или уточнение диагноза. Одним из примеров решения подобной задачи может

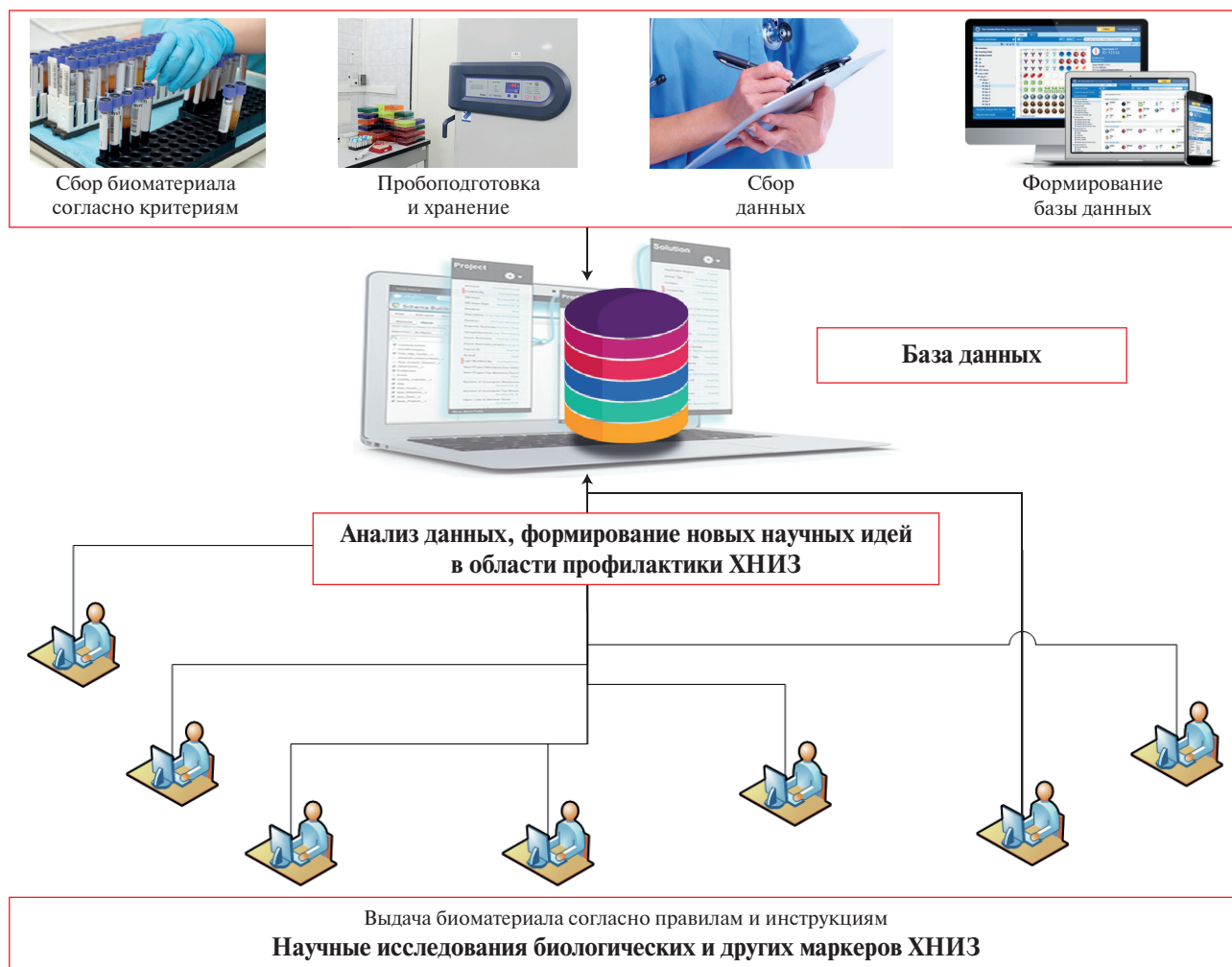


Рис. 3 Схема проекта IPPM.

Примечание: ХНИЗ — хронические неинфекционные заболевания.

служить следующий клинический случай — мужчина, 41 год, с подозрением на наличие дисплазии соединительной ткани: высокий рост с детства, развитие варикозного расширения вен нижних конечностей с юношеского возраста, выраженная миопия, нарушения опорно-двигательного аппарата (арахнодактилия кистей, сандалевидные стопы, сколиоз, килевидная асимметрия грудной клетки, гиперподвижность суставов), готическое небо, скрученность зубов, гиперэластичность кожи, множественные "папиросные" рубцы и стрии на коже, аневризма корня аорты [11]. Биоматериал пациента и его родственников первой линии родства был сохранен в рамках проекта IPPM. Пациент был консультирован врачом-генетиком, учитывая фенотип больного, установлен диагноз наследственного нарушения соединительной ткани, рекомендовано проведение дифференциальной диагностики между синдромом Марфана и синдромом Элерса-Данлоса. Благодаря наличию в биобанке биообразцов и клинических данных пациента и его родственников стало возможным оперативное проведение молекулярно-

генетического исследования, по результатам которого установлен диагноз синдрома Марфана: у проба́нда и его 3-летнего сына был выявлен новый, ранее не описанный вариант нуклеотидной последовательности (ВНП) в гене *FBNI* — (hg19::chr15: 48757772_48757775del, p.R1644fs). После получения данных молекулярно-генетического анализа педиатрами проведено дополнительное обследование сына пациента: по результатам эхокардиографии выявлены аневризма аорты, пролапс створок митрального клапана, пролапс створок трикуспидального клапана, установлен диагноз синдрома Марфана [11]. Ранняя постановка диагноза открывает широкие возможности для своевременной профилактики и качественного динамического наблюдения подобных больных.

Показательным является еще один случай — пациентка, 41 год, госпитализированная в НМИЦ ТПМ с целым спектром разнообразных, казалось бы, никак не связанных между собой клинических симптомов: одышка при физической нагрузке с подросткового возраста; макротромбоцитопения;

артралгия коленных суставов; поликистоз яичников с резекцией в 23 года; замершая беременность в анамнезе; слабость родовой деятельности, потребовавшая проведения кесарева сечения; выраженное повышение уровня общего холестерина и холестерина липопротеинов низкой плотности; тяжелое многососудистое поражение коронарных артерий в 36 лет, потребовавшее выполнения аортокоронарного шунтирования; раннее наступление менопаузы в 39 лет [12]. Семейный анамнез относительно раннего развития сердечно-сосудистых заболеваний был не отягощен. С учетом клинической картины, согласно критериям сети голландских липидных клиник, липидологом был установлен диагноз семейная гиперхолестеринемия (СГХС). Вместе с тем было рекомендовано биобанкирование в рамках проекта IPPM для последующего проведения генетического тестирования [12]. Благодаря сохранению биообразцов, в последующем стало возможным проведение таргетного секвенирования 25 генов, ответственных за липидный обмен. В результате генетического тестирования патогенных ВНП в генах, ассоциированных с развитием СГХС, обнаружено не было. При этом выявлено, что пациентка является гомозиготой относительно ВНП в гене *ABCG8* (NM_022437.2: c.1083G >A, p.Trp361Ter), который описан как патогенный в отношении развития редкого аутосомно-рецессивного заболевания — ситостеролемии, характеризующегося нарушением обмена растительных стеролов, поступающих с пищей, и отложением их в различных тканях и органах. Была исследована сыворотка крови, хранившаяся в биобанке. Выявлено, что уровень растительных стеролов в крови данной пациентки существенно повышен: для ситостерола в 16 раз, для кампестерола в 6 раз, что явилось дополнительным подтверждением диагноза и объяснением всех имеющих у пациентки клинических проявлений [12]. Данный пример показывает, что именно биобанкирование крови в рамках проекта IPPM и проведение генетического тестирования позволили установить точный диагноз у пациентки, наблюдавшейся по поводу разнообразных, в т.ч. тяжелых диагнозов у разных врачей в течение многих лет, подобрать этиологически обоснованное лечение, в т.ч. прием эзетимиба и диетические рекомендации относительно значительного ограничения количества потребляемых с пищей растительных стеролов [12].

Проведение генетического тестирования позволяет выявлять ВНП, ответственные за манифестацию заболевания в той или иной семье. В частности, опубликованы данные обследования и генотипирования семей с фенотипом некомпактной кардиомиопатии: выявлены патогенные ВНП в генах *MYH7*, *RBM20*, *PRDM16*, *FLNC*, *MYBPC3*, *TTN* и др. [13–19]. Подобный подход позволяет провести генетический анализ и раннюю диагностику у всех

доступных членов семьи и, при выявлении патогенного ВНП, осуществить максимально раннюю профилактику и более тщательное динамическое наблюдение, что, безусловно, может существенно улучшить прогноз у данных пациентов.

2) Формирование когорт пациентов для изучения генетических аспектов заболеваний

Подход к сбору биоматериала пациентов в рамках проекта IPPM в соответствии с четкими критериями включения позволяет формировать когорты больных с различными нозологиями. В частности, создается одна из самых больших коллекций биообразцов пациентов с некомпактной кардиомиопатией и их родственников (>350 семей, >800 чел.). В 2023г был проведен генетический анализ у членов 48 семей с подробно описанным фенотипом (n=214). Было идентифицировано 54 патогенных и вероятно патогенных ВНП в 24 генах (преимущественно в генах *MYH7* и *TTN*) [20]. Выявлено, что в одной семье могут манифестировать различные подтипы некомпактной кардиомиопатии левого желудочка, а более тяжелое течение заболевания у пациента может быть обусловлено наличием нескольких ВНП. Данные результаты поддерживают идею о том, что пациентам с некомпактной кардиомиопатией может быть рекомендовано генетическое тестирование для более корректных диагностики и определения прогноза [20]. Данное исследование расширило понимание генетического ландшафта некомпактной кардиомиопатии и возможности клинической интерпретации генетических данных пациентов с данной патологией в России.

Пациенты из проекта IPPM вошли в когорту с диагностированной СГХС, включившую 595 пробандов, из которых, согласно клиническим критериям, у 6 пациентов наблюдался фенотип гомозиготной СГХС, у остальных — гетерозиготной СГХС [21]. С помощью таргетного и полногеномного секвенирования у 49,4% пациентов идентифицированы ВНП в генах *LDLR*, *APOB* и *PCSK9*, ассоциированные с развитием СГХС [21]. Полученные данные служат уникальным справочником для клинической интерпретации генетических данных пациентов с СГХС в России.

3) Выявление новых генетических ВНП наследственных заболеваний

Описанная выше работа по изучению генетического ландшафта заболеваний, помимо всего прочего, позволяет выявлять новые генетические ВНП, не описанные ранее. В частности, при изучении когорты пациентов с некомпактной кардиомиопатией 14,8% ВНП ранее не были описаны в других популяциях и могут являться специфичными для населения России [20]. При исследовании биоматериала пациентов с СГХС впервые обнаружено 34 новых ВНП в гене *LDLR*, 6 новых ВНП в гене *APOB* и 6 новых ВНП в гене *PCSK9* [21].

Примером процесса выявления и подтверждения патогенности новых ВНП может служить случай сочетания некомпактной кардиомиопатии левого желудочка с миопатией скелетных мышц. Благодаря тому, что кровь пациентов из обследуемой семьи в стандартизированном виде хранилась в биобанке в рамках проекта IPPM, стало возможным проведение генетического тестирования, в результате которого выявлен редкий вероятно патогенный ВНП в гене *DES* (p.A337P). Патогенность данного варианта была подтверждена путем проведения функционального анализа, который был выполнен в рамках международного сотрудничества с участием лаборатории университетской клиники Института Эриха и Ханны Клесманн (Германия) [22]. Одним из важных выводов данной работы стало предложение о включении гена *DES* в генетический анализ для пациентов с некомпактной кардиомиопатией в будущем, особенно если присутствует клиническое поражение скелетных мышц [22].

4) Разработка генетических диагностических панелей

А) Для диагностики моногенных заболеваний

Работа по изучению генетического ландшафта СГХС в России позволила выявить наиболее характерные для представителей российской популяции ВНП, ассоциированные с СГХС, ставшие основой для создания незарегистрированной тест-системы для диагностики СГХС, которая внедрена в работу НМИЦ ТПМ. Выявленные в работе ВНП также легли в основу создания тест-системы для диагностики предрасположенности к раннему развитию ИБС².

Б) Для диагностики полигенных заболеваний

На сегодняшний день активно развивается направление по созданию шкал генетического риска (ШГР) хронических неинфекционных заболеваний, для разработки которых требуются выборки большого размера. Однако для валидации разработанных ШГР может быть достаточно выборки небольшого размера, созданной по четко заданным критериям. Так, когорта больных с ранним развитием ИБС, созданная в рамках проекта IPPM, позволила провести валидацию ШГР ИБС [23].

5) Изучение редких заболеваний

В рамках проекта IPPM собирается коллекция биообразцов пациентов с редкими заболеваниями, в частности, с атаксией Фридрейха, болезнью Фабри и др. Сбор и сохранение биоматериала и ассоциированной клинической информации по единому стандарту позволяют собирать данные и биообраз-

цы от значимого количества пациентов с течением времени, что может явиться основой для клинических и фундаментальных научных исследований в будущем как в рамках НМИЦ ТПМ, так и в сотрудничестве с другими центрами, изучающими подобные патологии [24-26].

Сохранение биоматериала может иметь важное клиническое значение для ряда пациентов с редкой клинической симптоматикой. Показательным является случай семьи с множественными фенотипическими аномалиями. Благодаря включению в проект IPPM и возможности генетического анализа трех поколений семьи при клиническом обследовании и генетическом тестировании родственников пробанда с некомпактной кардиомиопатией, у всех пациентов из данной семьи, имеющих признаки кардиомиопатии, удалось выявить ВНП с.4411-2A>C в гене *ALPK3*, влияющий на сплайсинг; при этом впервые был проведен функциональный анализ данного ВНП, который подтвердил гаплонедостаточность белкового продукта [27]. Кроме того, у сестры пробанда был выявлен патогенный ВНП в гене *GATA3*, ассоциированный с HDR-синдромом (сочетание гипопаратиреоза, нейросенсорной тугоухости, дисплазии почек), а у дочери пробанда обнаружен другой крайне редкий ВНП p.Ser251del в гене *WDR45*, ассоциированный с нейродегенерацией, связанной с β -пропеллерным белком [27]. Этот уникальный случай трех моногенных заболеваний в одной семье показывает, как комплексный подход с тщательным фенотипированием и обширным генетическим тестированием всех лиц с симптомами обеспечивает точную диагностику и соответствующее последующее наблюдение, воплощая концепцию персонализированной медицины.

6) Сокращение времени для создания выборки пациентов при возникновении новой научной идеи

Примером реализации данной задачи может служить совместное исследование с биобанком Санкт-Петербургского государственного университета (СПбГУ) [28]. У исследователей возникла идея использования изучения генетических маркеров ожирения и СД. Для реализации идеи требовались выборки пациентов с ожирением II-III ст. без СД, с СД 2 типа без ожирения и с сочетанием данных диагнозов. Поиск подобных групп пациентов является достаточно трудоемким и затратным по времени. В связи с тем, что к тому моменту в рамках проекта IPPM уже было накоплено значительное количество биообразцов и ассоциированных с ними данных, был проведен поиск по заданным критериям включения и исключения, отобрано значительное количество пациентов, которого хватило в совокупности с биообразцами из биобанка СПбГУ для формирования каждой из требуемых выборок. Такой подход позволил сразу приступить непосредственно к экспериментальной части ра-

² Мешков А.Н., Киселева А., Ершова А.И. и др. Патент № 2762958 С1 Российская Федерация, МПК А61В 5/145. Способ прогнозирования риска развития ишемической болезни сердца на основании данных генетического тестирования. Заявка № 2021125458 от 30.08.2021. Оpubл. 24.12.2021, Бюлл. № 36. Заявитель ФГБУ "Национальный медицинский исследовательский центр терапии и профилактической медицины" Минздрава России — EDN AW7TYU.

боты, анализу генетических особенностей каждой из групп. В результате от момента возникновения научной идеи до публикации результатов в высоко-рейтинговом журнале прошло <1 года, что является очень хорошим показателем [28].

Таким образом, предложенный в 2016г подход к сбору биоматериала пациентов с редкими и интересными для определенных научных целей клиническими случаями демонстрирует высокую эффективность для решения целого ряда задач. Подход уникален тем, что представляет собой целостную, хорошо организованную работу по выявлению пациентов с разнообразными, представляющими научный и клинический интерес заболеваниями, сохранению биоматериала и данных и дальнейшего анализа биохимических и генетических маркеров как в рамках работы по постановке и уточнению диагноза, так и с целями научного изучения редких и необычных патологий. Анализ литературы не выявил работ, использующих подобный подход к формированию коллекции биообразцов с широким спектром разработанных экспертами критериев включения для изучения разнообразных редких и интересных клинических случаев.

Стандартизация всех процедур преаналитического этапа исследований в рамках биобанкирования дает возможность объединения усилий различных биобанков и исследовательских групп с целью изучения редких заболеваний [29]. Примером такого объединения может служить Европейская сеть биобанков, изучающих редкие заболевания [30]. Эксперты данной сети подчеркивают, что для повышения эффективности биобанков редких заболеваний, необходимо решить три основные задачи: 1) максимизировать доступ научному сообществу к редким биологическим образцам, хранящимся в биобанках по всему миру; 2) содействовать сетевому взаимодействию таких биобанков для обмена стандартами и процедурами качества; 3) создать эффективную модель управления, соответствующую правовым и этическим нормам и обеспечивающую устойчивость биобанков [30].

В России в 2018г была создана Национальная ассоциация биобанков и специалистов по биобанкированию (НАСБИО), которая объединяет 44 организации и 50 специалистов в сфере биобанкирования³ [3, 31]. Среди прочего, в рамках работы

НАСБИО создается единая платформа, объединяющая различные биобанки нашей страны. Кроме того, в 2022г в России образована Национальная ассоциация экспертов по редким заболеваниям⁴. Перспективным может явиться взаимодействие специалистов двух ассоциаций с целью совершенствования практик биообанкирования и научного изучения биообразцов пациентов с редкими и наследственными заболеваниями.

Заключение

Предложенный подход, подразумевающий сбор и сохранение биообразцов и ассоциированных с ними клинических, социально-демографических, лабораторных, инструментальных, генетических и других видов данных у пациентов с редкими и представляющими научный интерес клиническими случаями, является важным и эффективным для решения целого ряда задач как в сфере изучения новых биомаркеров, так и в решении научно-практических вопросов постановки и уточнения диагноза, оптимизации и персонализации лечения пациентов. Особенностью проекта IPPM является широкий набор критериев, который разработан специалистами экспертного уровня, позволяющий включить большое количество разнообразных клинических случаев, требующих углубленного изучения и персонализированного подхода. Важным является тот факт, что алгоритм работы хорошо проработан, стандартизован и легко реализуем в рамках научно-медицинских клиник, независимо от их размера. Биобанкирование позволяет собирать уникальные коллекции биоматериала и базы данных, проводить генетическое тестирование, определение ряда биомаркеров в отсроченном режиме, что открывает новые возможности для персонализированной диагностики и лечения в сложных и нетипичных клинических случаях. Стандартизация преаналитического этапа в рамках биобанкирования интересных для научного изучения и редких клинических случаев создает предпосылки для развития многоцентрового сотрудничества на национальном и международном уровне.

Отношения и деятельность. Исследование выполнено за счет гранта Российского Научного Фонда № 22-15-00507.

³ About the association — NASBIO. Accessed October 5, 2021. http://nasbio.ru/about_us/ob-assocciaczii.html (10 September 2024).

⁴ National association of rare disease experts. <http://naerez.ru/#naerez> (10 September 2024).

Литература/References

1. Kopylova OV, Ershova AI, Pokrovskaya MS, et al. Population-nosological research biobank of the National Medical Research Center for Therapy and Preventive Medicine: analysis of bio-samples, principles of collecting and storing information. Cardiovascular Therapy and Prevention. 2021;20(8):3119. (In Russ.) Копылова О.В., Ершова А.И., Покровская М.С. и др. Популяционно-нозологический исследовательский биобанк "НМИЦ ТПМ": анализ коллекций биообразцов, принципы сбора и хранения информации. Кардиоваскулярная терапия и профилактика. 2021;20(8):3119. doi:10.15829/1728-8800-2021-3119.
2. Zohouri M, Ghaderi A. The Significance of Biobanking in the Sustainability of Biomedical Research: A Review. Iran Biomed J. 2020;24(4):206-13. doi:10.29252/ibj.24.4.206.

3. Meshkov AN, Glotov AS, Anisimov SV, et al. National Association of Biobanks and Biobanking Specialists. BIOBANKING. NATIONAL GUIDE. Triumph Publishing House; 2022. (In Russ.) Мешков А. Н., Глотов А. С., Анисимов С. В. и др. Национальная ассоциация биобанков и специалистов по Биобанкированию. БИОБАНКИРОВАНИЕ. НАЦИОНАЛЬНОЕ РУКОВОДСТВО. Изд-во Триумф; 2022. ISBN: 978-5-93673-322-2.
4. Pokrovskaya MS, Sivakova OV, Efimova IA, et al. Biobanking as a necessary tool for research in the field of personalized medicine in the scientific medical center. Pers Med. 2019;16(6):501-9. doi:10.2217/pme-2019-0049.
5. Galvin JW, Patterson BM, Bozoghlian M, et al. Musculoskeletal Biorepository: Establishment, Sustainment, and Tips for Success. J Am Acad Orthop Surg. 2024;32(11):485-93. doi:10.5435/JAAOS-D-24-00153.
6. Xu W, Liang X, Chen L, et al. Biobanks in chronic disease management: A comprehensive review of strategies, challenges, and future directions. Heliyon. 2024;10(11):e32063. doi:10.1016/j.heliyon.2024.e32063.
7. Asbury CH. The Orphan Drug Act. The first 7 years. JAMA. 1991;265(7):893-7.
8. Pinto e Vairo F, Kemppainen JL, Vitek CRR, et al. Implementation of genomic medicine for rare disease in a tertiary healthcare system: Mayo Clinic Program for Rare and Undiagnosed Diseases (PRAUD). J Transl Med. 2023;21(1):410. doi:10.1186/s12967-023-04183-7.
9. Wang Q, Dhindsa RS, Carss K, et al. Rare variant contribution to human disease in 281,104 UK Biobank exomes. Nature. 2021;597(7877):527-32. doi:10.1038/s41586-021-03855-y.
10. Patrick MT, Bardhi R, Zhou W, et al. Enhanced rare disease mapping for phenotype-wide genetic association in the UK Biobank. Genome Med. 2022;14(1):85. doi:10.1186/s13073-022-01094-y.
11. Meshkov AN, KaluginA EV, Kiseleva AV, et al. Genetic screening in the family of a patient with connective tissue dysplasia syndrome and a new pathogenic variant of the FBN1 gene. Russian Journal of Preventive Medicine. 2020;23(2):109-16. (In Russ.) Мешков А. Н., Калугина Е. В., Киселева А. В. и др. Генетический скрининг в семье пациента с синдромом дисплазии соединительной ткани и новым патогенным вариантом гена FBN1. Профилактическая медицина. 2020;23(2):109-16. doi:10.17116/profmed202023021109.
12. Limonova AS, Ershova AI, Meshkov AN, et al. Case Report: Next Generation Sequencing in Clinical Practice—A Real Tool for Ending the Protracted Diagnostic Odyssey. Front Cardiovasc Med. 2022;8. doi:10.3389/fcvm.2021.778961.
13. Myasnikov RP, Kulikova OV, Meshkov AN, et al. A Splice Variant of the MYH7 Gene Is Causative in a Family with Isolated Left Ventricular Noncompaction Cardiomyopathy. Genes (Basel). 2022;13(10):1750. doi:10.3390/genes13101750.
14. Kudryavtseva MM, Kiseleva AV, Myasnikov RP, et al. Nucleotide sequence variant of the TPM1 gene in a family with different phenotypes of left ventricular non-compaction. Cardiovascular Therapy and Prevention. 2022;21(12):3471. (In Russ.) Кудрявцева М. М., Киселева А. В., Мясников Р. П. и др. Вариант нуклеотидной последовательности гена TPM1 в семье с различными фенотипами некомпактного миокарда левого желудочка. Кардиоваскулярная терапия и профилактика. 2022;21(12):3471. doi:10.15829/1728-8800-2022-3471.
15. Kulikova OV, Myasnikov RP, Meshkov AN, et al. RBM20 nucleotide sequence variant in a family with a dilated phenotype of left ventricular non-compaction. Cardiovascular Therapy and Prevention. 2022;21(12):3470. (In Russ.) Куликова О. В., Мясников Р. П., Мешков А. Н. и др. Вариант нуклеотидной последовательности гена RBM20 в семье с дилатационным фенотипом некомпактного миокарда левого желудочка. Кардиоваскулярная терапия и профилактика. 2022;21(12):3470. doi:10.15829/1728-8800-2022-3470.
16. Myasnikov RP, Bukaeva AA, Kulikova OV, et al. New variant of PRDM16 gene nucleotide sequence in a family with various phenotypic manifestations of the non-compacted myocardium. Russian Journal of Cardiology. 2021;26(1S):4315. (In Russ.) Мясников Р. П., Букаева А. А., Куликова О. В. и др. Новый вариант нуклеотидной последовательности гена PRDM16 в семье с различными фенотипическими проявлениями некомпактного миокарда. Российский кардиологический журнал. 2021;26(1S):4315. doi:10.15829/1560-4071-2021-4315.
17. Kulikova OV, Myasnikov RP, Meshkov AN, et al. Variant of the FLNC gene nucleotide sequence in a family with different phenotypic manifestations of left ventricular non-compaction. Russian Journal of Cardiology. 2021;26(10):4748. (In Russ.) Куликова О. В., Мясников Р. П., Мешков А. Н. и др. Вариант нуклеотидной последовательности гена FLNC в семье с различными фенотипическими проявлениями некомпактного миокарда левого желудочка. Российский кардиологический журнал. 2021;26(10):4748. doi:10.15829/1560-4071-2021-4748.
18. Myasnikov RP, Kulikova OV, Meshkov AN, et al. New Variant of MYH7 Gene Nucleotide Sequence in Familial Non-Compaction Cardiomyopathy with Benign Course. Rational Pharmacotherapy in Cardiology. 2020;16(3):383-91. (In Russ.) Мясников Р. П., Куликова О. В., Мешков А. Н. и др. Новый вариант нуклеотидной последовательности в гене MYH7 у пациентов с семейной формой некомпактной кардиомиопатии с доброкачественным течением. Рациональная Фармакотерапия в Кардиологии. 2020;16(3):383-91. doi:10.20996/1819-6446-2020-06-01.
19. Myasnikov RP, Kulikova OV, Meshkov AN, et al. The combination of left ventricular non-compaction and hypertrophic cardiomyopathy in one family with a pathogenic variant in the MYBPC3 gene (rs397516037). Russian Journal of Cardiology. 2020;25(10):4115. (In Russ.) Мясников Р. П., Куликова О. В., Мешков А. Н. и др. Сочетание некомпактного миокарда левого желудочка и гипертрофической кардиомиопатии в одной семье с патогенным вариантом нуклеотидной последовательности в гене MYBPC3 (rs397516037). Российский кардиологический журнал. 2020;25(10):4115. doi:10.15829/1560-4071-2020-4115.
20. Meshkov AN, Myasnikov RP, Kiseleva AV, et al. Genetic landscape in Russian patients with familial left ventricular noncompaction. Front Cardiovasc Med. 2023;10. doi:10.3389/fcvm.2023.1205787.
21. Meshkov A, Ershova A, Kiseleva A, et al. The LDLR, APOB, and PCSK9 Variants of Index Patients with Familial Hypercholesterolemia in Russia. Genes (Basel). 2021;12(1):66. doi:10.3390/genes12010066.
22. Kulikova O, Brodehl A, Kiseleva A, et al. The Desmin (DES) Mutation p.A337P Is Associated with Left-Ventricular Non-Compaction Cardiomyopathy. Genes (Basel). 2021;12(1):121. doi:10.3390/genes12010121.
23. Ershova AI, Meshkov AN, Kutsenko VA, et al. Validation of genetic risk scores for coronary artery disease, developed on European population samples, in Russian population. Cardiovascular Therapy and Prevention. 2023;22(12):3856. (In Russ.) Ершова А. И., Мешков А. Н., Куценко В. А. и др. Валидация шкал генетического риска ишемической болезни сердца, разработанных на европейских популяционных выборках, у представителей российской популяции. Кардиоваскулярная терапия и профилактика. 2023;22(12):3856. doi:10.15829/1728-8800-2023-3856.

24. Fomicheva EI, Myasnikov RP, Selivyorstov YA, et al. Cardiomyopathy in the Friedreich ataxia: clinical presentation and diagnostics of complications. *Russian Journal of Cardiology*. 2017;(10):100-6. (In Russ.) Фомичева Е.И., Мясников Р.П., Селивёрстов Ю.А. и др. Кардиомиопатия при атаксии Фридрейха: клинические проявления и диагностика осложнений. *Российский кардиологический журнал*. 2017;(10):100-6. doi:10.15829/1560-4071-2017-10-100-106.
25. Fomicheva EI, Myasnikov RP, Selivyorstov YA, et al. Cardiomyopathy of Friedreich's Disease. *Modern Methods of Diagnostic. Rational Pharmacotherapy in Cardiology*. 2021;17(1):105-10. (In Russ.) Фомичева Е.И., Мясников Р.П., Селиверстов Ю.А. и др. Кардиомиопатия при болезни Фридрейха: современные методы диагностики. *Рациональная Фармакотерапия в Кардиологии*. 2021;17(1):105-10. doi:10.20996/1819-6446-2021-01-05.
26. Zlobina PD, Kalemberg AA, Myasnikov RP, et al. Shortened PQ interval in the differential diagnosis of Anderson-Fabry disease: a case report. *Russian Journal of Cardiology*. 2022;27(7):5123. (In Russ.) Злобина П.Д., Калемберг А.А., Мясников Р.П. и др. Укороченный интервал PQ в дифференциальной диагностике болезни Андерсона-Фабри *Российский кардиологический журнал*. 2022;27(7):5123. doi:10.15829/1560-4071-2022-5123.
27. Bukaeva A, Myasnikov R, Kulikova O, et al. A Rare Coincidence of Three Inherited Diseases in a Family with Cardiomyopathy and Multiple Extracardiac Abnormalities. *Int J Mol Sci*. 2024; 25(14):7556. doi:10.3390/ijms25147556.
28. Barbitoff YA, Serebryakova EA, Nasykhova YA, et al. Identification of Novel Candidate Markers of Type 2 Diabetes and Obesity in Russia by Exome Sequencing with a Limited Sample Size. *Genes (Basel)*. 2018;9(8). doi:10.3390/GENES9080415.
29. Kodra Y, Weinbach J, Posada-de-la-Paz M, et al. Recommendations for Improving the Quality of Rare Disease Registries. *Int J Environ Res Public Health*. 2018;15(8):1644. doi:10.3390/ijerph15081644.
30. Monaco L, Crimi M, Wang CM. The Challenge for a European Network of Biobanks for Rare Diseases Taken up by RD-Connect. *Pathobiology*. 2014;81(5-6):231-6. doi:10.1159/000358492.
31. Anisimov SV, Meshkov AN, Glotov AS, et al. National Association of Biobanks and Biobanking Specialists: New Community for Promoting Biobanking Ideas and Projects in Russia. *Biopreserv Biobank*. 2021;19(1):73-82. doi:10.1089/bio.2020.0049.

Создание коллекции образцов плазмы для поиска диагностических биомаркеров глиальных опухолей

Омельчук Е. П., Тимошкина Н. Н., Гвалдин Д. Ю., Петрусенко Н. А., Росторгуев Э. Е., Новикова И. А., Кит О. И.

ФГБУ "Национальный медицинский центр онкологии" Минздрава России. Ростов-на-Дону, Россия

Цель. Создание коллекции образцов плазмы крови пациентов с опухолями головного мозга (ГМ) для разработки диагностической микроРНК (рибонуклеиновая кислота) панели глиальных опухолей.

Материал и методы. Образцы плазмы крови пациентов с доброкачественными и злокачественными опухолями ГМ были получены путем двойного центрифугирования цельной крови, а затем заморожены при -75°C . Выделенные из плазмы крови 59 образцов РНК исследованы методом next-generation sequencing (NGS)-секвенирования.

Результаты. На текущий момент в биобанке депонированы образцы 339 пациентов с первичными и вторичными опухолями ГМ и 10 человек контрольной группы (всего 698 образцов — по 2 аликвоты плазмы/человека), из которых 143 мужчины, 206 женщин. Возраст больных варьировал от 19 до 91 года, медиана составила 56 лет. Первичные опухоли ГМ (41%) включали две группы: доброкачественные (33,7%) и злокачественные (66,3%). Менингиомы составили основную часть (91%) группы доброкачественных новообразований. Среди злокачественных новообразований преобладали глиобластомы (46,7%) и астроцитомы (41,6%), а олигодендроглиомы и эпендимомы составили всего 9,1 и 2,5%, соответственно. Вторичные опухоли ГМ (59%) представлены рецидивирующими глиальными опухолями (92,5%) и метастатическими опухолями (7,5%) рака легких (71,4%) и рака молочных желез (28,6%). Внедрен протокол первичной подготовки образцов жид-

костной биопсии, позволившей получить библиотеки ДНК (дезоксирибонуклеиновая кислота) высокого качества для выбранной платформы профилирования микроРНК.

Заключение. Создание депозитария образцов плазмы крови является основой для поиска циркулирующих биомаркеров опухолей ГМ.

Ключевые слова: биобанкинг, глиальные опухоли, коллекция образцов, плазма крови, биомаркеры, микроРНК.

Отношения и деятельность. Работа выполнена в рамках государственного задания Минздрава России (госрегистрация № 123030200082-9).

Поступила 29/08-2024

Рецензия получена 30/09-2024

Принята к публикации 14/10-2024



Для цитирования: Омельчук Е. П., Тимошкина Н. Н., Гвалдин Д. Ю., Петрусенко Н. А., Росторгуев Э. Е., Новикова И. А., Кит О. И. Создание коллекции образцов плазмы для поиска диагностических биомаркеров глиальных опухолей. *Кардиоваскулярная терапия и профилактика*. 2024;23(11):4171. doi: 10.15829/1728-8800-2024-4171. EDN OLWCVE

Creation of a plasma collection for the search of diagnostic biomarkers of glial tumors

Omelchuk E. P., Timoshkina N. N., Gvaldin D. Yu., Petrusenko N. A., Rostorguev E. E., Novikova I. A., Kit O. I.
National Medical Research Center for Oncology. Rostov-on-Don, Russia

Aim. To create a collection of plasma samples of patients with brain tumors (BTs) for the development of a diagnostic microRNA (ribonucleic acid) panel of glial tumors.

Material and methods. Plasma samples of patients with benign and malignant BTs were obtained by double centrifugation of whole blood and then frozen at -75°C . Fifty-nine RNA samples isolated from blood plasma were analyzed by next-generation sequencing (NGS).

Results. Currently, the biobank contains samples from 339 patients with primary and secondary BTs and 10 control group individuals (698 samples — 2 plasma aliquots per individual), including 143 men and 206 women. The age of the patients ranged from 19 to 91 years (median — 56 years). Primary BTs (41%) included two following

groups: benign (33,7%) and malignant (66,3%). Meningiomas constituted the bulk (91%) of the benign BTs. Among the malignant tumors, glioblastomas (46,7%) and astrocytomas (41,6%) prevailed, while oligodendrogliomas and ependymomas accounted for only 9,1 and 2,5%, respectively. Secondary BTs (59%) are represented by recurrent glial tumors (92,5%) and metastatic tumors (7,5%) of lung cancer (71,4%) and breast cancer (28,6%). A protocol for the primary preparation of liquid biopsy samples was implemented, which made it possible to obtain high-quality deoxyribonucleic acid libraries for the selected microRNA profiling platform.

Conclusion. The creation of a plasma sample collection is the basis for searching circulating biomarkers of BTs.

*Автор, ответственный за переписку (Corresponding author):

e-mail: ekaterina.omelchuck@yandex.ru

[Омельчук Е. П. — м.н.с. лаборатории молекулярной онкологии, ORCID: 0000-0003-0786-9684, Тимошкина Н. Н. — к.б.н., зав. лаборатории молекулярной онкологии, ORCID: 0000-0001-6358-7361, Гвалдин Д. Ю. — к.б.н., с.н.с. лаборатории молекулярной онкологии, ORCID: 0000-0001-8633-2660, Петрусенко Н. А. — м.н.с. лаборатории молекулярной онкологии, ORCID: 0000-0001-7919-6111, Росторгуев Э. Е. — д.м.н., доцент, зав. отделением нейроонкологии, ORCID: 0000-0003-2937-0470, Новикова И. А. — д.м.н., зам. генерального директора по науке, ORCID: 0000-0002-6496-9641, Кит О. И. — д.м.н., профессор, академик РАН, генеральный директор, ORCID: 0000-0003-3061-6108].

Keywords: biobanking, glial tumors, sample collection, blood plasma, biomarkers, microRNA.

*Corresponding author:
ekaterina.omelchuck@yandex.ru

Relationships and Activities. The study was carried out within the state assignment of the Ministry of Health of the Russian Federation (state registration № 123030200082-9).

Received: 29/08-2024
Revision Received: 30/09-2024
Accepted: 14/10-2024

Omelchuk E. P.* ORCID: 0000-0003-0786-9684, Timoshkina N. N. ORCID: 0000-0001-6358-7361, Gvaldin D. Yu. ORCID: 0000-0001-8633-2660, Petrusenko N. A. ORCID: 0000-0001-7919-6111, Rostorguev E. E. ORCID: 0000-0003-2937-0470, Novikova I. A. ORCID: 0000-0002-6496-9641, Kit O. I. ORCID: 0000-0003-3061-6108.

For citation: Omelchuk E. P., Timoshkina N. N., Gvaldin D. Yu., Petrusenko N. A., Rostorguev E. E., Novikova I. A., Kit O. I. Creation of a plasma collection for the search of diagnostic biomarkers of glial tumors. *Cardiovascular Therapy and Prevention*. 2024;23(11):4171. doi: 10.15829/1728-8800-2024-4171. EDN OLCWVE

ГМ — головной мозг, ДНК — дезоксирибонуклеиновая кислота, микроРНК — малые некодирующие молекулы рибонуклеиновой кислоты, РНК — рибонуклеиновая кислота, ЦНС — центральная нервная система, NGS-секвенирование — next-generation sequencing (секвенирование следующего поколения/секвенирование нового поколения).

Ключевые моменты

Что известно о предмете исследования?

- Биобанкирование является основой для исследований по поиску опухоль-ассоциированных маркеров в биологических жидкостях.
- Малые некодирующие молекулы рибонуклеиновой кислоты (микроРНК) представляют собой наиболее многообещающие циркулирующие биомаркеры опухолей глиального ряда.

Что добавляют результаты исследования?

- Создана коллекция образцов плазмы пациентов с первичными и вторичными опухолями головного мозга.
- Из плазмы экстрагирована фракция микроРНК и подвергнута NGS (next-generation sequencing) секвенированию для поиска опухоль-специфичных маркеров глиом.

Key messages

What is already known about the subject?

- Biobanking is the basis for research on tumor-associated markers in biological fluids.
- Small non-coding ribonucleic acid molecules (microRNA) are the most promising circulating biomarkers of glial tumors.

What might this study add?

- A collection of plasma samples from patients with primary and secondary brain tumors was created.
- A fraction of microRNA was extracted from the plasma and subjected to next-generation sequencing to search for tumor-specific glioma markers.

Введение

По данным Всемирной организации здравоохранения (ВОЗ) в 2022г в мире выявлено ~20 млн случаев злокачественных новообразований различных локализаций. Опухоли центральной нервной системы (ЦНС) (международная классификация болезней (МКБ) С70-72) насчитывали 321731 (1,6%) случаев. В 2022г смертность при опухолях ЦНС составила >77% (ВОЗ)¹. В 2022г в РФ зарегистрировано 624835 случаев первично выявленных злокачественных новообразований, из которых опухоли ЦНС составили 8192 (1,3%). При этом смертность значительно выше среднемировой и достигает 91,7% [1]. Высокая смертность обусловлена не только чрезвычайной агрессивностью опухолей головного мозга (ГМ), но и несовершенством неинвазивной диагностики, представленной в основном магнитно-резонансной томографией. Более того, постановка диагноза зачастую осуществляется

на поздних стадиях заболевания, когда возникают клинические проявления [2].

Решением проблемы малоинвазивной диагностики опухолей ГМ может стать поиск циркулирующих маркеров в биологических жидкостях, среди которых наиболее распространены кровь и спинномозговая жидкость [3, 4]. С точки зрения точности ликвор является наиболее предпочтительным источником опухолевых маркеров вследствие непосредственной близости к ГМ и отсутствию гематоэнцефалического барьера. Однако в связи с инвазивным характером люмбальной пункции и высокими рисками для пациента плазма крови представляется вариантом выбора, особенно при мониторинге опухолей ГМ [5]. Основные биомаркеры в плазме крови при внутричерепных опухолях представлены циркулирующими опухолевыми клетками, экзосомами, внеклеточной опухолевой ДНК (дезоксирибонуклеиновой кислотой), внеклеточной опухолевой РНК (рибонуклеиновой кислотой), и, в частности, микроРНК (малыми некодирующими молекулами рибонуклеиновой

¹ <https://gco.iarc.who.int/media/globocan/factsheets/populations/900-world-fact-sheet.pdf>.

кислоты), а также белками [6]. Циркулирующие микроРНК считаются одними из наиболее перспективных молекул для малоинвазивной диагностики опухолей ЦНС [3, 7, 8]. Малоинвазивный метод на основе выявления циркулирующих микроРНК позволит дополнить диагностику глиальных опухолей, снижая потребность в проведении стереотаксической биопсии, которая может быть причиной тяжелых осложнений и инвалидизации пациента. Предлагаемый подход, вероятно, обеспечит раннюю диагностику опухолей ГМ до появления неврологического дефицита в связи с прогрессированием заболевания [9].

Создание коллекции биологических образцов опухолей является основой для проведения качественных и воспроизводимых исследований [10], а также выявления механизмов, лежащих в основе патогенеза онкологических заболеваний [11]. В настоящее время в РФ функционирует >20 биобанков, где хранится биологический материал пациентов и культуры опухолевых клеток [12]. Первый биобанк опухолей глиального ряда на территории РФ основан в 2016г на базе ФГАУ "НМИЦ нейрохирургии имени академика Н.Н. Бурденко", Минздрава России, г. Москва. В данном биобанке находятся криоконсервированные и паспортизированные образцы ткани и плазмы крови пациентов с верифицированными опухолями ГМ [13]. Работа в этом направлении на базе "НМИЦ онкологии", г. Ростов-на-Дону, начата с 2017г. На сегодняшний день наш депозитарий опухолей ГМ включает >600 паспортизированных образцов крови, плазмы крови и образцов опухолей, хранящихся в низкотемпературных условиях [14].

В связи с актуальностью ранней диагностики опухолей ЦНС Минздрав России одобрил государственное задание "Разработка малоинвазивной диагностической панели опухолей головного мозга на основе циркулирующих микроРНК в плазме крови" (Госзадание № 123030200082-9). Работа выполняется на базе отделения нейроонкологии и лаборатории молекулярной онкологии "НМИЦ онкологии", г. Ростов-на-Дону.

Цель исследования — создание коллекции образцов плазмы крови пациентов с опухолями ГМ для разработки диагностической микроРНК-панели глиальных опухолей.

Материал и методы

Критерии отбора для биобанкирования включали: пациенты >18 лет, морфологически подтвержденный диагноз злокачественной или доброкачественной глиальной опухоли, или метастаз в ГМ (рак легких, рак молочной железы). Пациенты проходили лечение на базе "НМИЦ онкологии" в 2023-2024гг. В исследование также включена контрольная группа условно здоровых доноров без новообразований и патологий ГМ.

Все участники исследования подписали добровольное информированное согласие пациента или члена группы сравнения (письменное согласие на передачу биологического материала и обработку персональных данных оператору, а также на передачу и получение сведений, составляющих врачебную тайну). Проведение исследования было одобрено Локальным Советом по Этике "НМИЦ онкологии" Минздрава России.

Формирование коллекции образцов было начато со сверки соответствия пациента критериям включения/невключения в исследование и подписания информированного согласия. Затем был осуществлен сбор образцов крови натощак в вакуумные пробирки объемом 10 мл с К₂ЭДТА (калиевой солью этилендиаминтетрауксусной кислоты). В течение 30 мин кровь доставляли в лабораторию и подвергали последовательному двойному центрифугированию в режиме: 2000 об./мин 10 мин и 5000 об./мин 10 мин. Полученный объем плазмы разделяли на две криопробирки с присвоенными уникальными лабораторными номерами и немедленно замораживали при -75°С. Пробы регистрировали в базе данных, представленной в виде таблицы Excell (Microsoft Excel, США), содержащей следующие сведения: лабораторный номер пациента, дата взятия материала, пол, дата рождения, возраст, номер истории болезни, регион проживания, диагноз, TNM (tumor, nodus, metastasis) классификация, стадия развития заболевания, заключение прижизненного патолого-анатомического исследования биопсийного (операционного материала), сопутствующие патологии, проведенная терапия, результаты дополнительных анализов: иммуногистохимии, молекулярно-генетического тестирования на наличие мутаций в генах *IDH1/2* (кодирующих изоцитратдегидрогеназы 1 и 2). Все случаи были верифицированы в ходе морфологического исследования операционного или биопсийного материала опухоли. Параллельно образцы регистрировали с использованием программного обеспечения FreezerPro (Azenta Life Science, США).

Выделенные из плазмы крови 59 образцов РНК были исследованы методом NGS-секвенирования (next-generation sequencing, секвенирования следующего поколения/секвенирования нового поколения) с помощью набора QIAseq miRNA Library Kit (Qiagen, Германия) на приборе MiSeq Dx (Illumina, США). Анализ качества полученных ДНК библиотек проводили с помощью онлайн программы RNA-seq Analysis Portal (geneglobe.qiagen.com, Германия).

Результаты

Пациенты с впервые выявленными опухолями на момент забора крови для исследования не получали никакого лечения, а пациентам из группы вторичных опухолей ГМ было проведено оперативное удаление новообразования и/или химиолучевая терапия. У 52 пациентов образцы крови были отобраны как до, так и после лечения. При этом у 9 пациентов потребовалось повторное взятие крови вследствие нарушения времени транспортировки образца в лабораторию или гемолиза эритроцитов, что является критичным для получения достоверных результатов.

Таблица 1

Контроль качества образцов
(биоинформационный анализ
NGS-секвенирования) с помощью онлайн
программы RNA-seq Analysis Portal
(geneglobe.qiagen.com, Германия)

Номер образца	Количество прочтений	Количество аннотированных последовательностей по базам данных miRBase и piRNAdb
1	5581	2798
2*	897	321
3	3631	1539
4	4749	2078
5	6419	1990
6*	1928	254
7	5351	1586

Примечание: знаком * помечены образцы низкого качества. NGS-секвенирование — next-generation sequencing (секвенирование следующего поколения/секвенирование нового поколения).

Таблица 2

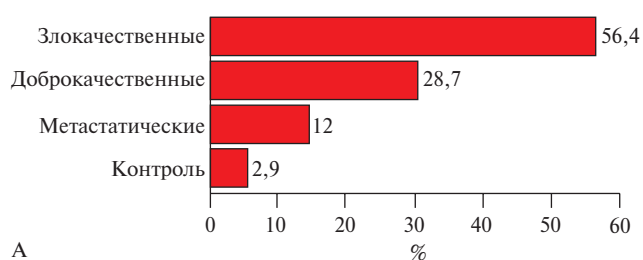
Характеристика исследуемой выборки

Характеристики	Пациенты, n (%)
Пол	
Мужчины	143 (41)
Женщины	206 (59)
Обращение	
Первичное	139 (41)
Повторное	200 (59)
Группы пациентов	
Злокачественные опухоли	197 (56,4)
Доброкачественные опухоли	100 (28,7)
Метастатические опухоли	42 (12)
Контроль	10 (2,9)
Итого	349 (100)

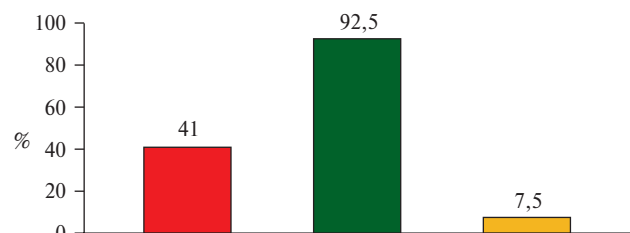
Таблица 3

Распределение пациентов
по гистологическому типу опухоли

	Гистологический тип опухоли	Количество пациентов	Количество образцов плазмы в биобанке
Доброкачественные опухоли	менингиома	91	182
	другие типы	9	18
Итого		100	200
Злокачественные опухоли	астроцитомы	82	164
	глиобластома	92	184
	олигодендроглиомы	18	36
	эпендимомы	5	10
Итого		197	394
Метастатические опухоли	метастазы рака легкого	30	60
	метастазы рака молочных желез	12	24
Итого		42	84
Норма		10	20
Итого		349	698



А

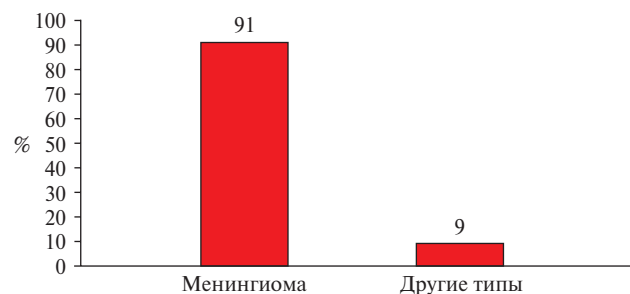


Первичные опухоли

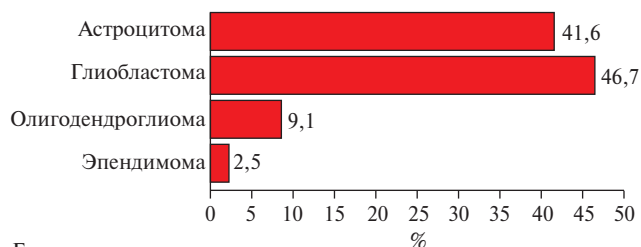
Рецидивирующие опухоли ГМ

Метастатические опухоли

Б



В



Г

Рис. 1 Распределение пациентов (%): А — по типу новообразования ГМ; Б — по времени возникновения опухоли; В — по типу доброкачественных новообразований; Г — по типу злокачественных новообразований.

Примечание: ГМ — головной мозг.

В настоящем исследовании для NGS-секвенирования циркулирующих микроРНК нами было отобрано 83 образца плазмы крови. Из данных образцов была выделена тотальная РНК и подготовлены библиотеки комплементарной ДНК. Концентрации 61 библиотеки оказались достаточно высокими и составили, в среднем, 25 нг/мкл. При этом 22 (26,5%) образца имели крайне низкие концентрации (<1 нг/мкл) при минимально требуемой в 4 нг/мкл. Анализ результатов NGS-секвенирования двух образцов с концентрациями по 0,4 нг/мкл продемон-

стрировал низкое качество полученных библиотек. Количество прочтений для них составило 897 и 1928, соответственно. При этом диапазон показателя для образцов с высокими концентрациями составил от >3600 до >5500 (таблица 1). Анализ уникальных последовательностей показал, что библиотеки с концентрациями по 0,4 нг/мкл содержат 321 и 254 малых некодирующих РНК, по сравнению с 1500–2700 для библиотек высокого качества (таблица 1).

В коллекцию образцов плазмы пациентов за период 2023–2024 гг. отобран биоматериал 339 пациентов с доброкачественными и злокачественными опухолями ГМ, а также пациентов с диагнозами рак легких или рак молочной железы с метастазами в ГМ. Контрольную группу составили 10 условно здоровых доноров. Итого было получено 349 образцов плазмы крови (две аликвоты на одного пациента, 698 проб) (таблица 2). Диапазон возраста участников исследования составил от 19 до 91 года, медиана равнялась 56 годам. В выборке пациентов преобладали женщины (соотношение 1,44:1) (таблица 2).

В объединенной группе первичных и вторичных опухолей ГМ злокачественные новообразования (56,4%) преобладали над доброкачественными (28,7%) и метастатическими экстракраниальными опухолями (12%) (таблица 3, рисунок 1 А). В группу со вторичными опухолями ГМ вошли как рецидивирующие опухоли ГМ (92,5%), так и метастатические опухоли рака молочных желез и легких (7,5%) (таблица 3, рисунок 1 Б). Доброкачественные опухоли ГМ были представлены в основном менингиомами (91 пациент, 91%). Количество опухолей других гистологических подтипов незначительно и составило суммарно 9% (таблица 3, рисунок 1 В). Группа новообразований различной степени злокачественности представлена глиобластомами (92 пациента, 46,7%), астроцитомами (82 пациента, 41,6%) и олигодендроглиомами (18 пациентов, 9,1%), объединенными в группу опухолей глиального ряда, а также эпендимомы (5 пациентов, 2,5%) (таблица 3, рисунок 1 Г).

С помощью NGS-секвенирования были проанализированы 59 образцов: 22 образца больных с диагнозом глиобластома, 15 — с астроцитомами, 5 — с олигодендроглиомами, 13 — с менингиомами и 4 образца плазмы крови условно здоровых доноров. В результате биоинформационного анализа NGS-данных выявлено 59 дифференциально экспрессирующиеся микроРНК, специфичных для каждой группы.

Обсуждение

На сегодняшний день единых протоколов для жидкостной биопсии при глиальных опухолях в повседневной практике не существует. Поэтому научное сообщество сходит в мнении, что перед внедрением в клиническую практику циркулирующих

маркеров необходима стандартизация методов сбора биоматериала, проведения исследования и анализа результатов [15]. Международный консорциум RANO (Response Assessment in Neuro-Oncology), занимающийся стандартизацией исследовательской практики в области нейроонкологии, рекомендует подвергать цельную кровь первичной обработке в течение 3 ч после забора [16]. В настоящем исследовании продемонстрировано, что ДНК библиотеки низкого качества были получены из образцов плазмы крови с крайне низкими концентрациями (<1 нг/мкл) (рисунок 2 А, Б). Данный факт нами был связан со временем первичной обработки цельной крови. Эмпирически определено, что образцы, взятые в работу не позднее 30 мин после забора крови, служили адекватным материалом для выделения достаточного количества РНК и последующей подготовки ДНК библиотек с требуемыми характеристиками (рисунок 2 А). Из цельной крови, которая в силу логистических трудностей была обработана через ≥40 мин после забора, не удалось получить библиотеки, пригодные для дальнейшего NGS-секвенирования (рисунок 2 Б). Кроме того, для подтверждения гипотезы значимости времени, в течение которого была получена плазма, нами были отсекарованы два образца с крайне низкими концентрациями. Количество прочтений и анализ уникальных последовательностей показал снижение качества библиотек данных образцов в ~3,5 раза по сравнению с образцами с высокой концентрацией (таблица 1). Таким образом, в ходе подготовки к исследованию профилей опухоль-специфичных микроРНК с помощью NGS-секвенирования нами экспериментально был определен критичный период между забором крови и получением плазмы, который составил 30 мин. В случае превышения данного периода времени получить библиотеки ДНК для дальнейшего секвенирования надлежащего качества и в требуемом количестве не представлялось возможным. Опыт использования нами криоконсервированной плазмы для выбранной платформы профилирования микроРНК выявил узкие места в логистике отбора материала и позволил эмпирически выделить критичный период между отбором крови и её первичной обработкой.

В собранной коллекции образцов плазмы крови ожидаемо преобладали пробы, полученные от пациентов с глиобластомами (27,1%) и менингиомами (26,8%), которые являются наиболее часто диагностируемыми злокачественными и доброкачественными опухолями ЦНС. Следующим по распространенности типом злокачественных новообразований были астроцитомы, которые составили 24,2%. Среди опухолей глиального ряда наименее распространенными оказались олигодендроглиомы (5,3%). Эпендимомы были представлены всего в 1,5% случаев. В группе доброкачественных ново-

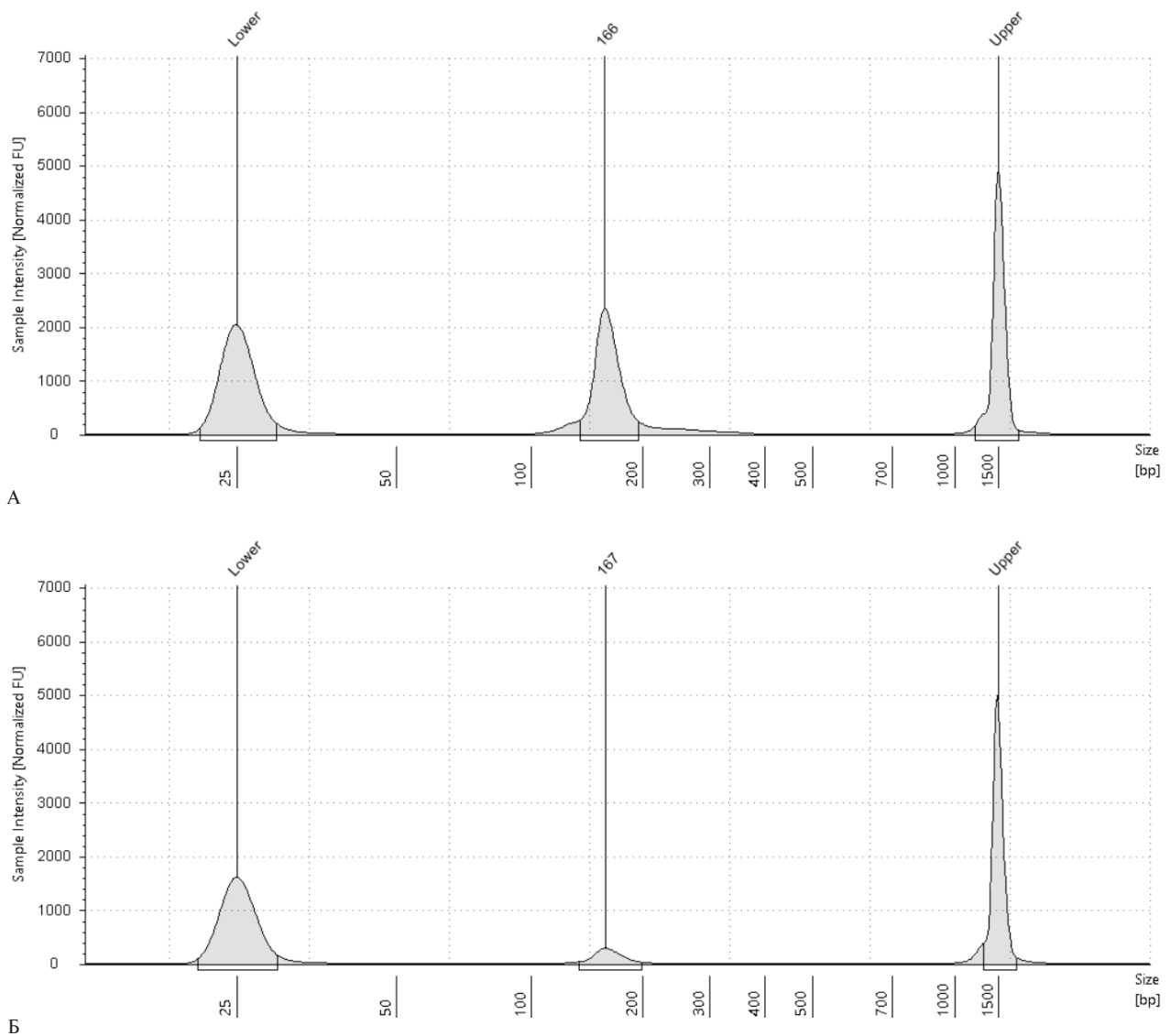


Рис. 2 Электрофореграмма ДНК библиотек (биоанализатор 4150 TapeStation, Agilent, США) (пациент №113): А — образец успешно секвенированной библиотеки, полученной из пробы, первично обработанный в течение 30 мин после забора крови. Визуализирован четкий пик библиотеки требуемого размера в диапазоне 160–180 п.н. и маркеры Lower (нижний), Upper (верхний); Б — образец библиотеки, непригодный для секвенирования (концентрация <0,618 нг/мкл). Получен из пробы, первично обработанной в течение 50 мин после забора крови.

Примечание: По оси X — размер библиотеки в п.н., по оси Y — интенсивность свечения образца (нормализованные единицы флуоресценции). ДНК — дезоксирибонуклеиновая кислота, п.н. — пар нуклеотидов.

образований гистотипы помимо менингиом были представлены единичными случаями и составили всего 9%. Полученное соотношение распространенности различных типов первичных опухолей ГМ в целом соответствует мировой статистике [17]. Группа вторичных опухолей ГМ включала метастатические опухоли (12,4%) рака молочных желез (3,5%) и рака легкого (8,8%). Вышеупомянутые локализации первичных экстракраниальных опухолей выбраны ввиду высокой частоты метастазов в ГМ: до 40% при раке легких и до 30% при раке молочной железы [18]. При этом соотношение доброкачественных и злокачественных опухолей (первичных и вторичных) составило 1:2,4.

Изменение экспрессии микроРНК при опухолях ГМ было продемонстрировано во множестве как отечественных, так и зарубежных исследований [7–9, 19, 20]. Интересно, что в разных исследованиях уровень одной и той же микроРНК был как повышенным, так и сниженным. На сегодняшний день для опухолей глиального ряда выявлена только одна микроРНК (miR-21), сверхэкспрессия которой подтверждается во всех работах без исключения [21]. Кроме того, дифференциальная экспрессия некоторых микроРНК может позволить различить первичные и вторичные опухоли ГМ, в частности метастатические опухоли рака молочной железы, легких, меланомы и других. Установлено, что при метастазировании

в ГМ в основном изменяется уровень микроРНК, ассоциированных с нарушением проницаемости гематоэнцефалического барьера [22]. В результате проведенного нами NGS-секвенирования образцов плазмы крови (первичные опухоли ГМ, $n=55$; группа контроля, $n=4$) было выявлено 59 дифференциально экспрессирующихся микроРНК. При этом во всех группах преобладали микроРНК с повышенной экспрессией, которые являются потенциально онкогенными. Кроме того, были определены специфические микроРНК, характерные для менингиомы (15), олигодендроглиомы (14), астроцитомы (13) и глиобластомы (17) (неопубликованные данные). Согласно полученным нами ранее результатам, обнаруженный спектр микроРНК в плазме крови хоть и обладает меньшим разнообразием, но повторяет профиль экспрессии в опухолевой ткани [23, 24]. Данный факт свидетельствует о целесообразности малоинвазивной диагностики опухолей ГМ на основе плазмы крови.

Заключение

Биобанкирование является основой для поиска опухоль-ассоциированных маркеров. На ба-

зе ФГБУ "НМИЦ онкологии" Минздрава России функционирует современный депозитарий, в котором создана коллекция из 698 образцов плазмы. При этом коллекция образцов включает весь спектр гистотипов первичных доброкачественных и злокачественных новообразований ГМ, диагностируемых в онкоцентре. В группе доброкачественных опухолей преобладали менингиомы, злокачественных — глиобластомы и астроцитомы. Вторичные опухоли ГМ представлены рецидивирующими глиальными опухолями и метастатическими опухолями рака легких и рака молочной железы. Помимо собранной коллекции образцов нами был усовершенствован протокол первичной подготовки образцов крови, позволивший получить библиотеки ДНК высокого качества для проведения NGS-секвенирования микроРНК. В результате были определены микроРНК, специфичные для различных подтипов опухолей ГМ.

Отношения и деятельность. Работа выполнена в рамках государственного задания Минздрава России (госрегистрация № 123030200082-9).

Литература/References

1. Kaprin AD, Starinskiy VV, Shahzadova AO, et al. Malignant neoplasms in Russia in 2022 (morbidity and mortality). М.: P. Hertsen MORI — branch of the NMRRС of the Ministry of Health of the Russian Federation, 2023. p. 174. (In Russ.) Каприн А. Д., Старинский В. В., Шахзадова А. О. и др. Злокачественные новообразования в России в 2022 году (заболеваемость и смертность). М.: МНИОИ им. П. А. Герцена – филиал ФГБУ "НМИЦ радиологии" Минздрава России, 2023. С. 174. ISBN: 978-5-85502-290-2.
2. Klekner Á, Szivos L, Virga J, et al. Significance of liquid biopsy in glioblastoma—A review. J Biotech. 2019;298:82-7. doi:10.1016/j.jbiotec.2019.04.011.
3. Aalami AH, Abdeahad H, Shoghi A, et al. Brain tumors and circulating micrornas: a systematic review and diagnostic meta-analysis. Expert Rev Mol Diagn. 2022;22(2):201-11. doi:10.1080/14737159.2022.2019016.
4. Le Rhun E, Seoane J, Salzet M, et al. Liquid biopsies for diagnosing and monitoring primary tumors of the central nervous system. Cancer Lett. 2020;480:24-8. doi:10.1016/j.canlet.2020.03.021.
5. Berzero G, Pieri V, Mortini P, et al. The coming of age of liquid biopsy in neuro-oncology. Brain. 2023;146(10):4015-24. doi:10.1093/brain/awad195.
6. Omel'chuk EP, Timoshkina NN, Rostorguev EE, et al. Circulating biomarkers of gliomas (review of literature). Russian clinical laboratory diagnostics. 2024;69(8):411-20. (In Russ.) Омельчук Е. П., Тимошкина Н. Н., Росторгуев Э. Е. и др. Циркулирующие биомаркеры глиом (обзор литературы). Клиническая лабораторная диагностика. 2024;69(8):411-20. doi:10.51620/0869-2084-2024-69-8-411-420.
7. Wang J, Che F, Zhang J. Cell-free microRNAs as non-invasive biomarkers in glioma: a diagnostic meta-analysis. Int J Biol Marker. 2019;34(3):232-42. doi: 10.1177/1724600819840033.
8. Ma C, Nguyen HP, Luwor RB, et al. A comprehensive meta-analysis of circulation miRNAs in glioma as potential diagnostic biomarker. PLoS One. 2018;13(2):e0189452. doi:10.1371/journal.pone.0189452.
9. Gvaldin DY, Petrusenko NA, Rostorguev EE, et al. Comparative analysis of the profile of circulating microRNAs in the blood plasma of patients with gliomas. Research'n Practical Medicine Journal. 2024;11(2):36-45. (In Russ.) Гвалдин Д. Ю., Петрусенко Н. А., Росторгуев Э. Е. и др. Сравнительный анализ профиля циркулирующих микроРНК в плазме крови пациентов с глиальными опухолями мозга. Исследования и практика в медицине. 2024;11(2):36-45. doi:10.17709/2410-1893-2024-11-2-3.
10. Kosobokova EN, Kalinina NA, Baryshnikova MA, et al. Bioresource collections: algorithms for development and functioning; basic and applied significance. Cardiovascular Therapy and Prevention. 2023;22(11):3654. (In Russ.) Кособокова Е. Н., Калинина Н. А., Барышникова М. А. и др. Биоресурсные коллекции: алгоритмы формирования и функционирования, фундаментальная и прикладная значимость. Кардиоваскулярная терапия и профилактика. 2023;22(11):3654. doi:10.15829/1728-8800-2023-3654.
11. Karandashov IV, Golbin DA, Goryainov SA, et al. Principles of biobanking and biobanks of central nervous system tumors in world practice. Burdenko's journal of neurosurgery. 2022;86(6):91-8. (In Russ.) Карандашов И. В., Гольбин Д. А., Горьяинов С. А. и др. Принципы биобанкирования и биобанки опухолей нервной системы в мировой практике. Вопросы нейрохирургии им. Н. Н. Бурденко. 2022;86(6):91-8. doi:10.17116/neiro20228606191.
12. Kasymova AB, Zhetpisbayev BB, Solodovnikov MP, et al. Organization of a biobank in neurosurgery. Neurosurgery and Neurology of Kazakhstan. 2021;3(64):3-10. (In Russ.) Касымова А. Б., Жетписбаев Б. Б., Солодовников М. П. и др. Организация биобанка в нейрохирургии. Нейрохирургия и неврология Казахстана. 2021;3(64):3-10. doi:10.53498/24094498_2021_3_3.
13. Golbin DA, Korochkina AL, Shugay SV, et al. Specialized biorepository for human brain glioma: project development and

- operational experience. Clinical and experimental morphology. 2020;9(4):39-49. (In Russ.) Гольбин Д. А., Корочкина А. Л., Шугай С. В. и др. Опыт создания специализированного биобанка глиом головного мозга человека. Клиническая и экспериментальная морфология. 2020;9(4):39-49. doi:10.31088/CEM2020.9.4.39-49.
14. Kit OI, Timofeeva SV, Sitkovskaya AO, et al. The biobank of the National Medical Research Centre for Oncology as a resource for research in the field of personalized medicine: A review. Journal of modern oncology. 2022;24(1):6-11. (In Russ.) Кит О. И., Тимофеева С. В., Ситковская А. О. и др. Биобанк ФГБУ "НМИЦ онкологии" Минздрава России как ресурс для проведения исследований в области персонифицированной медицины. Современная онкология. 2022;24(1):6-11. doi:10.26442/18151434.2022.1.201384.
15. Krasnikova OV, Kondrat'eva AR, Badu SQ, et al. Potential diagnostic biomarkers of glioma in the liquid media of the body. Journal of Medical and Biological Research. 2022;10(1):52-63. (In Russ.) Красникова О. В., Кондратьева А. Р., Бадю С. К. и др. Потенциальные диагностические биомаркеры глиом в жидких средах организма. Журнал медико-биологических исследований. 2022;10(1):52-63. doi:10.37482/2687-1491-Z090.
16. Karschnia P, Smits M, Reifemberger G, et al. A framework for standardised tissue sampling and processing during resection of diffuse intracranial glioma: joint recommendations from four RANO groups. Lancet Oncol. 2023;24(11):e438-50. doi:10.1016/S1470-2045(23)00453-9.
17. Reynoso-Noverón N, Mohar-Betancourt A, Ortiz-Rafael J. Epidemiology of brain tumors. In: Monroy-Sosa A, ed. Principles of neuro-oncology: brain & skull base. Springer/Cham. 2020:15-25. ISBN: 978-3-030-54879-7.
18. Almabek AT, Kaidarova DR, Kim VB, et al. Features of radiation therapy in patients with brain metastases. Newsletter of KAZNMU. 2021;(1):57-60. (In Russ.) Алмабек А. Т., Кайдарова Д. Р., Ким В. Б. и др. Особенности лучевой терапии у пациентов с метастазами в головной мозг. Вестник Казахского Национального медицинского университета. 2021;(1):57-60. doi:10.53065/kaznm.2021.84.42.013.
19. Pushkin AA, Gvaldin DYU, Timoshkina NN, et al. Analysis of Gene Expression Omnibus high-throughput sequencing data for the determination of microribonucleic acids in the blood plasma of patients with glioblastomas. Research and Practical Medicine Journal. 2022;9(1):54-64. (In Russ.) Пушкин А. А., Гвалдин Д. Ю., Тимошкина Н. Н. и др. Анализ данных высокопроизводительного секвенирования базы Gene Expression Omnibus для идентификации микроРНК в плазме крови пациентов с глиобластомой. Исследования и практика в медицине. 2022;9(1):54-64. doi:10.17709/2410-1893-2022-9-1-5.
20. Alliluev IA, Pushkin AA, Kuznetsova NS, et al. Estimation of the diagnostic significance of circulating microRNAs in blood plasma of patients with high grade gliomas. Modern problems of science and education. 2020;(6):135. (In Russ.) Аллилуев И. А., Пушкин А. А., Кузнецова Н. С. и др. Оценка диагностической значимости циркулирующих микроРНК в плазме крови пациентов с глиомами высокой степени злокачественности. Современные проблемы науки и образования. 2020;(6):135. doi:10.17513/spno.30309.
21. Gareev IF, Novicova LB, Beylerli OA. Circulating microRNAs as new potential biomarkers for the diagnosis of high-grade gliomas. SS Korsakov Journal of Neurology and Psychiatry. 2019;119(5):86-90. (In Russ.) Гареев И. Ф., Новикова Л. Б., Бейлерли О. А. Циркулирующие микроРНК как новые потенциальные биомаркеры для диагностики высокозлокачественных глиом. Журнал неврологии и психиатрии им. С. С. Корсакова. 2019;119(5):86-90. doi:10.17116/jnevro201911905186.
22. Rehman AU, Khan P, Maurya SK, et al. Liquid biopsies to occult brain metastasis. Mol Cancer. 2022;21(1):113. doi:10.1186/s12943-022-01577-x.
23. Gvaldin DYU, Pushkin AA, Timoshkina NN, et al. Integrative analysis of mRNA and miRNA sequencing data for gliomas of various grades. Egypt J Med Hum Genet. 2020;21(73):1-17. doi:10.1186/s43042-020-00119-8.
24. Pushkin AA, Gvaldin DYU, Petrusenko NA, et al. miRNA levels of tumours and plasma in glioma patients. Modern Problems of Science and Education. 2023;(5). (In Russ.) Пушкин А. А., Гвалдин Д. Ю., Петрусенко Н. А. и др. Уровень опухолевых и внеклеточных микроРНК у пациентов с глиальными опухолями головного мозга. Современные проблемы науки и образования. 2023;(5). doi:10.17513/spno.32954.

Исследование маркеров транспорта и обмена липопротеинов у больных инфарктом миокарда в коллекции образцов крови лаборатории "Биобанк Югры"

Воробьев А.С.^{1,2,4}, Донников М.Ю.², Глотов О.С.³, Коваленко Л.В.², Николаев К.Ю.^{2,4},
Урванцева И.А.^{1,2}, Дренина Ю.А.², Морозкина А.В.², Чернышева Г.Н.¹

¹БУ ХМАО-Югры "Окружной кардиологический диспансер "Центр диагностики и сердечно-сосудистой хирургии". Сургут;

²БУ ВО ХМАО-Югры "Сургутский государственный университет". Сургут; ³ФГБУ "Детский научно-клинический центр

инфекционных болезней ФМБА". Санкт-Петербург; ⁴НИИ терапии и профилактической медицины — филиал ФГБНУ

"ФИЦ Институт цитологии и генетики СО РАН". Новосибирск, Россия

Цель. Оценка клинических ассоциаций и предиктивной значимости маркеров транспорта и обмена липопротеинов (ТОЛ), определенных в коллекции образцов сыворотки больных инфарктом миокарда (ИМ).

Материал и методы. В лаборатории "Биобанк Югры" сформирована коллекция образцов крови 88 больных в острой фазе ИМ для последующей биохимической оценки сывороточных уровней маркеров ТОЛ. Все пациенты включены в клиническое проспективное исследование на протяжении 48 мес. с регистрацией клинических событий и томографической оценкой отдаленного поражения коронарных артерий (КА) по завершении наблюдения.

Результаты. Установлены прямые ассоциации между уровнями PCSK9 (proprotein convertase subtilisin/kexin type 9, пропротеиновая конвертаза субтилизин-кexинового типа 9) и величинами холестерина липопротеинов низкой плотности, коронарным атеросклерозом, риском шкалы GRACE (Global Registry of Acute Coronary Events) 2.0, а также риском повторного острого коронарного синдрома. Уровни липопротеина(а) >50 мг/дл выявлены у 28,4% больных ИМ и ассоциированы с клиническими событиями в анамнезе, атеросклерозом КА и экстракардиальных артерий, коморбидностью, повторным поражением КА, а также риском крупных кардиальных событий по завершении наблюдения. Определена связь высокого (5,14) триглицеридно-глюкозного индекса с коморбидностью, повторным поражением КА и риском смерти по завершении наблюдения.

Заключение. Лаборатория "Биобанк Югры" — эффективная база для проведения лабораторных исследований. Маркеры ТОЛ ассоциированы с клиническими факторами, коморбидностью, сосудистым атеросклерозом и негативным прогнозом у больных ИМ.

Ключевые слова: биобанк, маркеры транспорта и обмена липопротеинов, инфаркт миокарда.

Отношения и деятельность. Исследование выполнено при финансовой поддержке Фонда научно-технологического развития Югры в рамках научного проекта № 2023-574-05.

Поступила 03/09-2024

Рецензия получена 08/10-2024

Принята к публикации 03/11-2024



Для цитирования: Воробьев А.С., Донников М.Ю., Глотов О.С., Коваленко Л.В., Николаев К.Ю., Урванцева И.А., Дренина Ю.А., Морозкина А.В., Чернышева Г.Н. Исследование маркеров транспорта и обмена липопротеинов у больных инфарктом миокарда в коллекции образцов крови лаборатории "Биобанк Югры". Кардиоваскулярная терапия и профилактика. 2024;23(11):4178. doi: 10.15829/1728-8800-2024-4178. EDN QDOSBG

*Автор, ответственный за переписку (Corresponding author):

e-mail: a.s.vorobyov@gmail.com

[Воробьев А.С.* — к.м.н., доцент, зам. зав. кафедрой кардиологии, в.н.с. научно-образовательного центра Медицинского института, врач-кардиолог отдела госпитализации с телемедицинским центром, ORCID: 0000-0001-7014-2096, Донников М.Ю. — к.м.н., в.н.с. научно-образовательного центра Медицинского института, ORCID: 0000-0003-0120-4163, Глотов О.С. — д.б.н., руководитель НИО экспериментальной медицинской вирусологии, молекулярной генетики и биобанкинга, в.н.с. отдела геномной медицины, ORCID: 0000-0002-0091-2224, Коваленко Л.В. — д.м.н., профессор, зав. кафедрой общей патологии и патофизиологии, директор Медицинского института, ORCID: 0000-0002-0918-7129, Николаев К.Ю. — д.м.н., профессор, зав. лабораторией неотложной терапии, профессор кафедры кардиологии, ORCID: 0000-0003-4601-6203, Урванцева И.А. — к.м.н., доцент, зав. кафедрой кардиологии, Медицинский институт, главный врач, ORCID: 0000-0002-5545-9826, Дренина Ю.А. — аспирант кафедры кардиологии, Медицинский институт, ORCID: 0000-0002-3798-8724, Морозкина А.В. — к.б.н., в.н.с. научно-образовательного центра Медицинского института, ORCID: 0009-0000-1598-9542, Чернышева Г.Н. — врач-кардиолог, кардиологическое отделение № 2, ORCID: 0009-0000-1598-9542].

Lipoprotein transport and metabolism markers in patients with myocardial infarction in the Biobank of Yugra blood sample collection

Vorobyov A. S.^{1,2,4}, Donnikov M. Yu.², Glotov O. S.³, Kovalenko L. V.², Nikolaev K. Yu.^{2,4}, Urvantseva I. A.^{1,2}, Drenina Yu. A.², Morozkina A. V.², Chernysheva G. N.¹

¹District Cardiology Dispensary "Center for Diagnostics and Cardiovascular Surgery". Surgut; ²Surgut State University. Surgut;

³Children's Research and Clinical Center for Infectious Diseases. Saint Petersburg; ⁴Research Institute of Therapy and Preventive Medicine — branch of the Federal Research Center Institute of Cytology and Genetics. Novosibirsk, Russia

Aim. To evaluate clinical associations and predictive value of lipoprotein transport and metabolism markers determined in a collection of serum samples from patients with myocardial infarction (MI).

Material and methods. Collection of blood samples from 88 patients with the acute MI was created in the Biobank of Yugra laboratory for subsequent biochemical assessment of serum levels of lipoprotein transport and metabolism markers. All patients were included in a clinical prospective study for 48 months with registration of medical events and remote tomographic assessment of coronary artery (CA) involvement upon follow-up completion.

Results. Direct associations were established between proprotein convertase subtilisin/kexin type 9 (PCSK9) levels and low-density lipoprotein cholesterol levels, coronary atherosclerosis, Global Registry of Acute Coronary Events (GRACE) 2.0 risk score, and the risk of recurrent acute coronary syndrome. Lipoprotein (a) levels >50 mg/dl were detected in 28,4% of patients with MI and were associated with prior medical events, coronary and non-coronary artery atherosclerosis, comorbidity, recurrent coronary lesions, and the risk of major cardiac events at the end of follow-up. A relationship was established between a high (5,14) triglyceride-glucose index and comorbidity, recurrent coronary lesions, and the death risk at the end of follow-up.

Conclusion. The Biobank of Yugra laboratory is an effective base for laboratory research. Lipoprotein transport and metabolism markers are associated with clinical factors, comorbidity, vascular atherosclerosis and a negative prognosis in patients with MI.

Keywords: biobank, lipoprotein transport and metabolism markers, myocardial infarction.

Relationships and Activities. The study was financially supported by the Science and Technology Development Fund of Yugra within the project № 2023-574-05.

Vorobyov A. S.* ORCID: 0000-0001-7014-2096, Donnikov M. Yu. ORCID: 0000-0003-0120-4163, Glotov O. S. ORCID: 0000-0002-0091-2224, Kovalenko L. V. ORCID: 0000-0002-0918-7129, Nikolaev K. Yu. ORCID: 0000-0003-4601-6203, Urvantseva I. A. ORCID: 0000-0002-5545-9826, Drenina Yu. A. ORCID: 0000-0002-3798-8724, Morozkina A. V. ORCID: 0009-0000-0547-4959, Chernysheva G. N. ORCID: 0009-0000-1598-9542.

*Corresponding author:
a.s.vorobyov@gmail.com

Received: 03/09-2024

Revision Received: 08/10-2024

Accepted: 03/11-2024

For citation: Vorobyov A. S., Donnikov M. Yu., Glotov O. S., Kovalenko L. V., Nikolaev K. Yu., Urvantseva I. A., Drenina Yu. A., Morozkina A. V., Chernysheva G. N. Lipoprotein transport and metabolism markers in patients with myocardial infarction in the Biobank of Yugra blood sample collection. *Cardiovascular Therapy and Prevention*. 2024;23(11):4178. doi: 10.15829/1728-8800-2024-4178. EDN QDOSBG

ДИ — доверительный интервал, ИБС — ишемическая болезнь сердца, ИМ — инфаркт миокарда, КА — коронарные артерии, ЛНП — липопротеины низкой плотности, Лп(а) — липопротеин(а), ОКС — острый коронарный синдром, ТОЛ — транспорт и обмен липопротеинов, ХС — холестерин, АУС — area under curve (площадь под кривой), PCSK9 — proprotein convertase subtilisin/kexin type 9 (пропротеиновая конвертаза субтилизин-кексинового типа 9), ТгГ индекс — триглицеридно-глюкозный индекс, GRACE 2.0 — Global Registry of Acute Coronary Events 2.0 (обновленная версия).

Введение

Последние два десятилетия ознаменовались стремительным развитием геномных и протеомных технологий. Поиск новых генов и биологических молекул привел к существенным достижениям в понимании механизмов патогенеза, диагностике, прогнозировании исходов, а также таргетной терапии сердечно-сосудистых заболеваний преимущественно наследственной природы [1]. Наибольший удельный вес в структуре кардиоваскулярной смертности занимают острые и хронические формы ишемической болезни сердца (ИБС), которая относится к многофакторным заболеваниям [2]. Известно, что в основе ИБС ключевое место отводится нарушениям транспорта и обмена липопротеинов (ТОЛ) плазмы крови. По данным международной и отечественной литературы повышенные уровни холестерина (ХС) липопротеинов низкой плотности (ЛНП), триглицеридов, а также липопротеина(а) (Лп(а)) и пропротеиновой кон-

вертазы субтилизин-кексинового типа 9 (PCSK9) являются маркерами сердечно-сосудистого прогноза и эффективности проводимой гиполипидемической терапии у лиц с ИБС, в т.ч. перенесших инфаркт миокарда (ИМ) [3]. Принципы и методология набора, транспортировки, обработки и хранения коллекции образцов крови пациентов с ИМ, проходивших лечение в Бюджетном учреждении Ханты-Мансийского автономного округа — Югры Окружном кардиологическом диспансере "Центре диагностики и сердечно-сосудистой хирургии" (БУ ХМАО-Югры "ОКД "ЦД и ССХ"), в условиях лаборатории "Биобанк Югры" (бюджетное учреждение высшего образования ХМАО-Югры "Сургутский государственный университет" — СурГУ) опубликованы ранее (2023г) [4]. В настоящей статье представлены результаты биохимического исследования маркеров ТОЛ на фрагменте коллекции образцов крови больных ИМ, хранимых в лаборатории "Биобанк Югры" СурГУ.

Ключевые моменты**Что известно о предмете исследования?**

- Биобанк является универсальной и надежной высокотехнологичной платформой для обработки, долговременного хранения, извлечения биоматериала для последующего генетического и биохимического анализа у кардиологических пациентов.
- Повышенные уровни маркеров транспорта и обмена липопротеинов определяют сердечно-сосудистый прогноз и эффективность гиполипидемической терапии у лиц с ишемической болезнью сердца.

Что добавляют результаты исследования?

- Собранная на базе лаборатории "Биобанк Югры" коллекция образцов биоматериала позволила успешно провести одноцентровое проспективное исследование биохимических маркеров в когорте пациентов с инфарктом миокарда, проживающих в ХМАО-Югре.
- Сывороточные уровни маркеров транспорта и обмена липопротеинов (PCSK9, липопротеин(а), триглицеридно-глюкозный индекс), определенные у пациентов в острой фазе инфаркта миокарда, достоверно ассоциированы с клиническими факторами, коморбидностью, сосудистым атеросклерозом и негативным прогнозом в постинфарктном периоде.

Key messages**What is already known about the subject?**

- The biobank is a universal and reliable high-tech platform for processing, long-term storage, extraction of biomaterial for genetic and biochemical analysis in cardiovascular patients.
- Elevated levels of lipoprotein transport and metabolism markers specify the cardiovascular prognosis and the effectiveness of lipid-lowering therapy in patients with coronary artery disease.

What might this study add?

- A biomaterial collection of the Biobank of Yugra laboratory made it possible to conduct a single-center prospective study of biochemical markers in a cohort of patients with myocardial infarction living in the Khanty-Mansi Autonomous Okrug.
- Serum levels of lipoprotein transport and metabolism markers (PCSK9, lipoprotein(a), triglyceride-glucose index), determined in patients with acute myocardial infarction, are reliably associated with clinical factors, comorbidity, vascular atherosclerosis and a negative prognosis in the post-infarction period.

Цель исследования — оценка клинических ассоциаций и предиктивной значимости маркеров транспорта и обмена липопротеинов, определенных в образцах сыворотки больных острым ИМ.

Материал и методы

На первом этапе (рисунок 1) у 88 больных острым ИМ при поступлении в приемное отделение БУ ХМАО-Югры "ОКД "ЦД и ССХ" был проведен однократный сбор образцов биоматериала: периферической венозной крови в вакуумные пробирки "Vacuette" с активатором свертывания (для получения сыворотки).

Все пациенты проходили курс стационарного обследования и лечения в клинике, в рамках которого проводилась реваскуляризация миокарда в объеме чрескожного коронарного вмешательства — ангиопластики и стентирования инфаркт-связанной артерии или аортокоронарного шунтирования, и медикаментозная терапия в соответствии с клиническими рекомендациями [5]. Клиническая характеристика лиц с ИМ представлена в таблице 1.

У всех исследуемых больных было взято информированное согласие на сбор биоматериала и участие в проспективном клиническом исследовании. Все 88 лиц после перенесенного индексного ИМ наблюдались в консультативном кардиологическом отделении БУ ХМАО-Югры "ОКД "ЦД и ССХ" на протяжении 48 мес. (4 года). Клинические события (сердечно-сосудистая смерть, повторный острый коронарный синдром (ОКС),

повторная симптом-обусловленная реваскуляризация миокарда, ишемический инсульт) регистрировались на протяжении указанного периода наблюдения. По завершении периода наблюдения всем постинфарктным пациентам была выполнена мультиспиральная компьютерная томография для морфологической оценки отдаленного поражения коронарных артерий (КА). Исследование проводилось на компьютерном томографе "Revolution CT" фирмы "General Electric" (США) с внутривенным болюсным введением контраста.

Критерии включения: острый ИМ с/без подъема сегмента ST; первые 24 ч от начала болевого синдрома; возраст 35-70 лет. Критерии не включения: болевой синдром >24 ч; непереносимость гиполипидемических препаратов; беременность и лактация; неизлечимое онкологическое заболевание, вирус иммунодефицита человека, отказ пациента от участия в исследовании.

На втором этапе собранные образцы крови у больных ИМ были переданы для обработки и долговременного хранения в лабораторию "Биобанк Югры" СурГУ. В соответствии с разработанными и утвержденными стандартными операционными процедурами была сформирована коллекция биоматериала из аликвот-криопробирок (цельная кровь, сыворотка), размещенная на долговременное хранение при температуре -80°С [4, 6].

На третьем этапе для проведения биохимического исследования маркеров ТОЛ были взяты образцы размороженной сыворотки всех включенных в исследование больных ИМ. При проведении биохимического исследо-

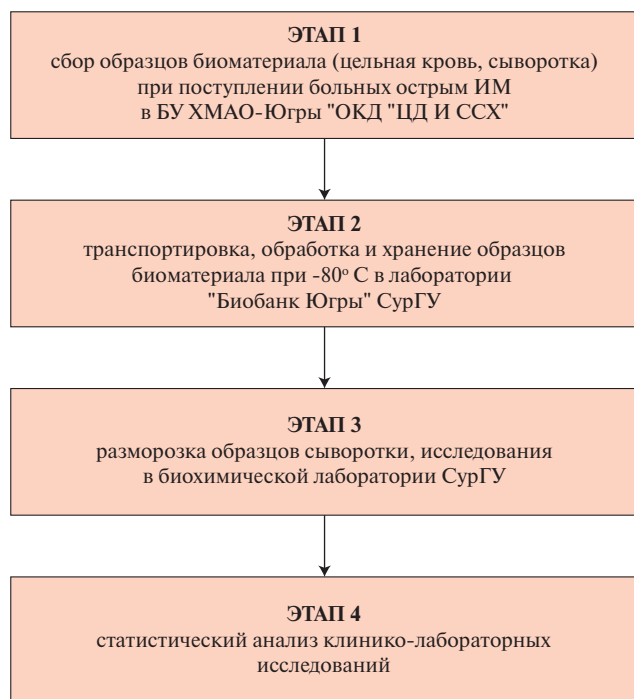


Рис. 1 Схема маршрутизации образцов биоматериала, использованных в настоящем исследовании, между клиникой, биобанком и биохимической лабораторией.

Примечания: ИМ — инфаркт миокарда.

Таблица 1

Клиническая характеристика больных ИМ (n=88)

Характеристики	Количество больных	
	Абс.	%
Пол:		
— мужской (53,7±8,4 лет)	75	85,2
— женский (62,1±4,4 лет)	13	14,8
Индексный ИМ:		
— первый	79	89,8
— повторный	9	10,2
Тип ИМ по ЭКГ:		
— с подъемом сегмента ST	60	68,2
— без подъема сегмента ST	28	31,8
Локализация ИМ:		
— передняя	38	43,2
— задняя	46	52,3
— боковая	4	4,5
Классы Killip:		
— I-II	84	95,5
— III-IV	4	4,5
Риск смерти по шкале GRACE 2.0:		
— низкий (≤10%)	58	65,9
— средний (11-30%)	24	27,3
— высокий (≥30%)	6	6,8
Гипертоническая болезнь	75	85,2
Сахарный диабет 2 типа	22	25,0
ХБП (стадия С3а и выше)	10	11,4

Примечания: Абс. — абсолютная величина, ИМ — инфаркт миокарда, ХБП — хроническая болезнь почек, ЭКГ — электрокардиограмма, n — количество пациентов; GRACE 2.0 — Global Registry of Acute Coronary Events 2.0.

вания сывороточные уровни ХС ЛНП, глюкозы и Лп(а) определены на автоматизированной модульной платформе Roche Cobas (Швейцария); уровни белка PCSK9 измерены с использованием иммуноферментной тест-системы BioVendor Laboratory Medicine (Чехия). Расчёт значений триглицеридно-глюкозного (TyG) индекса выполнен по формуле: $\ln(\text{триглицериды, ммоль/л} \times \text{глюкоза, ммоль/л натощак})/2$. Риск наступления кардиальной смерти на протяжении 3-х лет после индексного ИМ рассчитан по соответствующей формуле шкалы GRACE (Global Registry of Acute Coronary Events) 2.0, далее — риск GRACE 2.0. Выраженность коморбидности установлена при подсчете значений индекса коморбидности по Чарлсону (Charlson Comorbidity Index).

На четвертом этапе проводился статистический анализ клинических данных и результатов лабораторных исследований с применением корреляционного анализа (r) и анализа таблиц сопряженности (χ^2) — для оценки наличия ассоциаций между признаками, ROC-анализа и логистической регрессии — для оценки предиктивной значимости биомаркеров. Уровень статистической достоверности (p) <0,05 считали достаточным для отвержения нулевой гипотезы.

Результаты

Нами установлены статистически значимые прямые ассоциации между сывороточными уровнями PCSK9 и риском GRACE 2.0 (p<0,001), классами Killip (p=0,005), уровнями Лп(а) (p=0,001), уровнями ХС ЛНП у пациентов на этапе индексного ИМ; количеством пораженных КА (неоатеросклероз, рестенозы в стентах, тромбозы шунтов) по завершении наблюдения (p<0,001), что представлено в таблице 2. По результатам бинарной логистической регрессии установлена прямая ассоциация PCSK9 с повторным ОКС в 4-летнем постинфарктном периоде (Exp (B) =1,006, 95% доверительный интервал (ДИ): 1,003-1,010, p<0,001). При проведении ROC-анализа (рисунок 2) определено отрезное (cut-off) значение PCSK9 в сыворотке крови, равное 303 нг/мл, превышение которого достоверно ассоциируется с наступлением повторного ОКС с чувствительностью — 100%, специфичностью — 72,1%, площадью под ROC-кривой 86,7% на протяжении указанного периода наблюдения (4 года).

Известно, что сывороточные уровни Лп(а) >50 мг/дл расцениваются как высокие [7]. В исследуемой когорте сывороточные уровни Лп(а) >50 мг/дл выявлены у 25 (28,4%) больных ИМ. Показано, что уровни Лп(а) >50 мг/дл были прямо ассоциированы с перенесенными ранее (до индексного ИМ) ОКС (p<0,001) и сосудистой реваскуляризацией (p<0,001) по данным анамнеза; наличием экстракардиального атеросклероза, представляющего значимые стенозы брахиоцефальных артерий и/или нижних конечностей (p<0,001), индексом коморбидности по Charlson (p=0,029), 3-сосудистым коронарным поражением (p=0,011) у пациентов на этапе индексного ИМ; значимым стенозом ствола

Таблица 2

Ассоциации маркеров ТОЛ с клинико-инструментальными показателями и прогнозом у больных ИМ в рамках проспективного наблюдения (4 года)		
Пары признаков	Ассоциации (χ^2 , r)	p
До индексного ИМ (в анамнезе)		
Лп(а) — ИМ, перенесенный ранее	$\chi^2=9,96$ (прямая)	0,004
Лп(а) — сосудистая реvascularизация в любом русле	$\chi^2=29,57$ (прямая)	<0,001
На этапе индексного ИМ		
PCSK9 — риск GRACE 2.0	$r=0,72$ (прямая)	<0,001
PCSK9 — классы Killip	$r=0,31$ (прямая)	0,005
PCSK9 — ХС ЛНП	$r=0,57$ (прямая)	<0,001
PCSK9 — уровни Лп(а)	$r=0,36$ (прямая)	0,001
Лп(а) — экстракардиальный атеросклероз	$\chi^2=42,16$ (прямая)	<0,001
Лп(а) — индекс коморбидности по Charlson	$r=0,25$ (прямая)	0,029
Лп(а) — 3-х сосудистое поражение КА	$\chi^2=6,86$ (прямая)	0,011
Индекс TuG — индекс коморбидности по Charlson	$r=0,33$ (прямая)	0,002
Индекс TuG — стадия ХБП	$\chi^2=9,16$ (прямая)	0,027
По завершению постинфарктного наблюдения		
PCSK9 — количество пораженных КА	$r=0,45$ (прямая)	<0,001
Лп(а) — значимый стеноз стволом левой КА и/или КА	$\chi^2=14,87$ (прямая)	<0,001
Лп(а) — повторная реvascularизация миокарда	$\chi^2=7,38$ (прямая)	0,011
Индекс TuG — количество пораженных КА	$r=0,32$ (прямая)	0,009

Примечания: ИМ — инфаркт миокарда, КА — коронарные артерии, Лп(а) — липопротеин(а), ХБП — хроническая болезнь почек, ХС ЛНП — холестерин липопротеинов низкой плотности, ТОЛ — транспорт и обмен липопротеинов, TuG индекс — триглицеридно-глюкозный индекс, PCSK9 — пропротеиновая конвертаза субтилизин-кексин 9 типа.

левой КА и/или стенозами КА ($p<0,001$), повторной симптом-обусловленной реvascularизацией миокарда ($p=0,011$) по завершению постинфарктного наблюдения. Результаты анализа с помощью логистической регрессии демонстрируют достоверное 4-кратное увеличение риска комбинированной конечной точки (сердечно-сосудистая смерть, повторный ОКС, повторная симптом-обусловленная реvascularизация миокарда, ишемический инсульт) по завершению постинфарктного наблюдения при наличии уровней Лп(а) >50 мг/дл у обследуемых лиц (Exp (B) =4,01, 95% ДИ:1,39-11,54; $p=0,01$).

Определены прямые ассоциации величин индекса TuG со значениями индекса коморбидности по Charlson ($p=0,002$), стадиями хронической болезни почек у пациентов на этапе индексного ИМ, а также количеством пораженных КА ($p=0,009$) по завершению постинфарктного 4-летнего наблюде-

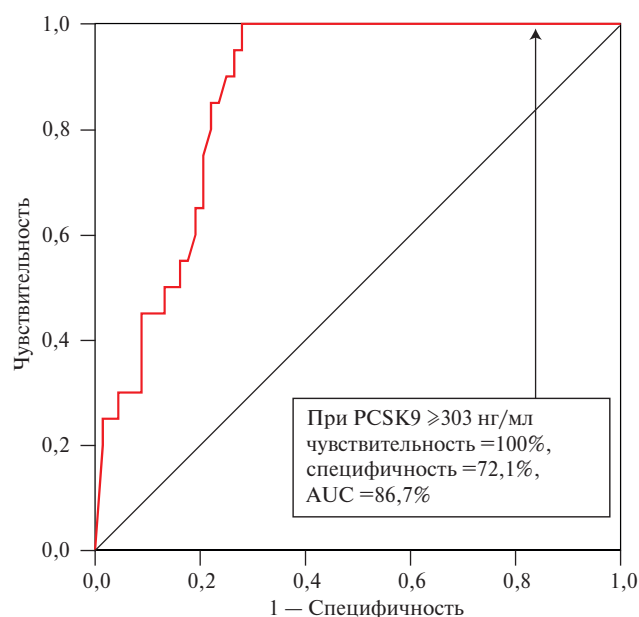


Рис. 2 ROC-анализ: прогностическая значимость отрезного сыровороточного значения PCSK9 (303 нг/мл) в изучаемой выборке 88 пациентов с ИМ в отношении развития повторного ОКС.

Примечание: ИМ — инфаркт миокарда, ОКС — острый коронарный синдром, AUC — area under curve (площадь под кривой), PCSK9 — proprotein convertase subtilisin/kexin type 9 (пропротеиновая конвертаза субтилизин-кексин 9 типа).

ния. Значение индекса TuG в 3-м квантиле составило 5,14 в данной выборке больных ИМ и определено нами как высокое. По результатам бинарной логистической регрессии установлено, что высокие значения индекса TuG ($\geq 5,14$) существенно (в >4 раза) увеличивают риск сердечно-сосудистой смерти в 4-летнем постинфарктном периоде (Exp (B) =4,41, 95% ДИ:1,07-18,27; $p=0,041$).

Обсуждение

Ввиду географических особенностей ХМАО-Югры и существенной удаленности многих населенных пунктов в пределах округа от клинических центров, а также высокого риска инвалидизации и смерти пациентов после перенесенного ИМ, своевременный сбор образцов биоматериала в период их лечения в стационарах представляет большое значение для науки и практического здравоохранения. Однако длительное хранение крови и ее компонентов в стандартных клинико-диагностических лабораториях несет риск потери качества биообразцов из-за отсутствия специализированных систем низкотемпературного охлаждения, бесперебойного электроснабжения, медицинского персонала с компетенциями по биобанкированию и других принципиальных условий. Размещение биоматериала в лаборатории "Биобанк Югры" СурГУ позволило собрать, обработать и разместить на долговременное хранение репрезентативную выборку образцов

больных ИМ, часть из которых (n=88) проанализирована в настоящей работе [4, 8].

С 2003г по настоящее время подробно изучено нарушение рециркуляции рецептора ЛНП на поверхность мембраны гепатоцита вследствие его связывания с PCSK9, внутриклеточной интернализацией и последующим разрушением. Открытие этого механизма привело к пониманию взаимодействия ЛНП и их рецепторов, что легло в основу создания нового высокоэффективного класса гиполипидемических препаратов — ингибиторов PCSK9. При этом роль PCSK9 в качестве потенциального биомаркера все еще активно изучается [9]. Результаты настоящего исследования демонстрируют достоверную прямую связь между уровнями PCSK9 и ХС ЛНП, а также количеством пораженных артерий у больных ИМ. Французские авторы в клиническом исследовании PC-SCA-9 (Relevance of Plasma PCSK9 Concentration as a Biomarker in Acute Coronary Syndrome) продемонстрировали подобную связь между PCSK9, ХС ЛНП и выраженностью коронарного поражения по шкале SYNTAX (Synergy Between Percutaneous Coronary Intervention With TAXUS and Coronary Artery Bypass Surgery) [10], а южнокорейские исследователи показали прямые ассоциации сывороточных концентраций PCSK9 как с поражением КА по шкале SYNTAX, так и с риском GRACE [11]. В то же время канадские коллеги в рамках проекта Ottawa Heart Genomics Study не выявили ассоциацию PCSK9 с ХС ЛНП ни у больных хронической ИБС, ни у лиц без коронарного атеросклероза [12]. Заслуживают внимания данные швейцарских ученых, которые отметили менее частое достижение целевых уровней ХС ЛНП на фоне лечения у лиц с высокими уровнями PCSK9 в острой фазе и в течение года после ОКС, но не установили связи с риском по шкале GRACE [13, 14]. Результаты настоящего исследования показывают отчетливую прямую ассоциацию PCSK9 с риском по шкале GRACE 2.0 у больных на этапе индексного ИМ, а также с риском повторного ОКС при завершении 4-летнего постинфарктного наблюдения.

Повышенные концентрации Лп(а) имеют широкую распространенность как в общей популяции, так и у пациентов высокого кардиоваскулярного риска. Известна их отчетливая связь с прогрессированием коронарного атеросклероза у лиц с ИБС, окклюзией венозных шунтов и увеличением риска кардиоваскулярных событий у больных после аортокоронарного шунтирования. Частота выявления Лп(а) в крови >50 мг/дл установлена у 20% общей популяции, а у лиц с хронической ИБС может достигать 39-48% [15]. Необходимо отметить, что у больных ИМ в настоящем исследовании сывороточные уровни Лп(а) >50 мг/дл выявлены в 28,4% случаев. Установлены достоверные ассоциации уровней Лп(а) >50 мг/дл с сердечно-сосудистыми событиями в анамнезе, наличием атеросклероза ко-

ронарных и экстракардиальных артерий, высокой коморбидностью при индексном ИМ, а также развитием повторных поражений КА (неоатеросклероз, рестенозы в стентах, тромбозы шунтов) и клиническими событиями по завершении 4-летнего наблюдения. Следует отметить противоречивость данных о ценности Лп(а) в постинфарктном прогнозе. Австрийские исследователи не установили достоверный риск кардиальной и общей смерти на протяжении 5 лет наблюдения у 1245 больных с уровнями Лп(а) >60 мг/дл, однако выявили более частое многососудистое коронарное поражение [16]. В то же время Bittner V, et al, анализируя выборку 18924 пациентов с ОКС исследования ODYSSEY OUTCOMES (Evaluation of Cardiovascular Outcomes After an Acute Coronary Syndrome During Treatment With Alirocumab), позиционируют Лп(а) >60 мг/дл как мощный фактор остаточного риска, сопоставимый по влиянию на исходы ОКС с недостижением целевого уровня ХС ЛНП [3, 17].

При изучении величин индекса TyG нами получены ассоциации с высокой коморбидностью на этапе индексного ИМ, а также количеством пораженных КА и высоким риском кардиальной смерти по завершении 4-летнего наблюдения. Результаты недавнего (2023г) комплексного метаанализа (41 исследование) китайских ученых, посвященного изучению индекса TyG у различных категорий больных ИБС (коронарный атеросклероз, стабильная стенокардия, ОКС), демонстрируют отчетливое повышение риска коронарных осложнений и крупных клинических событий в когортах на фоне высокого индекса TyG. Авторами показана более высокая частота отдаленных коронарных осложнений (рестеноз в стенте, прогрессия атеросклероза и кальциноза артерий) и клинических событий (общая смерть, кардиальная смерть, ишемический инсульт, повторный ИМ, повторная реваскуляризация миокарда) у больных с ОКС и высокими величинами индекса TyG на протяжении длительного периода наблюдения (12-63 мес. после индексного ОКС), что отчетливо согласуется с результатами настоящего исследования [18].

Проведенное нами исследование было ограничено сбором образцов крови на одной клинической базе, небольшой выборкой больных ИМ, а также представлением результатов биохимической оценки сывороточных уровней маркеров ТОЛ без изучения вариантов кодирующих их генов.

Заключение

Лаборатория "Биобанк Югры" СурГУ является универсальной и надежной высокотехнологичной платформой для обработки, хранения и последующего биохимического анализа образцов крови у больных ИМ. Маркеры ТОЛ (PCSK9, Лп(а), индекс TyG), определенные у пациентов в острой фа-

зе ИМ, достоверно ассоциированы с клиническими факторами, коморбидностью, атеросклерозом коронарных и экстракардиальных артерий, а также негативным прогнозом в постинфарктном периоде.

Литература/References

1. Dolgoplov IS, Rykov MYu. The evolution of personalized medicine: literature review. Research and Practical Medicine Journal (Issled. prakt. med.). 2022;9(3):117-28. (In Russ.) Долгополов И. С., Рыков М. Ю. Эволюция персонализированной медицины: обзор литературы. Исследования и практика в медицине. 2022;9(3):117-28. doi:10.17709/2410-1893-2022-9-3-9.
2. Shuvalova YA, Moskalenko SA, Kaminnyi AI. Contribution of polymorphisms of genes of the Interleukin-6 system to the development of atherosclerosis. Journal of Atherosclerosis and Dyslipidemias. 2020;4(41):5-11. (In Russ.) Шувалова Ю. А., Светлана А. М., Каминный А. И. Вклад полиморфизмов генов системы интерлейкина-6 в развитие атеросклероза. Атеросклероз и дислипидемии. 2020;4(41):5-11. doi:10.34687/2219-8202.JAD.2020.04.0001.
3. Mora S. Lp(a)'s Odyssey: Should We Measure Lp(a) Post-ACS and What Should We Do With the Results? J Am Coll Cardiol. 2020;75(2):145-7. doi:10.1016/j.jacc.2019.11.016.
4. Morozkina AV, Vorobyov AS, Donnikov MYu, et al. Creation of a biosample collection from patients after myocardial infarction in the Khanty-Mansi Autonomous Okrug — Yugra. Cardiovascular Therapy and Prevention. 2023;22(11):3805. (In Russ.) Морозкина А. В., Воробьев А. С., Донников М. Ю. и др. Создание в Ханты-Мансийском автономном округе — Югре коллекции биологических образцов пациентов, перенесших инфаркт миокарда. Кардиоваскулярная терапия и профилактика. 2023;22(11):3805. doi:10.15829/1728-8800-2023-3805.
5. Russian Society of Cardiology (RSC). 2020 Clinical practice guidelines for Acute ST-segment elevation myocardial infarction. Russian Journal of Cardiology. 2020;25(11):4103. (In Russ.) Российское кардиологическое общество (РКО). Острый инфаркт миокарда с подъемом сегмента ST электрокардиограммы. Клинические рекомендации 2020. Российский кардиологический журнал. 2020;25(11):4103. doi:10.15829/29/1560-4071-2020-4103.
6. Borisova AL, Pokrovskaya MS, Meshkov AN, et al. ISO 20387 biobanking standard. Analysis of requirements and experience of implementation. Russian Clinical Laboratory Diagnostics. 2020;65(9):587-92. (In Russ.) Борисова А. Л., Покровская М. С., Мешков А. Н. и др. Стандарт по биобанкированию ISO 20387. Анализ требований и опыт внедрения. Клиническая лабораторная диагностика. 2020;65(9):587-92. doi:10.18821/0869-2084-2020-65-9-587-592.
7. Emelyanchik VS, Marilovtseva OV, Khomchenkov RV, et al. Lipoprotein(a) in the diagnosis of cardiovascular risk. The values of lipoprotein (a) and apolipoprotein B in the adult population of Krasnoyarsk. Russian Journal of Cardiology. 2023;28(7):5499. (In Russ.) Емельянчик В. С., Мариловцева О. В., Хомченков Р. В. и др. Липопротеин (а) в диагностике сердечно-сосудистого риска. Значения липопротеина (а) и аполипопротеина В во взрослой популяции г. Красноярск. Российский кардиологический журнал. 2023;28(7):5499. doi:10.15829/1560-4071-2023-5499.
8. Kalinin RS, Goleva OV, Illarionov RA, et al. Development of a biobank in the structure of scientific and diagnostic and treatment institutions and prospects for interregional integration. Cardiovascular Therapy and Prevention. 2022;21(11):3401. (In Russ.) Калинин Р. С., Голева О. В., Илларионов Р. А. и др. Формирование биобанка в структуре научных и лечебно-диагностических учреждений и перспективы межрегиональной интеграции Кардиоваскулярная терапия и профилактика. 2022;21(11):3401. doi:10.15829/1728-8800-2022-3401.
9. Ugovšek S, Šebešljen M. Non-Lipid Effects of PCSK9 Monoclonal Antibodies on Vessel Wall. J Clin Med. 2022;11(13):3625. doi:10.3390/jcm11133625.
10. Cariou B, Guerin P, Le May C, et al. Circulating PCSK9 levels in acute coronary syndrome: Results from the PC-SCA-9 prospective study. Diabetes Metab J. 2017;43(6):529-35. doi:10.1016/j.diabet.2017.07.009.
11. Bae KH, Kim SW, Choi YK, et al. Serum Levels of PCSK9 Are Associated with Coronary Angiographic Severity in Patients with Acute Coronary Syndrome. Diabetes Metab J. 2018;42(3):207-14. doi:10.4093/dmj.2017.0081.
12. Almontashiri NA, Vilmundarson RO, Ghasemzadeh N, et al. Plasma PCSK9 levels are elevated with acute myocardial infarction in two independent retrospective angiographic studies. PLoS One. 2014;9(9):e106294. doi:10.1371/journal.pone.0106294.
13. Gencer B, Montecucco F, Nanchen D, et al. Prognostic value of PCSK9 levels in patients with acute coronary syndromes. Eur Heart J. 2016;37(6):546-53. doi:10.1093/eurheartj/ehv637.
14. Drenina YuA, Nikolaev KYu. PCSK9 in acute coronary syndrome: analysis of associations with clinical and laboratory characteristics. Cardiovascular Therapy and Prevention. 2020;19(4):2484. (In Russ.) Дренина Ю. А., Николаев К. Ю. PCSK9 при остром коронарном синдроме: анализ ассоциаций с клиническими и лабораторными характеристиками. Кардиоваскулярная терапия и профилактика. 2020;19(4):2484. doi:10.15829/1728-8800-2020-2484.
15. Simerzin VV, Fatenkov OV, Gagloeva IV, et al. Residual Risk of Cardiovascular Complications in Case of Adequate Lipid-Lowering Therapy. Science and Innovations in Medicine. 2018;3(2):19-25. (In Russ.) Симерзин В. В., Фатенков О. В., Гаглоева И. В. и др. Остаточный риск сердечно-сосудистых осложнений при адекватной липидкорректирующей терапии. Наука и инновации в медицине. 2018;3(2):19-25. doi:10.35693/2500-1388-2018-0-2-19-25.
16. Roth C, Krychtiuk KA, Gangl C, et al. Lipoprotein(a) plasma levels are not associated with survival after acute coronary syndromes: An observational cohort study. PLoS ONE. 2020;15(1):e0227054. doi:10.1371/journal.pone.0227054.
17. Bittner VA, Szarek M, Aylward PE, et al. ODYSSEY OUTCOMES Committees and Investigators. Effect of Alirocumab on Lipoprotein(a) and Cardiovascular Risk After Acute Coronary Syndrome. J Am Coll Cardiol. 2020;75(2):133-44. doi:10.1016/j.jacc.2019.10.057.
18. Liang S, Wang C, Zhang J, et al. Triglyceride-glucose index and coronary artery disease: a systematic review and meta-analysis of risk, severity, and prognosis. Cardiovasc Diabetol. 2023;22(1):170. doi:10.1186/s12933-023-01906-4.

Банк данных геномных последовательностей патогенных микроорганизмов и его роль в осуществлении эпидемиологического надзора

Семененко Т. А.¹, Акимкин В. Г.², Соломай Т. В.²

¹ФГБУ "Национальный исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии им. Н. Ф. Гамалеи" Минздрава России. Москва;

²ФБУН "Центральный научно-исследовательский институт эпидемиологии" Роспотребнадзора. Москва, Россия

Несмотря на то, что банки данных геномных последовательностей имеют четкие информационные связи с биологическими образцами, они являются самостоятельным интеллектуальным ресурсом, востребованным у многих исследователей. Для депонирования информации, полученной в ходе молекулярно-генетических исследований в России, был сформирован банк данных VGARus (Virus Genome Aggregator of Russia).

Цель. Оценка данных о вариабельности генетических последовательностей вируса Эпштейна-Барр (ВЭБ), полученных в ходе отечественных исследований, и возможности их интеграции в банк данных VGARus для последующего использования в рамках эпидемиологического надзора.

Материал и методы. Осуществлен поиск научных публикаций в библиографических базах данных PubMed, eLibrary, Cyberleninka. Всего в исследование включено 32 работы отечественных и зарубежных авторов, отвечающих поставленной цели.

Результаты. Число исследований, содержащих данные о генетических последовательностях ВЭБ в Российской Федерации, крайне мало. Представленные в научных публикациях сведения указывают на территориальные различия в соотношении двух генотипов ВЭБ, наличие особого варианта гена *LMP1* Tat^K у татар Поволжья, отличие российских образцов ВЭБ по гену, кодирующему поверхностный гликопротеин gp350, от таковых из других регионов мира. При этом информация о геномных последовательностях, полученных в ходе проведенных исследований, ни в одном случае не была депонирована в российский генетический банк.

Заключение. Расширение возможностей отечественной платформы VGARus путем включения информации о геномных последовательностях всех циркулирующих на территории Российской Федерации патогенных для человека микроорганизмов потребует проведения масштабной работы, учитывающей технические особенности, требования биологической и информационной безопасности.

Ключевые слова: банк данных геномных последовательностей, VGARus, вирус Эпштейна-Барр, молекулярно-генетический мониторинг.

Отношения и деятельность: нет.

Поступила 05/09-2024

Рецензия получена 09/09-2024

Принята к публикации 09/10-2024



Для цитирования: Семененко Т. А., Акимкин В. Г., Соломай Т. В. Банк данных геномных последовательностей патогенных микроорганизмов и его роль в осуществлении эпидемиологического надзора. *Кардиоваскулярная терапия и профилактика*. 2024;23(11):4185. doi: 10.15829/1728-8800-2024-4185. EDN SKZFFF

Databank of genomic sequences of pathogenic microorganisms and its role in the implementation of epidemiological surveillance

Semenenko T. A.¹, Akimkin V. G.², Solomay T. V.²

¹Gamaleya National Research Center for Epidemiology and Microbiology. Moscow; ²Central Research Institute of Epidemiology. Moscow, Russia

Despite the fact that databanks of genomic sequences have clear information links with biological samples, they are an independent intellectual resource in demand among many researchers. To deposit information obtained in the course of molecular genetic studies in Russia, the Virus Genome Aggregator of Russia (VGARus) databank was created.

Aim. To evaluate data on the variability of genetic sequences of the Epstein-Barr virus (EBV), obtained as a result of Russian studies, and the possibility of their integration into the VGARus database for subsequent use in epidemiological surveillance.

Material and methods. A search for publications was carried out in the PubMed, eLibrary, Cyberleninka databases. In total, the study included 32 papers of Russian and external authors that meet the stated aim.

Results. The number of studies containing data on the EBV genetic sequences in the Russian Federation is extremely small. The information presented in publications indicates geographical differences in the ratio of two EBV genotypes, the presence of a special *LMP1* Tat^K gene variant in the Tatars of the Volga region, the difference between Russian EBV samples in the gene encoding the gp350 from those from other world regions. At the same time, information on the genomic

*Автор, ответственный за переписку (Corresponding author):

e-mail: solomay@rambler.ru

[Семененко Т. А. — д.м.н., профессор, научный консультант, ORCID: 0000-0002-6686-9011, Акимкин В. Г. — д.м.н., профессор, академик РАН, директор, ORCID: 0000-0001-8139-0247, Соломай Т. В. — к.м.н., с.н.с., лаборатория инфекций, связанных с оказанием медицинской помощи, ORCID: 0000-0002-7040-7653].

sequences obtained in the studies was not deposited in the Russian gene bank in any case.

Conclusion. Expanding the potential of the Russian VGARus platform by including information on the genomic sequences of all pathogenic microorganisms circulating in the Russian Federation will require large-scale work that takes into account technical features, biological and information security requirements.

Keywords: genomic sequence databank, VGARus, Epstein-Barr virus, molecular genetic monitoring.

Relationships and Activities: none.

Semenenko T. A. ORCID: 0000-0002-6686-9011, Akimkin V. G. ORCID: 0000-0001-8139-0247, Solomay T. V.* ORCID: 0000-0002-7040-7653.

*Corresponding author:
solomay@rambler.ru

Received: 05/09-2024

Revision Received: 09/09-2024

Accepted: 09/10-2024

For citation: Semenenko T. A., Akimkin V. G., Solomay T. V. Databank of genomic sequences of pathogenic microorganisms and its role in the implementation of epidemiological surveillance. *Cardiovascular Therapy and Prevention*. 2024;23(11):4185. doi: 10.15829/1728-8800-2024-4185. EDN SKZFFF

ВЭБ — вирус Эпштейна-Барр, COVID-19 — COroNa Virus Disease 2019 (коронавирусная инфекция 2019г), SARS-CoV-2 — Severe Acute Respiratory Syndrome CoronaVirus 2 (коронавирус 2, вызывающий тяжелый острый респираторный дистресс-синдром), VGARus — Virus Genome Aggregator of Russia.

Ключевые моменты

Что известно о предмете исследования?

- Банки данных геномных последовательностей являются самостоятельным интеллектуальным ресурсом, востребованным у многих исследователей.
- Для депонирования информации, полученной в ходе молекулярно-генетических исследований в нашей стране, был сформирован банк данных VGARus (Virus Genome Aggregator of Russia).

Что добавляют результаты исследования?

- VGARus даёт возможность вести мониторинг мутационной изменчивости вирусов, осуществлять оперативный и ретроспективный анализ их распространённости на территории России.
- Депонирование информации о последовательностях вируса Эпштейна-Барр в VGARus позволяет изучать изменчивость вируса и ее влияние на течение эпидемического процесса, разрабатывать меры противодействия, включая специфическую иммунопрофилактику.

Key messages

What is already known about the subject?

- Genomic sequence databases are an independent intellectual resource in demand by many researchers.
- The Virus Genome Aggregator of Russia (VGARus) database was created to deposit information obtained during molecular genetic studies in Russia.

What might this study add?

- VGARus makes it possible to monitor the mutational variability of viruses, to carry out operational and retrospective analysis of their prevalence in Russia.
- Depositing information on the Epstein-Barr virus sequences in VGARus makes it possible to study its variability and impact on epidemic process, to develop countermeasures, including specific immunoprophylaxis.

Введение

Опыт работы в условиях пандемии COVID-19 (COroNa Virus Disease 2019, коронавирусная инфекция 2019г) заставил мировое сообщество пересмотреть свои взгляды на проблему биологических угроз. Уже в 2022г Всемирная организация здравоохранения на конференции, посвященной научным стратегиям по борьбе с недавними вспышками инфекционных болезней, обозначила необходимость подготовки к появлению нового патогена "X", определив при этом, что все инфекционные агенты, обладающие на современном этапе эпидемическим потенциалом, относятся к вирусам.

Одновременно с этим, в период высокой заболеваемости COVID-19 возросла роль отдельных хронических вирусных инфекций, тем или иным

образом связанных с состоянием, которое получило название "long COVID" или постковидный синдром. В ходе проведенных исследований было установлено, что у ряда пациентов на фоне течения COVID-19 происходит реактивация хронических герпесвирусных инфекций, в перечне которых лидирующую позицию занимает инфекция, вызванная вирусом Эпштейна-Барр (ВЭБ) [1-4], существенно утяжеляющая состояние больного и требующая глобальных материальных затрат на его лечение [5].

Это, в свою очередь, требует проведения исследований по изучению структуры и свойств вирусов — возбудителей инфекционных болезней человека, как новых, ранее не встречающихся, так и давно известных, но недостаточно изученных

в силу определенных обстоятельств [6]. Для решения данной задачи необходима организация крупномасштабных мониторинговых исследований [7, 8]. При этом вирусологические методы, основанные на воспроизводстве патогенов в биологических моделях или культурах клеток и позволяющие оценить фенотипические свойства возбудителей и их биологические особенности, достаточно трудоемки и требуют наличия большого временного ресурса. Кроме того, их применение не позволяет проследить степень генетического родства исследуемых патогенов, их изменчивость, что, в свою очередь, определяет необходимость использования иных научных подходов [9].

В последнее время интенсивно развиваются и усовершенствуются технологии секвенирования, направленные на определение нуклеотидной последовательности отдельных генов или генома в целом. Результаты таких исследований позволяют проводить филогенетический анализ путем поиска сходств и различий с ранее изученными образцами [10]. С 2020г такой подход стал неотъемлемой частью молекулярно-генетического мониторинга за циркулирующими геновариантами SARS-CoV-2 (Severe Acute Respiratory Syndrome CoronaVirus 2, коронавирус 2, вызывающий тяжелый острый респираторный дистресс-синдром), что наряду с другими исследованиями позволило соотнести определенные штаммы вируса не только с характером и тяжестью клинических проявлений болезни, но и с интенсивностью эпидемического процесса, а также составить математический прогноз его развития [6, 11].

Для депонирования информации, полученной в ходе молекулярно-генетических исследований SARS-CoV-2, впервые в России был сформирован масштабный банк данных генетической информации¹ VGARus (Virus Genome Aggregator of Russia), в работу с которым во время пандемии COVID-19 были вовлечены ведущие исследовательские центры [12, 13]. В дальнейшем возможности VGARus были существенно расширены²: развернута масштабная работа по секвенированию и биоинформатическому анализу геномов не только SARS-CoV-2, но и других микроорганизмов, вызывающих заболевания человека, выявлению как известных, так и потенциально новых вариантов патогенов. К сентябрю 2024г на указанном ресурсе было размещено >365 тыс. последовательностей геномов

различных патогенов, в т.ч. SARS-CoV-2, вируса иммунодефицита человека (ВИЧ), вирусов гепатитов В и С, гриппа, норо- и ротавирусов, а также *Varicella Zoster Virus*. Сведения о геномах иных вирусов герпеса, вызывающих заболевания человека, на настоящий момент в банке генетической информации системно не представлены.

Целью работы стала оценка данных о вариабельности генетических последовательностей ВЭБ, полученных в ходе отечественных исследований, и возможности их интеграции в банк данных VGARus для последующего использования в рамках эпидемиологического надзора.

Материал и методы

Для проведения настоящего исследования был осуществлен поиск научных публикаций по следующим ключевым словам: "генетические последовательности вируса Эпштейна-Барр". Поиск проводился в библиографических базах данных PubMed, eLibrary, Cyberleninka. Глубина поиска составила 10 лет. Ограничения по территориальному признаку установлены не были.

Количество работ, найденных в ходе поиска, по ключевым словам, составило 5107, из которых по результатам оценки на соответствие цели исследования отобрано 76 резюме. Полные тексты были доступны для 33 статей, которые в последующем включены в настоящее исследование.

Результаты

ВЭБ относится к семейству *Herpesviridae*, подсемейству *Gammaherpesvirinae*. Геном вируса, представленный двуцепочечной дезоксирибонуклеиновой кислотой (ДНК), содержащей >85 генов, имеет много повторяющихся областей, что существенно затрудняет его анализ. В настоящий момент исследования сфокусированы на изучении нуклеотидных последовательностей отдельных генов ВЭБ, среди которых основной акцент сделан на *EBNA2*, *EBNA3* и *LMP1* [14].

Интерес к перечисленным генам обусловлен тем, что первые два из них определяют существование основных типов ВЭБ — 1 (А) и 2 (В), идентичность которых по гену *EBNA2* составляет 51%, а *EBNA3* — 71% [15]. Особое внимание к изучению гена *LMP1* связано с его ролью в ассоциированном с ВЭБ канцерогенезе [16]. В зарубежной литературе приводятся сведения о наличии десяти вариантов данного гена (дикий В95-8; Аляска (Ala), Китай (Ch1) и (Ch2), Средиземноморье (Med+) и (Med-), Северная Каролина (NC), Юго-Восточная Азия 1 и 2 (SEA1 и SEA2), Аргентина (Arg)), названных по региону, где они были впервые обнаружены [17-19]. Однако это не указывает на географическую привязку выявленных геновариантов, т.к. они встречаются и в других регионах мира. Последовательности других генов ВЭБ изучены в меньшей степени, либо не исследовались совсем.

¹ Распоряжение Правительства Российской Федерации от 23 марта 2021г № 448 "О необходимости создания единого информационного центра для анализа эпидемической ситуации и отслеживания циркулирующих в стране геновариантов коронавируса".

² Постановление Правительства Российской Федерации от 23.12.2022г № 2395 "О внесении изменения в приложение к Положению о федеральной государственной информационной системе сведений санитарно-эпидемиологического характера".

Таблица 1

Частота выявления ВЭБ 1 (А) и ВЭБ 2 (В) у населения разных регионов РФ

Ссылка на источник	Регион РФ	Характеристика группы	Возраст, лет	Число обследованных лиц	Частота выявления, (п/%)		
					ВЭБ 1 (А)	ВЭБ 2 (В)	Оба генотипа
[21]	Нижний Новгород	пациенты с инфекционным мононуклеозом	1-15	50	50/100	0	0
[21]	Нижний Новгород	лица без признаков инфекционного мононуклеоза	1-15	29	28/96,6	1/3,4	0
³	Москва	медицинские работники	>18	47	45/95,7	1/2,15	1/2,15
[22]	Московская область	лица славянского происхождения	>18	40	32/81	8/19	0
[22]	Республика Татарстан	татары Поволжья	>18	60	50/83	10/17	0
[22]	Республика Адыгея	коренные адыгейцы	>18	59	11/19	48/81	0
[22]	Республика Калмыкия	коренные калмыки	>18	50	26/51	24/49	0
Всего дети				79	78/98,7	1/1,3	0
Всего взрослые				256	163/63,7	92/35,9	1/0,4
Итого				335	241/71,9	93/27,8	1/0,3

Примечание: ВЭБ — вирус Эпштейна-Барр.

В последние годы в мире были разработаны и внедрены методы высокопроизводительного секвенирования NGS (next generation sequencing), использование которых позволило исследователям существенно продвинуться в изучении полногеномных последовательностей ВЭБ; были выделены азиатская и неазиатская группы вируса, привязанные к конкретным географическим местностям [19, 20]. Несмотря на то, что указанные методы существенно нивелировали проблему считывания повторяющихся областей, отсутствие единого стандарта сборки окончательной последовательности генома ВЭБ не позволяет на современном этапе проводить эффективное сопоставление данных, полученных разными учеными [19], и возвращают исследования на этап оценки нуклеотидных последовательностей отдельных генов.

В Российской Федерации (РФ) результаты полногеномного секвенирования ВЭБ в доступной литературе не описаны. Единичные работы содержат сведения о частоте обнаружения двух основных генотипов вируса (таблица 1).

Так, в ходе исследования, проведенного в Нижнем Новгороде, установлено, что у детей 1-15 лет генотип ВЭБ 1 (А) встречался в 100% при наличии у них клинических проявлений инфекционного мононуклеоза, и в 96,6% при отсутствии данного заболевания. Частота выявления ВЭБ 2 (В) составила 0 и 3,4%, соответственно [21].

Генотипирование ВЭБ у лиц >18 лет в России проводили в группе медицинских работников столичного региона, где показатель выявления

ВЭБ 1 (А) составил 95,7%, ВЭБ 2 (В) — 2,15%, еще в 2,15% случаев установлено сочетание обоих генотипов у одного человека³.

В другом исследовании у взрослого населения Московской области, имеющего славянские корни, также доминировал ВЭБ 1 (А) — 81%, при этом в 19% исследованных образцов был идентифицирован ВЭБ 2 (В). Преобладание ВЭБ 1 (А) выявлено и у коренного населения Республики Татарстан — 83% [22].

В то же время, в отдельных регионах РФ частота обнаружения генотипов ВЭБ может иметь иное соотношение. Например, в Республике Адыгея среди лиц, исторически проживающих на данной территории, ВЭБ 2 (В) был идентифицирован в 81% образцов. Показатель выявления ВЭБ 1 (А) и ВЭБ 2 (В) среди коренного населения Калмыкии составил 51 и 49%, соответственно [22]. Интересно, что в ходе изучения территориальных особенностей эпидемического процесса ВЭБ-инфекции в различных субъектах РФ, именно в Республике Калмыкия был зарегистрирован один из самых низких уровней заболеваемости инфекционным мононуклеозом на фоне высокой серопревалентности к ВЭБ детского населения, значимо превышающей таковую в других регионах и в стране в целом. Кроме того, частота выявления ДНК ВЭБ в слюне взрослого населения

³ Соломай Т. В., Малахова М. В., Шитиков Е. А. и др. Оценка встречаемости вируса Эпштейна-Барр генотипов 1 и 2 в столичном регионе. Сборник материалов конгресса с международным участием "Молекулярная диагностика и биобезопасность-2022". Москва, 2022: С. 115-116.

Калмыкии составила 77,6% и была самой высокой для данной возрастной группы из 16 анализируемых регионов страны [23]. Это дает основания для продолжения поиска, в т.ч. основанного на оценке принадлежности ВЭБ к одному из генотипов, изучения последовательностей отдельных генов, а также внедрения методов полногеномного секвенирования.

В настоящий момент большинство исследований, проведенных в РФ, сконцентрировано на изучении последовательностей *LMP1* и их вероятной связи с онкогенезом [24].

Отечественными исследователями установлено, что у инфицированных ВЭБ здоровых индивидов, лиц, больных инфекционным мононуклеозом, и пациентов с онкологической патологией в совокупности преобладал дикий В95-8 вариант гена *LMP1*, на долю которого в целом пришлось 45,4%. Среди прочих генотипов наиболее часто встречались Med+, NC и Med-. Также обнаружены единичные находки вариантов Ch1 и Ch2. Различий в частоте обнаружения вариантов гена *LMP1* в зависимости от наличия патологического состояния и его характера выявлено не было [25].

Отдельный интерес представляет поиск особенностей гена *LMP1* ВЭБ, выделенного от населения разных регионов нашей страны. Несмотря на то, что исследования, посвященные данному вопросу, ставят своей целью поиск связи между вариантами данного гена и частотой развития онкологических заболеваний, полученные в ходе них данные заслуживают внимания с позиции эпидемиологического надзора, т.к. могут быть использованы в качестве основы для формирования молекулярно-генетического мониторинга ВЭБ в РФ.

Так, в группе этнических татар Поволжья был обнаружен вариант *LMP1* (Tat^K), содержащий две уникальные делеции 5 а.к. в кодонах 312-316 и 382-386. Данный вариант не был выявлен в образцах, изолированных от россиян других национальностей, а также в международных банках генетической информации, в результате чего авторами исследования высказано предположение о том, что вариант Tat^K сформировался в период образования в Поволжье Казанского ханства после выделения его из состава Золотой Орды [26, 27].

В то же время, сопоставление последовательностей *LMP1*, выделенного от татар Поволжья, с данным геном ВЭБ, изолированным от представителей адыгейцев и калмыков, показало наличие между ними генетического родства. Аналогичные сравнения *LMP1* ВЭБ, полученного от поволжских татар и славян, проживающих в Москве, обнаружило большее число различий. Так, в гене *LMP1* славян отсутствовали мутации в домене STAR1, характерные для трех других этносов, а число мутаций в доменах STAR2 и STAR3 было увеличено [28].

Исследования, проведенные в Хабаровском крае, показали, что среди коренного населения нанайцев и мигрантов из европейской части России дикий В95-8 вариант гена *LMP1* встречался в 26,2 и 25,0% исследованных образцов. Частота выявления генотипа Med+ составила 21,1 и 17,9%; Med- — 21,1 и 14,3%; NC — 15,8 и 21,4%; Ch1 — 15,8 и 21,4%, соответственно. При этом варианты Ala и Ch2 обнаружены не были. Несмотря на существенное сходство в частоте выявления отдельных вариантов *LMP1*, в образцах, выделенных от нанайцев, были идентифицированы аминокислотные замены в позициях 212, 328 и 399, отсутствующие у мигрантов из европейской части России [29], что, в свою очередь, может являться следствием относительно изолированного существования коренных народов от прочего населения и определять особенности течения эпидемического процесса ВЭБ-инфекции среди них.

Подобные сопоставления представляют интерес не только с позиции поиска различий, но и установления эпидемиологических связей между группами населения и отдельными индивидуумами. Так, сопоставление последовательностей *LMP1* у больных инфекционным мононуклеозом детей Нижегородской области с информацией из международных банков генетических данных позволил установить наличие общей мутации D250N с изолятами из Сербии. При этом, оценка скорости эволюции *LMP1* в исследуемых образцах показала время происхождения их ближайшего общего предка — 1923г, что соотносится с периодом массовой русской эмиграции в этот регион во время гражданской войны [30].

Проведенные исследования наглядно свидетельствуют о том, что изучение распространенности основных генотипов ВЭБ и последовательностей гена *LMP1* позволяют выдвинуть предположения о "географических маршрутах распространения" ВЭБ и происходящих с вирусом изменениях, включая появление новых вариантов. Однако следует отметить, что ген *LMP1* участвует в реализации латентной фазы ВЭБ-инфекции, в то время как больший интерес с эпидемиологической точки зрения будет представлять информация о вариабельности генов ВЭБ, ответственных за литическую репродукцию вируса и его взаимодействие с организмом хозяина.

Единственное исследование отечественных авторов, проведенное в этом направлении, касается изучения вариабельности гена, кодирующего поверхностный гликопротеин gp350, участвующий в проникновении вируса в клетки хозяина и рассматриваемый зарубежными учеными в качестве основы для создания потенциальных вакцин против ВЭБ-инфекции. Изучение последовательностей gp350 с эпидемиологической точки зрения представляется наиболее перспективным, т.к. по-

мимо выявления особенностей вируса, позволит в дальнейшем разработать подходы к специфической профилактике ВЭБ-инфекции. Кроме того, авторам исследования удалось установить связь между участниками эпидемического процесса. Всего было исследовано 30 образцов, соответствующих типу ВЭБ 1 (А), полученных от условно здоровых медицинских работников 4-х стоматологических клиник г. Москвы. При сопоставлении последовательностей gp350 российских образцов с данными аналогичных исследований, представленными в генетическом банке NCBI (National Center for Biotechnology Information) США, установлено, что отечественные образцы не формировали отдельной клады и равномерно распределялись по филогенетическому дереву [31].

В то же время, gp350 ВЭБ, выделенный от медицинских работников стоматологических клиник, содержал в совокупности 15 уникальных аминокислотных замен и одну делецию, отсутствующие в образцах из других регионов мира. Именно наличие уникальных мутаций позволило достоверно установить эпидемиологические связи между обследованными лицами. Все исследованные образцы были представлены 22 индивидуальными профилями gp350, из которых только три встречались одновременно у нескольких медицинских работников. Профиль № 13 имел максимальное сходство с другими образцами, информация о которых была представлена в банке генетических данных NCBI и встречался у сотрудников всех 4-х стоматологических клиник, включенных в исследование. Наибольший интерес представили профили № 5 и 6, каждый из которых встречался у двух сотрудников одной и той же клиники, работающих в паре — врач и ассистент стоматолога. И если профиль № 5 отличался от референсного штамма B95-8 (NC_007605.1) только делецией в позициях 593–613, то профиль № 6 помимо двух делеций, встречающихся в других регионах мира (del 540–560, del 593–613), имел уникальную мутацию Q853K, наличие которой стало убедительным доказательством эпидемиологической взаимосвязи и подтвердило существование риска профессионального инфицирования ВЭБ в условиях стоматологической клиники [31].

Заключение

Все приведенные в настоящем обзоре данные были извлечены из научных публикаций. Информация о геномных последовательностях ВЭБ, полученных в ходе проведенных исследований, ни в одном случае не была депонирована в российский генетический банк, что существенно осложняет научный поиск и не позволяет в полной мере сопоставить разрозненные сведения.

На настоящий момент число исследований, содержащих данные о генетических последовательностях ВЭБ в РФ, крайне мало. Однако уже сейчас результаты проанализированных работ содержат важные с позиции эпидемиологии сведения и свидетельствуют о наличии особенностей ВЭБ, циркулирующих в разных субъектах нашей страны. Установлены территориальные различия в соотношении двух генотипов ВЭБ, выявлен новый вариант гена *LMPI* Tat^K у татар Поволжья, обнаружены отличия российских образцов ВЭБ по гену, кодирующему поверхностный гликопротеин gp350, от таковых из других регионов мира. Кроме того, проведенные исследования позволили проследить "пути миграции" ВЭБ и определить эпидемиологические связи между сотрудниками одного коллектива.

Депонирование информации о расшифрованных последовательностях в банк генетических данных с возможностью последующего сопоставления с другими образцами позволит заложить основу молекулярно-генетического мониторинга ВЭБ в нашей стране, изучать изменчивость вируса и ее влияние на течение эпидемического процесса, разрабатывать адекватные меры противодействия, включая специфическую иммунопрофилактику.

На современном этапе продолжается активное депонирование результатов секвенирования в VGARus, включая соответствующие метаданные. Платформа VGARus даёт возможность вести постоянный мониторинг мутационной изменчивости вирусов, предоставляя важнейшие данные для обнаружения новых геновариантов и осуществлять оперативный и ретроспективный анализ их распространённости на территории России [32, 33]. Расширение возможностей банка данных VGARus путем включения информации о геномных последовательностях всех циркулирующих на территории РФ патогенных для человека микроорганизмов потребует проведения масштабной работы, учитывающей технические особенности, требования биологической и информационной безопасности. В настоящее время все научные учреждения России, занимающиеся секвенированием геномов коронавируса и зарегистрировавшиеся на портале в качестве пользователей, имеют возможность выложить изучаемые геномные последовательности в VGARus. Полученные регистрационные удостоверения позволяют её участникам использовать информацию национальной базы данных. Доступ к платформе осуществляется через портал genome.crie.ru.

Отношения и деятельность: все авторы заявляют об отсутствии потенциального конфликта интересов, требующего раскрытия в данной статье.

Литература/References

- Algaadi SA. Herpes zoster and COVID-19 infection: a coincidence or a causal relationship? *Infection*. 2022;50(2):289-93. doi:10.1007/s15010-021-01714-6.
- Yan M, Xiao LY, Gosau M, et al. The causal association between COVID-19 and herpes simplex virus: a Mendelian randomization study. *Front Immunol*. 2023;14:1281292. doi:10.3389/fimmu.2023.1281292.
- Solomay TV, Semenenko TA, Isaeva EI, et al. COVID-19 and the risk of reactivation of herpesvirus infection. *Epidemiology and infectious diseases*. Current items. 2021;11(2):55-62. (In Russ.) Соломай Т.В., Семененко Т.А., Исаева Е.И. и др. COVID-19 и риск реактивации герпесвирусной инфекции. Эпидемиология и инфекционные болезни. Актуальные вопросы. 2021;11(2):55-62. doi:10.18565/epidem.2021.11.2.55-62.
- Solomay TV, Semenenko TA, Filatov NN, et al. Reactivation of Epstein-Barr virus infection (Herpesviridae: Lymphocryptovirus, HHV-4) against COVID-19: epidemiological features. *Problems of Virology (Voprosy virusologii)*. 2021;66(2):152-61. (In Russ.) Соломай Т.В., Семененко Т.А., Филатов Н.Н. и др. Реактивация инфекции, вызванной вирусом Эпштейна-Барр (Herpesviridae: Lymphocryptovirus, HHV-4), на фоне COVID-19: эпидемиологические особенности. Вопросы вирусологии. 2021;66(2):152-61. doi:10.36233/0507-4088-40.
- Solomay TV, Voronin EM, Semenenko TA, et al. The economic burden of Epstein-Barr virus infection in the Russian Federation. *Public Health and Life Environment*. 2024;32(3):7-14. (In Russ.) Соломай Т.В., Воронин Е.М., Семененко Т.А. и др. Экономическое бремя инфекции, вызванной вирусом Эпштейна-Барр, в Российской Федерации. Здоровье населения и среда обитания. 2024;32(3):7-14. doi:10.35627/2219-5238/2024-32-3-7-14.
- Gushchin VA, Postal AA, Kustova DD, et al. Characteristics of the COVID-19 epidemic process in Moscow and the search for possible factors determining the trends of the observed changes. *Journal of Microbiology, Epidemiology and Immunobiology*. 2023;100(4):267-84. (In Russ.) Гушин В.А., Почтовый А.А., Кустова Д.Д. и др. Характеристика эпидемического процесса COVID-19 в Москве и поиск возможных факторов, определяющих тенденции наблюдаемых изменений. Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии. 2023;100(4):267-84. doi:10.36233/0372-9311-375.
- Mamoshina MV, Yatsyshina SB, Akimkin VG. Analysis of monitoring results of ARVI, influenza and COVID-19 pathogens in asymptomatic individuals. *Epidemiology and infectious diseases*. Current items. 2023;13(2):63-9. (In Russ.) Мамошина М.В., Яцышина С.Б., Акимкин В.Г. Анализ результатов мониторинга возбудителей ОРВИ, гриппа и COVID-19 у бессимптомных лиц. Эпидемиология и инфекционные болезни. Актуальные вопросы. 2023;13(2):63-9. doi:10.18565/epidem.2023.13.2.63-9.
- Solomay TV, Simonova EG, Semenenko TA. Scientific substantiation of the creation and prospects for the development of an epidemiological surveillance system for infection caused by the Epstein-Barr virus. *Epidemiology and vaccine prevention*. 2022;21(1):21-31. (In Russ.) Соломай Т.В., Симонова Е.Г., Семененко Т.А. Научное обоснование создания и перспективы развития системы эпидемиологического надзора за инфекцией, вызванной вирусом Эпштейна-Барр. Эпидемиология и вакцинопрофилактика. 2022;21(1):21-31. doi:10.31631/2073-3046-2022-21-1-21-31.
- Saidullayeva IS, Tikhomirov DS, Drovok MYu, et al. Human herpes virus type 6 (Orthoherpesviridae: Roseolovirus): features of epidemiology and diagnosis. *Problems of Virology (Voprosy virusologii)*. 2024;69(1):22-30. (In Russ.) Сайдудллаева И.С., Тихомиров Д.С., Дроков М.Ю. и др. Вирус герпеса человека 6-го типа (Orthoherpesviridae: Roseolovirus): особенности эпидемиологии и диагностики. Вопросы вирусологии. 2024;69(1):22-30. doi:10.36233/0507-4088-208.
- Kucheryavikh ES, Panarina YaS, Venetsev EO, et al. Megapolis Laboratory Service: new approaches to managing the morbidity of the population during a pandemic based on methods of mass sequencing of the virus genome. *Remedium*. 2024;28(1):31-8. (In Russ.) Кучерявых Е.С., Панарина Я.С., Веневцев Е.О. и др. Лабораторная служба мегаполиса: новые подходы к управлению заболеваемостью населения в период пандемии на основе методов массового секвенирования генома вируса. Ремедиум. 2024;28(1):31-8. doi:10.32687/1561-5936-2024-28-1-31-38.
- Gerasimov AN, Shpitionkov MI. Mathematical model of the "parasite-host" system with distributed immunity retention time. *Computer research and modeling*. 2024;16(3):695-711. (In Russ.) Герасимов А.Н., Шпитонков М.И. Математическая модель системы "паразит-хозяин" с распределенным временем сохранения иммунитета. Компьютерные исследования и моделирование. 2024;16(3):695-711. doi:10.20537/2076-7633-2024-16-3-695-711.
- Akimkin VG, Semenenko TA, Khafizov KF, et al. The strategy of genomic epidemiological surveillance. *Problems and prospects. Journal of Microbiology, Epidemiology and Immunobiology*. 2024;101(2):163-72. (In Russ.) Акимкин В.Г., Семененко Т.А., Хафизов К.Ф. и др. Стратегия геномного эпидемиологического надзора. Проблемы и перспективы. Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии. 2024;101(2):163-72. doi:10.36233/0372-9311-507.
- Akimkin VG, Khafizov KF, Dubodelov DV, et al. Molecular genetic monitoring and digital transformation technologies in modern epidemiology. *Annals of the Russian academy of medical sciences*. 2023;78(4):363-9. (In Russ.) Акимкин В.Г., Хафизов К.Ф., Дубоделов Д.В. и др. Молекулярно-генетический мониторинг и технологии цифровой трансформации в современной эпидемиологии. Вестник Российской академии медицинских наук. 2023;78(4):363-9. doi:10.15690/vramn13672.
- Neves M, Marinho-Dias J, Ribeiro J, et al. Epstein-Barr virus strains and variations: Geographic or disease-specific variants? *J Med Virol*. 2017;89(3):373-87. doi:10.1002/jmv.24633.
- Correia S, Bridges R, Wegner F, et al. Sequence variation of Epstein-Barr virus: viral types, geography, codon usage, and diseases. *J Virol*. 2018;92(22):e01132-18. doi:10.1128/JVI.01132-18.
- Smirnova KV, Senyuta NB, Botezatu IV, et al. Epstein-Barr virus in ethnic Tatars: infection and sequence variants of the LMP1 oncogene. *Advances in Molecular Oncology*. 2018;5(3):65-74. (In Russ.) Смирнова К.В., Сенюта Н.Б., Ботезату И.В. и др. Вирус Эпштейна-Барр у этнических татар: инфицированность и сиквенсные варианты онкогена LMP1. Успехи молекулярной онкологии. 2018;5(3):65-74. doi:10.17650/2313-805X-2018-5-3-65-74.
- Tzellos S, Farrell PJ. Epstein-Barr virus sequence variation-biology and disease. *Pathogens*. 2012;1(2):156-74. doi:10.3390/pathogens1020156.
- Smatti MK, Al-Sadeq DW, Ali NH, et al. Epstein-Barr virus epidemiology, serology, and genetic variability of LMP-1 oncogene among healthy population: an update. *Front Oncol*. 2018;8:211. doi:10.3389/fonc.2018.00211.
- Blazquez AC, Berenstein AJ, Torres C, et al. Comprehensive evolutionary analysis of complete Epstein-Barr virus genomes

- from Argentina and other geographies. *Viruses*. 2021;13(6):1172. doi:10.3390/v13061172.
20. Telford M, Hughes DA, Juan D, et al. Expanding the geographic characterisation of Epstein-Barr virus variation through gene-based approaches. *Microorganisms*. 2020;8(11):1686. doi:10.3390/microorganisms8111686.
21. Popkova MI, Utkin OV, Soboleva EA, et al. Methodological basics for differential detection of EB1/EB2 and VHCH6A/VHCH6B. *Russian Journal of Infection and Immunity*. 2021;11(6):1057-66. (In Russ.) Попкова М. И., Уткин О. В., Соболева Е. А. и др. Методические основы дифференциальной детекции ВЭБ1/ВЭБ2 и ВГЧ6А/ВГЧ6В. *Инфекция и иммунитет*. 2021;11(6):1057-66. doi:10.15789/2220-7619-MBF-1661.
22. Gurtsevich VE, Lubenskaya AK, Senyuta NB, et al. Epstein-Barr virus (Orthoherpesviridae: Lymphocryptovirus) in ethnic groups of Russia: prevalence of types of EBV (EB-1 and EB-2), variants of the LMP1 gene and malignant tumors. *Problems of Virology (Voprosy virusologii)*. 2024;69(1):56-64. (In Russ.) Гурцевич В. Э., Лубенская А. К., Сеньюта Н. Б. и др. Вирус Эпштейна-Барр (Orthoherpesviridae: Lymphocryptovirus) у этносов России: распространенность типов ВЭБ (ВЭБ-1 и ВЭБ-2), варианты гена LMP1 и злокачественные опухоли. *Вопросы вирусологии*. 2024;69(1):56-64. doi:10.36233/0507-4088-214.
23. Solomay TV, Semenenko TA, Kuzin SN, et al. Territorial features of the epidemic process of infection caused by the Epstein-Barr virus. *Infectious diseases: news, opinions, education*. 2021;10(4):81-9. (In Russ.) Соломай Т. В., Семененко Т. А., Кузин С. Н. и др. Территориальные особенности эпидемического процесса инфекции, вызванной вирусом Эпштейна-Барр. *Инфекционные болезни: новости, мнения, обучение*. 2021;10(4):81-9. doi:10.33029/2305-3496-2021-10-4-81-89.
24. Senyuta NB, Smirnova KV, Diduk SV, et al. Structural and functional characteristics of the LMP1 oncogene in patients with tumors associated and not associated with Epstein-Barr virus. *Mol Gen Mikrobiol Virusol*. 2016;34(2):71-5. (In Russ.) Сеньюта Н. Б., Смирнова К. В., Дидук С. В. и др. Структурно-функциональная характеристика онкогена LMP1 у больных с опухолями, ассоциированными и не ассоциированными с вирусом Эпштейна-Барр. *Молекулярная генетика, микробиология и вирусология*. 2016;34(2):71-5. PMID: 30380210.
25. Goncharova EV, Senyuta NB, Smirnova KV, et al. Epstein-Barr virus (EBV) in Russia: infection of the population and analysis of variants of the LMP1 gene in patients with EBV-associated pathologies and healthy individuals. *Problems of Virology (Voprosy virusologii)*. 2015;60(2):11-7. (In Russ.) Гончарова Е. В., Сеньюта Н. Б., Смирнова К. В. и др. Вирус Эпштейна-Барр (ВЭБ) в России: инфицированность населения и анализ вариантов гена LMP1 у больных ВЭБ-ассоциированными патологиями и здоровых лиц. *Вопросы вирусологии*. 2015;60(2):11-7.
26. Smirnova KV, Senyuta NB, Lubenskaya AK, et al. Ancient variants of the Epstein-Barr virus (Herpesviridae, Lymphocryptovirus, HHV-4): hypotheses and facts. *Problems of Virology (Voprosy virusologii)*. 2020;65(2):77-86. (In Russ.) Смирнова К. В., Сеньюта Н. Б., Лубенская А. К. и др. Древние варианты вируса Эпштейна-Барр (Herpesviridae, Lymphocryptovirus, HHV-4): гипотезы и факты. *Вопросы вирусологии*. 2020;65(2):77-86. doi:10.36233/0507-4088-2020-65-2-77-86.
27. Gurtsevich VE, Smirnova KV, Botezatu IV, et al. Polymorphism of the oncogene LMP-1 of the Epstein-Barr virus in two ethnic groups of Russia, Tatars and Slavs, and its effect on the development of some malignant tumors. *Russian Journal of Infection and Immunity = Infektsiya i immunitet*. 2020;10(2):347-58. (In Russ.) Гурцевич В. Э., Смирнова К. В., Ботезату И. В. и др. Полиморфизм онкогена LMP-1 вируса Эпштейна-Барр в двух этнических группах России, татар и славян, и его влияние на развитие некоторых злокачественных опухолей. *Инфекция и иммунитет*. 2020;10(2):347-58. doi:10.15789/2220-7619-EBV-1162.
28. Smirnova KV, Lubenskaya AK, Senyuta NB, et al. The molecular profile of the Epstein-Barr virus in representatives of four ethnic groups of Russia: virus types, LMP1 gene variability, and malignant tumors. *Advances in molecular oncology*. 2023;10(4):116-23. (In Russ.) Смирнова К. В., Лубенская А. К., Сеньюта Н. Б. и др. Молекулярный профиль вируса Эпштейна-Барр у представителей четырех этносов России: типы вируса, вариативность гена LMP1 и злокачественные опухоли. *Успехи молекулярной онкологии*. 2023;10(4):116-23. doi:10.17650/2313-805X-2023-10-4-116-123.
29. Smirnova KV, Diduk SV, Gurtsevich VE. Polymorphism of the oncogene LMP1 of the Epstein-Barr virus in representatives of the indigenous small-numbered people of the Russian Far East. *Epidemiology and Infectious diseases*. 2017;22(5):239-47. (In Russ.) Смирнова К. В., Дидук С. В., Гурцевич В. Э. Полиморфизм онкогена LMP1 вируса Эпштейна-Барр у представителей коренного малочисленного народа Дальнего Востока России. *Эпидемиология и инфекционные болезни*. 2017;22(5):239-47. doi:10.18821/1560-9529-2017-22-5-239-247.
30. Bryzgalova DA, Sakharov NA, Popkova MI, et al. Philodynamic characteristics of the LMP-1 gene of the Epstein-Barr virus isolated in the Nizhny Novgorod region. *Journal of microbiology, epidemiology and immunobiology*. 2023;100(5):369-79. (In Russ.) Брызгалова Д. А., Сахаров Н. А., Попкова М. И. и др. Филодинамическая характеристика гена LMP-1 вируса Эпштейна-Барр, изолированного на территории Нижегородской области. *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии*. 2023;100(5):369-79. doi:10.36233/0372-9311-379.
31. Solomay TV, Malakhova MV, Shitikov EA, et al. Epstein-Barr virus: evaluation of the variability of gp350 and EBNA2 genes. *Molecular Genetics Microbiology and Virology*. 2022;40(3):32-40. (In Russ.) Соломай Т. В., Малахова М. В., Шитиков Е. А. и др. Вирус Эпштейна-Барр: оценка вариативности генов gp350 и EBNA2. *Молекулярная генетика, микробиология и вирусология*. 2022;40(3):32-40. doi:10.17116/molgen20224003132.
32. Akimkin VG, Semenenko TA, Ugleva SV, et al. COVID-19 in Russia: epidemiology and molecular genetic monitoring. *Annals of the Russian Academy of Medical Sciences*. 2022;77(4):254-60. (In Russ.) Акимкин В. Г., Семененко Т. А., Углева С. В. и др. COVID-19 в России: эпидемиология и молекулярно-генетический мониторинг. *Вестник Российской академии медицинских наук*. 2022;77(4):254-60. doi:10.15690/vramn2121.
33. Akimkin VG, Semenenko TA, Ugleva SV, et al. COVID-19 Epidemic Process and Evolution of SARS-CoV-2 Genetic Variants in the Russian Federation. *Microbiol Res*. 2024;15:213-24. doi:10.3390/microbiolres15010015.

Технология оценки частот ДНК-маркеров в многонациональных административных единицах по данным о коренном народонаселении в связи с заболеваемостью (на примере сердечно-сосудистых заболеваний)

Балановская Е. В.¹, Потанина А. Ю.¹, Кошель С. М.², Адамов Д. С.¹, Евсюков И. В.¹, Борисова А. Л.³, Покровская М. С.³, Мешков А. Н.³

¹ФГБНУ "Медико-генетический научный центр им. акад. Н.П. Бочкова". Москва; ²ФГБОУ ВО "Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова". Москва; ³ФГБУ "Национальный медицинский исследовательский центр терапии и профилактической медицины" Минздрава России. Москва, Россия

Информация о заболеваемости представлена в статистических отчетах суммарно обо всем населении многонациональных субъектов России, но Биобанки народонаселения содержат информацию об отдельных народах.

Цель. Разработать технологию оценки частоты ДНК- (дезоксирибонуклеиновая кислота) маркеров для административных единиц по данным о коренном народонаселении, что позволит оценить связь частоты ДНК-маркеров с заболеваемостью.

Материал и методы. Биобанк Северной Евразии представил частоты 24 ДНК-маркеров, ассоциированных с сердечно-сосудистыми заболеваниями (ССЗ) для 86 коренных народов России (6227 ДНК-образцов). Из переписи 2010г извлечена информация об этническом составе 83 субъектов Российской Федерации (РФ), из данных Минздрава России — заболеваемость ССЗ в 85 субъектах РФ (2020-2021гг).

Результаты. Совокупность данных о генофондах коренного населения и этническом составе субъектов РФ позволила оценить частоты 24 ДНК-маркеров в 85 субъектах РФ. Полученные частоты позволили напрямую оценить их связь с ССЗ в России — хроническими ревматическими болезнями сердца, кардиомиопатией, ишемическими болезнями сердца, гипертензивной болезнью сердца, острым инфарктом. Результаты применения технологии представлены в виде таблиц и геногеографических карт: 1) распространения в субъектах РФ 24 ДНК-маркеров ССЗ; 2) географии заболеваемости в субъектах РФ для пяти ССЗ; 3) корреляции распространения частоты ДНК-маркеров ССЗ и заболеваемости ССЗ среди населения России.

Заключение. Предложенная технология оценки современного генофонда субъектов РФ по данным о генофонде коренных народов

России впервые позволила оценить связь клинически значимых ДНК-маркеров и заболеваемости в РФ.

Ключевые слова: генофонд, ДНК-маркеры, сердечно-сосудистая заболеваемость, геногеография, этносостав, субъекты Российской Федерации, коренное народонаселение.

Отношения и деятельность. Исследование выполнено в рамках Государственного задания Минобрнауки России для ФГБНУ "МГНЦ".

Благодарности. Авторы благодарят АНО "Биобанк Северной Евразии" за предоставление данных о частотах ДНК-маркеров ССЗ в коренном населении России.

Поступила 19/09-2024

Рецензия получена 27/09-2024

Принята к публикации 05/10-2024



Для цитирования: Балановская Е. В., Потанина А. Ю., Кошель С. М., Адамов Д. С., Евсюков И. В., Борисова А. Л., Покровская М. С., Мешков А. Н. Технология оценки частот ДНК-маркеров в многонациональных административных единицах по данным о коренном народонаселении в связи с заболеваемостью (на примере сердечно-сосудистых заболеваний). *Кардиоваскулярная терапия и профилактика*. 2024;23(11):4204. doi: 10.15829/1728-8800-2024-4204. EDN LXRFUJ

*Автор, ответственный за переписку (Corresponding author):

e-mail: potaninaaanna@gmail.com

[Балановская Е. В. — д.б.н., профессор, зав. лабораторией популяционной генетики человека, ORCID: 0000-0002-3882-8300, Потанина А. Ю.* — м.н.с. лаборатории популяционной генетики человека, ORCID: 0009-0000-7911-4673, Кошель С. М. — к.г.н., в.н.с., Географический факультет, ORCID: 0000-0002-4540-2922, Адамов Д. С. — к.ф.-м.н., с.н.с. лаборатории популяционной генетики человека, ORCID: 0009-0009-3527-4195, Евсюков И. В. — н.с. лаборатории популяционной генетики человека, ORCID: 0000-0003-1810-429X, Борисова А. Л. — н.с., руководитель лаборатории "Банк биологического материала" Института персонализированной терапии и профилактики, ORCID: 0000-0003-4020-6647, Покровская М. С. — к.б.н., в.н.с. лаборатории "Банк биологического материала" Института персонализированной терапии и профилактики, ORCID: 0000-0001-6985-7131, Мешков А. Н. — д.м.н., руководитель Института персонализированной терапии и профилактики, ORCID: 0000-0001-5989-6233].

Assessment of the frequency and association with morbidity of DNA markers in multinational administrative divisions based on indigenous population data (based on cardiovascular diseases)

Balanovskaya E. V.¹, Potanina A. Yu.¹, Koshel S. M.², Adamov D. S.¹, Evsyukov I. V.¹, Borisova A. L.³, Pokrovskaya M. S.³, Meshkov A. N.³

¹Bochkov Medical Genetic Research Center. Moscow; ²Lomonosov Moscow State University. Moscow; ³National Medical Research Center for Therapy and Preventive Medicine. Moscow, Russia

Information on morbidity is presented in statistical reports for the entire population of multinational subjects of Russia, but population Biobanks contain information on individual peoples.

Aim. To develop a technology for assessing the frequency of deoxyribonucleic acid (DNA) markers for administrative units based on indigenous population data, which will make it possible to assess the relationship between the frequency of DNA markers and morbidity.

Material and methods. The Biobank of Northern Eurasia presented the frequencies of 24 DNA markers associated with cardiovascular disease (CVD) for 86 indigenous peoples of Russia (6227 DNA samples). Information on the ethnic composition of 83 Russian regions was extracted from the 2010 census, and the CVD incidence in 85 Russian regions (2020–2021) was assessed by data from the Ministry of Health of Russia.

Results. The data on the gene pools of the indigenous population and the ethnic composition of Russian regions made it possible to assess the frequencies of 24 DNA markers in 85 Russian regions. The obtained frequencies allowed us to directly assess their relationship with CVD in Russia — chronic rheumatic heart diseases, cardiomyopathy, coronary artery disease, hypertension, acute myocarditis. Technology application data are presented in the form of tables and genogeographic maps of the distribution of 24 CVD DNA markers in Russian subjects, the geography of morbidity in Russian subjects for five CVDs, and the correlation of the distribution of the frequency of CVD DNA markers and the incidence of CVD among the population of Russia.

Conclusion. The proposed technology for assessing the modern gene pool in Russian subjects based on the data on the gene pool of the indigenous peoples of Russia for the first time made it possible to assess the relationship between clinically significant DNA markers and morbidity in Russia.

Keywords: gene pool, DNA markers, cardiovascular morbidity, genogeography, ethnic composition, subjects of the Russian Federation, indigenous population.

Relationships and Activities. The study was conducted within the State assignment of the Ministry of Education and Science of the Russian Federation for the Medical Genetic Research Center.

Acknowledgements. The authors thank the ANO Biobank of Northern Eurasia for providing data on the frequencies of DNA markers of CVD in the indigenous population of Russia.

Balanovskaya E. V. ORCID: 0000-0002-3882-8300, Potanina A. Yu.* ORCID: 0009-0000-7911-4673, Koshel S. M. ORCID: 0000-0002-4540-2922, Adamov D. S. ORCID: 0009-0009-3527-4195, Evsyukov I. V. ORCID: 0000-0003-1810-429X, Borisova A. L. ORCID: 0000-0003-4020-6647, Pokrovskaya M. S. ORCID: 0000-0001-6985-7131, Meshkov A. N. ORCID: 0000-0001-5989-6233.

*Corresponding author:
potaninaaanna@gmail.com

Received: 19/09-2024

Revision Received: 27/09-2024

Accepted: 05/10-2024

For citation: Balanovskaya E. V., Potanina A. Yu., Koshel S. M., Adamov D. S., Evsyukov I. V., Borisova A. L., Pokrovskaya M. S., Meshkov A. N. Assessment of the frequency and association with morbidity of DNA markers in multinational administrative divisions based on indigenous population data (based on cardiovascular diseases). *Cardiovascular Therapy and Prevention*. 2024;23(11):4204. doi: 10.15829/1728-8800-2024-4204. EDN LXRUFJ

АО — Автономный Округ, ДНК — дезоксирибонуклеиновая кислота, ИБС — ишемическая(-ие) болезнь(-и) сердца, РФ — Российская Федерация, ССЗ — сердечно-сосудистые заболевания, SNP — Single Nucleotide Polymorphism (однонуклеотидный полиморфизм).

Введение

В настоящее время развитие превентивной и персонализированной медицины невозможно без применения генетических данных. Однако фармакогенетическое тестирование в регионах с недостаточным финансированием здравоохранения недоступно. Решение этой проблемы дает популяционная геногеография, предоставляющая информацию о частоте важнейших ДНК (дезоксирибонуклеиновая кислота)-маркеров фармакогенетики¹ [1–5]. В такой многонациональной стране, как Россия, данные геногеографии могут дать важную информацию для принятия клинических решений. Изучение закономерностей в распределении фармакогенетических маркеров в народонаселении России

выявляет этносы и регионы, где фармакогенетическое тестирование будет клинко-экономически выгодным решением, и предоставляет информацию, на которую может ориентироваться персонализированная медицина.

Исходную информацию популяционная геногеография извлекает из двух типов популяционных биобанков человека. Первый тип — "целевые биобанки" — объединяет медицинские, коммерческие и другие биобанки, формируемые в соответствии с конкретной целью данной организации. Медицинские биобанки хранят образцы, связанные с определенным медицинским диагнозом. Второй тип популяционных биобанков — биобанки народонаселения — хранят биообразцы, не связанные с заболеваниями. Из биобанков народонаселения мировая наука отдает предпочтение биобанкам коренного народонаселения. Их особенностью является тща-

¹ Исследование основано на информации базы данных "Фармакогенетика популяций России и сопредельных стран" (<https://pharma-gene-geography.ru/>).

Ключевые моменты**Что известно о предмете исследования?**

- Биобанки народонаселения содержат уникальную информацию о клинически значимых ДНК- (дезоксирибонуклеиновая кислота) маркерах в коренном народонаселении. Однако показатели заболеваемости представлены не для коренного, а общего населения регионов.

Что добавляют результаты исследования?

- Разработана технология оценки частот ДНК-маркеров в субъектах Российской Федерации по данным о генофондах коренных народов России и этно-демографической информации о субъектах Российской Федерации.
- Разработанный подход позволяет количественно оценить корреляцию клинически значимых ДНК-маркеров с показателями заболеваемости в любых административных единицах, провести расчет для любых регионов и периодов с известным этническим составом и заболеваемостью.

Key messages**What is already known about the subject?**

- Population biobanks contain unique information about clinically significant deoxyribonucleic acid (DNA) markers in the indigenous population. However, the incidence rates are presented not for the indigenous population, but for the general population of the regions.

What might this study add?

- A technology has been developed for assessing the DNA marker frequencies in Russian regions based on data on the gene pools of the indigenous peoples of Russia and ethno-demographic information in regions.
- The developed approach allows for a quantitative assessment of the correlation of clinically significant DNA markers with incidence rates in any administrative units, and for calculations for any regions and periods with a known ethnic composition and incidence.

тельный подбор индивидов, репрезентативно представляющих популяцию определенной этнической или субэтнической группы. Такие биобанки необходимы не только для фундаментальных, но и для медицинских исследований: от формирования контрольной выборки до изучения распространенности клинически значимых ДНК-маркеров. Во всем мире биобанки народонаселения ориентированы на получение биообразцов от всех этнических групп региона, причем преимущественно коренного сельского населения, поскольку стремятся собрать "вневременную" информацию, обеспечивающую устойчивость частот ДНК-маркеров. Для этого отбираются доноры, все предки которых на протяжении минимум трех поколений родились в данной популяции и относили себя к данному этносу.

Однако для фармакогенетических ДНК-маркеров, полученных благодаря биобанкам коренного населения, невозможно оценить степень корреляции с заболеваемостью в многонациональном регионе: данные о ДНК-маркерах характеризуют отдельные этносы, а данные о заболеваемости даются суммарно по всему многонациональному населению административных субъектов. При этом необходимость в оценке связи ДНК-маркеров и заболеваемости велика, поскольку в генофондах разных по этническому и расовому составу регионах клинически значимые ДНК-маркеры проявляют себя по-разному.

Для решения этой проблемы предлагается технология расчета средней частоты (встречаемости) маркеров в любой многонациональной административной единице (например, субъекте Российской Федерации (РФ)) как взвешенной суммы

с использованием двух массивов данных: частоты ДНК-маркеров в коренном народонаселении и демографической информации об этническом составе этой административной единицы. Частоты ДНК-маркеров в коренных народах берутся каждая со своим весом, равным доле этого народа в этническом составе административной единицы и затем суммируются. Такой подход используется во многих практических областях и дает разумные (а зачастую и единственно правильные) оценки средних показателей. Кроме того, предлагаемая технология позволяет оперативно реагировать на изменения генофонда из-за интенсивных миграционных процессов (частоты можно пересчитать сразу после появления новых данных), намного экономичнее и, скорее всего, точнее, чем непосредственное обследование региона. Полученные средние частоты вместе с данными о заболеваемости в административных единицах уже позволяют оценивать связь между ними статистическими методами. Возможности предлагаемой технологии продемонстрированы на примере расчета частот 24 фармакогенетических маркеров сердечно-сосудистых заболеваний (ССЗ) и выявления их связи с географией заболеваемости населения 85 субъектов России.

Материал и методы

Исследование основано на 6227 ДНК-образцах популяционного Биобанка Северной Евразии (Москва), изученных по 24 биомаркерам ССЗ, данные о частотах которых представлены в базе данных "Фармакогенетика популяций России и сопредельных стран"¹. Коллекции ДНК сформированы по единой технологии в ходе

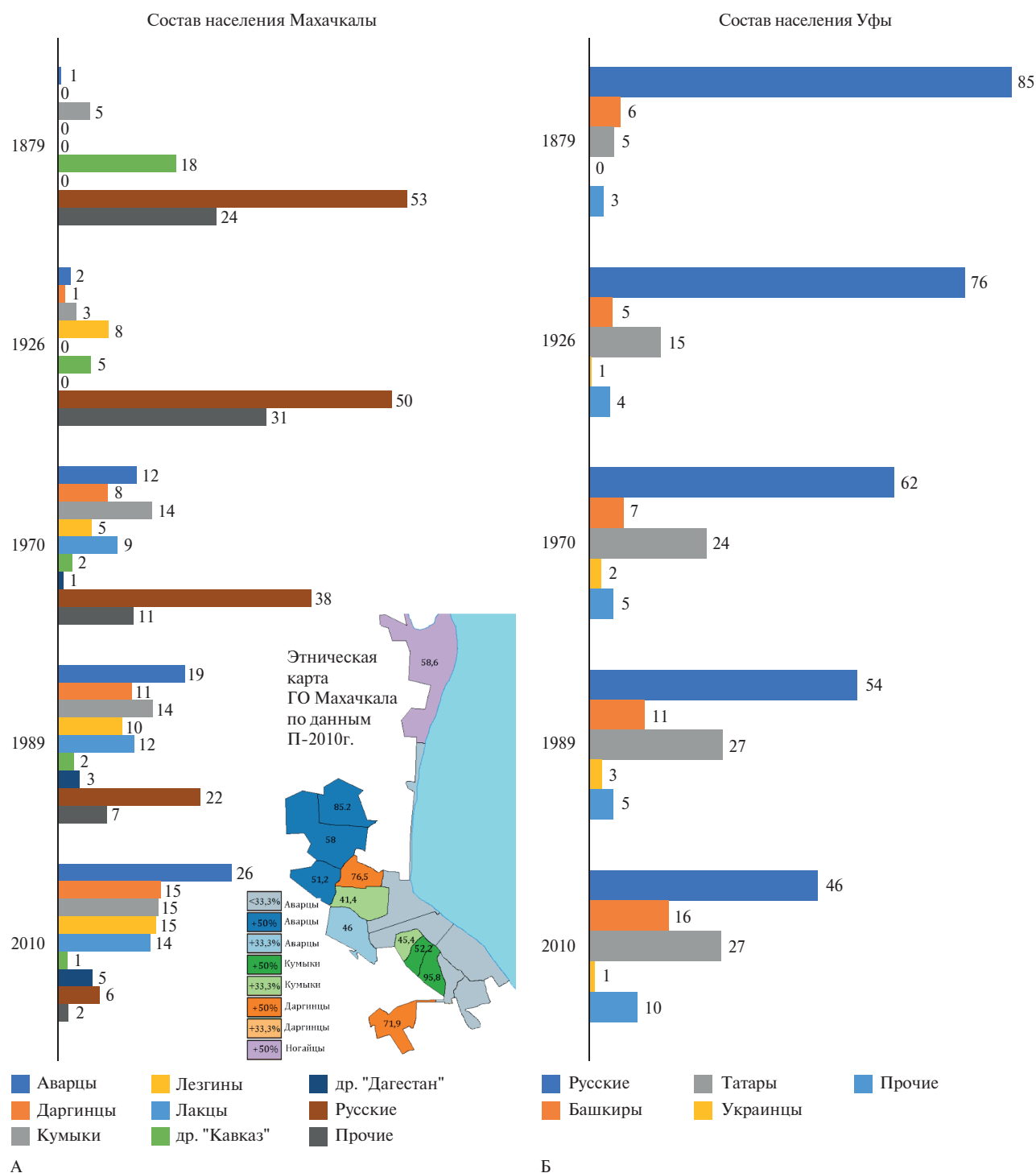


Рис. 1 Динамика изменения этнического состава (в %) населения столиц Дагестана и Башкортостана по данным переписи населения разных лет: А — динамика этнического состава населения Махачкалы; Б — динамика этнического состава населения Уфы. Примечание: цветное изображение доступно в электронной версии журнала.

многолетних экспедиционных обследований коренного населения [6]. В выборки включены образцы неродственных между собой индивидов, предки которых на глубину не менее трех поколений относили себя к данному этносу и данной популяции. Обследование проведено на добровольной основе с письменным информированным согласием, одобренным Этическим комитетом ФГБНУ "Медико-генетический научный центр им. академика Н. П. Бочкова", далее "МГНЦ" (Заключение

от 29.06.2020г). Данные об этническом составе населения субъектов РФ получены из переписей 2010г (для 83 субъектов) и 2020-2021гг (для Республики Крым и г. Севастополь). Данные о заболеваемости ССЗ (хронические ревматические болезни сердца, кардиомиопатия, ишемические болезни сердца (ИБС), гипертензивная болезнь сердца, острый миокардит) в 85 субъектах РФ получены как средние за 2020-2021гг [7]. Геногеографические карты построены с помощью программного пакета GeneGeo

Таблица 1

Этно-демографическая оценка частоты генетического маркера
в населении Башкортостана в 2010г по данным о коренном населении России

Этнос	Русские	Башкиры	Татары	Другие	Сумма
Доля этноса в Башкортостане	0,36	0,30	0,25	0,09	1,00
Этническая частота ДНК-маркера	0,65	0,12	0,21	0,24	
Расчет вклада этноса в частоту данного маркера в Башкортостане	$0,65 \times 0,36$	$0,12 \times 0,30$	$0,21 \times 0,25$	$0,24 \times 0,09$	
Вклад каждого этноса в итоговую частоту данного ДНК-маркера в Башкортостане	0,23	0,04	0,05	0,02	0,34
Искомая частота данного ДНК-маркера в Башкортостане					0,34

[8] методом средневзвешенной интерполяции со степенью весовой функции 3 и радиусом влияния 1800 км.

Результаты

1. Особенности формирования народонаселения субъектов РФ

Возникает закономерный вопрос: почему популяционные биобанки народонаселения собирают информацию о сельском населении, когда доля городского населения России составляет 75% и неуклонно растет (с 1950 до 2000гг доля городского населения выросла с 40 до 73%). Ответ связан с тремя следующими особенностями крупных городов.

Город живет за счет сельского населения. Показано, что крупные города ни сейчас, ни в далеком прошлом не воспроизводили свое население и потому похожи на "черные дыры": они сохраняют свою численность только благодаря постоянному притоку сельского населения [9-13]. Чем крупнее город — тем шире территория, откуда приезжают мигранты, а в мегаполисах ареалы источников миграции уже во многом перекрывают друг друга. В результате генофонды крупных городов становятся похожи: их изучение для целей криминалистики привело к выводу о неотличимости генофондов городских популяций, представляющих центр европейской части России (Москва), ее юг (Белгород, Орел), север (Ярославль), Урал (Оренбург) и Сибирь (Томск) [14]. Города образуют иерархическую систему, на нижнем уровне которой население малых городов интенсивно замещается сельским населением. Перемещение населения обычно идет двумя потоками: часть населения сразу мигрирует на вершину иерархии — в мегаполисы, а часть — в города на один уровень иерархии выше источника миграции. Поэтому чем крупнее город, тем больше он похож на другие города России; чем меньше город — тем больше он отражает особенности местного сельского населения.

Динамичность генофонда городского населения. Зависимость городского населения от притока мигрантов приводит к тому, что состав населения (а значит и его генофонд) может изменяться очень быстро [9-13]. Изменения в политике и экономике могут приводить к быстрому изменению структуры миграций и структуры генофонда: "Различия пара-

метров миграции в двух возрастных группах указывают на возможность динамики этнорегионального состава населения Москвы в последующих поколениях, что непременно вызовет изменение частот многих генетических маркеров" [15].

Насколько критичным для городского генофонда оказывается изменение структуры миграций демонстрирует рисунок 1. Например, данные о генофонде Махачкалы, полученные в 1970г, уже стали непригодны к 1990г. Если в 1970г русские и другие пришлые народы Дагестана составляли в Махачкале 51%, то в 2010г всего 11%. Значительно меняется и соотношение вклада разных народов Дагестана в генофонд Махачкалы (рисунок 1 А). Более того, в разных районах Махачкалы сконцентрированы представители разных народов Дагестана (врезка на рисунок 1 А). Изменение состава городского генофонда прослеживается для всех городов. Например (рисунок 1 Б), в 1970г численность русских в Уфе была больше в 9 раз, чем численность башкир, в 1989г это соотношение упало до 5, а еще через 20 лет — до 3.

Недолговечность биобанков городского населения. Поскольку изменения состава генофонда городского населения столь динамичны и значительны, исследователи приходят к выводу, что при формировании генетических баз данных для населения мегаполиса должны создаваться отдельные "референтные популяции" для каждой этнической группы города [9], причем сохраняется "необходимость постоянного обновления и актуализации таких баз данных и сбора генетико-демографических данных параллельно со сбором биологических образцов с целью изучения генетических маркеров" [15]. Иными словами, биобанки разнородного населения оказываются крайне недолговечными.

2. Технология оценки генофонда разнородного населения по данным о коренном населении

Приведенные данные о городском населении показывают необходимость постоянного обновления, причем для каждого поколения следует собирать данные в каждом городе о каждой этнической группе, ее составляющей. Иными словами, данные собираются с большим трудом, служат всего несколько лет, но все равно вызывают сомнения, поскольку учесть внутреннюю структуру города (разные

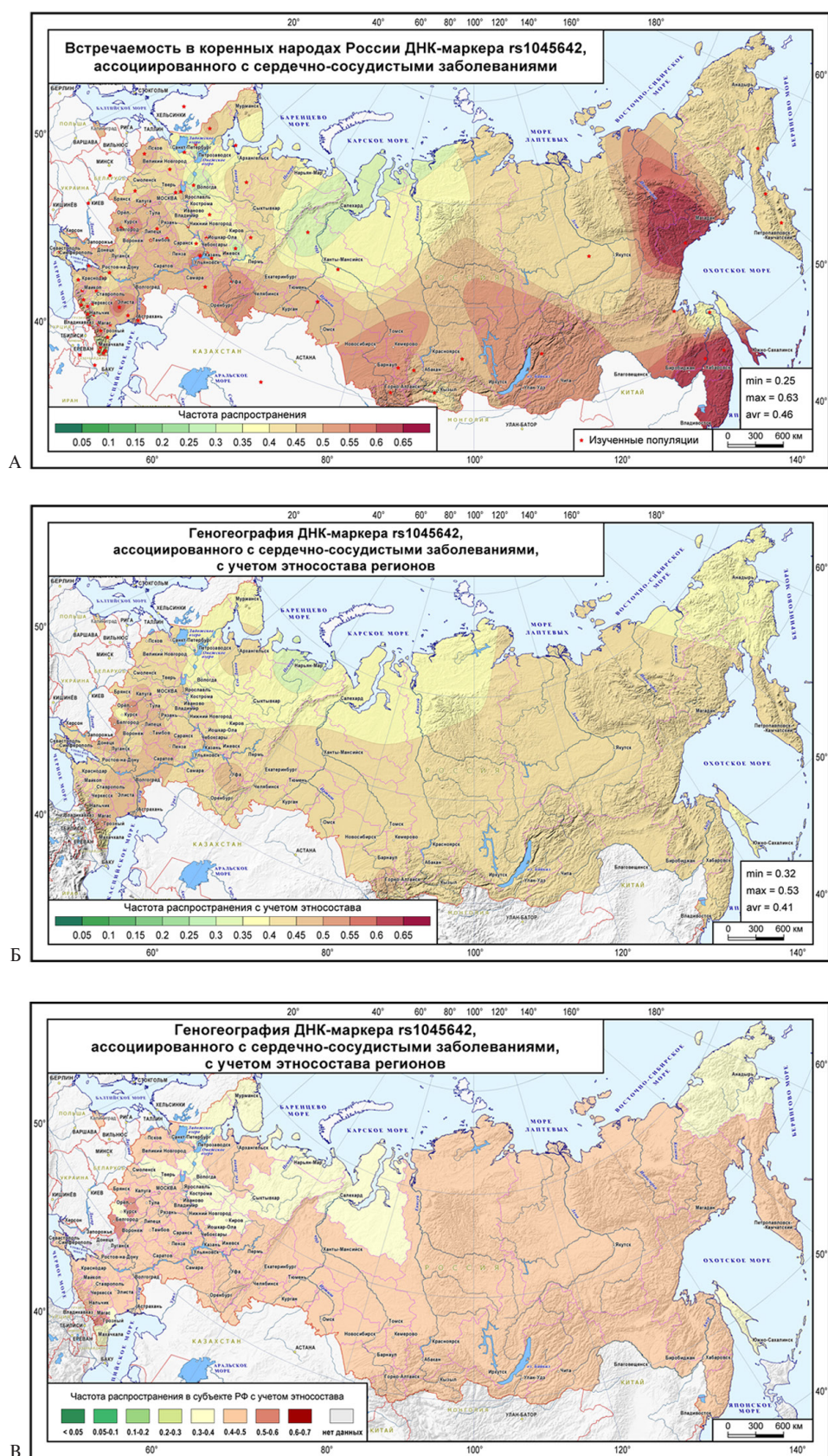


Рис. 2 Распространенность ДНК-маркеров rs1045642 (А-В) и rs12248560 (Г-Д), ассоциированных с сердечно-сосудистыми заболеваниями: А, Г — распространенность ДНК-маркеров в коренных народах России; Б, Д — интерполяционные карты расчетной частоты ДНК-маркеров в полиэтничном населении субъектов РФ; В, Е — картограммы расчетной частоты ДНК-маркеров субъектов РФ в их административных границах.

Примечание: ДНК — дезоксирибонуклеиновая кислота. Цветное изображение доступно в электронной версии журнала.

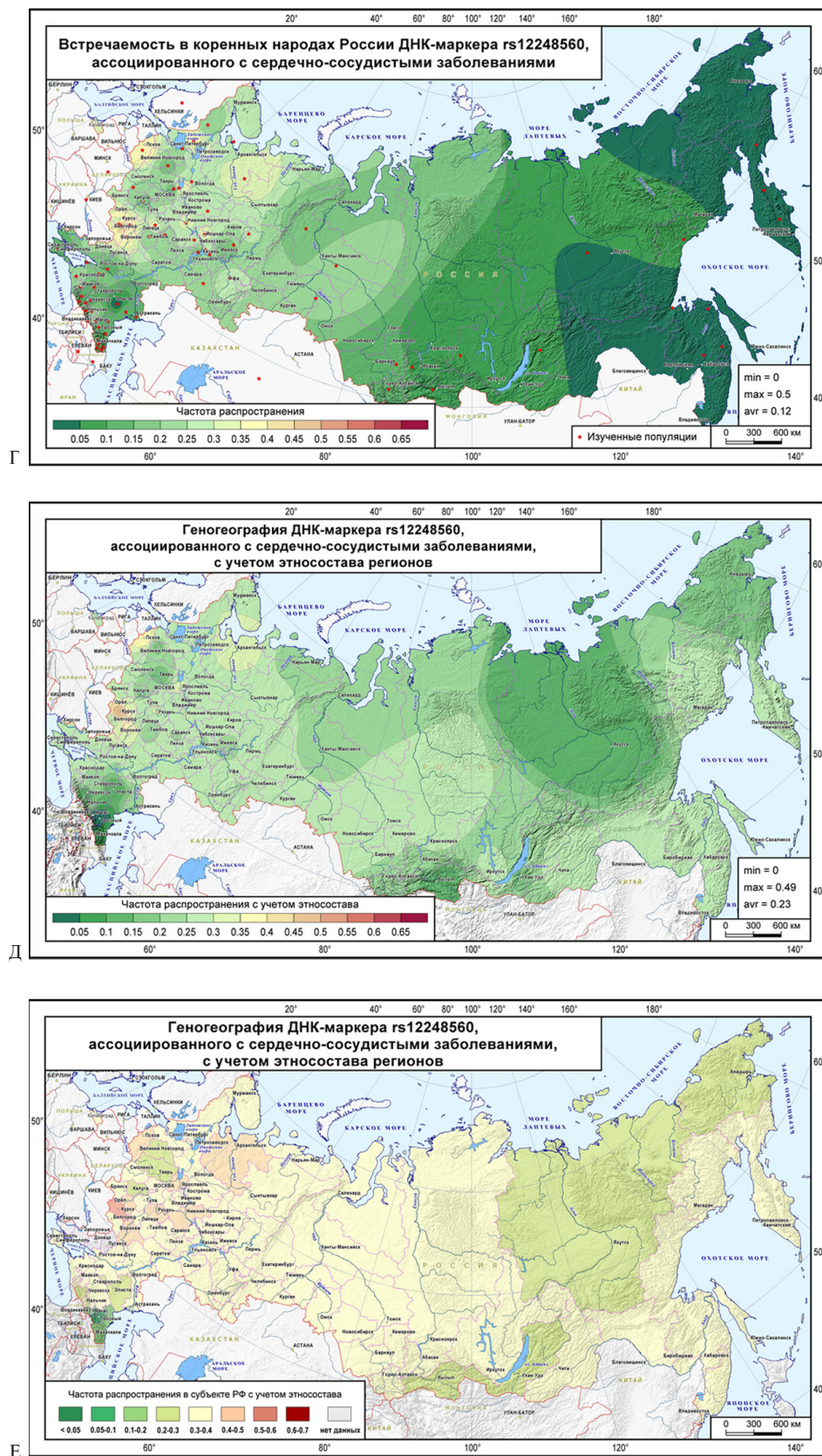


Рис. 2 Продолжение.

этно-демографические группы обычно расселены неравномерно) и собрать репрезентативные выборки для нее чрезвычайно сложно. Еще сложнее собрать

репрезентативную выборку для полноценной характеристики генофонда того или иного административного субъекта — района, области, республики,

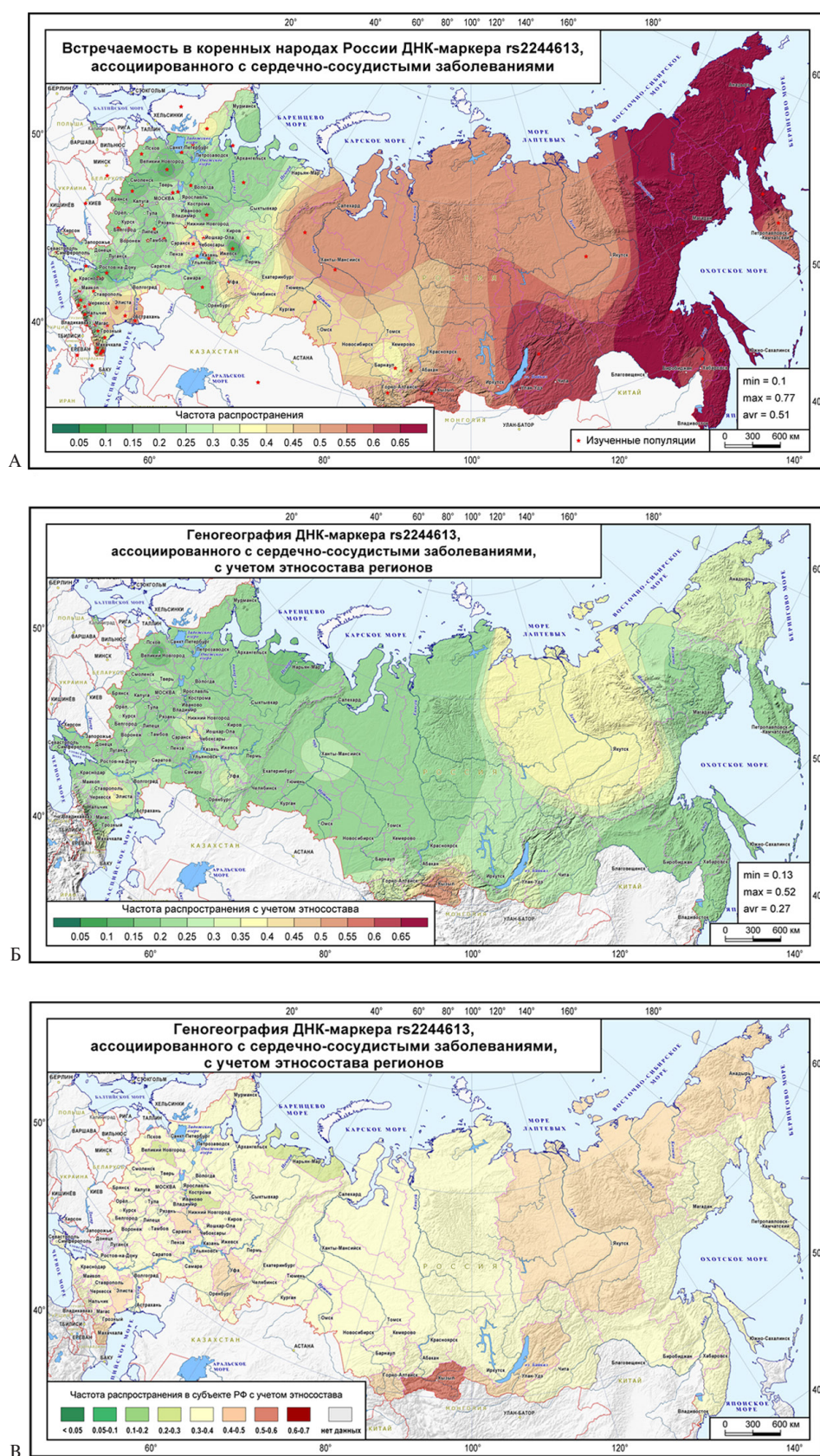


Рис. 3 Распространенность ДНК-маркеров rs2244613 (А-В) и rs3892097 (Г-Д), ассоциированных с сердечно-сосудистыми заболеваниями: А, Г — распространенность ДНК-маркеров в коренных народах России; Б, Д — интерполяционные карты расчетной частоты ДНК-маркеров в полиэтническом населении субъектов РФ; В, Е — картограммы расчетной частоты ДНК-маркеров субъектов РФ в их административных границах.

Примечание: ДНК — дезоксирибонуклеиновая кислота. Цветное изображение доступно в электронной версии журнала.

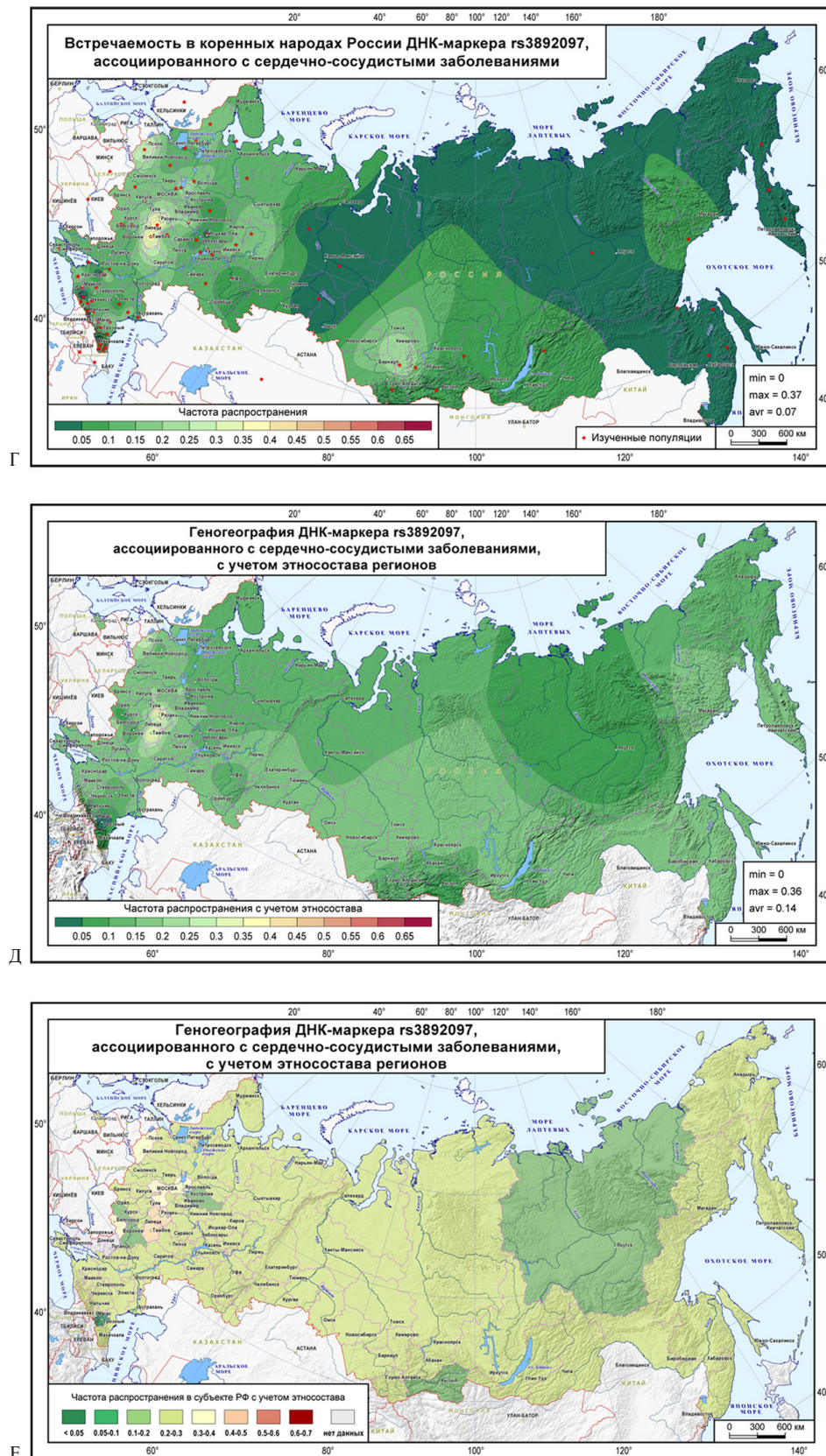


Рис. 3 Продолжение.

поскольку необходимо одновременно собрать представительные выборки биообразцов во всех населенных пунктах каждого субъекта. И все равно результа-

ты, добытые со столь большим трудом, будут крайне недолговечны (в Башкортостане за одно поколение соотношение башкир и татар изменилось с 2,5 до 1,7).

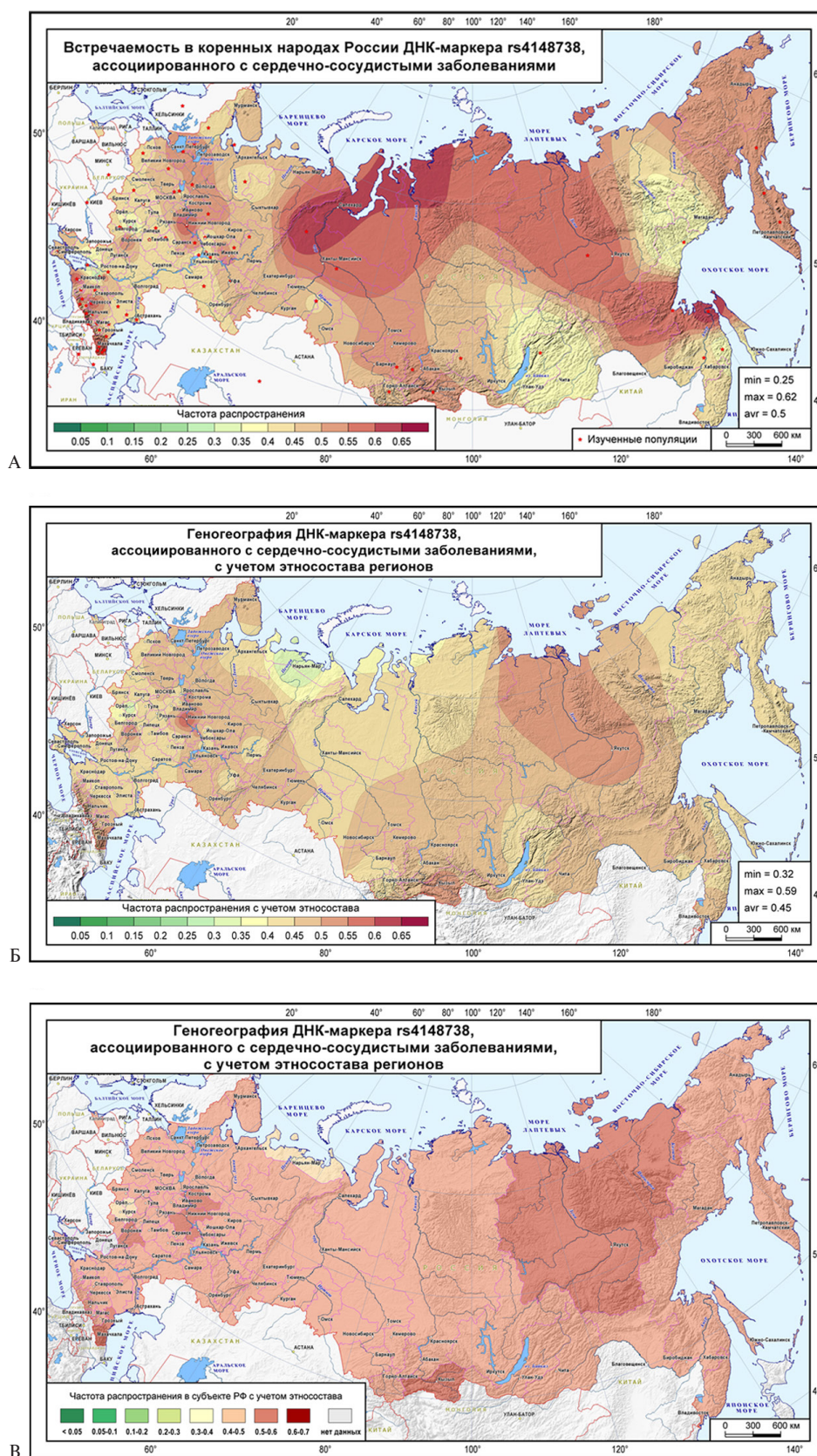


Рис. 4 Распространенность ДНК-маркеров rs4148738 (А-В) и rs9934438 (Г-Д), ассоциированных с сердечно-сосудистыми заболеваниями: А, Г — распространенность ДНК-маркеров в коренных народах России; Б, Д — интерполяционные карты расчетной частоты ДНК-маркеров в полиэтническом населении субъектов РФ; В, Е — картограммы расчетной частоты ДНК-маркеров субъектов РФ в их административных границах.

Примечание: ДНК — дезоксирибонуклеиновая кислота. Цветное изображение доступно в электронной версии журнала.

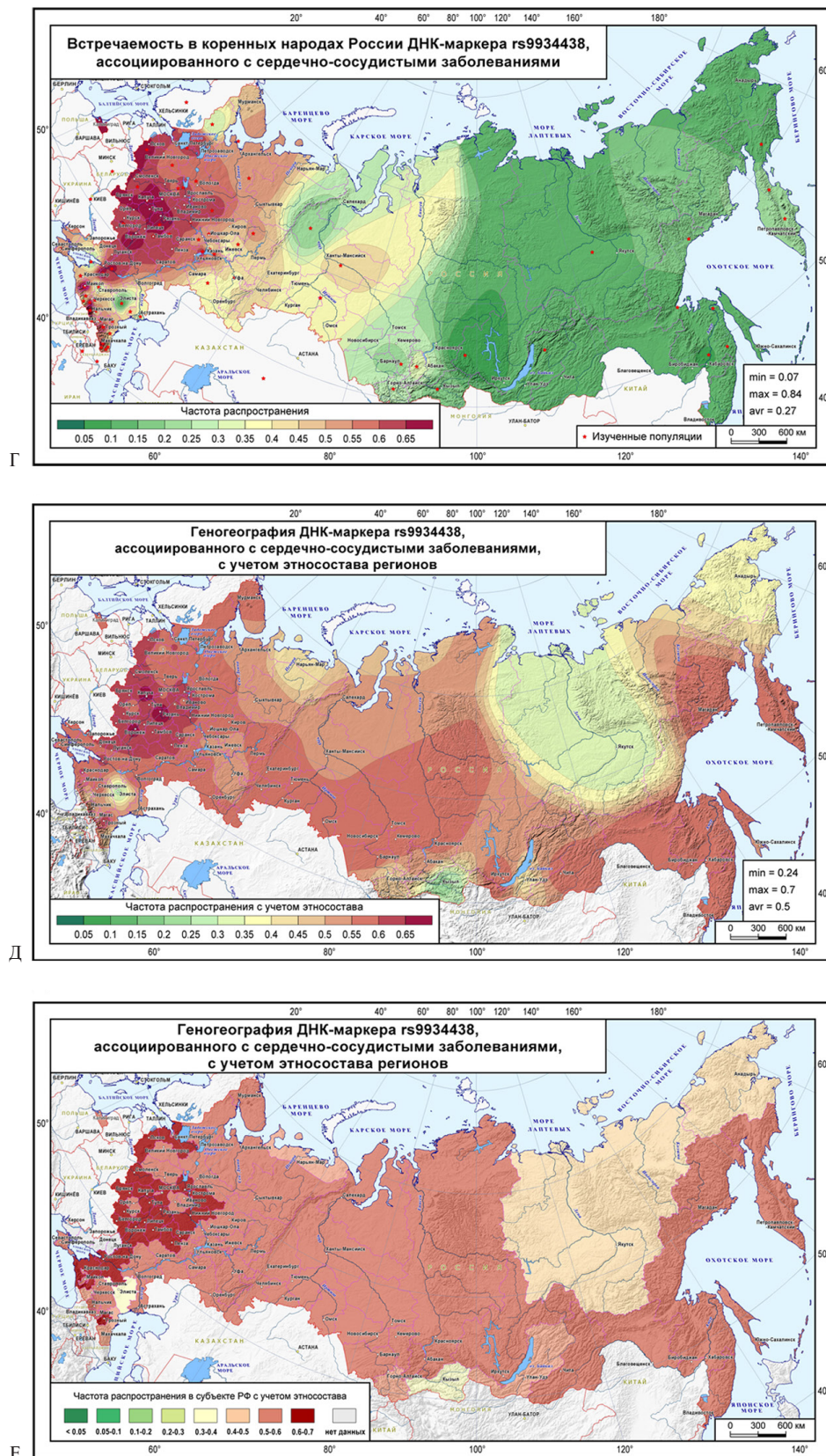


Рис. 4 Продолжение.

Поэтому наиболее достоверной оказывается оценка генофонда любого полиэтнического административного субъекта по совокупности данных

об его этно-демографической структуре (которые постоянно обновляются) и данных Биобанка коренного народонаселения. Зная частоту заданного

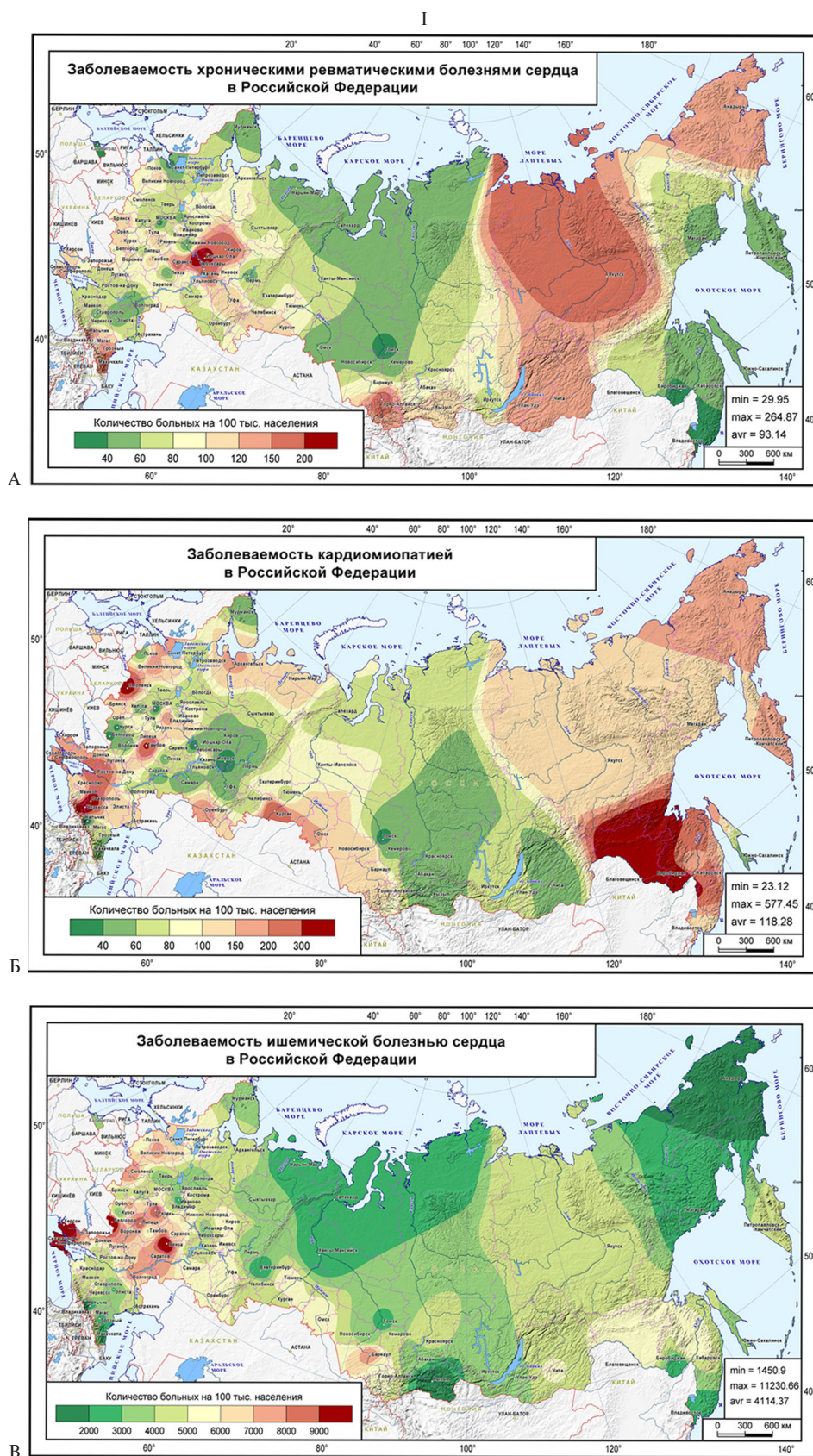
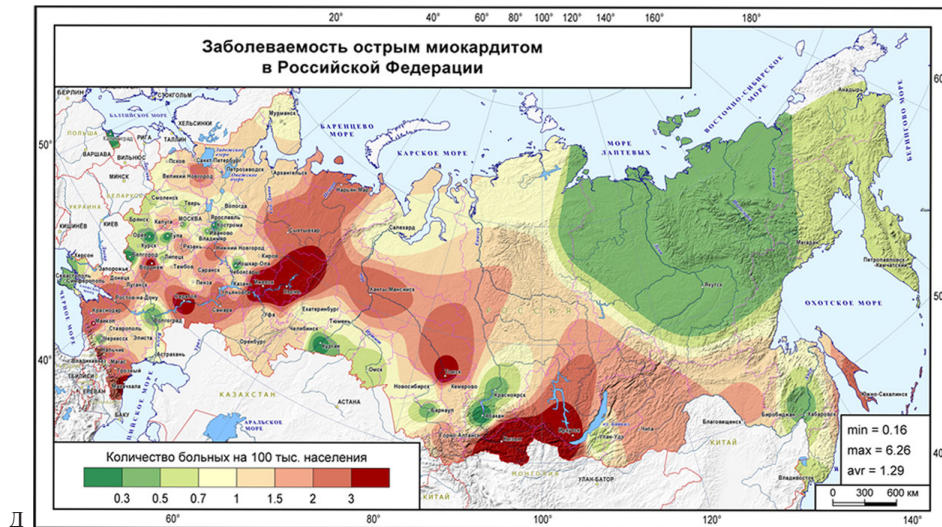


Рис. 5 Заболеваемость ССЗ на территории РФ, представленная в виде интерполяционных карт (I) и картограмм в пределах административных границ субъектов (II): А — хронические ревматические болезни сердца; Б — кардиомиопатия; В — ишемические болезни сердца; Г — гипертензивная болезнь сердца (гипертоническая болезнь с преимущественным поражением сердца); Д — острый миокардит.

I



Г



Д

II



А

Рис. 5 Продолжение.

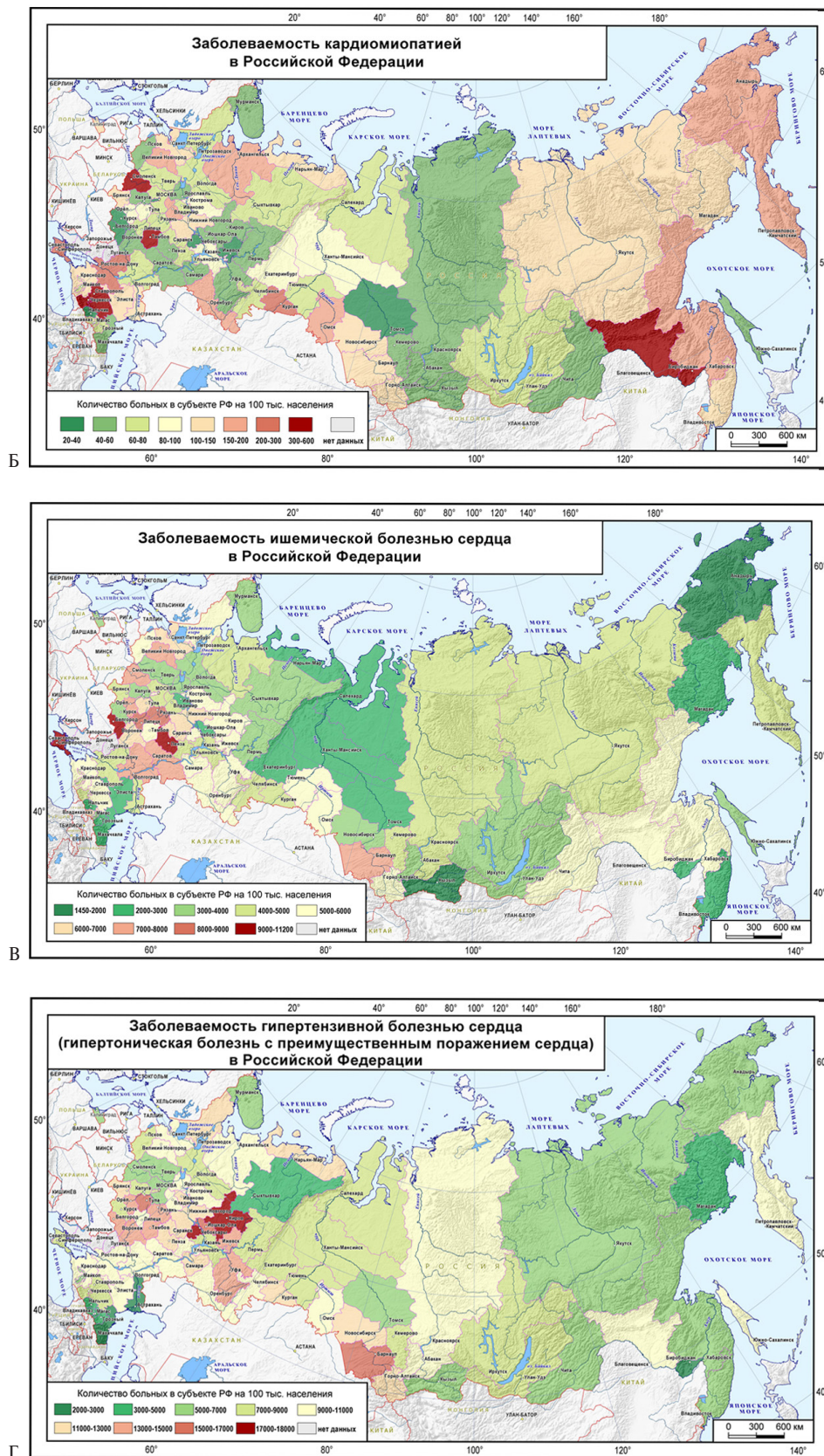


Рис. 5 Продолжение.



Рис. 5 Продолжение.

генетического маркера в каждом этносе коренного населения и долю этого этноса в составе данного субъекта в данный момент, можно рассчитать среднюю частоту маркера в данном субъекте в данное время. Простой пример такого расчета приведен для населения Башкортостана (таблица 1).

Получить информацию о частотах генетического маркера в населении каждого субъекта РФ в один и тот же момент времени невозможно. И в любом случае, такая информация устареет через 10 лет. Однако, используя данные Биобанка коренного населения, можно получить одновременную характеристику встречаемости ДНК-маркера для всех субъектов РФ (и табличную, и в виде карт). Поскольку данные об этническом составе административных единиц имеются для различных периодов времени, можно реконструировать и динамику генофондов во времени.

Этно-демографическая оценка современного состояния генофонда города или иной административной единицы необходима как для криминалистики, так и для медицинских исследований, поскольку данные о заболеваемости обычно представляются для субъектов РФ. Мы получаем возможность проследить во времени динамику связи клинически значимых ДНК-маркеров и заболеваемости, поскольку данные об этническом составе и заболеваемости представляются регулярно.

3. Оценка частоты ДНК-маркеров, ассоциированных с ССЗ, для населения субъектов РФ по данным о коренном населении

С помощью описанной выше технологии проведен расчет частот 24 ДНК-маркеров, ассоциированных с заболеваниями ССЗ, для каждого из 85 субъектов (аналогично таблице 1). Для этого использованы два массива данных.

Первый массив — демографические данные о составе этносов в каждом из 85 субъектов РФ (для

Донецкой народной республики, Луганской народной республики, Запорожской и Херсонской областей сопоставимые данные отсутствуют) согласно наиболее корректной переписи 2010г. Второй массив — данные о частотах в коренном населении России 24 ДНК-маркеров, ассоциированных с ССЗ [4, 16]. За четверть века в интенсивных экспедиционных обследованиях была добыта информация практически обо всех коренных народах России. Для каждого народа известен его основной этнический ареал. Так, для русского этноса — это Русская равнина и Русский Север [17], а Кавказ, Приуралье, Урал и вся азиатская часть России принадлежат этническим ареалам других народов России. В пределах каждого этнического ареала собирались биообразцы от представителей только коренного этноса, причем так, чтобы максимально охватить все генетическое разнообразие этноса. Итогом стала коллекция, содержащая 30 тыс. биообразцов коренного населения "Биобанка Северной Евразии", часть которой, изученная по ДНК-маркерам ССЗ, и легла в основу оценки их геногеографии в субъектах РФ.

Генофонды многих народов России гетерогенны. Например, генофонд центральных и южных русских популяций значительно отличается от Русского Севера, чем от популяций Белоруссии и Польши. Поэтому для расчета выбиралась не средняя этническая частота ДНК-маркера, а его частота в тех популяциях данного этноса, которые наиболее географически и исторически близки к изучаемому субъекту РФ и с наибольшей вероятностью участвовали в формировании его генофонда. Например, для учета в других субъектах РФ русские популяции объединены в метапопуляции южных, центральных и северных русских, а популяции татар — в метапопуляции поволжских, сибирских и астраханских татар. Для каждой метапопуляции были рассчитаны частоты ДНК-маркеров,

Таблица 2

Значимые для персонализации лечения CC3 SNP-маркеры
и степень корреляции их частот с заболеваемостью пяти CC3

Идентификатор	Название гена	Средняя частота по табличным данным	Средняя частота по интерполяционной карте	Хронические ревматические болезни сердца	Кардио-миопатия	Ишемическая болезнь сердца	Гипертензивная болезнь сердца (гипертоническая болезнь с преимущественным поражением сердца)	Острый миокардит	Препараты для лечения CC3
rs1045642	ABCB1	0,43	0,41	0,086	-0,001	0,315	0,150	-0,018	Антиагреганты, гипотензивные препараты
rs10509681	CYP2C8	0,07	0,06	-0,170	0,024	0,215	0,046	-0,101	Антиагреганты
rs1057910	CYP2C9	0,07	0,06	0,109	-0,056	-0,046	-0,267	0,000	Антикоагулянты, нестероидные противовоспалительные средства
rs1065852	CYP2D6	0,17	0,15	-0,211	0,180	0,365	0,236	-0,096	β-блокаторы
rs12248560	CYP2C19	0,25	0,23	-0,160	-0,055	0,223	0,397	-0,142	Антиагреганты, ингибиторы протонной помпы
rs1799853	CYP2C9	0,09	0,08	-0,227	0,099	0,067	0,075	-0,102	Антикоагулянты, нестероидные противовоспалительные средства
rs1801252	ADRB1	0,15	0,15	-0,152	0,049	0,072	0,203	-0,115	β-блокаторы
rs2046934	P2RY12	0,13	0,12	-0,101	0,030	0,164	0,179	0,156	Антиагреганты
rs2108622	CYP4F2	0,22	0,23	0,248	-0,005	-0,121	-0,281	0,164	Антикоагулянты непрямого действия
rs2231137	ABCG2	0,10	0,13	0,262	-0,142	-0,315	-0,055	0,118	Розувастатин
rs2231142	ABCG2	0,09	0,10	-0,010	-0,153	-0,060	0,095	-0,095	Статины
rs2242480	CYP3A4	0,09	0,09	0,050	0,393	0,112	-0,221	0,165	Статины
rs2244613	CES1	0,25	0,27	0,393	-0,141	-0,232	-0,059	0,235	Антикоагулянты прямые пероральные, антиагреганты
rs28371725	CYP2D6	0,06	0,06	0,112	-0,003	-0,080	-0,126	-0,083	β-блокаторы
rs3892097	CYP2D6	0,16	0,14	-0,221	0,165	-0,256	0,027	0,171	β-блокаторы
rs4148738	ABCB1	0,45	0,45	0,165	-0,092	-0,046	-0,098	0,218	Антикоагулянты прямые пероральные
rs4149056	SLCO1B1	0,23	0,22	-0,256	0,213	0,246	0,331	-0,168	Статины
rs4244285	CYP2C19	0,12	0,12	0,027	0,049	-0,115	-0,098	-0,044	Антиагреганты, ингибиторы протонной помпы
rs4986893	CYP2C19	0,01	0,01	0,171	-0,127	-0,141	-0,212	0,110	Антиагреганты, ингибиторы протонной помпы
rs662	PON1	0,27	0,28	0,303	-0,145	-0,168	-0,266	0,227	Антиагреганты
rs7294	VKORC1	0,34	0,30	-0,074	-0,018	0,336	0,113	-0,096	Антикоагулянты непрямого действия
rs776746	CYP3A5	0,09	0,09	-0,004	-0,120	0,033	0,090	0,052	Статины
rs9923231	VKORC1	0,56	0,50	-0,211	0,028	0,409	0,243	-0,180	Антикоагулянты непрямого действия
rs9934438	VKORC1	0,56	0,50	-0,216	0,022	0,401	0,230	-0,174	Антикоагулянты непрямого действия
Число достоверных корреляций			8	1	11	6	3		

Примечание: оранжевым фоном отмечены значимые корреляции Пирсона при $\alpha=0,01$ (порог значимости корреляции $=0,278$), желтым — значимые при $\alpha=0,05$ (порог значимости корреляции $=0,213$), серым — ДНК-маркеры, геногеография которых представлена на рисунках 2-4, CC3 — single nucleotide polymorphism (однонуклеотидный полиморфизм). Цветное изображение доступно в электронной версии журнала.

которые и использовались за пределами русского или татарского этнических ареалов. Для ногайцев использовались частоты популяций (астраханские, кубанские, ставропольские ногайцы, караногайцы), географически наиболее близких к конкретному субъекту РФ. Из расчета исключались редкие этносы ("другие") и те немногие, для которых не было информации в Биобанке, но в расчеты включены в среднем >95% этносов субъекта, что обеспечило приемлемую точность результатов.

В результате получен массив искомым частот в 85 субъектах РФ 24 ДНК-маркеров ССЗ в виде таблицы данных 24×85, на основе которой созданы геногеографические карты встречаемости ДНК-маркеров ССЗ в субъектах РФ. На рисунках 2-4 приведены по три карты для шести ДНК-маркеров. Сначала (на рисунках А, Г) даны исходные карты частоты ДНК-маркера — в коренном народонаселении России; далее приведены по две карты (на рисунках Б, В, Д, Е) расчетной частоты этого ДНК-маркера в полиэтничном населении всех субъектов РФ с указанием административных границ 89 субъектов РФ. На рисунках Б и Д эта информация представлена в виде интерполяционных карт (исходные данные помещены в административные центры субъектов). На рисунках В и Е эта же информация дана в виде картограмм, где частота ДНК-маркера в каждом субъекте занимает площадь точно в административных границах данного субъекта РФ (указаны на картах рисунков Б, В, Д, Е светлокрасными линиями). Поскольку эти границы не служат "заборами" для распространения генов, интерполяционные карты (рисунки Б и Д) оказываются более корректными и близкими к реальности: они позволяют проследивать реальные тренды в изменчивости ДНК-маркеров. Для корректности сравнения все интерполяционные карты (рисунки А, Б, Г, Д) и коренного, и полиэтничного населения приведены в единой шкале. Все картограммы (рисунки В, Е) также выполнены в собственной единой шкале, по цветовой гамме, максимально приближенной к шкале интерполяционных карт.

Задачей настоящей работы является изложение самой технологии оценки частоты ДНК-маркера в любой административной единице по совокупности данных о его этносоставе и о генофондах коренного населения. Поэтому ограничимся лишь описанием трех особенностей карт на рисунках 2-4.

Во-первых, выразительны отличия между картами для коренного и общего (разнородного) населения. Эти различия связаны с долей пришлого населения (таблица Приложения). В азиатской части России резко преобладает пришлое население (Алтайский край — 99,9%; Ханты-Мансийский Автономный Округ (АО) — 97,9%; Ямало-Ненецкий АО — 97,8%), и именно оно формирует полиэтничный генофонд субъектов РФ. Напротив, на Кавка-

зе доля пришлого населения минимальна (в Чечне — 4,7%, в Ингушетии — 5,9), и поэтому там нет расхождений по частоте ДНК-маркера между коренным населением и субъектом. Похожая ситуация наблюдается в областях русского ареала с преобладанием коренного русского населения (3-8% пришлого населения). Во-вторых, мы видим не менее яркие отличия по размеру территории, занимаемой субъектами. Например, площадь Якутии больше суммарной площади 50 субъектов РФ, входящих в состав Центрального, Северо-Западного и Приволжского федеральных округов. Совокупность этих двух параметров — вариации доли пришлого населения и различий по площади субъектов РФ — приводит к третьей особенности геногеографии ДНК-маркеров, а именно: к различной гетерогенности распределения (дисперсии) ДНК-маркера в европейской и в азиатской частях РФ (рисунки 2-4).

Обсуждение

Результаты расчетов средневзвешенной частоты ДНК-маркеров, ассоциированных с тем или иным заболеванием, полученные для субъектов РФ, позволяют оценить величину связи с заболеваемостью, поскольку она фиксируется для всех 85 субъектов РФ по единой схеме учета. Геногеография показателей заболеваемости для пяти ССЗ приведена на рисунке 5: в левом столбце (I) даны интерполяционные карты (более реалистичные); в правом столбце (II) — картограммы. Данные по заболеваемости получены как средние за 2020 и 2021гг [7], поскольку с 2022г могли возникнуть нестандартные отклонения от обычных показателей. Заболеваемость ССЗ чрезвычайно варьирует (рисунок 5). В статистической легенде интерполяционных карт указаны средние значения количества больных/100 тыс. населения: от 7884 (гипертоническая болезнь с преимущественным поражением сердца) до 1,3 для острого миокардита.

Поскольку и относительное количество больных, и частота ДНК-маркеров теперь, благодаря технологии, представлены для каждого из 85 субъектов РФ, появилась возможность впервые оценить для населения РФ связь между каждым из пяти заболеваний ССЗ и каждым из 24 ДНК-маркеров, ассоциированных с этими заболеваниями (таблица 2). Из полученных 120 коэффициентов корреляции достоверными оказались 32: наибольшее число ДНК-маркеров достоверно коррелируют с ИБС, наименьшее — с кардиомиопатией.

Впервые полученные данные о реальной связи между частотами ДНК-маркеров в населении РФ и заболеваемостью в субъектах РФ уникальны, поскольку имеющаяся в литературе информация об ассоциации ДНК-маркеров с ССЗ представляет преимущественно население Западной Европы, ге-

нофонд которой существенно отличается от генофонда населения РФ.

В то же время следует помнить о значительной гетерогенности всех показателей в пределах обширной территории РФ: и самих ДНК-маркеров (ри-

сунки 2-4, таблица 2), и показателей заболеваемости ССЗ (рисунок 5). Поэтому полученные коэффициенты связи между частотами ДНК-маркеров и заболеваемостью являются "средней температурой по больнице": многие субъекты РФ обладают

Таблица 3

Коэффициенты ранговой корреляции Спирмена
между тремя ДНК-маркерами и тремя ССЗ для 4-х федеральных округов РФ

Федеральный округ РФ	Число субъектов РФ	Ранговый коэффициент корреляции Спирмена		
		между rs12248560 и гипертензивной болезнью сердца ¹	между rs2244613 и хроническими ревматическими болезнями сердца ²	между rs9934438 и ишемической болезнью сердца ³
Северо-Западный*	10	-0,309	-0,018	0,515
Дальневосточный**	10	0,061	0,828	0,242
Сибирский	10	0,285	0,622	0,471
Северо-Кавказский***	10	0,638	0,313	0,227

Примечание: А) оранжевым фоном отмечены значимые корреляции при $\alpha=0,01$, желтым — при $\alpha=0,05$; Б) * — без Калининградской области; ** — без Бурятии; *** — добавлены Краснодарский край, Адыгея, Крым; В) ¹ — карта согласованности векторов изменчивости для rs12248560 и гипертензивной болезни сердца; ² — для rs2244613 и хронических ревматических болезней сердца; ³ — для rs9934438 и ишемической болезни сердца. ДНК — дезоксирибонуклеиновая кислота, ССЗ — сердечно-сосудистые заболевания. Цветное изображение доступно в электронной версии журнала.

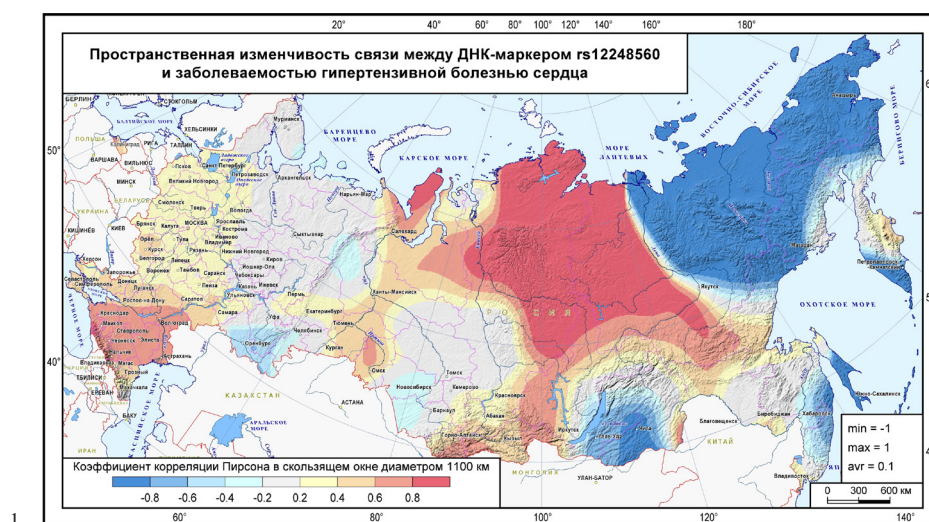
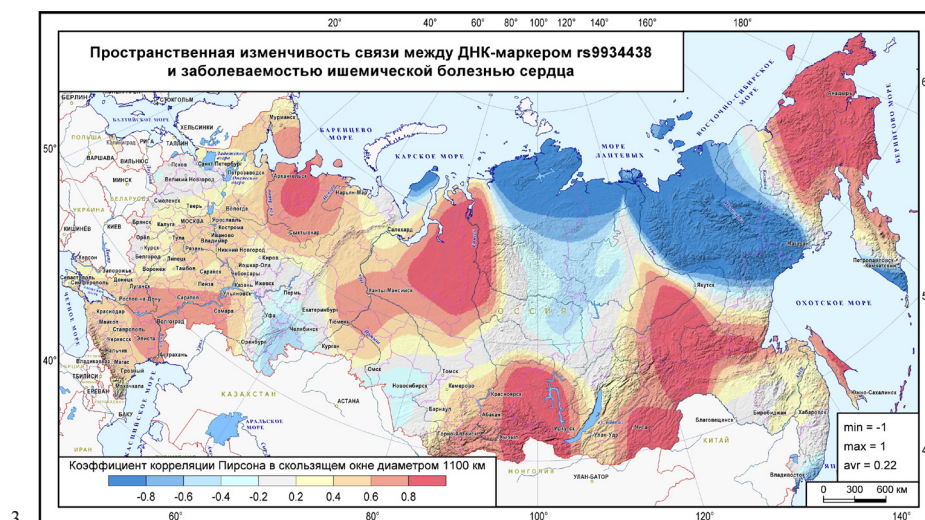


Таблица 3. Продолжение



различными генофондами, и для разных субъектов показатели связи между ДНК-маркерами и заболеваемостью могут существенно различаться. К сожалению, из-за отсутствия данных для более дробного административного деления рассчитать корреляции для отдельного субъекта нельзя, но их можно рассчитать для федеральных округов. В таблице 3 для 4-х федеральных округов приведены результаты расчета корреляции между тремя ДНК-маркерами и тремя заболеваниями: для корректности сравнения в каждом из федеральных округов учтены ровно по 10 субъектов РФ. При том, что для всех трех пар признаков "средняя температура по больнице" оценивалась как +0,4 (таблица 2) в федеральных округах показатель связи крайне изменчив. Размах изменения связи между rs12248560 и гипертензивной болезнью сердца варьирует максимально (от -0,3 до +0,6). Между rs2244613 и хроническими ревматическими болезнями сердца колебания показателя связи также очень велики (от 0 до 0,8). А вот между rs9934438 и ИБС связь наиболее устойчива — она варьирует от 0,2 до 0,5. Это означает, что реальная ассоциация ДНК-маркеров с заболеваниями в РФ отличается не только от населения Западной Европы, но различна в разных регионах РФ, что требует дифференцированного подхода для разных субъектов РФ.

Конечно, любая оценка требует проверки и уточнения. К сожалению, прямую проверку можно провести только при субтотальном обследовании самых малых административных единиц. Чем меньше административная единица — тем более надежные данные можно собрать во всех ее субпопуляциях: и о частотах ДНК-маркеров, и об этническом составе, и о заболеваемости; и тем точнее будет оценка связи ДНК-маркеров и заболеваемости. Для малых административных единиц также можно

получить надежную информацию о реальных источниках миграции (например, для русского этноса — из точно известных областей), что позволит точнее прогнозировать частоты ДНК-маркеров.

В крупных административных единицах такое субтотальное обследование, да еще и одновременно во всех субпопуляциях, провести нельзя. Однако и для них прогноз можно уточнять. Для этого следует, во-первых, провести расширенное генотипирование по исследуемым ДНК-маркерам, увеличив выборки для каждой популяции, биообразцы которой уже имеются в Биобанке коренного населения. Во-вторых, необходимо максимально пополнять коллекции Биобанка за счет субпопуляций этносов с широким этническим ареалом. Иными словами, именно пополнение информации, получаемой из Биобанка коренного населения, позволит сделать все более точным прогноз о частоте в населении ДНК-маркеров, ассоциированных с различными заболеваниями.

Заключение

Предложена технология оценки современного состояния генофонда населения для любых административных единиц России (с разнородным и быстро меняющимся этническим составом) с использованием данных о генофонде коренных народов России. Она позволяет оценить связь между частотой ДНК-маркера, ассоциированного с заболеванием, и заболеваемостью им в России. Для этого используются три источника данных: данные о клинически значимых ДНК-маркерах практически для всех народов России; данные об этническом составе для субъектов РФ; данные о заболеваемости в субъектах РФ. Совокупность первых двух источников данных — о генофондах коренного населения и этническом составе субъектов РФ — позволила про-

гнозировать частоту клинически значимых ДНК-маркеров в современном населении субъектов РФ. Полученные частоты клинически значимых ДНК-маркеров позволили напрямую анализировать их связь с заболеваемостью в субъектах РФ.

Использование метода проиллюстрировано на примере ДНК-маркеров сердечно-сосудистой патологии и географии заболеваемости населения во всех субъектах РФ пятью ССЗ: это хронические ревматические болезни сердца, кардиомиопатия, ИБС, гипертензивная болезнь сердца, острый миокардит.

Результаты применения предлагаемой технологии представлены в виде трех серий таблиц и геногеографических карт: 1) частоты в населении России 24 ДНК-маркеров сердечно-сосудистой патологии; 2) частоты сердечно-сосудистой заболеваемости во всех субъектах РФ; 3) корреляции между частотами ДНК-маркеров и сердечно-сосудистой заболеваемостью в России.

Предложенная технология оценки частоты ДНК-маркера в полиэтнических субъектах РФ по

данным о коренном народонаселении позволяет впервые оценить их связь с заболеваемостью в современном населении России. Получение таких данных иным способом не представляется возможным ввиду динамичного изменения этносовета населения под действием миграционных потоков, а также невозможности проведения синхронного субтотального обследования во всех субъектах РФ. В то же время, данная технология позволяет оценить связь ДНК-маркеров с заболеваемостью в любые периоды времени, для которых имеются данные об этническом составе любого региона и заболеваемости в нем.

Благодарности. Авторы благодарят АНО "Биобанк Северной Евразии" за предоставление данных о частотах ДНК-маркеров ССЗ в коренном населении России.

Отношения и деятельность. Исследование выполнено в рамках Государственного задания Минобрнауки России для ФГБНУ "МГНЦ".

Литература/References

1. Mirzaev KB, Fedorinov DS, Ivashchenko DV, et al. Multi-Ethnic Analysis of Cardiac Pharmacogenetic Markers of Cytochrome p450 and Membrane Transporters Genes in the Russian Population. *Rational Pharmacotherapy in Cardiology*. 2019;15(3):393-406. (In Russ.) Мирзаев К. Б., Федоринов Д. С., Иващенко Д. В. и др. Мультиэтнический анализ кардиологических фармакогенетических маркеров генов цитохрома Р450 и мембранных транспортеров в российской популяции. *Рациональная фармакотерапия в кардиологии*. 2019;15(3):393-406. doi:10.20996/1819-6446-2019-15-3-393-406.
2. Gorin IO, Petrushenko VS, Zapisetskaya YuS, et al. Population-based biobank for analyzing the frequencies of clinically relevant DNA markers in the Russian population: bioinformatic aspects. *Cardiovascular Therapy and Prevention*. 2020;19(6):2732. (In Russ.) Горин И. О., Петрушенко В. С., Записецкая Ю. С. и др. Применение популяционного биобанка для анализа частот клинически значимых ДНК-маркеров у населения России: биоинформатические аспекты. *Кардиоваскулярная терапия и профилактика*. 2020;19(6):2732. doi:10.15829/1728-8800-2020-2732.
3. Balanovska EV, Petrushenko VS, Koshel SM, et al. Cartographic atlas of frequency variation for 45 pharmacogenetic markers in populations of Russia and its neighbor states. *Bulletin of RSMU*. 2020;(6):39-52. (In Russ.) Балановская Е. В., Петрушенко В. С., Кошель С. М. и др. Картографический атлас распространения 45 фармакогенетических маркеров в народонаселении России и сопредельных стран. *Вестник Российского государственного медицинского университета*. 2020;(6):39-52. doi:10.24075/vrgmu.2020.080.
4. Pylev VYu, Agdzhoian AT, Gorin IO, et al. Population biobank as a basis for determining spatial variation of clinically relevant pharmacogenetic biomarkers of cardiovascular diseases. *Cardiovascular Therapy and Prevention*. 2022;21(11):3430. (In Russ.) Пылёв В. Ю., Агджоян А. Т., Горин И. О. и др. Популяционный биобанк как основа для выявления пространственной изменчивости клинически значимых фармакогенетических биомаркеров сердечно-сосудистых заболеваний. *Кардиоваскулярная терапия и профилактика*. 2022;21(11):3430. doi:10.15829/1728-8800-2022-3430.
5. Balanovsky O, Petrushenko V, Mirzaev K, et al. Variation of genomic sites associated with severe Covid-19 across populations: global and national patterns. *Pharmacogenomics Pers Med*. 2021;4:1391-402. doi:10.2147/PGPM.S320609.
6. Balanovska EV, Zhabagin MK, Agdzhoian AT, et al. Population biobanks: organizational models and prospects of application in gene geography and personalized medicine. *Russian Journal of Genetics*. 2016;52(12):1371-87. (In Russ.) Балановская Е. В., Жабагин М. К., Агджоян А. Т. и др. Популяционные биобанки: принципы организации и перспективы применения в геногеографии и персонализированной медицине. *Генетика*. 2016;52(12):1371-87. doi:10.7868/S001667581612002X.
7. Kotova EG, Kobayakova OS, Aleksandrova GA, et al. Morbidity of the entire population of Russia in 2021: statistical materials. Moscow: RIH of the Ministry of Health of Russia, 2022. p. 145. (In Russ.) Котова Е. Г., Кобякова О. С., Александрова Г. А. и др. Заболеваемость всего населения России в 2021 году: статистические материалы. М.: ЦНИИОИЗ Минздрава России, 2022. p.145. ISBN: 978-5-94116-072-3.
8. Koshel SM. Geoinformation technologies in genogeography. In: *Modern geographical cartography*. 2012;158-66. (In Russ.) Кошель С. М. Геоинформационные технологии в геногеографии. В кн.: *Современная географическая картография*. (под ред. Лурье И. К., Кравцова В. И.). М.: Дата+. 2012;158-66.
9. Kurbatova OL, Pobedonostseva EY, Veremeychik VM, et al. Genetic demography of populations of three megalopolises in relation to the problem of creating genetic databases. *Russian Journal of Genetics*. 2013;49(4):513-22. (In Russ.) Курбатова О. Л., Победоносцева Е. Ю., Веремейчик В. М. и др. Особенности генетико-демографических процессов в населении трех мегаполисов в связи с проблемой создания генетических баз данных. *Генетика*. 2013;49(4):513-22. doi:10.7868/S0016675813040085.
10. Kurbatova OL, Yankovsky NK. Migration as the main factor of population dynamics of urban population in Russia. *Russian*

- Journal of Genetics. 2016;52(7):831-51. (In Russ.) Курбатова О.Л., Янковский Н.К. Миграция — основной фактор популяционной динамики городского населения России. Генетика. 2016;52(7):831-51. doi:10.7868/S0016675816070067.
11. Kurbatova OL, Udina IG, Gracheva AS, et al. Genetic and demographic parameters of the population of Novosibirsk. Russian Journal of Genetics. 2018;54(13):74-84. (In Russ.) Курбатова О.Л., Удина И.Г., Грачева А.С. и др. Генетико-демографические параметры населения г. Новосибирска. Генетика. 2018;54(13):74-84. doi:10.1134/S0016675818130106.
 12. Kurbatova OL, Udina IG, Gracheva AS, et al. Genetic and demographic parameters of the population of St.Petersburg. Migration processes. Russian Journal of Genetics. 2019;55(9):1071-82. (In Russ.) Курбатова О.Л., Удина И.Г., Грачева А.С. и др. Генетико-демографические параметры населения г. Санкт-Петербурга. Миграционные процессы. Генетика. 2019;55(9):1071-82. doi:10.1134/S001667581909008X.
 13. Kurbatova OL, Gracheva AS, Pobedonostseva EY, et al. Genetic and demographic parameters of the population of Moscow. Migration processes. Russian Journal of Genetics. 2021;56(12):1438-49. (In Russ.) Курбатова О.Л., Грачева А.С., Победоносцева Е.Ю. и др. Генетико-демографические параметры населения г. Москвы. Миграционные процессы. Генетика. 2021;56(12):1438-49. doi:10.31857/S0016675821120080.
 14. Stepanov VA, Balanovsky OP, Melnikov AV, et al. Characteristics of Russian Federation populations by a panel of fifteen loci used for DNA identification and forensic examination. Acta Naturae. 2011;3(2):59-71. doi:10.32607/20758251-2011-3-2-56-67.
 15. Udina IG, Gracheva AS, Kurbatova OL. Frequencies of Y-chromosome haplogroups and migration processes in three generations of Moscow residents. Russian Journal of Genetics. 2022;58(11):1325-33. (In Russ.) Удина И.Г., Грачева А.С., Курбатова О.Л. Частоты гаплогрупп Y-хромосомы и процессы миграции в трех поколениях жителей Москвы. Генетика. 2022;58(11):1325-33. doi:10.31857/S001667582110121.
 16. Balanovska EV, Gorin IO, Ponomarev GYu, et al. Genogeographic technologies of a population biobank as a tool for assessing selection effects (using the example of pharmacogenetic biomarkers of cardiovascular diseases). Cardiovascular Therapy and Prevention. 2023;22(11):3773. (In Russ.) Балановская Е.В., Горин И.О., Пономарёв Г.Ю. и др. Геногеографические технологии популяционного биобанка как инструмент оценки эффектов отбора (на примере фармакогенетических биомаркеров сердечно-сосудистых заболеваний). Кардиоваскулярная терапия и профилактика. 2023;22(11):3773. doi:10.15829/1728-8800-2023-3773.
 17. Balanovska EV, Balanovsky OP. Russian gene pool in the Russian Plain. Moscow: Luch, 2007. p. 412. (In Russ.) Балановская Е.В., Балановский О.П. Русский генофонд на Русской равнине. М.: Луч, 2007. с. 412. ISBN: 978-5-87140-267-2.

Приложение

Таблица

Доля пришлого населения в субъектах РФ

Субъект РФ	Доля пришлого населения, %	Субъект РФ	Доля пришлого населения, %	Субъект РФ	Доля пришлого населения, %
Алтайский край	99,87	Ленинградская область	7,16	Республика Северная Осетия	34,93
Амурская область	99,82	Липецкая область	3,74	Республика Татарстан	46,76
Архангельская область без Ненецкого АО	99,83	Магаданская область	97,82	Республика Тыва	17,96
Астраханская область	99,17	Московская область	7,08	Республика Хакасия	87,85
Белгородская область	5,63	Мурманская область	99,80	Ростовская область	9,66
Брянская область	3,30	Ненецкий АО	81,38	Рязанская область	4,89
Владимирская область	4,42	Нижегородская область	4,85	Самарская область	14,45
Волгоградская область	9,99	Новгородская область	4,94	Саратовская область	12,45
Вологодская область	2,70	Новосибирская область	6,90	Сахалинская область	99,38
Воронежская область	4,50	Омская область	14,17	Свердловская область	9,35
Город Москва	8,35	Оренбургская область	24,12	Смоленская область	5,34
Город Санкт-Петербург	7,52	Орловская область	3,96	Ставропольский край	19,11
Город Севастополь	99,35	Пензенская область	13,20	Тамбовская область	3,01
Еврейская автономная область	7,26	Пермский край	12,89	Тверская область	6,55
Забайкальский край	93,07	Приморский край	99,92	Томская область	7,95
Ивановская область	4,43	Псковская область	4,99	Тульская область	4,69
Иркутская область	96,63	Республика Адыгея	74,84	Тюменская область без Ханты-Мансийского АО — Югра и Ненецкого АО	99,91
Кабардино-Балкарская Республика	30,16	Республика Алтай	62,21	Удмуртская Республика	72,00
Калининградская область	99,18	Республика Башкортостан	70,51	Ульяновская область	26,42
Калужская область	6,92	Республика Бурятия	69,96	Хабаровский край	98,25
Камчатский край	95,11	Республика Дагестан	13,42	Ханты-Мансийский АО	97,90
Карачаево-Черкесская Республика	47,13	Республика Ингушетия	5,88	Челябинская область	16,20
Кемеровская область	6,30	Республика Калмыкия	42,63	Чеченская Республика	4,73
Кировская область	8,12	Республика Карелия	92,62	Чувашская Республика	32,30
Костромская область	3,40	Республика Коми	76,31	Чукотский АО	64,85
Краснодарский край	99,93	Республика Крым	85,87	Ямало-Ненецкий АО	91,84
Красноярский край	99,41	Республика Марий Эл	56,08	Ярославская область	4,03
Курганская область	7,53	Республика Мордовия	59,94		
Курская область	3,52	Республика Саха (Якутия)	50,09		

Примечание: АО — автономный округ.

Использование масштабных коллекций образцов для оценки частоты носительства вариантов, связанных с невынашиванием беременности

Барбитов Ю. А., Лазарева Т. Е., Насыхова Ю. А., Беспалова О. Н., Глотов А. С.

ФГБНУ "Научно-исследовательский институт акушерства, гинекологии и репродуктологии им. Д. О. Отта". Санкт-Петербург, Россия

Цель. Современные масштабные биокolleкции и создаваемые с их использованием открытые базы данных с информацией о хранящихся образцах играют важнейшую роль в разработке и внедрении новых подходов к профилактике и диагностике, а также в создании усовершенствованных методов терапии наследственных патологий. Целью настоящего исследования является анализ генетических вариантов, ассоциированных с риском невынашивания беременности, на основе информации о частотах носительства генетических вариантов в российской популяции, представленной в базе данных RUSeq.

Материал и методы. В качестве основного источника информации о частотах аллелей использована первая российская открытая база данных генетических вариантов и их частот в популяции Российской Федерации — RUSeq. В ходе работы было проанализировано 270 известных генетических вариантов, описанных в литературе как причина невынашивания беременности. Проведен поиск патогенных вариантов в 18 ключевых генах, связанных с риском прерывания беременности.

Результаты. Выявлено, что в российской популяции встречаются 10 из 270 описанных в литературе вариантов, являющихся причиной прерывания беременности. Также были обнаружены 46 известных или новых потенциально патогенных вариантов в 10 ключевых генах, являющихся возможными маркерами риска невынашивания беременности. В одном случае (ген *NEB*), совокупная частота таких вариантов превысила 0,5%.

Заключение. Полученные результаты подчеркивают значимость генетических баз данных и необходимость дальнейшего изучения

генных нарушений, связанных с прерыванием беременности, а также включения идентифицированных вариантов в программы пре-концепционного генетического тестирования пар с целью определения стратегии планирования и ведения беременности.

Ключевые слова: RUSeq, генетический вариант, выкидыш, невынашивание беременности.

Отношения и деятельность. Исследование выполнено в рамках реализации поисковой темы государственного задания ФГБНУ "НИИ АГиР им. Д. О. Отта" № 1022040700839-2-3.2.2 "Разработка и апробация алгоритма профилактики наследственных болезней для внедрения массового прекоцепционного генетического скрининга в Северо-Западном регионе РФ".

Поступила 20/09-2024

Рецензия получена 22/10-2024

Принята к публикации 18/11-2024



Для цитирования: Барбитов Ю. А., Лазарева Т. Е., Насыхова Ю. А., Беспалова О. Н., Глотов А. С. Использование масштабных коллекций образцов для оценки частоты носительства вариантов, связанных с невынашиванием беременности. *Кардиоваскулярная терапия и профилактика*. 2024;23(11):4206. doi: 10.15829/1728-8800-2024-4206. EDN IKHPZD

Use of large-scale sample collections to estimate the carriage rate of miscarriage-related variants

Barbitov Yu. A., Lazareva T. E., Nasykhova Yu. A., Bepalova O. N., Glotov A. S.

Ott Research Institute of Obstetrics, Gynecology and Reproductology. Saint Petersburg, Russia

Aim. Modern large-scale biocollections and related open databases play a critical role in the development and implementation of novel approaches to prevention and diagnostics, as well as in improvement of treatment of hereditary pathologies. The aim of this study was to analyze the carriage rate of miscarriage-related variants in the Russian population presented in the RUSeq database.

Material and methods. The first Russian open database of genetic variants and their rate in the Russian population (RUSeq) was used as

the main source of information on allele frequencies. We analyzed 270 known genetic variants described as a cause of miscarriage. A search for pathogenic variants in 18 key miscarriage-related genes was conducted.

Results. We revealed that 10 out of 270 variants described as a miscarriage cause are found in the Russian population. In addition, 46 known or new potentially pathogenic variants were found in 10 key genes that are possible markers of miscarriage risk. In one case (*NEB* gene), the cumulative frequency of such variants exceeded 0,5%.

*Автор, ответственный за переписку (Corresponding author):

e-mail: barbitoff@bk.ru

[Барбитов Ю. А.* — к.б.н., с.н.с. группы вычислительной биоинформатики отдела геномной медицины им. В. С. Баранова, ORCID: 0000-0002-3222-440X, Лазарева Т. Е. — м.н.с. лаборатории геномики отдела геномной медицины им. В. С. Баранова, ORCID: 0000-0002-8990-4748, Насыхова Ю. А. — к.б.н., зав. лабораторией геномики отдела геномной медицины им. В. С. Баранова, ORCID: 0000-0002-3543-4963, Беспалова О. Н. — д.м.н., зам. директора по научной работе, ORCID: 0000-0002-6542-5953, Глотов А. С. — д.б.н., зав. отделом геномной медицины им. В. С. Баранова, ORCID: 0000-0002-7465-4504].

Conclusion. The obtained results emphasize the importance of genetic databases and the need for further study of miscarriage-related gene disorders, as well as the inclusion of identified variants in preconception genetic testing programs for couples in order to determine pregnancy planning and management.

Keywords: RUSeq, genetic variant, miscarriage, pregnancy loss.

Relationships and Activities. The study was carried out within the state assignment of the Ott Research Institute of Obstetrics and Gynecology № 1022040700839-2-3.2.2 "Development and testing of an algorithm for the prevention of hereditary diseases for the implementation of mass preconception genetic screening in Northwest Russia".

Barbitov Yu. A. * ORCID: 0000-0002-3222-440X, Lazareva T. E. ORCID: 0000-0002-8990-4748, Nasykhova Yu. A. ORCID: 0000-0002-3543-

4963, Bespalova O. N. ORCID: 0000-0002-6542-5953, Glotov A. S. ORCID: 0000-0002-7465-4504.

*Corresponding author:
barbitoff@bk.ru

Received: 20/09-2024

Revision Received: 22/10-2024

Accepted: 18/11-2024

For citation: Barbitov Yu. A., Lazareva T. E., Nasykhova Yu. A., Bespalova O. N., Glotov A. S. Use of large-scale sample collections to estimate the carriage rate of miscarriage-related variants. *Cardiovascular Therapy and Prevention*. 2024;23(11):4206. doi: 10.15829/1728-8800-2024-4206. EDN IKHPZD

ПВ — привычный выкидыш, РФ — Российская Федерация.

Ключевые моменты

Что известно о предмете исследования?

- Значительная доля случаев самопроизвольных аборт (выкидышей) при эуплоидной беременности связана с наличием у плода патогенных генетических вариантов.
- Масштабные коллекции образцов предоставляют уникальную возможность для оценки частоты аллелей в популяции.

Что добавляют результаты исследования?

- Использование базы данных RUSeq позволяет провести первичную оценку частоты наследования основных вариантов, связанных с риском выкидыша.
- В здоровой российской популяции обнаружены как известные, так и новые генетические варианты в 10 генах, потенциально связанные с риском прерывания беременности.

Key messages

What is already known about the subject?

- A significant proportion of spontaneous abortions (miscarriages) in euploid pregnancy are associated with pathogenic genetic variants in the fetus.
- Large-scale collections of samples provide a unique opportunity to assess the allele frequency in the population.

What might this study add?

- RUSeq database makes it possible to initially assess the inheritance rate of the main miscarriage-related variants.
- In a healthy Russian population, both known and new genetic variants in 10 genes potentially associated with miscarriage have been discovered.

Введение

Биобанкирование играет важнейшую роль в обеспечении широкого спектра биомедицинских исследований. Биобанки являются центральным звеном в большинстве современных исследований в области генетики человека, включая медицинскую генетику и репродуктивную медицину [1, 2]. Одним из важных аспектов использования биобанков в медицинской генетике является создание открытых баз данных и иных ресурсов, агрегирующих генетические данные большого количества пациентов [3]. Такие ресурсы могут быть условно разделены на два типа: 1) популяционно-генетические базы данных, содержащие информацию о частоте носительства генетических вариантов в популяции (например, база данных RUSeq [4]; 2) каталоги, содержащие информацию о результатах сравнительного анализа групп образцов, в частности с по-

мощью методики полногеномного анализа ассоциаций (например, Биобанк России [5]).

Помимо исследований истории популяции и анализа различных фундаментальных аспектов эволюции генома человека, такие базы данных играют центральную роль как в диагностике наследственных болезней [6], так и в оценке риска наследственных патологий у пар, планирующих беременность. Например, в последние годы был опубликован ряд исследований, направленных на оценку частоты основных мутаций в гене *CFTR*, связанных с риском мужского бесплодия [7, 8].

Невынашивание беременности является одной из важнейших проблем современной репродуктивной медицины. Наиболее распространенной формой репродуктивных потерь является самопроизвольный аборт (выкидыш) — гибель плода на сроке до 20 нед. беременности. Частота выкидышей

в Российской Федерации (РФ) на 2022г составила 2,3/1 тыс. женщин репродуктивного возраста [9]. Потери на более поздних сроках описываются термином "мертворождение". От 1 до 5% всех пар сталкиваются с привычным невынашиванием (привычным выкидышем, ПВ) — состоянием, при котором наблюдаются ≥ 3 последовательных выкидышей до 22 нед. беременности или потерю плода весом < 500 г (определение Всемирной организации здравоохранения), в РФ принято считать ПВ потерю ≥ 2 беременностей [10].

К генетическим причинам прерывания беременности относятся аномалии кариотипа или метилирования дезоксирибонуклеиновой кислоты (ДНК), фрагментация ДНК сперматозоидов, гетероморфизм хромосом и др. [11]. Около 70–80% спонтанных выкидышей вызваны аномалиями в кариотипе эмбриона [12], но причина значительной доли выкидышей все еще остается неизвестной. В случае привычного выкидыша, причина остается неизвестной чаще (у $> 50\%$ пар).

Значительная доля случаев единичного или привычного выкидыша неуставленной природы может быть обусловлена наличием точечных мутаций, приводящих к серьезным дефектам раннего эмбрионального развития. В последние годы было описано большое количество таких точечных мутаций (например, в работе Вурне АВ, et al. (2023) [13]). Многие из них зачастую являются причиной серьезных наследственных заболеваний различных органов и систем, таких как, например, сердечно-сосудистая (мутации в генах *RYR2*, *SCN5A*).

Технологии высокопроизводительного секвенирования генома или экзона произвели настоящую революцию в области диагностики наследственных патологий человека [14] и активно применяются для идентификации причин невынашивания беременности. Однако эффективность применения данных технологий в значительной степени зависит от наличия ресурсов, содержащих информацию о генетических маркерах риска репродуктивных потерь, а также от наличия данных о частоте данных маркеров в популяции.

Ранее была собрана информация о 270 генетических вариантах, которые описаны в литературе как потенциальная причина выкидышей, включая случаи ПВ [15]. В этой работе использовали открытую базу данных RUSeq [4] для оценки частоты этих вариантов у жителей РФ, а также выявили новые мутации, затрагивающие один из 18 ключевых генов, вовлеченных в патогенез выкидышей и привычного невынашивания. Наши результаты подтверждают ценность масштабных коллекций образцов, подобных RUSeq, для оценки частоты носительства патогенных и вероятно патогенных генетических вариантов, связанных с различными наследственными патологиями.

Материал и методы

Использованные базы данных. В качестве исходных данных для настоящего исследования была использована публично доступная база данных RUSeq, содержащая информацию о частоте генетических вариантов в российской популяции [4]. Данный ресурс содержит информацию о генетических вариантах, обнаруженных у > 7 тыс. пациентов (7452), из которых 1696 человек не имеют наследственных патологий. Для анализа частоты вариантов были использованы VCF-файлы, содержащие обобщенную информацию об их частоте. Дополнительный отбор доноров по полу или иным характеристикам не проводился. Каждый вариант был дополнительно проаннотирован информацией о его частоте в мировых популяциях (по данным Genome Aggregation Database (gnomAD) v2 [16]), а также о клинической классификации варианта в базе данных NCBI ClinVar [17].

Отбор генетических вариантов, связанных с риском невынашивания беременности. Для поиска и оценки частоты связанных с невынашиванием беременности генетических вариантов в российской популяции были использованы данные о 270 генетических вариантах, описанных в литературе [15]. Для поиска вариантов из данного списка в базе RUSeq были использованы положения и тип аминокислотной замены в последовательности белка (поиск соответствий проводился с использованием аннотированного описания эффекта варианта на кодируемый геном белок).

Помимо поиска известных вариантов, описанных как причина выкидышей или привычного невынашивания, нами был проведен дополнительный отбор потенциально клинически значимых вариантов в основных генах, мутации в которых приводят к выкидышам или прерыванию беременности. Данный список генов был составлен на основе литературных данных, обобщенных в предыдущих исследованиях. В качестве генов-кандидатов рассматривали 18 генов, мутации в которых были обнаружены в ≥ 2 независимых исследованиях (таблица 1 из исходной публикации [15]) (*DYNC2H1*, *RYR2*, *OXPH3*, *PADI6*, *PIEZO1*, *SCN5A*, *NEB*, *STIL*, *COL2A1*, *FRAS1*, *FGFR3*, *GREB1L*, *RYR1*, *LZTR1*, *FGFR2*, *PTPN11*, *PIK3R2*, *GBE1*). Помимо невынашивания, все эти гены (за исключением *PADI6*) связаны с серьезными наследственными патологиями, включая сердечно-сосудистые заболевания (желудочковая аритмия (OMIM: 115000, ген *RYR2*); синдром Бругада (OMIM: 601144, ген *SCN5A*)), нервно-мышечные патологии (*NEB*), скелетные дисплазии (*COL2A1*, *DYNC2H1*, *FGFR2*, *FGFR3*, *FRAS1*, *RYR1*), болезни крови и иммунитета (*FOXP3*, *PIEZO1*), и иные мультисистемные синдромы.

Для сужения пространства поиска в качестве возможных причинных вариантов в данных генах рассматривались варианты, потенциально приводящие к полной потере функции белкового продукта гена (нонсенс-мутации, замены в канонических сайтах сплайсинга, вставки или выпадения нуклеотидов, приводящие к сдвигу рамки считывания). Кроме того, в анализ были включены варианты, отмеченные как патогенные или вероятно патогенные в базе данных ClinVar, без учета их типа. Список обнаруженных вариантов проходил дальнейшую проверку для исключения заведомо доброкачественных вариантов (с частотой $> 1\%$ или соответствующей пометкой в ClinVar).

Во всех случаях отбор вариантов проводился с использованием языка программирования Python версии 3.10.

Таблица 1

Частоты носительства генетических вариантов, связанных с риском невынашивания беременности, в здоровой российской популяции

Положение варианта*	rsID	Ген	а/к замена	Количество носителей	Частота	Частота в европейской популяции (gnomAD v4)
chr2:151501423	rs549794342	<i>NEB</i>	Arg8032*	22	0,0052	0,000351
chr13:51944145	rs76151636	<i>ATP7B</i>	His1069Gln	19	0,0056	0,001058
chr15:89327201	rs113994095	<i>POLG</i>	Ala467Thr	3	0,00089	0,001330
chr10:121503847	rs376451171	<i>FGFR2</i>	Ala363Val	2	0,00059	0,000048
chr2:46378723	rs935969368	<i>EPAS1</i>	Leu504Val	1	0,00030	0,000003
chr22:50288030	rs192965378	<i>PLXNB2</i>	Arg463Gln	1	0,00059	0,000009
chr3:81649884	rs374404487	<i>GBE1</i>	Arg156His	1	0,00030	0,000081

Примечание: * — положение приведено согласно референсной сборке генома человека GRCh38. В выделенных ячейках указаны частоты вариантов, статистически значимо отличающиеся от общеевропейской частоты по результатам сравнения в оригинальном исследовании UUSeq [4], а/к — аминокислота.

Поисковая тема государственного задания ФГБНУ "НИИ АГиР им. Д. О. Отта" № 1022040700839-2-3.2.2 "Разработка и апробация алгоритма профилактики наследственных болезней для внедрения массового прекоцепционного генетического скрининга в Северо-Западном регионе РФ".

Результаты

Частота носительства известных патогенных вариантов

На первом этапе работы была проанализирована частота носительства генетических вариантов, обнаруженных в опубликованных исследованиях генетических основ невынашивания беременности. В общей сложности в анализ были включены 270 генетических вариантов в 18 генах. Из этого набора, в базе RUSeq были обнаружены 28 (10,3%) вариантов, из которых 10 встречались в здоровой популяции (2 варианта были обнаружены исключительно в здоровой популяции). Из них 2 варианта были аннотированы как доброкачественные в базе данных NCBI ClinVar, а еще один был отмечен как вариант с противоречащими интерпретациями патогенности. Таким образом, всего 7 из обнаруженных вариантов, встречающихся в здоровой российской популяции, могут быть рассмотрены как потенциальные аллели риска репродуктивных потерь. Из этих вариантов 3 были классифицированы как патогенные или вероятно патогенные в NCBI ClinVar, и еще 1 вариант был отмечен как вариант неопределенного значения.

Информация о наиболее частых вариантах представлена в таблице 1. Наиболее часто встречались варианты в генах *NEB* и *ATP7B* (0,0059 и 0,0054, соответственно). Оба варианта являются известными патогенными вариантами, связанными с немалиновой миопатией и болезнью Вильсона-Коновалова, соответственно, а частота их носительства в РФ значительно превышает частоту в европейской популяции (по данным gnomAD).

Наименьшей частотой характеризовались варианты в генах *EPAS1*, *PLXNB2* и *GBE1* (все эти варианты наблюдались однократно).

Совокупная частота повреждающих вариантов в ключевых генах

На следующем этапе работы была проанализирована совокупная частота функционально значимых генетических вариантов в ключевых генах, связанных с риском невынашивания. Для этого мы сосредоточились на вариантах, вероятно приводящих к потере функции белка (появлению преждевременных стоп-кодиров или сдвигу рамки считывания, нарушению сплайсинга). Для сужения пространства поиска были использованы только те гены, варианты в которых были обнаружены более, чем в одном исследовании генетических причин репродуктивных потерь.

В результате поиска вариантов, подходящих под критерии поиска, в базе данных RUSeq, было обнаружено 154 повреждающих или известных патогенных варианта в использованном наборе из 18 генов. Из них, 46 вариантов в 10 генах встречались у представителей здоровой популяции. Обобщенная информация об этих вариантах представлена в таблице 2. Наибольшее число вариантов было обнаружено в гене *DYNC2H1*, что, скорее всего, связано с большой длиной кодируемого данным геном полипептида. Примечательно, что мутации в *DYNC2H1* встречались лишь у 11 человек, в то время как мутации в гене *NEB* наблюдались у 30 человек, несмотря на меньшее количество обнаруженных повреждающих мутаций в этом гене (7 шт.) Данное наблюдение, без сомнения, объясняется наличием частой нонсенс-мутации в *NEB*, описанной в предыдущем разделе. Интересно, что у 4 человек были обнаружены мутации в гене *STIL*. В отличие от других генов, которые также связаны с наследственными патологиями в постнатальный период, варианты в гене *STIL* являются специфическим маркером риска привычного невынашивания.

Таблица 2

Совокупная частота повреждающих мутаций в генах, связанных с риском невынашивания беременности, в здоровой российской популяции

Ген	Количество вариантов			Совокупное число носителей	Совокупная частота
	Общее	Известные патогенные	Потенциально значимые (нонсенс/сплайс/сдвиг рамки)		
<i>COL2A1</i>	1	1	0	1	0,000298
<i>DYNC2H1</i>	10	1	9 (4/4/1)	11	0,003322
<i>FGFR3</i>	2	0	2 (0/1/1)	2	0,000633
<i>FRAS1</i>	5	0	5 (2/1/2)	5	0,001493
<i>LZTR1</i>	5	2	3 (1/0/2)	7	0,002470
<i>NEB</i>	7	3	4 (0/0/4)	30	0,008936
<i>PIEZO1</i>	3	0	3 (0/3/0)	3	0,000929
<i>RYR1</i>	6	1	5 (1/1/3)	11	0,003267
<i>SCN5A</i>	3	0	3 (0/2/1)	6	0,001923
<i>STIL</i>	4	0	4 (2/1/0)	4	0,001190

Обсуждение

Информация о частоте носительства генетических вариантов в популяции имеет ключевое значение как в ходе молекулярной диагностики наследственных патологий [6, 14], так и для эпидемиологической оценки риска генетических заболеваний. База данных RUSeq является единственным на сегодняшний день открытым ресурсом, содержащим такую информацию о российской популяции, и была многократно использована в целом ряде медико-генетических исследований (например, Glotov AS, et al. (2024) [8]). В настоящем исследовании продемонстрирована ценность данных RUSeq для оценки риска репродуктивных патологий у жителей РФ на примере невынашивания беременности.

Выкидыши и привычное невынашивание являются важной проблемой репродуктивного здоровья человека, и даже один выкидыш способен оказывать значительное психологическое влияние на женщину. Для успешного предсказания риска невынашивания, необходимо как полноценное понимание патогенетических механизмов, лежащих в основе данной патологии, так и информация о частоте в популяции генетических вариаций, связанных с риском невынашивания беременности. Наличие этой информации позволяет проводить направленное преемуприцепционное генетическое тестирование пар на этапе планирования беременности для оценки риска репродуктивных потерь и разработки успешной стратегии предупреждения патологии.

Настоящая работа является первым в России исследованием частоты точечных мутаций, связанных с риском выкидыша и привычного невынашивания. В ходе работы, было обнаружено 7 известных вариантов, встречающихся у жителей РФ и связанных с риском самопроизвольного аборта, а также 46 известных и потенциально патогенных вариантов в основных генах, вовлеченных в патогенез невынашивания беременности.

Важно заметить, что далеко не все варианты, обнаруженные в настоящем исследовании, служат специфическими маркерами риска выкидыша. Так, наиболее частыми вариантами из числа обнаруженных нами являются мутации в генах *NEB* и *ATP7B*. Вариант rs76151636 в гене *ATP7B*, связанный с болезнью Вильсона-Коновалова, известен как один из наиболее часто встречающихся патогенных вариантов в этом гене у российских пациентов [18]. Повышенная частота носительства вариантов в гене *NEB* также была отмечена в целом ряде исследований российской популяции с использованием высокопроизводительных методов анализа [4, 19]. Известно, что некоторые патогенные вариации в гене *NEB* являются специфическими для российской популяции, что хорошо согласуется со значимо увеличенной частотой варианта rs549794342 в гене *NEB* в данных RUSeq относительно данных gnomAD. Частота варианта rs76151636 в гене *ATP7B* также значимо различается между российской и европейской популяцией [4]. Стоит заметить, однако, что статистическое сравнение частоты носительства других вариантов, обнаруженных в настоящем исследовании, между российской и европейской популяциями затруднено ввиду их низкой общей частоты.

Наконец, важно подчеркнуть, что имеющихся в нашем распоряжении данных недостаточно для того, чтобы уверенно предсказать, будут ли обнаруженные в исследовании варианты приводить к выкидышу у каждой отдельно взятой пары. Тем не менее, их следует принимать во внимание как потенциальные факторы риска при планировании беременности.

Заключение

Биобанки играют важнейшую роль как в изучении генетических основ наследственных болезней, так и в их диагностике и профилактике. Полученные в настоящем исследовании результаты

подчеркивают важность накопления информации о частоте генетических вариантов в российской популяции для идентификации потенциальных маркеров риска репродуктивных проблем, включая невынашивание беременности. Обнаружение потенциально значимых часто встречающихся вариантов указывает на необходимость принятия этих вариантов во внимание при проведении медико-генетического консультирования при планировании беременности для оценки риска невынашивания беременности. В то же время, данная работа подчеркивает необходимость дальнейшего изуче-

ния патогенетических процессов, лежащих в основе невынашивания беременности, для более комплексной оценки риска у пар.

Отношения и деятельность. Исследование выполнено в рамках реализации поисковой темы государственного задания ФГБНУ "НИИ АГиР им. Д. О. Отта" № 1022040700839-2-3.2.2 "Разработка и апробация алгоритма профилактики наследственных болезней для внедрения массового прекоцепционного генетического скрининга в Северо-Западном регионе РФ".

Литература/References

1. Tabakov VY. Management of biobanking for medical genetics research. Cardiovascular Therapy and Prevention. 2021;20(8): 3027. (In Russ.) Табаков В.Ю. Организация биобанкирования для обеспечения медико-генетических исследований. Кардиоваскулярная терапия и профилактика. 2021;20(8):3027. doi:10.15829/1728-8800-2021-3027.
2. Glotov A, Nasykhova Y, Dvoynova N, et al. Prospects for biobanking in reproductive health: genetic aspects. Biol Commun. 2022;67(4):286-300. doi:10.21638/spbu03.2022.40467(4).
3. Lazareva TE, Barbitoff YA, Changalidis AI, et al. Biobanking as a Tool for Genomic Research: From Allele Frequencies to Cross-Ancestry Association Studies. J Pers Med. 2022;12(12):2040. doi:10.3390/jpm12122040.
4. Barbitoff YA, Khmelkova DN, Pomerantseva EA, et al. Expanding the Russian allele frequency reference via cross-laboratory data integration: insights from 7,452 exome samples. Natl Sci Rev. 2024;11(10):nwae326. doi:10.1093/nsr/nwae326/7758245.
5. Usoltsev D, Kolosov N, Rotar O, et al. Complex trait susceptibilities and population diversity in a sample of 4,145 Russians. Nat Commun. 2020;15:6212. doi:10.1038/s41467-024-50304-1.
6. Ryzhkova OP, Kardymon OL, Prohorchuk EB, et al. Guidelines for interpretation of human DNA sequence data obtained using massively parallel sequencing (MPS) (2018 edition, version 2). Medical Genetics. 2019;18(2):3-23. (In Russ.) Рыжкова О.П., Кардымон О.Л., Прохорчук Е.Б. и др. Руководство по интерпретации данных последовательности ДНК человека, полученных методами массового параллельного секвенирования (MPS) (редакция 2018, версия 2). Медицинская генетика. 2019;18(2):3-23. doi:10.25557/2073-7998.2019.02.3-23.
7. Chernykh V, Sorokina T, Sedova A, et al. L138ins Variant of the CFTR Gene in Russian Infertile Men. Genes (Basel). 2023;14(7): 1407. doi:10.3390/genes14071407.
8. Glotov AS, Chernykh VB, Solovova OA, et al. Russian Regional Differences in Allele Frequencies of CFTR Gene Variants: Genetic Monitoring of Infertile Couples. Genes (Basel). 2023;15(1):45. doi:10.3390/genes15010045.
9. Stupak V, Banteva M, Manoshkina E. Dynamics And Structure Of Abortions In The Russian Federation And Far Eastern Federal District In 2003-2022. Social'nye aspekty zdorov'a naselenia [serial online]. 2024;70(1):10. (In Russ.) Ступак В.С., Бантьева М.Н., Маношкина Е.М. Динамика и структура аборт в Российской Федерации и Дальневосточном федеральном округе в 2003-2022 годах. Социальные аспекты здоровья населения [сетевое издание] 2024;70(1):10. doi:10.21045/2071-5021-2024-70-1-10.
10. Dobrokhotova YE, Kuznetsov PA, Dzhokhadze LS. Current discourse on recurrent pregnancy loss (ESHRE Protocol 2023, National Clinical Guidelines "Recurrent Pregnancy Loss" 2021, materials of the World Congress of ESHRE 2023). Russ J Woman Child Heal [Internet]. 2023;6(3):219-25. (In Russ.) Доброхотова Ю.Э., Кузнецов П.А., Джохадзе Л.С. Привычное невынашивание. Актуальное сегодня (Протокол ESHRE 2023 г., Национальные клинические рекомендации "Привычный выкидыш" 2021г., материалы Всемирного конгресса ESHRE 2023г). ПМЖ. Мать и дитя. 2023;6(3):219-25. doi:10.32364/2618-8430-2023-6-3-1.
11. Cao C, Bai S, Zhang J, et al. Understanding recurrent pregnancy loss: recent advances on its etiology, clinical diagnosis, and management. Med Rev [Internet]. 2023;2(6):570-89. doi:10.1515/mr-2022-0030/html.
12. Suzumori N, Sugiura-Ogasawara M. Genetic Factors as a Cause of Miscarriage. Curr Med Chem. 2010;17(29):3431-7. doi:10.2174/092986710793176302.
13. Byrne AB, Arts P, Ha TT, et al. Genomic autopsy to identify underlying causes of pregnancy loss and perinatal death. Nat Med. 2023;29(1):180-9. doi:10.1038/s41591-022-02142-1.
14. Barbitoff YA, Ushakov MO, Lazareva TE, et al. Bioinformatics of germline variant discovery for rare disease diagnostics: current approaches and remaining challenges. Brief Bioinform. 2024;25(2):bbad508. doi:10.1093/bib/bbad508.
15. Maksutenko EM, Barbitoff YA, Nasykhova YA, et al. The Landscape of Point Mutations in Human Protein Coding Genes Leading to Pregnancy Loss. Int J Mol Sci. 2023;24(24):17572. doi:10.3390/ijms242417572.
16. Karczewski KJ, Francioli LC, Tiao G, et al. The mutational constraint spectrum quantified from variation in 141,456 humans. Nature. 2020;581:434-43. doi:10.1038/s41586-020-2308-7.
17. Landrum MJ, Lee JM, Benson M, et al. ClinVar: improving access to variant interpretations and supporting evidence. Nucleic Acids Res. 2018;46(D1):D1062-7. doi:10.1093/nar/gkx1153.
18. Balashova MS, Tuluzanovskaya IG, Glotov OS, et al. The spectrum of pathogenic variants of the ATP7B gene in Wilson disease in the Russian Federation. J Trace Elem Med Biol [Internet]. 2020;59:126420. doi:10.1016/j.jtemb.2019.126420.
19. Barbitoff YA, Skitchenko RK, Poleshchuk OI, et al. Whole-exome sequencing provides insights into monogenic disease prevalence in Northwest Russia. Mol Genet Genomic Med. 2019;7(11):e964. doi:10.1002/mgg3.964.

Артефакты анализа при идентификации клеточных линий методом профилирования на основе коротких tandemных повторов

Мальченкова А. А., Кособокова Е. Н.

ФГБУ "Национальный медицинский исследовательский центр онкологии им. Н. Н. Блохина" Минздрава России. Москва, Россия

Цель. Изучить и описать самые распространенные виды артефактов, которые возникают при детекции коротких tandemных повторов STR (short tandem repeat)-ампликонов методом капиллярного электрофореза и вызывают трудности в интерпретации полученных STR-профилей.

Материал и методы. Клеточные линии получены из биоресурсной коллекции (БРК) клеточных линий ФГБУ "НМИЦ онкологии им. Н. Н. Блохина" Минздрава России. Выделение ДНК из суспензий клеток проводили по инструкциям производителей наборов DNeasy Blood & Tissue (QIAGEN, Германия) и ExtractDNA Blood & Cells (Eurogen, Россия). Измерение концентрации ДНК осуществляли с помощью прибора Qubit 4.0 (Thermo Fisher Scientific, США) и набора реагентов Qubit dsDNA BR Assay Kit (Thermo Fisher Scientific, США). Мультиплексная полимеразная цепная реакция (ПЦР) была поставлена с помощью набора реактивов CoRDIS "ЭКСПЕРТ26" (Гордиз, Россия). Капиллярный электрофорез продуктов ПЦР проводили на генетическом анализаторе Genetic Analyzer 3500xL (Applied Biosystems, США). Для обработки электрофореграмм использовали программу GeneMapper Software v6.0 (Thermo Fisher Scientific, США).

Результаты. Изучены наиболее известные артефакты, связанные с методом STR-профилирования и последующим капиллярным электрофоретическим разделением ампликонов. Приведены случаи детектирования этих артефактов из личной практики. Даны рекомендации действий для улучшения картины электрофореза.

Заключение. В работе изучены артефакты анализа при идентификации результатов STR-профилирования клеточных линий методом капиллярного электрофореза (STR-CE), с которыми исследователи сталкиваются в лабораторной практике. Подробно описаны

и проиллюстрированы примерами из собственной практики распространенные виды артефактов анализа, которые вызывают трудности в интерпретации полученных при STR-профилировании результатов, а также возможные причины их появления. Приведены рекомендации по снижению количества неспецифических флуоресцентных сигналов и их интенсивности.

Ключевые слова: STR-профилирование, артефакты анализа, капиллярный электрофорез.

Отношения и деятельность. Работа выполнена при финансовой поддержке Министерства науки и высшего образования Российской Федерации в рамках научно-исследовательской работы № 075-15-2021-1060 "Создание и развитие биоресурсной коллекции генетически и фенотипически охарактеризованных клеточных линий и первичных опухолей человека".

Поступила 24/07-2024

Рецензия получена 15/09-2024

Принята к публикации 30/09-2024



Для цитирования: Мальченкова А. А., Кособокова Е. Н. Артефакты анализа при идентификации клеточных линий методом профилирования на основе коротких tandemных повторов. *Кардиоваскулярная терапия и профилактика*. 2024;23(11):4121. doi: 10.15829/1728-8800-2024-4121. EDN MNQAWT

Artifacts of analysis in cell line identification by short tandem repeat profiling

Malchenkova A. A., Kosobokova E. N.

Blokhin National Medical Research Center of Oncology. Moscow, Russia

Aim. To study and describe the most common types of artifacts in detection of short tandem repeat (STR) amplicons by capillary electrophoresis and cause difficulties in interpreting the obtained STR profiles.

Material and methods. Cell lines were obtained from the bioresource collection of cell lines of the Blokhin National Medical Research Center of Oncology. DNA was isolated according to the manufacturer's instructions of the DNeasy Blood & Tissue (QIAGEN, Germany) and ExtractDNA Blood & Cells (Eurogen, Russia) kits. DNA concentration

was measured using a Qubit 4.0 device (Thermo Fisher Scientific, USA) and a Qubit dsDNA BR Assay Kit (Thermo Fisher Scientific, USA). Multiplex PCR was performed using a CoRDIS EXPERT26 reagent kit (Gordiz, Russia). Capillary electrophoresis of PCR products was performed on a 3500xL Genetic Analyzer (Applied Biosystems, USA). GeneMapper Software v6.0 (Thermo Fisher Scientific, USA) was used to process electrophoresis data.

Results. The most well-known artifacts associated with the STR profiling and subsequent capillary electrophoretic separation of

*Автор, ответственный за переписку (Corresponding author):

e-mail: ekkos@mail.ru

[Мальченкова А. А. — м.н.с. молекулярно-генетической диагностики и персонализированной медицины НИИ экспериментальной диагностики и терапии опухолей, ORCID: 0000-0003-2201-0472, Кособокова Е. Н. — в.н.с., к.б.н. лаборатории молекулярно-генетической диагностики и персонализированной медицины НИИ экспериментальной диагностики и терапии опухолей, ORCID: 0000-0002-4660-8519].

amplicons were studied. Cases of detection of these artifacts from personal practice are given. Recommendations for improving the electrophoresis pattern are given.

Conclusion. The paper studies the artifacts of analysis in cell line STR profiling by capillary electrophoresis (STR-CE), which researchers encounter in laboratory practice. Common types of analysis artifacts that cause difficulties in interpreting the results obtained during STR profiling, as well as possible reasons for their occurrence, are described in detail and illustrated with examples from our own practice. Recommendations are given for reducing the number of non-specific fluorescent signals and their intensity.

Keywords: STR profiling, analysis artifacts, capillary electrophoresis.

Relationships and Activities. The work was financially supported by the Ministry of Science and Higher Education of the Russian Federation within the research work № 075-15-2021-1060 "Creation

and development of a bioresource collection of genetically and phenotypically characterized cell lines and primary human tumors".

Malchenkova A. A. ORCID: 0000-0003-2201-0472, Kosobokova E. N. * ORCID: 0000-0002-4660-8519.

*Corresponding author: ekkos@mail.ru

Received: 24/07-2024

Revision Received: 15/09-2024

Accepted: 30/09-2024

For citation: Malchenkova A. A., Kosobokova E. N. Artifacts of analysis in cell line identification by short tandem repeat profiling. *Cardiovascular Therapy and Prevention*. 2024;23(11):4121. doi: 10.15829/1728-8800-2024-4121. EDN MNQAWT

ДНК — дезоксирибонуклеиновая кислота, ПО — программное обеспечение, ПЦР — полимеразная цепная реакция, LOD — Limit of Detection (предел обнаружения), LOQ — Limit of Quantification (предел количественного определения), NGS — Next Generation Sequencing (секвенирование нового поколения, высокопроизводительное секвенирование), RFU — relative fluorescent unit (относительная единица флуоресценции), STR — short tandem repeat (короткие tandemные повторы), STR-CE — short tandem repeat, products are separated by size using capillary electrophoresis (профилирование на основе коротких tandemных повторов с последующим анализом ампликонов методом капиллярного электрофоретического разделения).

Ключевые моменты

Что известно о предмете исследования?

- Метод профилирования на основе коротких tandemных повторов (STR — short tandem repeat) является одним из самых простых и удобных методов для подтверждения подлинности клеточных линий, однако интерпретация результатов может быть осложнена артефактами анализа.

Что добавляют результаты исследования?

- В работе впервые на русском языке описаны распространенные артефакты анализа, которые были обнаружены в ходе экспериментальной работы методом STR-профилирования, а также возможные причины их возникновения. Кроме того, даны рекомендации для снижения степени влияния упомянутых артефактов на результаты анализа.

Key messages

What is already known about the subject?

- The short tandem repeat (STR) profiling is one of the simplest and most convenient methods for cell line authentication, but interpretation of the results can be complicated by analysis artifacts.

What might this study add?

- The work describes for the first time in Russian the common analysis artifacts discovered during the experimental work using the STR profiling, as well as the possible reasons for their occurrence. In addition, recommendations are given for reducing the influence of the mentioned artifacts on the analysis results.

Введение

Идентификация клеточных линий при проведении доклинических исследований, даже спустя 50 лет после обнаружения научным сообществом проблемы ошибочной идентификации и невозпроизводимости экспериментов, всё еще не является повсеместной рутинной лабораторной практикой [1-4]. Несмотря на то, что заявленная проблема довольно хорошо освещается в научном сообществе (база данных ошибочно идентифицированных клеточных линий ICLAC пополняется каждый год), выходят обзорные статьи, подсчитывающие экономический и репутационный урон, возникающий из-за недостаточного внимания к проблеме идентификации и развенчанных исследований, построенных на ошибочных гипотезах.

При изучении внушительного набора статей, описывающих проблему внутривидовой контамина-

ции и связанных последствий [5-9], становится очевидна необходимость повсеместного внедрения процедур идентификации биологического материала.

Актуальность настоящей статьи обусловлена, с одной стороны, тем, что в российском научном сообществе за счет увеличения числа международных публикаций растет внимание к проблеме контаминации клеточных линий в лабораториях и осознание необходимости устанавливать подлинность своих культур, а с другой стороны — отсутствием достаточного количества литературы на русском языке для погружения в тему.

Одним из доступных и удобных вариантов идентификации клеточных линий человека является STR (short tandem repeat)-профилирование [10], которое заключается в проведении мультиплексной полимеразной цепной реакции (ПЦР) с последующим разделением и анализом продуктов ампли-

фикации с помощью капиллярного электрофореза. Однако из-за артефактов, обусловленных физико-химическими особенностями используемых методов (ПЦР, электрофоретическое разделение, флуоресцентная детекция), результаты анализа не всегда просто интерпретировать.

Для идентификации клеточных линий в рамках исследовательских лабораторий на территории нашей страны STR-профилирование только входит в рутинную практику и ещё недостаточно широко распространено. Методологической литературы, кроме руководств производителей для наборов реагентов, на русском языке нет. Поэтому настоящая статья может быть полезна исследователям в интерпретации данных применительно к задаче генотипирования образцов клеточных линий человека.

Цель работы — изучить и описать самые распространенные виды артефактов, которые возникают при детекции STR-ампликонов методом капиллярного электрофореза и вызывают трудности в интерпретации полученных STR-профилей.

Материал и методы

В работе использовали клеточные линии из биоресурсной коллекции (БРК) ФГБУ "НМИЦ онкологии им. Н. Н. Блохина" Минздрава России. Выделение дезоксирибонуклеиновой кислоты (ДНК) из суспензий клеток проводили по инструкциям производителей наборов DNeasy Blood & Tissue (QIAGEN, Германия) и ExtractDNA Blood & Cells (Евроген, Россия). Концентрацию ДНК измеряли с помощью прибора Qubit 4.0 (Thermo Fisher Scientific, США) и набора реагентов Qubit dsDNA BR Assay Kit (Thermo Fisher Scientific, США). Мультиплексная ПЦР была поставлена с помощью набора реактивов CoRDIS "ЭКСПЕРТ 26" (Гордиз, Россия). Капиллярный электрофорез продуктов ПЦР проводили на генетическом анализаторе Genetic Analyzer 3500xL (Applied Biosystems, США). Для обработки электрофореграмм использовали программу GeneMapper Software v6.0 (Thermo Fisher Scientific, США).

Результаты и обсуждение

Биобанкам как хранителям и распространителям биологического материала необходимо осуществлять идентификацию и строгий контроль клеточных линий для повсеместного искоренения проблемы контаминации клеточных культур [11, 12].

Поэтому в рамках проекта по созданию БРК на базе НМИЦ онкологии им. Н. Н. Блохина был внедрен целый набор процедур по контролю качества и подлинности депонированных и получаемых клеточных линий. В качестве основного метода для идентификации клеточных линий, подтверждения их подлинности и чистоты был выбран метод STR-профилирования [13].

Данный метод отличается сочетанием относительной простоты анализа и надежностью результатов в отличие от традиционных методов (HLA-

типирования, кариотипирования и др.); его стоимость значительно ниже проведения NGS (Next Generation Sequencing, секвенирование нового поколения), а кроме того, начиная с 2022г, метод рекомендован в Национальном руководстве по биобанкированию [14]. К несомненным преимуществам данной методики можно отнести и наличие внушительного количества анонсированных в базах данных референсных STR-профилей¹ для наиболее распространенных клеточных культур, что позволяет контролировать воспроизводимость результатов, полученных в лаборатории. Однако стоит признать, что у данной методики, несмотря на то, что она, согласно международному стандарту по аутентификации клеточных линий человека, разработанному ATCC (The American Type Culture Collection — Американская коллекция типовых культур), считается "золотым стандартом" и широко используется, есть ограничения и сложности применения [15].

К ограничениям метода стоит отнести невозможность обнаружения межвидовой контаминации, поскольку представленные на рынке наборы реагентов содержат праймеры, высокоспецифичные к человеческой ДНК, что не позволяет перекрыть одним анализом все проблемы с контаминацией в лаборатории. Хотя для персонализированной идентификации некоторых животных уже разработаны STR-праймеры (мыши, крысы, обезьяны, некоторые виды рыб) [16-18] и разработка стандарта по STR-идентификации мышинных клеточных линий находится на заключительных стадиях, коммерчески доступных наборов реагентов для STR-профилирования лабораторных животных всё ещё не представлено. Некоторые биобанки (например, ATCC — American Type Culture Collection) и коммерческие фирмы, (ООО "Гордиз", АО "SynGen") предлагают STR-профилирование мышинных линий только в качестве услуги [19].

Ещё одним ограничением метода является невозможность определить точную нуклеотидную последовательность амплифицированных фрагментов [20]. Это означает, что детектируемые в локусе продукты одинакового молекулярного веса могут быть разными по нуклеотидному составу, но на электрофореграмме они между собой никак различаться не будут. Это приводит к тому, что, при обнаружении нетипичной электрофоретической картины для клеток с известным STR-профилем (выпадение аллеля, гетерозиготный дисбаланс аллелей в локусе, изменения количества tandemных повторов в аллеле и т.д.), определить точную причину явления удается не всегда [15].

Причиной детектируемых генетических изменений могут быть как точечные мутации в зоне отжига праймеров, так и кардинальные изменения

¹ <https://iclac.org/databases/cross-contaminations/>.

в самом генотипе клеток данной линии, возникновение субклональной популяции, а также контаминация другой клеточной линией или ошибочная идентификация клеток персоналом. Для выяснения генетической картины и установления первопричины необходимы исследования дополнительными методами (например, кариотипирование, секвенирование экзона).

Конечно, наборы реагентов, условия постановки STR-профилирования и процедура анализа данных совершенствуются и уже не представляют тот объем проблем, с которым исследователи сталкивались 20 лет назад [21]. И если раньше продукты амплификации приходилось разделять с помощью горизонтального электрофореза, что представляло собой трудоёмкую задачу и сложную в интерпретации электрофоретическую картину [22], то на сегодняшний день большинство лабораторий использует приборы для капиллярного электрофоретического разделения продуктов мультиплексной амплификации с флуоресцентной детекцией. Это существенно упрощает и ускоряет анализ, позволяет очень точно различать аллели по молекулярному весу, а также получить и обработать результаты в удобной электронной форме. Кроме того, приборы с несколькими каналами флуоресцентной детекции позволяют усложнить мультиплексную смесь и использовать большее количество генетических маркеров в одном исследовании.

Однако при всех неоспоримых преимуществах данной технологии, у приборов капиллярного электрофореза есть два основных ограничения, связанных с флуоресцентной детекцией. Первое ограничение — это наличие одного лазера (канала возбуждения) и нескольких каналов детекции в приборах. Для работы по нескольким каналам детекции в ПЦР-смесь содержится смесь флуорофоров. Сигналы от флуорофоров с близкими по значению длинами волн испускания флуоресценции частично перекрываются, например, сигнал от синего флуорофора частично попадает и регистрируется в диапазоне зеленого канала детекции. Такая "засветка" в соседний канал уменьшает относительную яркость истинного сигнала от флуорофора, и при нормировании прибором сигнала в некоторых каналах детекции теряется до 99% сигнала, что может приводить к значимым проблемам с детекцией результатов [23, 24].

Аналитические алгоритмы прибора, как и некоторые технологические решения, которые применяют производители наборов реагентов, частично сглаживают данный эффект, но иногда это не решает проблему полностью, а оператор наблюдает её проявление в виде артефактов на электрофореграмме.

Артефакты — это вторая широко распространенная проблема, возникающая у оператора при

анализе данных STR-исследования методом STR-CE. Именно об артефактах далее пойдет речь в этой статье.

Артефактами в STR-CE являются все сигналы, наблюдаемые на электрофореграмме, нетипичные для характерной картины электрофореза образцов ДНК человека.

Можно выделить основные причины появления артефактов на электрофореграммах:

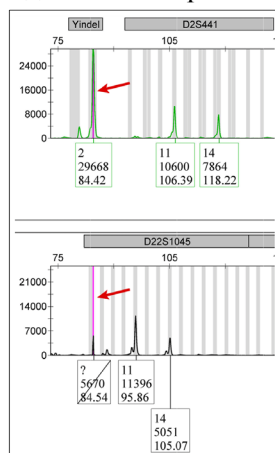
- качество и состояние реагентов для постановки анализа;
- качество загружаемых в прибор продуктов амплификации;
- неоптимальные настройки генетического анализатора (напряжение, время инъекции и др.);
- физические причины (стохастические эффекты, эффекты просачивания красителя);
- генетические особенности объекта исследования.

И если для преодоления первого ограничения методики, связанного с технической составляющей прибора, оператор ничего не может предпринять, то с артефактами анализа и алгоритмами уменьшения их количества вполне можно работать в рамках метода. После формирования ДНК-профилей тем или иным программным обеспечением (ПО) для анализа оператор должен проанализировать графики и оценить качество данных, отличить истинные сигналы от артефактов и, в конце концов, объединив данные от всех локусов, сформировать общий STR-профиль образца.

При продолжительной работе с методом и анализе данных STR-профилирования мы сталкивались с проявлениями всех основных артефактов анализа (рисунок 1), которые затрудняли интерпретацию результатов [13]. Некоторые артефакты не распознавались ПО прибора (в нашем случае GeneMapper Software 6.0), другие — приводили к ошибочным заключениям и формированию ПО некорректных STR-профилей, поэтому важно было проверять результаты вручную.

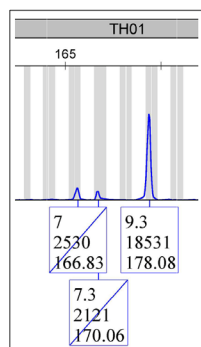
Поскольку криминалисты по всему миру уже около 30 лет [25, 26] используют STR-профилирование в своей повседневной практике для идентификации личности человека, для них разработано достаточное количество руководств и пособий по интерпретации сложных случаев из следственной практики. Также разработаны некоторые алгоритмы принятия решений о природе сигнала, основанные на разных математических подходах [27, 28]. Однако специфика исследуемых в биологических лабораториях клеточных культур и биобанках не позволяет применять на практике многие рекомендации, составленные для криминалистов. Генетическая интерпретация STR-профилей клеточных линий во многом отличается от интерпретации криминалистических образцов, потому что из-

Подтягивание красителя

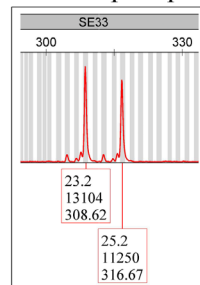


Виды артефактов

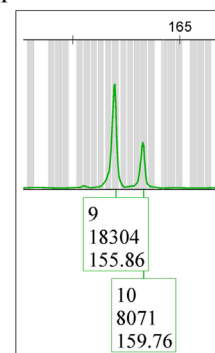
Побочные пики



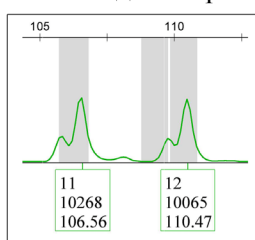
Аллель микроварианта



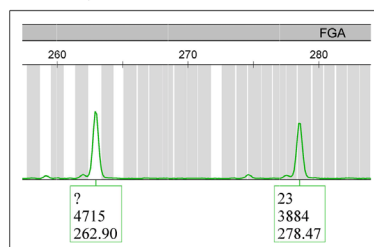
Гетерозиготный дисбаланс



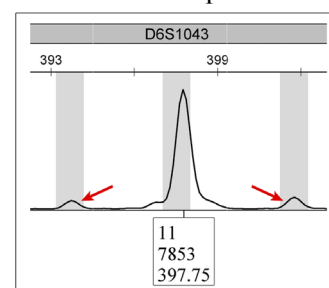
Неполное аденилирование



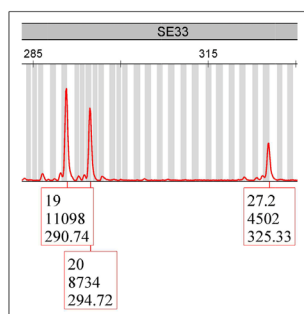
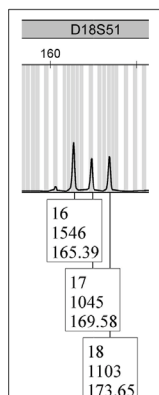
Аллель, не попадающая в лэддер



Статтеры



Триаллельные паттерны



Шум базовой линии

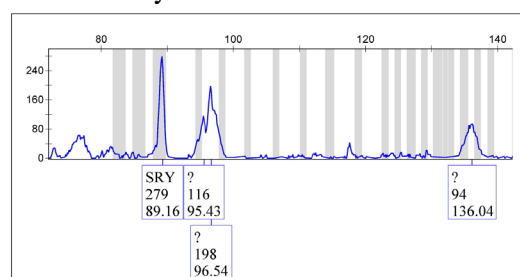


Рис. 1 Краткая схема распространенных артефактов анализа STR-CE, проиллюстрированных фрагментами электрофореграмм из лабораторной практики.

Примечание: STR-CE — short tandem repeat, products are separated by size using capillary electrophoresis (профилирование на основе коротких тандемных повторов с последующим анализом ампликонов методом капиллярного электрофоретического разделения). Цветное изображение доступно в электронной версии журнала.

за гетерогенности и анеуплоидии, встречающихся у многих иммортализованных и трансформированных клеток, электрофоретическая картина часто отличается от ожидаемых для соматических клеток человека 1-2 пиков на локус.

В настоящее время даже у одной и той же клеточной линии при изучении информации из разных источников, агрегированной международными базами данных (например, Cellosaurus), STR-профили в какой-то степени могут различаться. Причиной этого является как генетическая гетеро-

генность линии, культивируемой в условиях разных лабораторий на протяжении долгого времени, так и использование разных наборов для STR-профилирования [19].

С технической точки зрения работать с клеточными культурами проще, чем с криминалистическими образцами. Это объясняется тем, что в большинстве случаев не возникает проблем с недостатком или деградацией генетического материала и намного реже встречаются ситуации смесей ДНК в одной пробирке, т.е. применительно к исследова-

ниям на клеточных линиях — контаминация культуры клеток [13].

При соблюдении условий корректной постановки анализа и внимательном отношении к прибору и качеству реактивов, количество и интенсивность артефактов заметно снижены, зачастую в таком случае они вообще значимо не влияют и не затрудняют интерпретацию результатов анализа. Однако по разным причинам не всегда удается получить недвусмысленную электрофоретическую картину, поэтому умение работать с нестандартными результатами и отделять истинный сигнал от артефакта — важные навыки для оператора.

Самыми распространёнными артефактами STR-анализа являются шум, статтеры, побочные пики, просачивание красителя и гетерозиготный дисбаланс [20, 28]. Также встречаются капли краски, нематричное присоединение, аллели микровариантов, аллели, не попадающие в аллельную лестницу, выпадение аллелей (локусов) и триаллельные образцы [20].

Для каждого упомянутого артефакта ниже будет дано описание. Отдельные случаи возникновения артефактов, которые представляют наибольшее затруднение при интерпретации данных, будут рассмотрены подробно вместе с иллюстрациями из лабораторной практики и рекомендациями по решению проблем.

Стоит отметить, что наиболее часто встречающиеся и характерные артефакты при STR-профилеировании ДНК опухолевых клеточных линий и ДНК здорового человека (например, при установлении отцовства) различаются. В настоящей статье акцент сделан на артефакты при анализе опухолевых клеточных линий.

Шум. Шум представляет собой серию небольших невоспроизводимых пиков на уровне базовой линии, которые всегда присутствуют в результатах образцов в качестве фона и обычно не затрудняют анализ. Шум обусловлен электрическими флуктуациями в ходе электрофоретического разделения, наличием микропузырьков воздуха, мелких взвешенных частиц или кристаллов полимера в капиллярах, загрязнением в технических узлах генетического анализатора (камера насоса, окно детекции), состоянием капилляров и полимера, а также низкоуровневым загрязнением самих исследуемых образцов [29]. Мелкие взвешенные частицы, а также микропузырьки увеличивают амплитуду шума базовой линии, затрудняя распознавание пиков определяемых компонентов, поэтому до начала анализа электрофореграмм в программе для обработки данных автоматически или вручную определяется аналитический порог — LOD (Limit of Detection, предел обнаружения).

Аналитический порог (LOD) — это такое значение, выраженное в относительных единицах флу-

оресценции (Relative Fluorescence Unit, RFU), которое выражает статистический доверительный предел шумовой ошибки, обычно покрывающее 99,7% случаев (т.е. составляет три стандартных отклонения величины шума). Обычно LOD рассчитывается по формуле 1 [29]:

$$\text{LOD} = \mu_b + 3\sigma_b, (1)$$

где μ_b — среднее значение RFU сигнала базовой линии; σ_b — стандартное отклонение величины μ_b .

Или по формуле 2 [30]:

$$\text{ATin} = e^{v+kt}, (2)$$

где ATin — аналитический порог детекции, v — среднее значение RFU сигнала базовой линии, t — дисперсия натурального логарифма (логарифм по основанию e) шумовых сигналов, а k — числовой коэффициент, выбранный в соответствии с желаемым уровнем достоверности (обычно в диапазоне 3-5) [28].

Предел количественного определения — LOQ (Limit of Quantification), или стохастический предел, представляет собой величину, выраженную в относительных единицах флуоресценции — RFU (Relative Fluorescence Unit), которая задает минимальное значение интенсивности флуоресценции потенциального пика, который будет однозначно расцениваться за истинный сигнал [27]. Рассчитывается по формуле (3):

$$\text{LOQ} = \mu_b + 10\sigma_b, (3)$$

где μ_b — среднее значение RFU сигнала базовой линии; σ_b — стандартное отклонение величины μ_b .

Однако бывает, что значения RFU шумовых сигналов приближаются к заданному пороговому значению LOQ, в таком случае они могут быть приняты за пики и затруднить распознавание истинных сигналов. Самое важное отличие истинного пика от шумового заключается в том, что шумовой не воспроизводится. Поэтому, в случае получения сомнительных результатов, рекомендуется оценить электрофореграмму технического повтора исследуемого образца или провести повторный анализ.

Капли краски. На электрофореграмме такие пики имеют более пологую форму и широкое основание в отличие от истинных пиков. Обычно причиной таких капель, детектируемых на электрофореграмме, является разложение флуоресцентно-меченых праймеров вследствие их неправильного хранения или недостаточной очистки [20]. При корректной работе с коммерческими наборами реактивов данный артефакт встречается довольно редко, поскольку обычно производители проводят тщательную подготовку и очистку праймеров, входящих в состав набора, поэтому, при соблюдении условий хранения, целостность праймеров сохраняется на протяжении срока годности. На электрофореграмме пики от слипшихся фрагментов красителя можно достаточно точно отделить от истинных пиков: у таких пиков нетипичная широкая форма

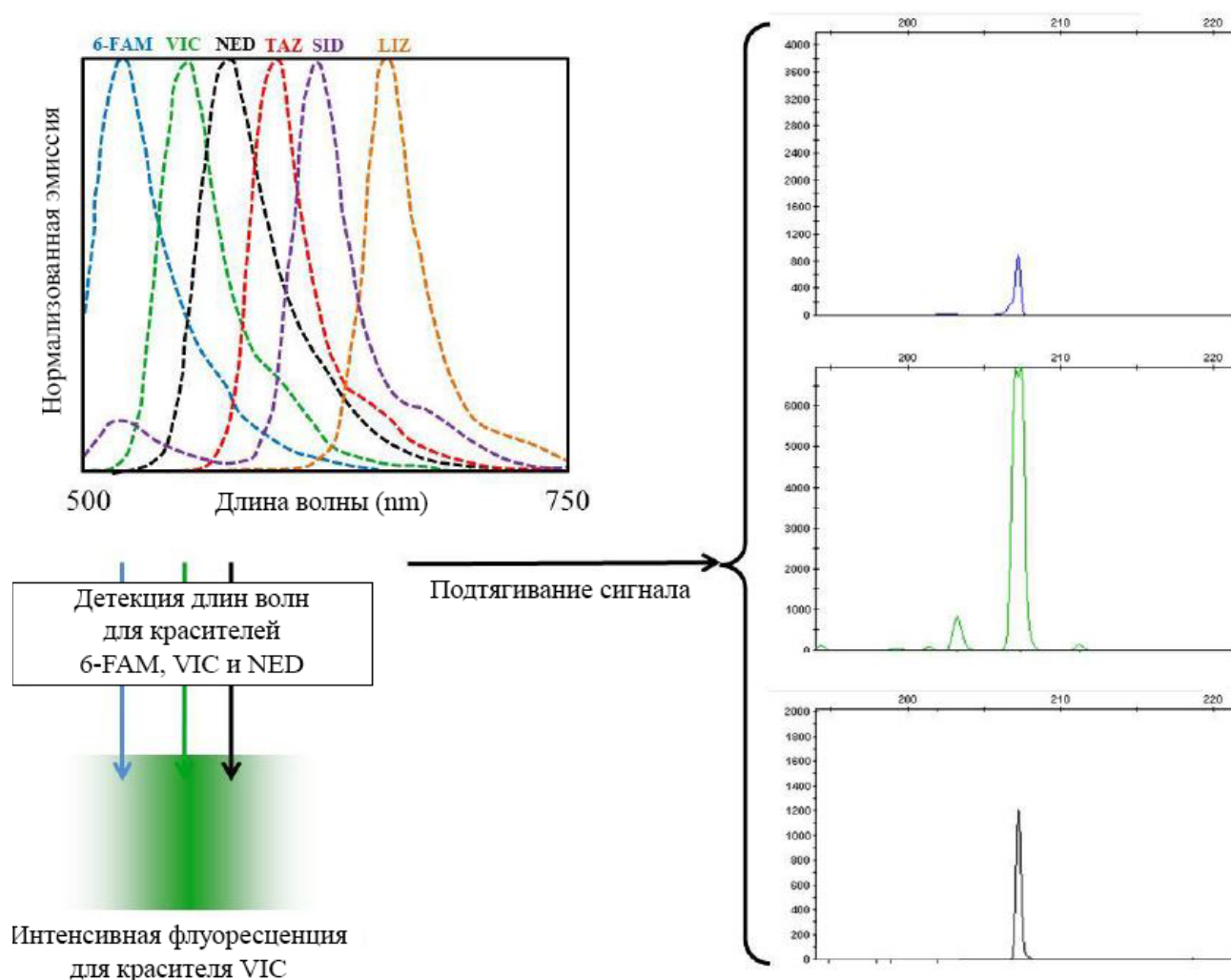


Рис. 2 Длины волн флуорофоров, использованных в наборе GlobalFiler PCR amplification kit (Life Technologies), демонстрируют пример подтягивания сигнала от красителя VIC (зеленый) в дорожки с красителями 6-FAM (голубой) и NED (черный). У электрофоретических графиков, показанных справа, вертикальная ось соответствует интенсивности сигнала в относительных единицах флуоресценции (RFU), а горизонтальная ось отображает размер ампликона количеством пар оснований (bp) (адаптировано из статьи авторов [32]).

Примечание: цветное изображение доступно в электронной версии журнала.

у основания, и они детектируются только в одном канале красителей.

Если же при работе оператор часто сталкивается с данным видом артефактов, то рекомендуется предварительная очистка амплифицированных смесей от остатков праймеров и побочных продуктов или разбавление наносимого на электрофорез ампликона в несколько раз для снижения количества таких капель краски.

Подтягивание/просачивание красителя. Как было упомянуто ранее, недостатком аналитических систем с многоканальной флуоресцентной детекцией является то, что у красителей, используемых в коммерческих наборах, диапазоны длин волн испускания флуоресценции в какой-то степени перекрываются. Поскольку прибор для капиллярного электрофореза имеет только один лазер для возбуждения флуоресценции, при детекции это при-

водит к просачиванию сигнала от одного флуорофора в канал соседнего. Для сглаживания данного явления ПО прибора математически нормализует выходные данные, разделяя полученный с ячейки детекции сигнал по отдельным каналам, вычитая долю перекрываемого сигнала [24, 31]. Это практически всегда позволяет корректно соотнести сигналы от разных флуорофоров и избежать проблем при анализе данных оператором, несмотря на большую потерю сигнала в некоторых каналах.

Просачивание красителя возникает, когда избыточное количество фрагментов, меченных определенным флуорофором, обнаруживается CCD-камерой, и на соответствующей этому красителю полосе электрофореграммы образуется пик крайне высокой интенсивности. В таком случае на дорожках соседних красителей со смежной длиной испускания флуоресценции в той же точке по горизон-

тальной оси будут наблюдаться побочные ложные пики нетипичной формы более низкой интенсивности [32].

Как это выглядит на электрофореграмме: крайне высокий пик в зеленом канале красителя и острый узкий пик в синем канале, регистрируемый в той же позиции по горизонтальной оси времени или длины нуклеотидной последовательности (рисунок 2).

Часто такой артефакт можно наблюдать, когда в смесь для ПЦР добавляется избыточное количество матричной ДНК [31]. Такие пики, если они имеют значительную высоту, могут остаться нераспознанными ПО как артефакты и быть принятыми за истинные аллели, поэтому важна дополнительная проверка результатов оператором. Важной особенностью идентификации данного вида артефактов является то, что небольшие пики-выбросы регистрируются только в соседних каналах детекции и строго в той же позиции по горизонтальной оси. Повторная амплификация с меньшим количеством вводимой ДНК или разведение в 10 раз исследованной пробы при внесении на планшет прибора может свести проявление данного артефакта к минимуму.

Статтеры. Статтеры (англ. Stutter) — это самые распространенные артефакты анализа [33]. Они образуются при амплификации как минорные побочные ПЦР-продукты, содержащие на кратное количество (один, реже два) больше или меньше микросателлитных повторов основного аллеля, и обозначаются как $n \pm 1, 2, 3$ -статтер, где n — истинное число микросателлитных повторов в образце.

Возможный механизм образования статтеров — некорректная транскрипция полимеразой целевого участка. Такая ситуация возникает, когда после начала синтеза нуклеотидной цепи с праймера матричная цепь и праймер по какой-то причине частично диссоциируют [34]. Если такое происходит во время ПЦР, но впоследствии праймер и матричная цепь повторно отжигаются с полной точностью и амплификация продолжается, то реакция дает только один целевой продукт. Неправильный повторный отжиг с образованием шпилек на матричной цепи или праймере и амплификация такой молекулы могут приводить к образованию и накоплению нескольких побочных продуктов длиной $n \pm 1, 2, 3 \dots$ наряду с целевым [20]. В этом случае на электрофореграмме рядом с истинными появляются небольшие дополнительные ложные пики, которые и называются статтерами.

Обычно, на частоту появления и высоту статтеров влияют такие факторы, как [20, 25]:

- количество нуклеотидов в единице повторов (динуклеотидные повторы характеризуются большим количеством статтеров, чем тетрануклеотидные);
- степень однородности и сложности тандемного повтора (у простых тандемных повторов высота статтеров выше, чем у сложных и составных);

- длина аллеля в локусе (чем больше повторов содержится в локусе, тем чаще детектируются статтеры аллелей).

Самый часто встречающийся статтер — это $n-1$, поскольку такой ампликон накапливается при однократном изменении длины матричной цепи или праймера во время частичной диссоциации, и это событие — самое энергетически выгодное из возможных для образования статтеров [20]. В основном (95% случаев), при амплификации достаточного количества ДНК высота статтеров не превышает порог в 15% [25, 35]. Соотношение высоты пика статтера к высоте истинного пика измеряется отношением высоты статтера к сумме высот этого статтера и истинного пика в % [36]. Чаще при интерпретации используют коэффициент статтера, который равен отношению высоты статтера к высоте истинного пика (в %) [34].

Программы для обработки данных STR-профилирования обычно имеют фильтр, который позволяет исключать пики статтеров, если отношение их высоты к высоте основного (истинного) пика $\leq 20\%$ [20, 35]. Некоторые программы позволяют выставить % порог фильтра вручную и индивидуально под каждый из маркеров, поскольку существует огромное количество исследований, направленных на изучение диапазона высот статтеров в зависимости от локуса, популяционных и этнических особенностей генотипа и др. [37].

При работе с клеточными линиями такая тщательная настройка отдельных для каждого локуса коэффициентов статтера не требуется, поскольку в сложных случаях почти всегда есть возможность повторить анализ, благодаря достаточному стартовому количеству ДНК и оптимальному качеству генетического материала, в отличие от криминалистических образцов.

Сложность при интерпретации результатов клеточных линий бывает в том случае, когда образец контаминирован или по какой-либо другой причине содержит ДНК из нескольких источников, тогда аллели минорного контрибьютора могут быть приняты за статтеры и наоборот; это определенно усложняет детекцию контаминации и определение истинного STR-профиля исследуемого образца.

Шипы, побочные пики. Это узкие, резкие и относительно высокие пики на графике, которые появляются из-за флуктуации напряжения в ходе анализа. Флуктуации напряжения могут быть вызваны присутствием пузырьков воздуха в капилляре, инородных частиц (например, пыли) или образованием кристаллов полимера или формамида. Обычно программы при обработке первичных данных хорошо справляются с задачей по распознаванию и исключению таких артефактов, но иногда их приходится исключать из анализа вручную.

Шипы, если они не появляются вдоль истинного пика, как правило, появляются в одной и той же точ-

ке данных во всех каналах красителей, эта характерная особенность позволяет отличить их от других артефактов. Появление таких всплесков можно свести к минимуму, используя свежий набор реагентов и образцов. Однако частое появление побочных пиков и шипов свидетельствует о неисправности системы.

Нематричное присоединение. Это известный артефакт ПЦР, который возникает из-за того, что некоторые полимеразы обладают внутренней, независимой от матрицы, полимеразной активностью, ответственной за добавление некодируемого матрицей остатка аденина, как правило, к вновь синтезированной цепи [20].

Полимераза Таq, например, после окончания синтеза дочерней цепи ДНК добавляет нуклеотиды уже без матрицы, в основном аденин (аденилирование), к 3'-концу продукта ПЦР, в результате чего некоторые продукты ПЦР становятся на одно основание больше, чем продукт от истинного аллеля. Причина такого поведения некоторых полимераз не ясна до конца, известно, что нематричное присоединение нуклеотидов, их количество и тип зависят от семейства полимеразы, от типа последнего нуклеотида в матрице, последовательности праймера, от расположения флуоресцентного красителя и от соотношения количества полимеразы и ДНК в реакционной смеси, а также от условий проведения ПЦР [38].

Аденилирование приводит к расщеплению пиков. Помимо соответствующего основному продукту, появляется дополнительный пик, расположенный на расстоянии ± 1 нуклеотид от основного. Тандем пиков в такой ситуации называют +А и -А.

Условия амплификации и полимеразы большинства коммерческих наборов реагентов для STR-профилирования хорошо сбалансированы за счет различных приёмов (особая нуклеотидная последовательность праймеров, добавление рестрикционных ферментов, модифицированная полимеразы), поэтому такой артефакт, как нематричное присоединение, встречается довольно редко в анализе, и ампликоны имеют одинаковую длину. В таких случаях причиной неполного аденилирования может стать высокая начальная концентрация ДНК относительно реакционной ёмкости ПЦР-смеси.

Если при анализе продуктов мультиплексной ПЦР на электрофореze все-таки обнаруживается картина +А и -А пиков, то чтобы предотвратить такое дробление сигнала и способствовать полному аденилированию ампликонов, обычно к заключительному этапу ПЦР добавляют 10–60 мин инкубации образцов при 60 или 72°С [20]. Если причиной неполного аденилирования стала высокая концентрация внесенной в реакцию ДНК, то такие образцы можно разбавить буфером для ПЦР, добавить полимеразы и провести элонгацию в ПЦР-амплификаторе.

Аллели, не попадающие в диапазон аллельной лестницы. Это пики, имеющие форму истинных

пиков аллелей и находящиеся в диапазоне нуклеотидного размера конкретного маркера, которые выбраковываются или не определяются ПО для анализа электрофореграмм из-за непредставленности в аллельной лестнице (reference ladder) [39]. Входящая в любой коммерческий набор по STR-профилированию аллельная лестница содержит в себе смесь аллелей, которые наиболее широко встречаются по популяции [20]. По частоте встречаемости тех или иных аллелей в различных популяциях написано много статей, на эти данные опираются и при разработке наборов реагентов [20, 25, 32, 40–43].

Однако человеческая популяция может содержать редкие аллели, которые отличны от входящих в состав набора реактивов. При анализе клеточных линий, особенно опухолевых, также встречаются нетипичные аллели, что связано с большей скоростью их генетических изменений или межвидовой контаминацией образца.

Редкий аллель, который все-таки амплифицируется, а соответствующий ему пик не попадает в границы диапазона заданных коммерческой панелью аллелей, называется аллелем, не попадающим в диапазон аллельной лестницы (off-ladder allele, OL) [20]. В таких случаях полученный результат подтверждают повторной постановкой образца на анализ. Если результат воспроизводится, а в литературе или базах данных есть информация о существовании такого аллеля, его можно считать истинным. В некоторых ПО можно задать значение такого аллеля (т.е. отобразить численно количество тандемных повторов), но это приходится делать вручную при анализе результатов оператором.

Если при повторном анализе пик не воспроизводится, следует заподозрить другой вид артефакта, например, побочный пик, шип, каплю краски, шум или внутривидовую контаминацию.

Аллели микровариантов. Иногда при анализе электрофореграмм можно столкнуться с истинными пиками, которые не представлены в лэддере, а количество тандемных повторов таких детектируемых фрагментов представляет собой не кратное число повторяющихся элементов, а, например, 14 целых единиц повтора (AGAA) и один неполный повтор (AG) в каком-либо месте последовательности. В таком случае возникает микровариантная аллель 14.2, что соответствует 14 полным повторам и 2 нуклеотидам неполного. Чаще всего такие микроварианты встречаются в высокополиморфных локусах, самые распространенные микроварианты включены в состав аллельной лестницы и не представляют проблем при анализе [20, 25].

При изучении оператором электрофореграмм такие нетипичные (неопределяемые ПО) микроварианты аллелей можно задать вручную после исключения других возможных причин для появления рассматриваемого артефакта и повторного

анализа. Надежным доказательством для подтверждения данного микроварианта служит секвенирование целевого участка. При анализе опухолевых клеточных линий появление микровариантов не редко, поскольку клетки предрасположены к хромосомным перестройкам, поломкам и менее драматичным изменениям генома.

Выпадение аллеля (выпадение аллельных вариантов). Это случай, когда в локусе не наблюдается сигнала от одного из аллелей (если таковой предполагается, например, если профиль клеточной культуры известен по генетическому паспорту заранее) или вообще отсутствуют пики накопления продукта ПЦР. Причин этому может быть много, их можно разделить на две категории: генетические изменения и технические проблемы анализа.

К основным генетическим причинам можно отнести мутации в сайтах связывания праймера, а для опухолевых клеточных линий следует упомянуть потерю и поломку частей или целых хромосом, что также может приводить к потере аллелей [44, 45]. Технические причины выпадения аллеля могут быть связаны с проблемами амплификации из-за деградированной ДНК (распространенная проблема у криминалистов) или ингибиторов ПЦР. Ингибиторы ПЦР могут попасть в реакционную смесь вместе с биоматериалом или в процессе выделения ДНК и не до конца элиминироваться в процессе очистки препарата нуклеиновой кислоты.

Поскольку современные методы выделения ДНК из клеточных культур в лаборатории позволяют выделять препараты ДНК, удовлетворяющие требованиям STR-анализа, в случае выпадения аллелей при анализе клеточных культур влияние генетического фактора более вероятно. Это можно подтвердить повторной постановкой образца, а чтобы исследовать причину такого результата, необходимо применение дополнительных методов (секвенирование фрагмента последовательности, кариотипирование и др.).

Триаллельный образец. В некоторых случаях можно наблюдать три аллеля в локусе STR-профиля аутосомной ДНК в образце из одного источника [45, 46]. При анализе ДНК человека данный артефакт может быть обусловлен мутацией соматических клеток на раннем этапе развития эмбриона или событиями хромосомной дупликации и перестройки в зародышевой линии, но также может наблюдаться, например, при синдроме Дауна или других генетических особенностях индивида [46, 47]. В случае анализа STR-профилей опухолевых образцов, полученные данные следует интерпретировать исходя из особенностей возможной генетической организации опухолевых клеток: наличие нескольких ядер, наличие лишнего фрагмента хромосомы или целой хромосомы, многочисленные мутации или сосуществование нескольких субклонов в клеточном флаконе.

Было установлено два типа триаллельных паттернов [20]:

- 1 тип, где сумма высот пиков двух аллелей равна высоте пика третьего аллеля (встречается чаще по сравнению с 2 типом [48]);
- 2 тип, где высота пиков трех аллелей уравновешена по своей высоте.

При анализе электрофореграмм клеточных линий в лаборатории наличие "лишних" (когда присутствует >2) пиков в нескольких локусах может свидетельствовать о смешанном образце ДНК из разных источников, например, из-за наличия нескольких субклонов или внутривидовой контаминации. Однако, если картина трёх пиков регистрируется только в одном локусе, вероятнее всего, это генетически обусловленный артефакт.

В некоторых случаях может наблюдаться ложный триаллельный паттерн, когда крайний пик вне аллельной лестницы от соседнего маркера неправильно интерпретирован. Кроме того, иногда триаллельный паттерн 1 типа может представлять собой 2 истинных аллеля и ложно принятый за аллель крайне высокий статтер между ними, полученный суммарным побочным продуктом обоих аллелей, если они расположены рядом, например, 14, 15 и 16 аллели. На такие случаи следует обращать внимание при интерпретации данных.

Гетерозиготный дисбаланс. Поскольку диплоидный набор хромосом человека состоит из пар соответствующих хромосом, можно было бы предположить, что амплификация ПЦР-продуктов с локуса на каждой хромосоме из пары должна проходить равноценно, соответственно, количество ПЦР-продукта и величина детектируемого сигнала от каждой аллели при STR-профилировании должны быть примерно равны. На деле же, взаимосвязь между количеством исходной матрицы и высотой пиков аллелей имеет стохастический характер. Это объясняется следующими факторами: эффективностью экстракции и амплификации, стохастическим распределением молекул ДНК при отборе пробы дозатором на всех этапах пробоподготовки, а также длиной и нуклеотидной последовательностью амплифицируемых фрагментов [25].

Следовательно, мы наблюдаем картину гетерозиготного дисбаланса сигналов, которая выглядит так: на электрофореграмме в одном локусе два пика с довольно большой разницей высот (например, высота аллеля 2 составляет всего 68% от высоты аллеля 1).

Гетерозиготный дисбаланс наблюдается всегда, но в разной степени выраженности. Был подсчитан допустимый ("безопасный" для принятия решений о статусе сигнала) диапазон гетерозиготного дисбаланса, и он составляет 0,6-1,66. Рассчитать данный параметр можно, применяя наиболее распространенную формулу для подсчета гетерозиготного дисбаланса (4), эта рекомендация выглядит так:

$$0,6 \leq H_b = \frac{\phi_{HMM}}{\phi_{LMW}} \leq 1,66, (4)$$

где H_b — степень гетерозиготного дисбаланса; ϕ_{HMM} — величина сигнала пика аллеля локуса с большим молекулярным весом (RFU); ϕ_{LMW} — величина сигнала низкого пика локуса с меньшим молекулярным весом (RFU).

Таким образом, при наблюдении гетерозиготного дисбаланса, попадающего в заданный диапазон, мы можем валидировать обе наблюдаемые аллели. Однако если разница высот пиков аллелей значительна, стоит подвергнуть сомнению такое простое разрешение электрофоретической картины, потому что причиной может быть целый спектр событий: неэффективная амплификация аллеля из-за мутаций в праймерной области, контаминация посторонней ДНК, побочный пик и т.д.

Заключение

Артефакты анализа — это, несомненно, проблема и неотъемлемая часть работы с данным молекулярно-генетическим методом. Их влияние на конечный результат можно свести к минимуму при использовании реактивов высокого качества, корректных концентраций ДНК в оптимальных диапазонах, заданных производителями наборов для исследования, при постоянном техническом обслуживании прибора.

Однако эти условия не всегда удается поддерживать в лаборатории, поэтому встреча с артефактами неизбежна, и зачастую это означает, что оператор должен вручную проверять полученные результаты. Тем не менее, зная характерные особенности каж-

дой группы артефактов, можно довольно эффективно интерпретировать полученные данные и получать надежные результаты.

Кроме того, стоит обратить внимание на положительный аспект данного явления — артефакты могут рассматриваться операторами как дополнительный качественный индикатор состояния всей системы, поэтому, зная причины их возникновения и характерные особенности, можно не только безошибочно детектировать и исключать их, получая корректные результаты, но и определять уязвимости в процессе работы.

В рамках проекта по созданию биобанка на базе НМИЦ онкологии им. Н. Н. Блохина нами проведена значительная работа по STR-профилированию образцов клеточных культур. По ходу работы мы сталкивались с проявлениями основных, затрудняющих интерпретацию результатов, артефактов анализа. Были опробованы найденные в литературе методики варьирования условий анализа, которые позволили сгладить негативный эффект артефактов на результаты. Таким образом, можно заключить, что наши эмпирические наблюдения согласуются с данными, приведенными в литературе.

Отношения и деятельность. Работа выполнена при финансовой поддержке Министерства науки и высшего образования Российской Федерации в рамках научно-исследовательской работы № 075-15-2021-1060 "Создание и развитие биоресурсной коллекции генетически и фенотипически охарактеризованных клеточных линий и первичных опухолей человека".

Литература/References

- Nardone RM. Eradication of cross-contaminated cell lines: a call for action. *Cell Biol Toxicol.* 2007;23(6):367-72. doi:10.1007/s10565-007-9019-9.
- Freedman LP, Gibson MC, Ethier SP, et al. Reproducibility: changing the policies and culture of cell line authentication. *Nat Methods.* 2015;12(6):493-7. doi:10.1038/nmeth.3403.
- Freedman LP, Gibson MC, Wisman R, et al. The culture of cell culture practices and authentication — Results from a 2015 Survey. *Biotechniques.* 2015;59(4):189-90. doi:10.2144/000114344.
- Bian X, Yang Z, Feng H, et al. A Combination of Species Identification and STR Profiling Identifies Cross-contaminated Cells from 482 Human Tumor Cell Lines. *Sci Rep.* 2017;7:9774. doi:10.1038/s41598-017-09660-w.
- Souren NY, Fusenig NE, Heck S, et al. Cell line authentication: a necessity for reproducible biomedical research. *EMBO J.* 2022; 41(14):e111307. doi:10.15252/embj.2022111307.
- Lin LC, Elkashty O, Ramamoorthi M, et al. Cross-contamination of the human salivary gland HSG cell line with HeLa cells: A STR analysis study. *Oral Dis.* 2018;24(8):1477-83. doi:10.1111/odi.12920.
- Horbach SPJM, Halfman W. The ghosts of HeLa: How cell line misidentification contaminates the scientific literature. *PLoS One.* 2017;12(10):e0186281. doi:10.1371/journal.pone.0186281.
- Ye F, Chen C, Qin J, et al. Genetic profiling reveals an alarming rate of cross-contamination among human cell lines used in China. *FASEB J.* 2015;29(10):4268-72. doi:10.1096/fj.14-266718.
- Korch C, Hall EM, Dirks WG, et al. Authentication of M14 melanoma cell line proves misidentification of MDA-MB-435 breast cancer cell line. *Int J Cancer.* 2018;142(3):561-72. doi:10.1002/ijc.31067.
- Almeida JL, Cole KD, Plant AL. Standards for Cell Line Authentication and Beyond. *PLoS Biol.* 2016;14(6):e1002476. doi:10.1371/journal.pbio.1002476.
- Vicente E, Lesniewski M, Newman D, et al. Best Practices for Authentication of Cell Lines to Ensure Data Reproducibility and Integrity. *Radiat Res.* 2022;197(3):209-17. doi:10.1667/RADE-21-00148.1.
- Yu M, Selvaraj SK, Liang-Chu MM, et al. A resource for cell line authentication, annotation and quality control. *Nature.* 2015; 520(7547):307-11. doi:10.1038/nature14397.
- Kosobokova EN, Malchenkova AA, Kalinina NA, et al. Using short tandem repeat profiling to validate cell lines in biobanks. *Cardiovascular Therapy and Prevention.* 2022;21(11):3386. (In Russ.) Кособокова Е. Н., Мальченкова А. А., Калинина Н. А. и др. Использование метода профилирования на основе коротких tandemных повторов для подтверждения подлинности клеточных линий в биобанках. *Кардиоваскулярная терапия и профилактика.* 2022;21(11):3386. doi:10.15829/1728-8800-2022-3386.
- Anisimov SV, Axmerov TM, Balanovskij OP, et al. Biobanking. *National Guide.* Moscow: ООО "Izdatel'stvo TRIUMF", 2022. 308 p. (In Russ.) Анисимов С. В., Ахмеров Т. М., Балановский О. П. и др. Биобанкирование. Национальное руководство. М.: ООО "Издательство ТРИУМФ", 2022. 308 с. ISBN 978-5-93673-322-2.

15. Parson W, Kirchbner R, Mühlmann R, et al. Cancer cell line identification by short tandem repeat profiling: power and limitations. *FASEB J*. 2005;19(3):434-6. doi:10.1096/fj.04-3062fje.
16. Almeida JL, Hill CR, Cole KD. Mouse cell line authentication. *Cyto-technology*. 2014;66(1):133-47. doi:10.1007/s10616-013-9545-7.
17. Almeida JL, Dakic A, Kindig K, et al. Interlaboratory study to validate a STR profiling method for intraspecies identification of mouse cell lines. *PLoS One*. 2019;14(6):e0218412. doi:10.1371/journal.pone.0218412.
18. Almeida JL, Hill CR, Cole KD. Authentication of African green monkey cell lines using human short tandem repeat markers. *BMC Biotechnol*. 2011;11:102. doi:10.1186/1472-6750-11-102. PMID: 22059503; PMCID: PMC3221628.
19. Chen YH, Connelly JP, Florian C, et al. Short tandem repeat profiling via next-generation sequencing for cell line authentication. *Dis Model Mech*. 2023;16(10):dmm050150. doi:10.1242/dmm.050150.
20. Butler JM. "Chapter 3 — STR alleles and amplification artifacts," in *Advanced topics in forensic DNA typing: Interpretation*. Editor JM Butler (San Diego: Academic Press, 2015:47-86). ISBN: 978-0-12-405213-0.
21. Gilbert DA, Reid YA, Gail MH, et al. Application of DNA fingerprints for cell-line individualization. *Am J Hum Genet*. 1990;47(3):499-514.
22. Bukreev YuM, Kosobokova EN, Kardashova SS, et al. DNA-markers for genetic monitoring of laboratory mouse. *Russian Journal of Biotherapy*. 2017;16(3):86-91. (In Russ.) Букреев Ю.М., Кособокова Е.Н., Кардашова С.С. Мониторинг чистоты линий лабораторных мышей с использованием ДНК-маркеров. *Российский биотерапевтический журнал*. 2017;16(3):86-91. doi:10.17650/1726-9784-2017-16-3-86-91.
23. Goor RM, Forman Neall L, Hoffman D, et al. A mathematical approach to the analysis of multiplex DNA profiles. *Bull Math Biol*. 2011;73(8):1909-31. doi:10.1007/s11538-010-9598-0.
24. Mohammed O, Assaleh K, Hussein G, et al. Novel algorithms for accurate DNA base-calling. *J Biomed Sci Eng*. 2013;6:165-74. doi:10.4236/jbise.2013.62020.
25. Gill P, Haned H, Bleka O, et al. Genotyping and interpretation of STR-DNA: Low-template, mixtures and database matches — Twenty years of research and development. *Forensic Sci Int Genet*. 2015;18:100-17. doi:10.1016/j.fsigen.2015.03.014.
26. Puch-Solis R, Pope S. Interpretation of DNA data within the context of UK forensic science — evaluation. *Emerg Top Life Sci*. 2021;5(3):405-13. doi:10.1042/ETLS20200340.
27. Gill P, Gusmão L, Haned H, et al. DNA commission of the International Society of Forensic Genetics: Recommendations on the evaluation of STR typing results that may include drop-out and/or drop-in using probabilistic methods. *Forensic Sci Int Genet*. 2012;6(6):679-88. doi:10.1016/j.fsigen.2012.06.002.
28. Karkar S, Alfonse LE, Grgicak CM, et al. Statistical modeling of STR capillary electrophoresis signal. *BMC Bioinformatics*. 2019;20:584. doi:10.1186/s12859-019-3074-0.
29. Gilder JR, Doom TE, Inman K, et al. Run-specific limits of detection and quantitation for STR-based DNA testing. *J Forensic Sci*. 2007;52(1):97-101. doi:10.1111/j.1556-4029.2006.00318.x.
30. Mönich UJ, Duffy K, Médard M, et al. Probabilistic characterisation of baseline noise in STR profiles. *Forensic Sci Int Genet*. 2015;19:107-22. doi:10.1016/j.fsigen.2015.07.001.
31. Goor RM, Hoffman D, Riley GR. Novel Method for Accurately Assessing Pull-up Artifacts in STR Analysis. *Forensic Sci Int Genet*. 2021;51:102410. doi:10.1016/j.fsigen.2020.102410.
32. Taylor D, Powers D. Teaching artificial intelligence to read electropherograms. *Forensic Sci Int Genet*. 2016;25:10-8. doi:10.1016/j.fsigen.2016.07.013.
33. Vilsen SB, Tvedebrink T, Eriksen PS, et al. Stutter analysis of complex STR MPS data. *Forensic Sci Int Genet*. 2018;35:107-12. doi:10.1016/j.fsigen.2018.04.003.
34. Agudo MM, Aanes H, Roseth A, et al. A comprehensive characterization of MPS-STR stutter artefacts. *Forensic Sci Int Genet*. 2022;60:102728. doi:10.1016/j.fsigen.2022.102728.
35. Duffy KR, Gurram N, Peters KC, et al. Exploring STR signal in the single- and multicopy number regimes: Deductions from an in silico model of the entire DNA laboratory process. *Electrophoresis*. 2017;38(6):855-68. doi:10.1002/elps.201600385.
36. Taylor D, Bright JA, McGoven C, et al. Validating multiplexes for use in conjunction with modern interpretation strategies. *Forensic Sci Int Genet*. 2016;20:6-19. doi:10.1016/j.fsigen.2015.09.011.
37. Purps J, Siegert S, Willuweit S, et al. A global analysis of Y-chromosomal haplotype diversity for 23 STR loci. *Forensic Sci Int Genet*. 2014;12(100):12-23. doi:10.1016/j.fsigen.2014.04.008.
38. Zhou Y, Bo F, Tian T, et al. Excessive addition split peak formed by the non-templated nucleotide addition property of Taq DNA polymerase after PCR amplification. *Front Bioeng Biotechnol*. 2023;11:1180542. doi:10.3389/fbioe.2023.1180542.
39. Gordon EM, Sturk-Andreaggi K, Warnke-Sommer J, et al. Next generation sequencing of STR artifacts produced from historical bone samples. *Forensic Sci Int Genet*. 2020;49:102397. doi:10.1016/j.fsigen.2020.102397.
40. Song B, Fu J, Guo K. A Tibetan group from Ngawa Tibetan and Qiang Autonomous Prefecture, southwest China, is rich in genetic polymorphisms at 36 autosomal STR loci and shares a complex genetic structure with other Chinese populations. *Heliyon*. 2023;9(12):e23005. doi:10.1016/j.heliyon.2023.e23005.
41. Bottinelli M, Gouy A, Utz S, et al. Population genetic analysis of 12 X-chromosomal STRs in a Swiss sample. *Int J Legal Med*. 2022;136(2):561-3. doi:10.1007/s00414-021-02684-y.
42. Ashirbekov Y, Seidualy M, Abaildayev A, et al. Genetic polymorphism of Y-chromosome in Kazakh populations from Southern Kazakhstan. *BMC Genomics*. 2023;24(1):649. doi:10.1186/s12864-023-09753-z.
43. Lang Y, Guo F, Niu Q. StatsX v2.0: the interactive graphical software for population statistics on X-STR. *Int J Legal Med*. 2019;133(1):39-44. doi:10.1007/s00414-018-1824-6.
44. Risinskaya NV, Kozhevnikova Ya, Kovaleva V, et al. Loss of heterozygosity in the short tandem repeat (STR) profile of tumor DNA in patients with de novo diagnosed acute lymphoblastic leukemia as a pattern of abnormal tumor karyotype. *Cellular Therapy and Transplantation*. 2020;9(3):22-3. (In Russ.) Рисинская Н.В., Кожевникова Я., Ковалева В. и др. Потеря гетерозиготности в профиле коротких tandemных повторов (STR) опухолевой ДНК у пациентов с de novo диагностированным острым лимфобластным лейкозом как паттерн аномального кариотипа опухоли. *Клеточная терапия и трансплантация*. 2020;9(3):22-3. doi:10.18620/ctt-1866-8836-2020-9-3-1-152. EDN VSSEKO.
45. Kosobokova EN, Kalinina NA, Konoplina KM, et al. Human Metastatic Melanoma Cell Lines Panel for In Vitro and In Vivo Investigations. *J Mol Pathol*. 2024;5(1):11-27. doi:10.3390/jmp5010002.
46. Fan J, Zhang AP, Zheng ZZ, et al. A Case of Type 1 Triallelic Patterns at D5S818, D18S51, D6S1043, and FGA Demonstrated by Short Tandem Repeat Analysis. *Int J Clin Pract*. 2022;2022:8600125. doi:10.1155/2022/8600125.
47. Gymrek M. A genomic view of short tandem repeats. *Curr Opin Genet Dev*. 2017;44:9-16. doi:10.1016/j.gde.2017.01.012.
48. Yang Q, Shen Y, Shao C, et al. Genetic analysis of tri-allelic patterns at the CODIS STR loci. *Mol Genet Genomics*. 2020;295(5):1263-8. doi:10.1007/s00438-020-01701-w.

Стратегии создания биоресурсных коллекций в акушерстве: опыт Биобанка "Генофонд"

Пачулия О.В.¹, Илларионов Р.А.¹, Вашукова Е.С.¹, Постникова Т.Б.¹, Мальцева А.Р.¹,
Попова А.К.¹, Корнюшина Е.А.¹, Беспалова О.Н.^{1,2}, Глотов А.С.^{1,2}

¹ФГБНУ "Научно-исследовательский институт акушерства, гинекологии и репродуктологии им. Д. О. Отта". Санкт-Петербург;

²ФГБОУ ВО "Санкт-Петербургский государственный университет". Санкт-Петербург, Россия

В статье освещен опыт Биобанка "Генофонд" ФГБНУ "НИИ АГиР им. Д. О. Отта" по созданию биоресурсных коллекций, представляющих стратегическое научное и практическое значение в области современного акушерства. Для создания различных типов коллекций впервые были сформулированы принципиально различающиеся стратегии биобанкирования образцов: "единовременное" и "лонгитюдное" (динамическое). Даны определения данным подходам, отмечены наиболее значимые преимущества и недостатки каждого из них. Приведены примеры пилотных исследований, проведенных на платформе биоресурсной коллекции, созданной с применением наиболее сложного подхода — "лонгитюдного" биобанкирования. Такой подход позволил на примере анализа микроРНК продемонстрировать возможности изучения закономерностей физиологических изменений при беременности на современном этапе, а также перспективы поиска ранних предикторов осложнений беременности.

Ключевые слова: биоресурсные коллекции, "лонгитюдное" банкирование, "единовременное" банкирование, беременность, физиология беременности, предикторы осложнений гестации.

Отношения и деятельность. Исследование поддержано грантом РФФИ 197520033-П.

Поступила 16/09-2024

Рецензия получена 29/09-2024

Принята к публикации 09/10-2024



Для цитирования: Пачулия О.В., Илларионов Р.А., Вашукова Е.С., Постникова Т.Б., Мальцева А.Р., Попова А.К., Корнюшина Е.А., Беспалова О.Н., Глотов А.С. Стратегии создания биоресурсных коллекций в акушерстве: опыт Биобанка "Генофонд". *Кардиоваскулярная терапия и профилактика*. 2024;23(11):4193. doi: 10.15829/1728-8800-2024-4193. EDN KDQVRN

Strategies for bioresource collection in obstetrics: the experience of the "Genofund" biobank

Pachulia O. V.¹, Illarionov R. A.¹, Vashukova E. S.¹, Postnikova T. B.¹, Maltseva A. R.¹, Popova A. K.¹, Korniyushina E. A.¹, Besspalova O. N.^{1,2}, Glotov A. S.^{1,2}

¹Ott Research Institute of Obstetrics, Gynecology and Reproductology. Saint Petersburg; ²Saint Petersburg State University. Saint Petersburg, Russia

The article highlights the experience of the "Genofund" biobank of the Ott Research Institute of Obstetrics, Gynecology and Reproductology in bioresource collection in modern obstetrics. To create different types of collections, the following different biobanking strategies were formulated for the first time: cross-sectional and longitudinal (dynamic). Definitions are given for these approaches. The most significant advantages and disadvantages of each of them are noted. Examples of pilot studies conducted on the platform of a bioresource collection created using the complex longitudinal biobanking are given. This approach made it possible to demonstrate, using the example of microRNA analysis, the potential of studying the physiological changes during pregnancy at the present stage, as well as the prospects for finding early predictors of pregnancy complications.

Keywords: bioresource collections, longitudinal banking, cross-sectional banking, pregnancy, pregnancy physiology, pregnancy complications.

Relationships and Activities. The study was supported by the grant of the Russian Science Foundation 197520033-P.

Pachulia O. V. ORCID: 0000-0003-4116-0222, Illarionov R. A. * ORCID: 0000-0003-2711-748X, Vashukova E. S. ORCID: 0000-0002-6996-8891, Postnikova T. B. ORCID: 0000-0002-8227-2629, Maltseva A. R. ORCID: 0000-0002-5647-6783, Popova A. K. ORCID: 0009-0008-3512-2557, Korniyushina E. A. ORCID: 0009-0003-5918-2697, Besspalova O. N. ORCID: 0000-0002-6542-5953, Glotov A. S. ORCID: 0000-0002-7465-4504.

*Автор, ответственный за переписку (Corresponding author):

e-mail: r.a.illarionov@gmail.com

[Пачулия О.В. — к.м.н., ученый секретарь, ORCID: 0000-0003-4116-0222, Илларионов Р.А. — м.н.с. Биобанка "Генофонд" отдела геномной медицины им. В.С. Баранова, специалист РЦ "Центр Биобанк" Научного парка, ORCID: 0000-0003-2711-748X, Вашукова Е.С. — к.б.н., н.с. лаборатории геномики отдела геномной медицины им. В.С. Баранова, ORCID: 0000-0002-6996-8891, Постникова Т.Б. — м.н.с. отдела акушерства и перинатологии, ORCID: 0000-0002-8227-2629, Мальцева А.Р. — лаборант-исследователь Биобанка "Генофонд" отдела геномной медицины им. В.С. Баранова, ORCID: 0000-0002-5647-6783, Попова А.К. — лаборант-исследователь лаборатории геномики отдела геномной медицины им. В.С. Баранова, ORCID: 0009-0008-3512-2557, Корнюшина Е.А. — к.м.н., с.н.с. акушерского отделения патологии беременности, ORCID: 0009-0003-5918-2697, Беспалова О.Н. — д.м.н., зам. директора по научной работе, ORCID: 0000-0002-6542-5953, Глотов А.С. — д.б.н., зав. отдела геномной медицины им. В.С. Баранова, профессор кафедры генетики и биотехнологии, ORCID: 0000-0002-7465-4504].

*Corresponding author:
r.a.illarionov@gmail.com

Received: 16/09-2024
Revision Received: 29/09-2024
Accepted: 09/10-2024

For citation: Pachulia O. V., Illarionov R. A., Vashukova E. S., Postnikova T. B., Maltseva A. R., Popova A. K., Korniyushina E. A., Beshpalova O. N., Glotov A. S. Strategies for bioresource collection in obstetrics: the experience of the "Genofund" biobank. *Cardiovascular Therapy and Prevention*. 2024;23(11):4193. doi: 10.15829/1728-8800-2024-4193. EDN KDQVRN

ДНК — дезоксирибонуклеиновая кислота, микроРНК — малые некодирующие молекулы рибонуклеиновой кислоты, РНК — рибонуклеиновая кислота, СОП — стандартная операционная процедура.

Ключевые моменты

Что известно о предмете исследования?

- Исследования последних десятилетий в области акушерства крайне редко затрагивают физиологи беременности, а в основном сосредоточены на осложненном ее течении.
- Динамичность изменений при беременности за короткий ограниченный срок обуславливает невозможность единовременной (разовой) оценки состояния организма беременной, а определяет необходимость внедрения новой стратегии создания биоресурсных коллекций — "лонгитюдного" биобанкирования образцов.

Что добавляют результаты исследования?

- Сформулированы две принципиально различающиеся стратегии биобанкирования образцов: "единовременное" и "лонгитюдное" банкирование.
- Создание коллекций с применением стратегии "лонгитюдного" биобанкирования открывает возможность изучения закономерностей физиологических изменений при беременности и поиска ранних предикторов гестационных осложнений.

Key messages

What is already known about the subject?

- Obstetrics research in recent decades has rarely considered the physiology of pregnancy, but has mainly focused on complications.
- The dynamism of changes during pregnancy over a short-limited period of time makes it impossible to perform a cross-sectional assessment of a pregnant woman's body, and determines the need to implement a novel longitudinal biobanking strategy.

What might this study add?

- Two fundamentally different strategies for biobanking samples have been formulated as follows: cross-sectional and longitudinal banking.
- The collection creation using the longitudinal biobanking strategy makes it possible to study the patterns of physiological changes during pregnancy and search for early predictors of pregnancy complications.

Введение

Беременность является уникальным состоянием женщины, когда за ограниченный, короткий период времени происходит большое число выраженных изменений на всех уровнях биологической организации организма. Происходят значимые процессы, которые должны обеспечить адаптацию материнского организма к возросшим физическим и метаболическим потребностям во время беременности. В норме сердечно-сосудистая, дыхательная, гематологическая, мочевыделительная, желудочно-кишечная, эндокринная и другие системы претерпевают важные изменения, необходимые для развития плода и для того, чтобы мать и плод могли пережить роды [1].

Исследования последних десятилетий в области акушерства крайне редко затрагивают физиологи беременности, и в основном сосредоточены на осложненном ее течении. В то же время, критически важно изучение закономерностей прогрессирования беременности и развития плода на со-

временном этапе, с учетом последних достижений биомедицинской науки, т.к. большая часть представлений об условно "нормальной" беременности основывается на данных, полученных в прошлом столетии. В настоящее время научные исследования в акушерстве формулируются по "классическому" типу, и включают исследуемую группу — беременные с осложненным течением и контрольную группу, которая формируется из пациенток не с физиологическим течением беременности, а с отсутствием изучаемого состояния (осложнения) в конкретный отрезок времени (на момент включения в исследование) [2]. Ценность получаемых данных и необходимость внедрения других методологий при изучении вопросов акушерства требует отдельного обсуждения, но главное, что имеющиеся на сегодняшний день подходы не дают новых представлений о физиологии беременности.

Объективные ограничения исследований, направленных на изучение физиологии беременности, в первую очередь связаны с невозможностью

за короткий период времени включить большое число беременных с физиологическим течением, т.к. частота различных гестационных осложнений достаточно высока. Таким образом, для изменения научно-исследовательских подходов в акушерстве крайне важным является создание биоресурсных коллекций образцов здоровых беременных, нереализовавших гестационные осложнения на протяжении всего срока беременности и в послеродовом периоде [3].

Другие сложности, с которыми сталкиваются исследователи, — это динамичность изменений при беременности за короткий ограниченный срок, что обуславливает невозможность единовременной (разовой) оценки состояния организма беременной, а определяет необходимость внедрения новой стратегии создания биоресурсных коллекций — "лонгитюдного" (динамического) биобанкирования образцов: неоднократного сбора биообразцов у одного испытуемого в течение ограниченного исследователем времени с определением контрольных точек [4]. Такой подход является крайне важным не только для понимания физиологии беременности, но и для изучения патогенетических механизмов реализации осложнений беременности и поиска их ранних предикторов.

Как известно, беременность является специфическим состоянием, при котором патологические события могут варьироваться от легких до жизнеугрожающих, что требует применения действенных прогностических, диагностических и терапевтических вмешательств. В то же время, ввиду неизученности, большое число методов прогнозирования и идентификации гестационных осложнений являются недостаточно точными или применяются с поздних сроков гестации, что значимо снижает эффективность превентивных мер [5-7]. Большинство имеющихся предикторов являются малоэффективными, в связи с тем, что относятся к какому-либо одному звену патогенеза и не учитывают другой "сценарий" развития патологических событий. Новые возможности в отношении целостной оценки предрасполагающих факторов, открывают исследования на основе биокolleкций, созданных по принципу "лонгитюдного" биобанкирования. Наиболее значимым преимуществом формирования такого типа коллекций является возможность изучения на их платформе предикторов осложнений, предшествующих клиническим проявлениям, что крайне важно для своевременного принятия мер профилактики.

В настоящей статье представлен опыт Биобанка "Генофонд" ФГБНУ "НИИ АГиР им. Д. О. Отта" по созданию биоресурсных коллекций, сформированных по принципу "лонгитюдного" биобанкирования, представляющих наибольший научный и практический интерес.

Особенности сбора биологических образцов

Для создания различных типов коллекций были сформулированы две принципиально различающиеся стратегии биобанкирования образцов: "единовременное" и "лонгитюдное" банкирование. Были даны определения для данных подходов, а также выделены по 2 подтипа каждого из подходов для уточнения деталей формата сбора биологических образцов:

— *Единовременное банкирование* — однократный сбор биообразцов, который может включать в себя *Ретроспективное (когортное) банкирование* — сбор биообразцов у когорты пациенток с установленным диагнозом и *Проспективное банкирование* — сбор биообразцов у группы пациенток до реализации исходов (осложнений/заболеваний);

— *Лонгитюдное банкирование* — сбор биообразцов в течение ограниченного исследователем времени (в течение беременности), которое может включать в себя *Динамическое банкирование* — сбор биообразцов на протяжении определенного исследователем ограниченного событием времени с определением контрольных точек (к примеру, сбор образцов у одной беременной в 1, 2, 3 триместре) и *Контрольное банкирование* — сбор биообразцов в контрольных точках до и после события, с определенным исследователем промежутком времени между точками (к примеру, сбор образцов до и после лечения).

Каждый из подходов формирования биоресурсных коллекций не лишен своих преимуществ и недостатков и должен применяться в зависимости от исследовательских целей, ресурсов и возможностей исследователей, когорты пациентов, образцы которых будут включены в биокolleкцию. К основным преимуществам "единовременного" биобанкирования можно отнести: возможность формирования больших биокolleкций образцов, быстрое наполнение коллекций, меньшая потеря ресурсов и данных, ассоциированных с образцами. К основным недостаткам данного подхода можно отнести: невозможность изучения динамических изменений, невозможность оценки биомаркеров на более ранних этапах. Относительно стратегии "лонгитюдного" банкирования, основным и главным преимуществом подхода является возможность поиска предикторов, предшествующих клиническим проявлениям заболевания, что принципиально важно для раннего принятия мер профилактики, а также для возможности изучения закономерностей физиологических и патологических изменений при беременности. К недостаткам такого типа банкирования можно отнести: длительность формирования коллекции, необходимость поддержки длительного контакта с исследуемым, большие затраты и потери ресурсов. В статье представлен опыт биобанка "Генофонд" в формировании биоресурсной коллекции

образцов беременных женщин по наиболее сложному принципу: "лонгитюдному" биобанкированию.

Формирование биокolleкции по принципу "лонгитюдного" биобанкирования

По состоянию на сегодняшний день биокolleкция образцов беременных, созданная по принципу "лонгитюдного" (динамического) биобанкирования включает образцы различного типа биоматериала от 360 беременных. Данное количество образцов в коллекции было сохранено после "выбраковки", которая осуществлена вследствие важного аспекта менеджмента качества биобанкирования образцов — инвентаризации [8].

Для создания коллекции от беременных женщин сбор биоматериала осуществляется в каждом триместре гестации в сроки проводимого скрининга на хромосомные патологии и врожденные пороки развития плода: I — триместр (11-14 нед.), II — триместр (19-21 нед.), III — триместр (30-34 нед.). После подписания информированного добровольного согласия собираются следующие типы биоматериала:

- Материнская периферическая кровь (вакуумные пробирки с этилендиаминтетрауксусной кислотой (ЭДТА) (фиолетовая крышка) 9 мл — 2 шт.; вакуумные пробирки с активатором свертывания крови и разделительным гелем (желтая крышка) 9 мл — 1 шт.);

- Моча (пластиковые контейнеры не <40 мл).

Все процедуры сбора материнской крови проводятся согласно стандартным операционным процедурам (СОПам) обученным медицинским персоналом в процедурном кабинете, моча собирается беременными самостоятельно, после проведения инструктажа исследователями. Сбор клинической информации осуществляется медицинским персоналом. Данные о течении и исходе беременности заносятся в специально разработанные для исследования карты участников. Вся информация о пациентках деперсонализируется и кодируется уникальными номерами. После получения биоматериала первичные контейнеры транспортируются в лабораторию в термоконтейнере с хладоэлементом при температуре от +4 до +8°С.

После пробоподготовки в условиях лаборатории, для дальнейшего хранения в биокolleкции, согласно разработанным СОПам, выделяются следующие типы образцов крови и ее компонентов:

- цельная кровь (4 аликвоты по 0,9 мл; 2 аликвоты по 4,5 мл со стабилизатором крови для рибонуклеиновой кислоты — РНК);

- сыворотка крови (6 аликвот по 0,7 мл);

- плазма крови (4 аликвоты по 0,9 мл);

- лейкоцитарная пленка.

В настоящее время коллекция содержит 15349 единиц хранения. Хранение происходит, согласно СОПам, в криопробирках с индивидуальным штрих-кодированием в криохранилищах биобан-

ка "Генофонд": низкотемпературные морозильники Thermo Fisher Scientific™ серии TSX Ultra-Low (-80°С), система хранения в парах жидкого азота Biosafe (-180°С).

Для использования образцов коллекции в дальнейших исследованиях был проведен контроль качества хранимых образцов, который осуществляли путем оценки качества производных образцов (дезоксирибонуклеиновая кислота (ДНК) и библиотек микроРНК (микроРНК) для секвенирования). Качество выделенных образцов ДНК оценивали путем измерения концентрации и соотношения длин волн A260/A280. Концентрацию всех образцов определяли на флуориметре "Qubit 2.0" (Invitrogen). Соотношения длин волн определяли на спектрофотометре "Nanodrop 2000C" (Thermo Scientific). Контроль качества библиотек микроРНК проводили с использованием автоматического капиллярного гель-электрофореза на приборе "2200 TapeStation Instrument" (Agilent Technologies).

Исследования на основе биокolleкции, созданной по принципу "лонгитюдного" биобанкирования

Динамические изменения биомаркеров при физиологической беременности. Для проведения данного пилотного исследования из биоресурсной коллекции были извлечены образцы плазмы и сыворотки крови 7 беременных женщин, полученных в ходе динамического сбора образцов в 3-х триместрах гестации. По данным медицинских карт об исходе беременности, после произошедших родов, у данных женщин в течение беременности и в послеродовом периоде не было диагностировано каких-либо гестационных осложнений.

Для оценки профиля микроРНК в парных образцах плазмы и сыворотки крови беременных были выделены 42 библиотеки малых РНК — по 21 для каждого типа биообразца. Высокопроизводительное секвенирование показало, что при динамической оценке в 3-м триместре процент считываний микроРНК в плазме и сыворотке снизился на треть по сравнению с 1-м и 2-м триместрами. Были обнаружены 2 микроРНК в плазме (hsa-miR-7853-5p и hsa-miR-200c-3p) и 10 микроРНК в сыворотке крови (hsa-miR-203a-5p, hsa-miR-495-3p, hsa-miR-4435), hsa-miR-340-5p, hsa-miR-4417, hsa-miR-1266-5p, hsa-miR-4494, hsa-miR-134-3p, hsa-miR-5008-5p и hsa-miR-6756-5p), которые продемонстрировали изменение уровня во время беременности (скорректированное значение $p < 0,05$). Кроме того, были выявлены различия в 36 микроРНК между плазмой и сывороткой (скорректированное значение $p < 0,05$), которые следует принимать во внимание при сравнении результатов исследований, проведенных с использованием разных типов биообразцов. Результаты были подтверждены анализом трех микроРНК с помощью ОТ-ПЦР (полимеразной цепной реакции с обратной транскрипцией) ($p < 0,05$) [9].

Результаты данного исследования продемонстрировали, что профиль циркулирующей микроРНК в крови в норме подвержен динамическому изменению во время беременности. Полученные данные закладывают основу для дальнейшего изучения молекулярных механизмов, участвующих в регуляции беременности, и поиска биомаркеров нарушений течения беременности.

Динамические изменения биомаркеров при патологии беременности. Для проведения данного пилотного исследования из биоресурсной коллекции были извлечены образцы плазмы крови, полученные в 1-м и 2-м триместрах гестации у 13 беременных, которые в дальнейшем были выделены в группу высокого риска преждевременных родов, в связи с тем, что реализовали такое осложнение беременности, как истмико-цервикальная недостаточность (Международная классификация болезней, МКБ О34.3) — патологическое состояние перешейка и шейки матки во время беременности, при котором они не способны противостоять внутриматочному давлению и удерживать увеличивающийся плод в полости матки до своевременных родов. Для контроля были отобраны образцы плазмы крови, полученные в 1-м и 2-м триместрах у 11 беременных с физиологическим течением гестации.

С применением технологии высокопроизводительного секвенирования в 1-м триместре беременности в сравниваемых группах были обнаружены различия в уровнях 15 микроРНК (3 с повышенным уровнем экспрессии — hsa-miR-122-5p, hsa-miR-34a-5p, hsa-miR-34c-5p; 12 с пониженным уровнем экспрессии — hsa-miR-487b-3p, hsa-miR-493-3p, hsa-miR-432-5p, hsa-miR-323b-3p, hsa-miR-369-3p, hsa-miR-134-5p, hsa-miR-431-5p, hsa-miR-485-5p, hsa-miR-382-5p, hsa-miR-369-5p, hsa-miR-485-3p, hsa-

miR-127-3p) ($\log_2(FC) \geq 1,5$; $FDR \leq 0,05$). Было отмечено, что все микроРНК с пониженной регуляцией в 1-м триместре из плаценто-специфического кластера C14MC. Во 2-м триместре дифференциально экспрессируемых микроРНК обнаружено не было [10].

Результаты настоящего исследования продемонстрировали, что микроРНК могут рассматриваться в качестве потенциальных ранних предикторов осложнений беременности, выявление которых важно для их своевременной профилактики. Отсутствие различий во 2-м триместре беременности, с одной стороны может связано с естественными причинами (увеличение срока беременности, активное становление и функционирование плаценты), с другой стороны, — с началом терапевтических мероприятий при появлении начальных признаков истмико-цервикальной недостаточности.

Заключение

Результаты приведенных пилотных исследований открывают широкие научные перспективы в области акушерства, в первую очередь ввиду принципиально нового методологического подхода к проведению исследований. Планирование такого дизайна исследований возможно только на платформе биоресурсных коллекций образцов беременных женщин, созданных по принципу "лонгитюдного" (динамического) биобанкирования. Создание коллекций с применением новой стратегии открывает исследователям возможность изучения не только закономерностей физиологических изменений при беременности, но и поиска ранних предикторов гестационных осложнений, предшествующих их клиническим проявлениям.

Отношения и деятельность. Исследование поддержано грантом РНФ 197520033-П.

Литература/References

1. Tan EK, Tan EL. Alterations in physiology and anatomy during pregnancy. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol*. 2013;27(6): 791-802. doi:10.1016/j.bpobgyn.2013.08.001.
2. Schreiber K, Graversgaard C, Hunt BJ, et al. Challenges of designing and conducting cohort studies and clinical trials in populations of pregnant people. *Lancet Rheumatol*. 2024;6(8): e560-72. doi:10.1016/S2665-9913(24)00118-8.
3. Gomez-Lopez N, Romero R, Hassan SS, et al. The Cellular Transcriptome in the Maternal Circulation During Normal Pregnancy: A Longitudinal Study. *Front Immunol*. 2019;10:2863. doi:10.3389/fimmu.2019.02863.
4. Chen J, Tian R, Zou Z, et al. Longitudinal study of multidimensional factors influencing maternal and offspring health outcomes: a study protocol. *BMC Pregnancy Childbirth*. 2023;23(1):466. doi:10.1186/s12884-023-05785-1.
5. Mavrelli D, Theodora M, Kolialexi A. Known biomarkers for monitoring pregnancy complications. *Expert Rev Mol Diagn*. 2021; 21(11):1115-7. doi:10.1080/14737159.2021.1971078.
6. Lin W, Teng S-W, Lin T-Y, et al. Combinatorial Analysis of Circulating Biomarkers and Maternal Characteristics for Preeclampsia Prediction in the First and Third Trimesters in Asia. *Diagnostics*. 2022;12(7):1533. doi:10.3390/diagnostics12071533.
7. Liu Y, Li DY, Bolatai A, Wu N. Progress in Research on Biomarkers of Gestational Diabetes Mellitus and Preeclampsia. *Diabetes Metab Syndr Obes*. 2023;16:3807-15. doi:10.2147/DMSO.S433179.
8. Maltseva AR, Illarionov RA, Vashukova ES, et al. Inventory and quality control of biosample collection from pregnant women at different gestational ages to search for early biomarkers of pregnancy complications. *Cardiovascular Therapy and Prevention*. 2023;22(11):3740. (In Russ.) Мальцева А. Р., Илларионов Р. А., Вашукова Е. С. и др. Инвентаризация и контроль качества "Коллекции биообразцов от беременных женщин на разных сроках гестации для поиска ранних биомаркеров осложнений беременности". *Кардиоваскулярная терапия и профилактика*. 2023;22(11):3740. doi:10.15829/1728-8800-2023-3740.
9. Vashukova ES, Kozyulina PY, Illarionov RA, et al. High-Throughput Sequencing of Circulating MicroRNAs in Plasma and Serum during Pregnancy Progression. *Life (Basel)*. 2021;11(10):1055. doi:10.3390/life11101055.
10. Illarionov RA, Pachuliia OV, Vashukova ES, et al. Plasma miRNA Profile in High Risk of Preterm Birth during Early and Mid-Pregnancy. *Genes (Basel)*. 2022;13(11):2018. doi:10.3390/genes13112018.

Создание банка клеточных культур: опыт Центра клеточных технологий "Покровский"

Приходько Е. М.^{1,2}, Супильникова О. В.^{1,3}, Масленникова И. В.¹, Енукашвили Н. И.^{1,3},
Котова А. В.^{1,3}, Багаева В. В.^{1,3}, Золина Т. Л.¹, Конкина А. И.¹, Яцемирский Г. С.¹

¹ООО "Покровский банк стволовых клеток". Санкт-Петербург; ²Медицинский институт, ФГБОУ ВО "Санкт-Петербургский государственный университет". Санкт-Петербург; ³ФГБОУ ВО "Северо-Западный государственный медицинский университет им. И. И. Мечникова". Санкт-Петербург, Россия

Современные исследования в области клеточной биологии предъявляют высокие требования к используемым модельным объектам, в т.ч. клеточным культурам. Эти требования продиктованы необходимостью избежать артефактов в работе и снизить потенциальные риски для окружающей среды, связанные с биологической опасностью. В статье представлен опыт создания в соответствии с существующей нормативно-правовой базой Российской Федерации и мировым опытом банка клеточных культур персонального и общественного хранения в Центре клеточных технологий "Покровский". Рассмотрены основные моменты организации сбора, входного контроля качества, паспортизации, обработки, подготовки к хранению и хранения биологических материалов человека. Разработанные подходы и алгоритмы работы позволили создать коллекцию культур ранних пассажей, состоящую из паспортизованных образцов, соответствующих требованиям к клеточным культурам для изготовления высокотехнологичных лекарственных препаратов и биомедицинских клеточных продуктов, а также для научных исследований.

Ключевые слова: биобанк, биоресурсная коллекция, клеточные культуры, контроль качества клеточных культур, паспортизация

клеточных биообразцов, мезенхимные стволовые клетки, стволовые клетки пульпы зуба, клетки эндотелия пупочной вены.

Отношения и деятельность: нет.

Поступила 31/08-2024

Рецензия получена 09/10-2024

Принята к публикации 06/11-2024



Для цитирования: Приходько Е. М., Супильникова О. В., Масленникова И. В., Енукашвили Н. И., Котова А. В., Багаева В. В., Золина Т. Л., Конкина А. И., Яцемирский Г. С. Создание банка клеточных культур: опыт Центра клеточных технологий "Покровский". *Кардиоваскулярная терапия и профилактика*. 2024;23(11):4173. doi: 10.15829/1728-8800-2024-4173. EDN KVZRMX

Creation of a cell culture bank: experience of the Pokrovsky Cell Technology Center

Prikhodko E. M.^{1,2}, Supilnikova O. V.^{1,3}, Maslennikova I. V.¹, Yenukashvili N. I.^{1,3}, Kotova A. V.^{1,3}, Bagaeva V. V.^{1,3}, Zolina T. L.¹, Konkina A. I.¹, Yatsemirsky G. S.¹

¹Pokrovsky Stem Cell Bank. Saint Petersburg; ²Medical Institute, Saint Petersburg State University. Saint Petersburg; ³Mechnikov North-Western State Medical University. Saint Petersburg, Russia

Modern research in cell biology places high demands on the model objects used, including cell cultures. These requirements are dictated by the need to avoid artifacts in work and reduce potential risks to the environment associated with biological hazard. The article presents the experience of creating cell culture bank for personal and public storage at the Pokrovsky Cell Technology Center. The main points of managing the collection, incoming quality control, certification, processing, preparation for storage and storage of human biological materials are considered. The developed approaches and work algorithms made it possible to create a collection of early passage cultures consisting of certified samples that meet the requirements for cell cultures for the manufacture of high-tech drugs and biomedical cell products, as well as for research.

Keywords: biobank, bioresource collection, cell cultures, cell culture quality control, certification of cell biosamples, mesenchymal stem cells, dental pulp stem cells, umbilical vein endothelial cells.

Relationships and Activities: none.

Prikhodko E. M.* ORCID: 0000-0002-5049-1368, Supilnikova O. V. ORCID: 0009-0003-2082-2140, Maslennikova I. V. ORCID: 0009-0005-5099-1572, Yenukashvili N. I. ORCID: 0000-0002-5971-7917, Kotova A. V. ORCID: 0000-0002-2887-344X, Bagaeva V. V. ORCID: 0009-0008-5104-2872, Zolina T. L. ORCID: 0009-0006-8795-6102, Konkina A. I. ORCID: 0009-0004-6803-9777, Yatsemirsky G. S. ORCID: 0009-0005-8628-5581.

*Автор, ответственный за переписку (Corresponding author):

e-mail: ceo@pokrovcell.ru

[Приходько Е. М.* — генеральный директор, ассистент кафедры пропедевтики внутренних болезней, ORCID: 0000-0002-5049-1368, Супильникова О. В. — зав. биотехнологическим центром, м.н.с. научно-исследовательской лаборатории клеточных технологий, ORCID: 0009-0003-2082-2140, Масленникова И. И. — к.б.н., советник биотехнологического центра, ORCID: 0009-0005-5099-1572, Енукашвили Н. И. — к.б.н., руководитель отдела научных проектов и разработок и зав. лабораторией клеточных культур, с.н.с. научно-исследовательской лаборатории клеточных технологий, ORCID: 0000-0002-5971-7917, Котова А. В. — биолог биотехнологического центра, н.с. научно-исследовательской лаборатории клеточных технологий, ORCID: 0000-0002-2887-344X, Багаева В. В. — руководитель отдела производства БМКП, м.н.с. научно-исследовательской лаборатории клеточных технологий, ORCID: 0009-0008-5104-2872, Золина Т. Л. — руководитель отдела контроля качества, ORCID: 0009-0006-8795-6102, Конкина А. И. — врач клинической лабораторной диагностики, ORCID: 0009-0004-6803-9777, Яцемирский Г. С. — зав. лабораторией проточной цитометрии, ORCID: 0009-0005-8628-5581].

*Corresponding author: ceo@pokrovcell.ru

Received: 31/08-2024

Revision Received: 09/10-2024

Accepted: 06/11-2024

For citation: Prikhodko E. M., Supilnikova O. V., Maslennikova I. V., Yenukashvili N. I., Kotova A. V., Bagaeva V. V., Zolina T. L., Konkina A. I., Yatsemirsky G. S. Creation of a cell culture bank: experience of the Pokrovsky Cell Technology Center. *Cardiovascular Therapy and Prevention*. 2024;23(11):4173. doi: 10.15829/1728-8800-2024-4173. EDN KVZRMX

БМКП — биомедицинский клеточный продукт, ВИЧ — вирус иммунодефицита человека, ВТЛП — высокотехнологичное лекарственное средство, ГСК — гемопоэтические стволовые клетки, КК — клеточная культура, КЛД — клиническая лабораторная диагностика, МНФ — моноклеарная фракция, МСК — мезенхимные стромальные клетки, ПБСК — Покровский банк стволовых клеток, СК — стволовые клетки, ФСВОК — Федеральная система внешней оценки качества, ЦКТ — Центр клеточных технологий, HUVEC — human umbilical vein endothelial cells (эндотелиальные клетки пупочной вены человека), РКТКК (RCTCC) — Российская коллекция типовых клеточных культур, STR — short tandem repeat (короткие tandemные повторы).

Ключевые моменты

Что известно о предмете исследования?

- При создании биобанков клеточных культур для производства высокотехнологичных лекарственных препаратов и для проведения научных исследований исследователи сталкиваются со сложностями, связанными с недостаточной проработанностью нормативно-правовой базы, отсутствием жестких критериев контроля качества культур.

Что добавляют результаты исследования?

- Разработанные методы, в т.ч. по обеспечению и контролю качества позволили создать крупнейшую в Северо-Западном регионе коллекцию культур мезенхимных стромальных клеток, фибробластов, клеток эндотелия пупочной вены человека ранних пассажей, состоящую из паспортизованных образцов, соответствующих существующим требованиям к клеточным культурам для изготовления высокотехнологичных лекарственных препаратов, а также для научных исследований.

Key messages

What is already known about the subject?

- When creating cell culture biobanks for the production of high-tech drugs and for conducting studies, researchers encounter difficulties with insufficiently developed regulatory framework, the absence of strict criteria for culture quality control.

What might this study add?

- The developed methods, including quality assurance and control, made it possible to create the largest collection of cultures of mesenchymal stromal cells, fibroblasts, early-passaged human umbilical vein endothelial cells in the North-West region, consisting of certified samples that meet existing cell culture requirements for the production of high-tech drugs, as well as for research.

Введение

Среди самых больших достижений биологии XXв можно назвать развитие технологии культивирования клеток, тканей и органов вне организма. В настоящее время биомедицинская наука далеко продвинулась вперед в этом направлении — созданы технологии культивирования практически любых типов клеток: от гамет до полностью дифференцированных соматических клеток, разработаны методики репрограммирования клеток, растущих в культуре. На основе этих технологий и данных фундаментальных исследований разрабатываются протоколы лечения в рамках трансляционной медицины. Развитие как исследовательских программ, так и методов регенеративной медицины привело к появлению потребности в наличии полностью охарактеризованных (паспортизованных) клеточных культур (КК), полученных с соблюдением принципов биоэтики в условиях постоянного контроля качества. Для клинических целей КК должны быть получены и помещены в биобанк с соблюдением Правил надлежащей практики по

работе с биомедицинскими клеточными продуктами¹. Требования к биобанкированию являются обязательными при депонировании материала, предназначенного для клинических и доклинических исследований, а также для производства биомедицинских клеточных продуктов (БМКП) и/или высокотехнологичных лекарственных препаратов (ВТЛП). Помимо этих требований следует также принимать во внимание нормативную базу Евразийского экономического союза, в частности, Решения Совета Евразийской экономической комиссии (таблица 1), регламентирующие правила производства и регистрации ВТЛП, к которым относятся некоторые из клеточных продуктов. В случае ориентации продукции биобанка на Евразийский союз с целью приготовления сырья для производства ВТЛП необходимо соблюдение принципов всех надлежащих практик: лабораторной — Good

¹ Приказ Минздрава России от 08.08.2018г № 512н "Об утверждении Правил надлежащей практики по работе с биомедицинскими клеточными продуктами".

Таблица 1

**Нормативные документы, регламентирующие работу
биобанков и коллекций КК для различного применения**

Документ	Этапы биобанкирования, регламентируемые документом
Приказ Минздрава России от 20.10.2017 № 842н (ред. от 30.01.2019) "Об утверждении требований к организации и деятельности биобанков и правил хранения биологического материала, клеток для приготовления клеточных линий, клеточных линий, предназначенных для производства биомедицинских клеточных продуктов, биомедицинских клеточных продуктов"	Основные принципы организации биобанка, требования к персоналу и помещениям
Приказ Минздрава России от 27.03.2018 № 125н "Об утверждении порядка медицинского обследования донора биологического материала и перечня противопоказаний (абсолютных и относительных) для получения биологического материала"	Перечень показаний и противопоказания для донорства, перечень медицинских обследований донора
Приказ Минздрава России от 8.08.2018 № 512н "Об утверждении Правил надлежащей практики по работе с биомедицинскими клеточными продуктами"	Устанавливает правила производства клеточных линий для БМКП
Приказ Минздрава России от 11.08.2017 № 517н "Об утверждении формы информированного добровольного согласия донора биологического материала либо одного из родителей или иного законного представителя на безвозмездное предоставление биологического материала для производства биомедицинского клеточного продукта, в т.ч. в целях проведения доклинических исследований и/или клинических исследований, и формы письменного согласия супруга/супруги либо одного из родственников умершего лица на посмертное предоставление биологического материала для производства биомедицинского клеточного продукта, в т.ч. в целях проведения доклинических исследований и/или клинических исследований"	Устанавливает форму добровольного согласия донора для БМКП. Особенность формы — она заполняется как для аутологичного, так и для аллогенного материала
Приказ Минздрава России от 31.01.2017 № 32н (ред. от 30.01.2019) "Об утверждении Порядка представления документов, из которых формируется регистрационное досье на биомедицинский клеточный продукт, и формы заявления о государственной регистрации"	Приказ необходимо учитывать, если в биобанке получают линию для последующего производства БМКП, т.к. он устанавливает перечень необходимых документов для досье. Часть данных (например, элементы спецификации) можно получить только на этапе биобанкирования
Приказ Минздрава России от 19.01.2017 № 14н (ред. от 30.01.2019) "Об утверждении формы спецификации на биомедицинский клеточный продукт" (Зарегистрировано в Минюсте России 13.02.2017 № 45607)	Утверждает форму спецификации на БМКП. При депонировании клеточной линии должна учитываться необходимость последующего предоставления данных для спецификации клеточного продукта. Спецификация готовится производителем продукта, однако он вправе запросить данные и подтверждающие документы для включения в спецификацию
Приказ Росздравнадзора от 19.01.2022 № 184 "Об утверждении формы оценочного листа, в соответствии с которым Федеральной службой по надзору в сфере здравоохранения проводится оценка соответствия соискателя лицензии или лицензиата лицензионным требованиям при осуществлении деятельности по производству биомедицинских клеточных продуктов"	Проверочный лист (чек-лист) для предприятий по производству БМКП. Если биобанк одной из своих целей ставит производство клеточных линий для БМКП, этот чек-лист должен учитываться при создании системы биобанкирования
*Решение Совета Евразийской экономической комиссии от 03.11.2016 № 78 (ред. от 29.05.2024) № 78 "О Правилах регистрации и экспертизы лекарственных средств для медицинского применения" с учетом Решения Совета Евразийской экономической комиссии от 17.03. 2022 № 36 "О внесении изменений в Правила регистрации и экспертизы лекарственных средств для медицинского применения"	Устанавливает понятие высокотехнологичного лекарственного препарата. Устанавливает требования к их регистрации, из которых вытекают некоторые принципы биобанкирования и получения клеточно-содержащих продуктов
*Решение Совета Евразийской экономической комиссии от 03.11.2016 № 77 "Об утверждении Правил надлежащей производственной практики Евразийского экономического союза"	Устанавливает ряд требований к производству, банкированию продуктов на клеточной основе, подпадающих под определение высокотехнологичного лекарственного препарата
*ГОСТ Р 52249-2009 Национальный стандарт российской федерации правила производства и контроля качества лекарственных средств — GMP	Устанавливает стандарты GMP
Приказ Минздрава России от 31.08.2016 № 646н "Об утверждении Правил надлежащей практики хранения и перевозки лекарственных препаратов для медицинского применения"	Регламентирует процессы, связанные с транспортировкой и хранением лекарственных препаратов
Федеральный закон от 27.07.2006 № 152-ФЗ (ред. от 14.07.2022) "О персональных данных"	Защита персональных данных донора
**ОФС.1.7.2.0011.15. Общая фармакопейная статья. Требования к клеточным культурам — субстратам производства биологических лекарственных препаратов (утверждена и введена в действие Приказом Минздрава России от 31.10.2018 № 749) ("Государственная фармакопея Российской Федерации. XIV издание. Том II")	Устанавливает требования к первичным и перерабатываемым (диплоидным и гетероплоидным) КК человека и животных, применяемым в качестве субстратов производства и контроля вирусных вакцин

Таблица 1. Продолжение

Документ	Этапы биобанкирования, регламентируемые документом
Приказ Минпромторга России от 14.06.2013 № 916 (ред. от 18.12.2015) "Об утверждении Правил надлежащей производственной практики" (Зарегистрировано в Минюсте России 10.09.2013 № 29938). Приложение 2	Технология производства биологических (в т.ч. иммунобиологических), фармацевтических субстанций и биологических лекарственных препаратов (далее — "биологические фармацевтические субстанции и лекарственные препараты")

Примечание: * — данные требования распространяются на процесс производства высокотехнологичного лекарственного препарата, т.е. при работе в рамках законодательства Евразийского экономического союза, ** — распространяется на КК человека и животных, применяемым в качестве субстратов производства и контроля вирусных вакцин, иммунобиологических препаратов. БМКП — биомедицинский клеточный продукт, КК — клеточные культуры, GMP — Good manufacturing practice for medicinal products.

Laboratory Practice (GLP), производственной — Good Manufacturing Practices (GMP), хранения — Good Storage Practices (GSP), дистрибуции — Good Distribution Practices (GDP). Подобные требования сформировали запрос на появление и развитие биобанков, соответствующих данным требованиям. В статье описывается опыт создания банка коллекции КК Центра клеточных технологий (ЦКТ) в соответствии с данными требованиями.

Структура ЦКТ "Покровский"

ЦКТ "Покровский" является подразделением общества с ограниченной ответственностью "Покровский банк стволовых клеток" (ПБСК). Структура ЦКТ "Покровский" разрабатывалась с учетом необходимости контроля и поддержания банка коллекции КК. В настоящий момент в ЦКТ "Покровский" создана коллекция первичных культур мезенхимных стромальных клеток (МСК) из разных источников, и продолжается работа по увеличению количества охарактеризованных первичных культур клеток для использования в научных исследованиях. Деятельность ЦКТ реализуется на основе гибридной модели [1], первоначально разработанной для банков пуповинной крови. В таких банках комбинируются две модели хранения биоматериала: публичное хранение донорских образцов за счет средств банка КК и персонализированное хранение, оплачиваемое физическим лицом или организацией-владельцем образца. Образцы публичного хранения, в отличие от персонализированного, могут быть предоставлены организациям для научной деятельности, доклинических и клинических исследований.

ЦКТ состоит из 3-х подразделений — Биотехнологического и Медицинского центров, Коммерческого отдела. Коммерческий отдел обеспечивает взаимодействие ЦКТ с клиентами, желающими воспользоваться услугами персонального хранения биоматериала. Биотехнологический центр, осуществляющий основную деятельность по получению и банкированию биоматериала, в свою очередь, состоит из 4-х отделений: отделения КК, криоконсервирования и хранения, клинической лабораторной диагностики (КЛД) и отдела науч-

ных проектов и разработок. Все эти отделения тесно взаимодействуют друг с другом, и каждое из них принимает участие в разных этапах обработки биоматериалов и контроля качества (рисунок 1).

Основная задача ЦКТ заключается в сохранении культур клеток и образцов моноклональной фракции (МНФ) пуповинной крови человека для использования в медицинской практике, создания новых клеточных технологий, проведения научных исследований и поддержания биологического разнообразия коллекций. В рамках этой задачи с 2021г ЦКТ включился в работу над проектом по созданию базового депозитария Российской коллекции типовых клеточных культур (РКТКК, RCTCC) вместе с Институтом цитологии, Институтом биологии развития и Институтом цитологии и генетики Сибирского отделения РАН. Цель ЦКТ в этом проекте — создание банка культур МСК ранних пассажей из разных источников: паспортизация уже имеющихся, получение и паспортизация новых культур для использования в научных исследованиях. Для паспортизации культур в ЦКТ осуществляется поэтапный контроль качества: каждый образец проходит путь от сбора, процедуры приемки, выделения, подготовки к криохранению до длительного хранения при температуре -196°С. На каждом этапе этого пути, в результате проведения исследований, образец приобретает документ (протокол), который становится частью его досье, и в итоге полностью охарактеризованный образец получает паспорт.

Нормативная документация

Работа ЦКТ выстроена на основе нормативных документов, регламентирующих работу биобанков и организацию процесса производства КК (таблица 1). Помимо этого, при создании банка КК ранних пассажей опирались на ряд признанных международных и национальных стандартов, таких как Передовые практики ISBER (International Society for Biological and Environmental Repositories, Международное общество биологических и экологических репозиториях) [2], ГОСТ Р ИСО 9001²; ГОСТ

² ГОСТ Р ИСО 9001–2015. Национальный стандарт Российской Федерации. Системы менеджмента качества. Требования.

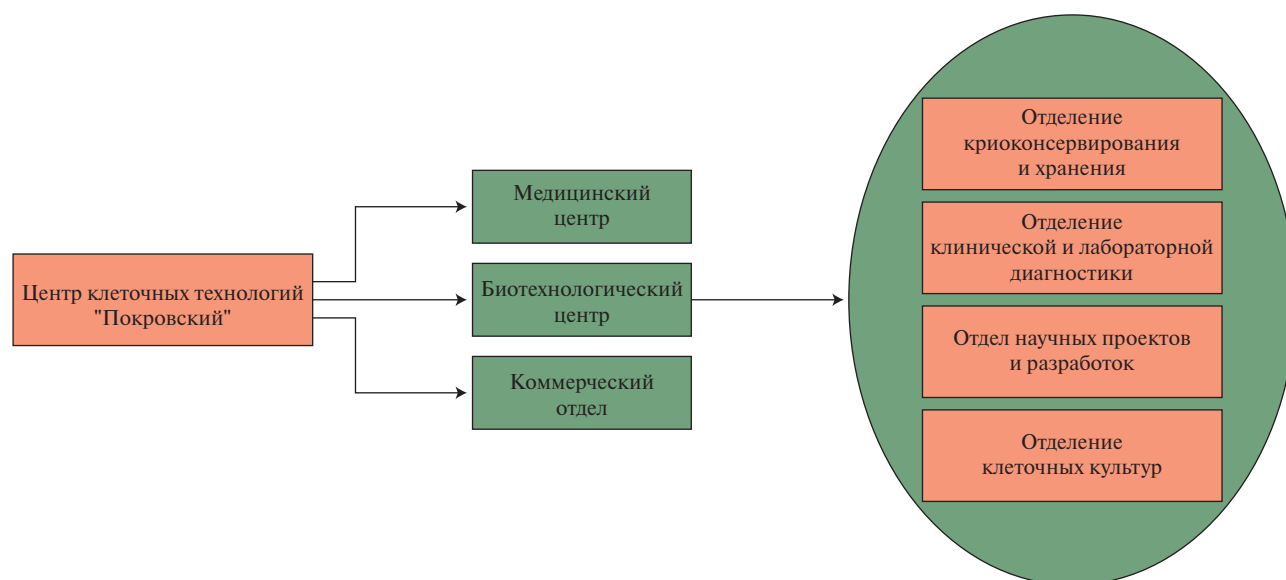


Рис. 1 Схема организации Центра клеточных технологий.

Р ИСО 20387³. С принятием Федерального закона № 180-ФЗ "О биомедицинских клеточных продуктах" от 23.06.2016, а также при вводе новой редакции Решения Совета Евразийской экономической комиссии от 03.11.2016 № 78 этот список пополняется нормативными актами, представленными в таблице 1.

Вышеприведенные документы позволили создать собственную систему документации и оформить все выполняемые манипуляции в виде стандартных операционных процедур в соответствии с ГОСТ Р ИСО 20387. ЦКТ получил сертификат соответствия стандарту менеджмента качества ГОСТ Р ИСО 9001 в 2022г на медицинские услуги по подготовке к хранению гемопоэтических стволовых клеток (ГСК), хранению ГСК и другого биологического материала и лабораторной диагностике и успешно подтвердил соответствие ему в 2023г. С 2014г отделение КЛД ПБСК ежегодно принимает участие во всех циклах межлабораторных сравнительных испытаний Федеральной системы внешней оценки качества (ФСВОК) проводимых исследований⁴.

Биоэтические принципы

Вся деятельность по сбору биологического материала и его последующему хранению осуществляется в соответствии с Хельсинкской декларацией Всемирной медицинской ассоциации⁵, а также

³ ГОСТ Р ИСО 20387–2021. Национальный стандарт Российской Федерации. Биотехнология. Биобанкинг. Общие требования.

⁴ Федеральная система внешней оценки качества (ФСВОК): <http://www.fsvok.ru/>.

⁵ Хельсинкская декларация: этические принципы медицинских исследований с участием человека, включая поправки, внесенные на 64-м заседании ВМА в Форталезе, Бразилия, октябрь 2013г (WMA declaration of Helsinki — ethical principles for medical research involving human subjects, 1964).

в соответствии с нормативными актами, регулирующими работу с донорами (таблица 1). Основные принципы деятельности ПБСК — это соблюдение конфиденциальности информации, обеспечение безопасности сотрудников, контактирующих с биологическим материалом, доступности биоматериала для научных исследований при анонимности доноров и их добровольного информированного согласия на использование биоматериала. Хранение данных осуществляется в соответствии с требованиями к защите персональных данных доноров.

Организация процессов

По нашему опыту, ключевым этапом для организации коллекции КК является изначальное правильное планирование и выстраивание общей схемы рабочего процесса: от поступления материала до выдачи из коллекции заказанного образца.

Биоматериал, предназначенный для получения КК, транспортируется в банк при условиях, обеспечивающих их сохранность. Различные виды биоматериала требуют разных условий транспортировки. Например, установили, что оптимальной температурой для транспортировки биоматериала для выделения МСК является диапазон 21-23°С. Соблюдение условий транспортировки контролируется во время транспортировки и при поступлении в ЦКТ. Обязательным условием является полная прослеживаемость всех этапов обработки материала (рисунок 2). При поступлении в ЦКТ биоматериала для обработки осуществляется регистрация — фиксируются данные о типе материала, дата и время поступления, количество образцов и название учреждения; информация о том, откуда доставлен материал, имя курьера и имя принявшего биоматериал работника, заносится в журнал регистрации образцов — бумажный и электронный. Доступ к электронному журналу разрешен



Рис. 2 Схема перемещения образца в ЦКТ "Покровский".

Примечание: ЦКТ — Центр клеточных технологий, STR — short tandem repeat (короткие tandemные повторы).

только санкционированным пользователям — тем, кто непосредственно занимается обработкой биоматериала и контролем качества.

Каждому образцу, поступившему в ЦКТ, присваивается индивидуальный код, под которым производится обработка и осуществляется хранение. Код позволяет обеспечить прослеживаемость пути образца в ЦКТ и деперсонализировать донора. Поступивший образец сопровождают документы: лист анамнеза донора и сопроводительная записка, содержащая информацию о дате, времени, способе сбора биоматериала, ФИО сотрудников, проводивших сбор материала и передачу его курьеру ЦКТ. На основании изучения этих документов и данных входного контроля принимается решение о дальнейшей обработке или утилизации образца. До изъятия биоматериала у донора получают информированное согласие, оформленное в соответствии с приказом Минздрава России № 517н от 11.08.2017 (таблица 1). Информацию об образце и обработке, которой он подвергся, записывают в протокол идентификации и протокол выделения (рисунок 2).

Для паспортизации проводится поэтапный контроль качества каждого полученного образца и расходных материалов, а именно:

- входной,
- промежуточный,
- выходной (при передаче образца заказчику в другое учреждение).

Под входным контролем подразумевается обследование донора — биоматериал для получения КК сопровождается аликвотой крови донора, которую исследуют на наличие антител к *Treponema pallidum*, а также к вирусам иммунодефицита человека (ВИЧ), гепатитам В и С, вне зависимости от того,

были ли выполнены эти исследования в месте сбора образца (например, лечебно-профилактическом учреждении). Согласно Приказу № 125н Минздрава России от 27.03.2018, образцы должны быть протестированы на присутствие антител к гепатиту В, в т.ч. — к HbsAg. Данные антитела могут появиться в результате вакцинации, поэтому все доноры предоставляют прививочные сертификаты. Согласно Приказу № 125н, в части, касающейся перечня абсолютных противопоказаний к донорству, указано, что образцы, наличие антител к гепатиту в которых подтверждено прививочным сертификатом, подлежат хранению. Также при наличии антител проводится ПЦР (полимеразная цепная реакция)-тест на присутствие в образце рибонуклеиновой кислоты (РНК), дезоксирибонуклеиновой кислоты (ДНК) возбудителей. При первичном обнаружении (ранее антитела у донора не выявляли) проводится повторное исследование в сторонней лаборатории для подтверждения результата. При выделении МНФ пуповинной крови, образцы пуповинной крови отбирают для анализа на присутствие бактериальной и грибковой контаминации, антител и антигена ВИЧ, вирусов гепатитов В и С, антител к цитомегаловирусу и токсоплазме, к *Treponema pallidum*, а также определяются группа крови и резус-фактор донора.

Таким образом, каждый образец на этапе обработки обладает следующими документами (в бумажной и электронной форме): анамнезом, информированным согласием донора, протоколами идентификации и выделения, результатами исследований на инфекции — ВИЧ, гепатиты В и С, сифилис и др.

Обработка образцов проводится согласно стандартным операционным процедурам, разработанным

ным для каждого вида биоматериала. Все этапы фиксируются в протоколе обработки биоматериала (в бумажной и электронной формах). После обработки биоматериала осуществляется его криоконсервация или культивирование клеток с последующей криоконсервацией. Образцы первоначально, до получения всех данных промежуточного контроля качества, хранятся в карантинном хранилище. Параллельно проводятся контроль качества, исследования, характеризующие образец, для создания досье и паспорта. После получения результатов на наличие/отсутствие контаминирующих агентов, образцы перемещают в основное криохранилище. КК переносят в сосуды Дьюара для основного хранения после полной консервации всей культуры и проведения исследований.

Неотъемлемой частью входного и промежуточного контроля является аутентификация образца методом профилирования по коротким tandemным повторам (short tandem repeat, STR) [3]. STR-профилирование помогает отследить кросс-контаминацию, идентифицировать культуру в случае утраты маркировки на криопробирке или в случае сомнения в её принадлежности конкретному донору. Для этого исследования отбирают фрагмент образца до его обработки и аликвоту КК после культивирования. Полученные STR-профили ткани и культуры сравнивают между собой для подтверждения аутентичности. STR-профилирование также проводится по запросу в рамках выходного контроля при передаче КК Заказчику. Важное значение имеет STR-профилирование при работе с МСК пупочного канатика, где особенно высока вероятность получения смешанной КК, состоящей из клеток матери и ребенка.

Для определения процентного состава КК в рамках промежуточного и выходного контроля качества применяется метод проточной цитометрии — анализируется набор поверхностных маркёров, характерных для данного типа клеток (например, МСК, ГСК, эндотелиальных клеток пупочной вены человека (human umbilical vein endothelial cells, HUVEC) и т.д. Так, для определения процентного содержания МСК используется набор маркёров, предложенный в 2006г — ISCT (International society for cell and gene therapy, Международным обществом клеточной и генной терапии) [4]. Проводится кариотипирование методом G-бандирования для подтверждения отсутствия хромосомных перестроек. Также проводится ПЦР или секвенирование для подтверждения наличия маркерного участка гена при наличии такового. Для контроля стерильности КК отбирают аликвоты среды для проверки на бактериальную и грибковую контаминацию. Аликвоты КК анализируют на отсутствие микоплазм. При наличии маркерных особенностей КК (способность к дифференцировке в трех направлениях для МСК,

поглощение Dil-Ac-LDL для HUVEC, колониеобразующий тест для ГСК и др.) проводят соответствующие исследования.

На основании протоколов проведённых исследований создается паспорт, в котором указаны результаты аутентификации КК и контроля качества, отражены характеристики клеток и описаны условия для оптимального культивирования и криоконсервации.

В создании характеристики образца и контроле качества участвуют как лаборатории ЦКТ, так и несколько сторонних организаций. Лаборатории ЦКТ, которые главным образом задействованы в контроле качества, зарегистрированы в программе ФСВОК (внешней оценки качества клинических лабораторных исследований) Ассоциации специалистов, некоммерческое партнёрство "Центр внешнего контроля качества клинических лабораторных исследований" (МСИ ФСВОК). Важность участия КДЛ в системах внешней оценки качества отражена в основополагающем международном стандарте ISO 15189:2012⁶, устанавливающем требования к деятельности КДЛ, а также в аналогичном отечественном стандарте ГОСТ Р ИСО 15189⁷, приказах Минздрава России и других ГОСТах (ГОСТ Р 53022.1⁸, ГОСТ Р 53079.2⁹ и др.). Пробы культуральной среды, пуповинной крови отправляются для исследований на бактериальную и грибную контаминацию в Северо-западный центр доказательной медицины¹⁰ (АО "СЗЦДМ", Санкт-Петербург). STR-профилирование образцов проводится в центре генетической экспертизы ООО "Медико-биологический центр"¹¹ (Великий Новгород).

Криоконсервация — наиболее длительный период в процессинге биообразцов, поэтому организация криохранилища в ЦКТ разработана с учетом анализа возможных рисков при хранении биоматериалов. Зона криоконсервирования состоит из двух помещений: зоны криоконсерви-

⁶ ISO 15189:2012 — Medical laboratories.

⁷ ГОСТ Р ИСО 15189–2015. Национальный стандарт Российской Федерации. Лаборатории медицинские. Частные требования к качеству и компетентности.

⁸ ГОСТ Р 53022.1–2008. Национальный стандарт Российской Федерации. Технологии лабораторные клинические. Требования к качеству клинических лабораторных исследований. Часть 1. Правила менеджмента качества клинических лабораторных исследований.

⁹ ГОСТ Р 53079.2–2008. Национальный стандарт Российской Федерации. Технологии лабораторные клинические. Обеспечение качества клинических лабораторных исследований. Часть 2. Руководство по управлению качеством в клиничко-диагностической лаборатории. Типовая модель.

¹⁰ АО "СЗЦДМ": <https://cdmed.ru/>.

¹¹ Судебно-генетическая экспертиза ООО "Медико-Биологический Центр": otcovo.ru.



Рис. 3 Состав коллекции КК ранних пассажей ЦКТ "Покровский".
Примечание: КК — клеточные культуры, МСК — мезенхимные стромальные клетки, СТ — стволовые клетки, ЦКТ — Центр клеточных технологий, HUVES — human umbilical vein endothelial cells.

рования и хранения и зоны основного криохрани- ния. Вход в них ограничен, доступ в помещение осуществляется по отпечатку пальца. Помещения оснащены датчиками уровня кислорода. Каждый сосуд Дьюара оборудован датчиком уровня азо- та, а показания с датчиков обрабатывает систе- ма мониторинга COMCRYO (ООО "Криогентех", Санкт-Петербург). Система мониторинга изме- ряет уровень азота и температуру в сосуде Дьюа- ра и отображает данные на мониторе компьютера в криохранилище. В случае резких изменений тем- пературы или уровня азота система оповещения отправляет смс-сообщение в качестве сигнала тре- воги на номер ответственного работника и реги- стрирует в своей системе колебания показателей, создавая отчет. Кроме того, система оборудова-

на веб-интерфейсом: информация обо всех по- казаниях с датчиков хранится на сервере. Доступ к этим данным также является авторизованным. В ЦКТ разработана программа контроля за усло- виями криоконсервации и хранения биоматериа- ла. Контролем качества криоконсервации является количество живых клеток до и после криоконсер- вации образца. Наличие программных заморажи- вателей с валидированной программой заморозки обеспечивает контролируемые и воспроизводи- мые условия замораживания [5]. Мониторинг та- ких параметров, как температура и уровень азота, в криохранилищах в процессе длительного хране- ния свидетельствует о постоянстве или изменении факторов, влияющих на качество. По требованиям Российского стандарта "Рускорд" для сбора, про- цессинга, хранения и выдачи пуповинной кро- ви ежегодно оценивается минимум три единицы МНФ, находящиеся на хранении. Качество крио- хранения можно оценить только после разморозки образцов. За период с 2009г разморожено 769 об- разцов ГСК пуповинной крови. Из них успешно, с жизнеспособностью >80%, 751 образец.

КК ЦКТ

В настоящее время в банке хранится >2 тыс. КК пупочного канатика и >8 тыс. образцов пупо- винной крови, включая образцы персонального и общественного хранения. Коллекцию КК ранних пассажей составляют культуры МСК, полученные из периваскулярного пространства вены пупочного канатика, жировой ткани, костного мозга, печени, тканей ротовой полости, эндометрия, плаценты, хориона, лёгкого; фибробласты кожи, клетки эн- дотелия сосудов (в т.ч. HUVES). Имеются образ- цы МСК и опухолевых клеток пациентов с множе- ственной миеломой. В коллекции также депони- рованы генетически тестированные образцы МСК пациентов с рецессивной множественной эпифи- зарной дистрофией. Перечень паспортизованных культур представлен в электронном каталоге¹² куль- тур ранних пассажей ЦКТ.

Основой коллекции ЦКТ являются МСК из источников, ставших классическими — пупочного канатика, жировой ткани и костного мозга (рису- нок 3). Клетки из этих источников обладают оди- наковой морфологией, иммунофенотипом, но раз- ным дифференцировочным потенциалом, разными характеристиками эпигенома, протеома, метаболо- ма. Их различия обусловлены влиянием локальной ниши [6, 7] и сохраняются в культуре.

МСК пупочного канатика. МСК пупочного ка- натика получают по запатентованной технологии из периваскулярного пространства пупочной ве-

¹² Каталог культур ранних пассажей ЦКТ "Покровский": <https://pokrovcell.ru/centr-kletochnyh-tehnologiy/priobresti-kletochnye-linii/katalog-kultur-ranni-passazhey/>.

ны¹³. Эта методика позволяет обработать ферментами только область, окружающую вену, минимально затронув вартонов студень и наружную ткань, что позволяет получить более однородную популяцию МСК, а также снизить риск бактериальной и грибковой контаминации, а также контаминации материнскими клетками. Несмотря на то, что этот метод разработан для получения однородной популяции МСК после двух циклов ферментации, с его помощью можно получить культуру HUVEC и после первого (краткого) цикла.

В банке хранится >2 тыс. образцов МСК пупочного канатика персонального хранения. Количество паспортизованных культур в разделе общественного хранения поддерживается на уровне 35–50 КК — вместо использованных образцов коллекция постоянно пополняется новыми.

МСК жировой ткани. Образцы жировой ткани, депонированные в ЦКТ, получены преимущественно в ходе оперативных вмешательств. В исследовательских целях в ЦКТ создана коллекция МСК жировой ткани от доноров с клиническими проявлениями рецессивной множественной эпифизарной дисплазии/диастрофической дисплазии. Множественная эпифизарная дисплазия IV типа (OMIM 226900) — наследственное системное заболевание скелета. Генетически обусловленная неполноценность суставного хряща приводит к раннему разрушению суставов — происходит их деформация. Наиболее нагруженные — тазобедренные, коленные, а также позвоночник — поражаются сильнее всего. Диастрофическая дисплазия (OMIM 222600) — одна из разновидностей скелетных дисплазий, которая также характеризуется нарушением формирования некоторых типов хрящевой ткани и связанным с этим затруднённым образованием эндохондральной кости. Симптомы заболевания выявляются сразу при рождении или в рамках пренатальной диагностики и заключаются в уменьшенной длине тела новорожденного и низкорослости в дальнейшем, в ограничении движения суставов, сколиозе и других пороках развития. Причиной развития заболевания является мутация в гене *SLC26A2* в гомозиготном или компаунд-гетерозиготном состоянии. Этот ген кодирует белок, отвечающий за транспортировку сульфат-ионов через мембрану. Описано несколько мутаций в данном гене, приводящих к развитию заболевания. Не исключено, что по мере внедрения методов генетического обследования пациентов количество известных мутаций будет увеличиваться.

¹³ Патент РФ № 2620981С2, 18.11.2015. Багаева В.В., Айзенштадт А.А., Александрова Л.В., Енукашвили Н.И., Адылов Ш.Ф., Золина Т.Л., Урусова М.Е. Способ получения культуры мезенхимных стволовых клеток человека из периваскулярного пространства вены пупочного канатика. Изобретения. Полезные модели № 16–2017, 28.05.2017–10.06.2017. Бюл. № 16.

В банке хранятся 13 КК от таких пациентов: 5 культур от пациентов с диагнозом диастрофическая дисплазия и 8 культур от пациентов с диагнозом множественная эпифизарная дисплазия. Представленные образцы содержат разные мутации гена *SLC26A2* в гомозиготном состоянии. От трёх пациентов — двух с эпифизарной, одного с диастрофической дисплазией — также удалось получить культуры хондроцитов и МСК жировой ткани.

В коллекции представлены и культуры МСК жировой ткани от доноров без диагностированных на момент забора материала заболеваний.

МСК костного мозга. МСК костного мозга являются одними из ключевых компонентов ниши ГСК. Особый интерес эти клетки представляют в связи с их ролью в развитии гематологических заболеваний и в формировании опухолевой гемopoэтической ниши. В банке имеется 32 культуры МСК костного мозга от пациентов с диагнозом множественная миелома. Множественная миелома — злокачественная плазмоклеточная опухоль, продуцирующая моноклональные иммуноглобулины, которые внедряются в прилежащую костную ткань и разрушают ее. МСК костного мозга, полученные у доноров с таким диагнозом, могут оказаться полезными в исследовании влияния опухолевых клеток на МСК.

Стволовые клетки (СК) ротовой полости. Ценной частью банка культур ЦКТ являются клетки, полученные из тканей ротовой полости. Эту коллекцию начали создавать с 2016г. Всего к настоящему моменту удалось получить 79 донорских культур из 43 зубов. Главным достижением стало получение парных КК из различных отделов одного и того же зуба. С помощью методики отдельной обработки периодонта и пульпы при получении клеток из зуба с закрытыми корневыми каналами удалось выделить 18 пар СК пульпа/периодонт. От ряда доноров удалось получить по три популяции клеток от каждого в разных комбинациях: СК пульпы, периодонта и десны; СК пульпы, периодонта и фолликула; СК пульпы, периодонта и апикальных папилл. У двоих доноров удалось выделить по 4 культуры у каждого: у одного — из пульпы, периодонта, десны и апикальных папилл, у другого — из пульпы, периодонта, фолликула и десны. От одного из доноров, помимо пары СК пульпы/периодонта, удалось получить клетки нёба. Изучение таких КК, выделенных одновременно от одного и того же донора, может оказаться полезным при исследовании вариативности свойств и между популяциями клеток из разных тканей, и между отдельными донорами [7].

Фибробласты кожи. Способность фибробластов секретировать компоненты внеклеточного матрикса соединительных тканей и поддерживать таким образом их целостность обуславливает интерес исследователей к этим клеткам с позиций регене-

ративной медицины [8]. Фибробласты стимулируют процессы регенерации тканей: в организме они играют ключевую роль в заживлении ран. ЦКТ ПБСК принимает участие в разработке клеточно-содержащих раневых покрытий на гелевой основе с 2009г [9]. Разработанные покрытия с успехом применяются в НИИ им. И. И. Джанелидзе почти 10 лет [10]. В ЦКТ создана коллекция фибробластов кожи в числе 19 культур.

HUVEC. HUVEC используются в фундаментальных и прикладных исследованиях как доступная модель эндотелиальных клеток. Последние являются одними из основных компонентов кровеносных сосудов. В ходе развития организма новые сосуды формируются путём васкулогенеза, а затем ангиогенеза. Помимо ведущей роли в ангиогенезе, гемостазе и регуляции сосудистого тонуса клетки эндотелия являются существенным и активным компонентом иммунных реакций [11]. Дисфункция кровеносных сосудов и нарушение регуляции образования новых кровеносных сосудов связаны с возникновением и прогрессированием многих заболеваний, включая рак, ишемическую болезнь сердца, воспаление и иммунные расстройства, поэтому клетки эндотелия могут быть терапевтической мишенью в лечении этих заболеваний, а HUVEC — удобной моделью при разработке новых терапевтических подходов. Примечательной их особенностью является также способность претерпевать эндотелиально-мезенхимный переход — процесс, в ходе которого HUVEC трансформируются в мезенхимные, приобретая таким образом высокую подвижность и способность к миграции [12]. Такое поведение у клеток наблюдается при ангиогенезе и воспалительных реакциях. HUVEC в связи со своими свойствами широко используются в качестве донорских клеток в тканевой инженерии, васкуляризации органоидов и разработке микрососудистых моделей *in vitro*. HUVEC являются бесценным инструментом для моделирования заболеваний и скрининга лекарств в фундаментальных исследованиях [13].

Коллекция HUVEC ЦКТ, полученных из пупочной вены, состоит из 12 паспортизованных культур ранних пассажей. Получаемые клетки методом проточной цитометрии исследуют на присутствие специфичного для HUVEC маркера — CD31+, а также оценивают способность поглощать липопротеины низкой плотности (Dil-Ac-LDL-тест).

Перспективы развития

Созданная система биобанкирования позволила ЦКТ "Покровский" стать членом ассоциации "Рускорд". "Рускорд" — это ассоциация специалистов и организаций в области заготовки, хранения, применения клеток пуповинной крови и клеточных технологий, которая зарегистрирована и работает с 2019г. Совместно с членами ассоциации ЦКТ

"Покровский" ведет работу по применению ГСК пуповинной крови. Собрана доклиническая база и разработан протокол клинического исследования: "Изучение безопасности и эффективности метода трансфузии аллогенных гемопоэтических клеток пуповинной крови пациентам с детским церебральным параличом". Результаты исследования будут включены в клинические рекомендации по применению ГСК пуповинной крови.

ЦКТ "Покровский" также занимается разработкой лекарственных препаратов на основе клеточных технологий. Некоторые из них находятся на завершающей стадии доклинических исследований и подготовки нормативной документации для составления заявки на получение разрешения на проведение клинических исследований. Планируется продолжать работу по созданию базового депозитария РКТКК вместе с Институтом цитологии, Институтом биологии развития и Институтом цитологии и генетики Сибирского отделения РАН. Продолжается сотрудничество с Северо-Западным государственным университетом им. И. И. Мечникова — ЦКТ является методической базой НИЛ клеточных технологий университета.

Суммируя описанный выше опыт сотрудничества, можно сказать, что в настоящий момент существуют возможности совместной работы коммерческого ЦКТ с государственными биобанками, коллекциями и научно-исследовательскими учреждениями.

Заключение

В настоящее время создание биобанков КК, в отличие от других биоресурсных коллекций, сталкивается с рядом сложностей, связанных с недостаточной нормативно-правовой базой: не до конца проработан статус таких коллекций, требования к сырью и получаемым культурам. Следует отметить, что в последнее время наметился существенный прогресс в этом направлении, однако отсутствие системы контроля и единых стандартов биобанкирования КК, затрудняет развитие биобанков. В настоящее время основные биобанки страны объединяются для создания единых правил и стандартов, для разработки единой системы контроля качества. Созданная в ЦКТ система контроля качества позволяет гарантировать получение надёжно охарактеризованных КК, в т.ч. первичных и ранних пассажей, соответствующих критериям, отраженным в действующих нормативных документах. Многие из разработанных в ЦКТ подходов планируется использовать в работе базового депозитария РКТКК.

Отношения и деятельность: все авторы заявляют об отсутствии потенциального конфликта интересов, требующего раскрытия в данной статье.

Литература/References

1. Laue J, Ambühl J, Surbek D. Hybrid umbilical cord blood banking: literature review. Arch Gynecol Obstet. 2024;309(1):93-104. doi:10.1007/s00404-023-07003-x.
2. Snapes E, Simeon-Dubach B. ISBER Best Practices for Repositories, Moving Toward the Fifth Edition. Biopreserv Biobank. 2022;20(1):107-8. doi:10.1089/bio.2022.29102.ejs.
3. Kosobokova EN, Malchenkova AA, Kalinina NA, et al. Using short tandem repeat profiling to validate cell lines in biobanks. Cardiovascular Therapy and Prevention. 2022;21(11):3386. (In Russ.) Кособокова Е. Н., Мальченкова А. А., Калинина Н. А. и др. Использование метода профилирования на основе коротких tandemных повторов для подтверждения подлинности клеточных линий в биобанках. Кардиоваскулярная терапия и профилактика. 2022;21(11):3386. doi:10.15829/1728-8800-2022-3386.
4. Dominici M, Le Blanc K, Mueller I, et al. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. Cytotherapy. 2006;8(4):315-7. doi:10.1080/14653240600855905.
5. Ivolgin DA, Smolyaninov AB, Bagautdinov ShM, et al. Modern cryopreservation methods for umbilical cord blood stem cells in the public registry of donors. Journal of International Academy of Refrigeration. 2012;1:36-9. (In Russ.) Иволгин Д. А., Смолянинов А. Б., Багаутдинов Ш. М. и др. Современные способы криоконсервации стволовых клеток пуповинной крови для общественного регистра доноров. Вестник Международной академии холода. 2012;1:36-9. EDN OWQHUF.
6. Lobov A, Kuchur P, Khizhina A, et al. Mesenchymal Cells Retain the Specificity of Embryonal Origin During Osteogenic Differentiation. Stem Cells. 2024;42(1):76-89. doi:10.1093/stmcls/sxad081.
7. Kotova AV, Lobov AA, Dombrovskaya JA, et al. Comparative Analysis of Dental Pulp and Periodontal Stem Cells: Differences in Morphology, Functionality, Osteogenic Differentiation and Proteome. Biomedicines. 2021;9(11):1606. doi:10.3390/biomedicines9111606.
8. Foster DS, Jones RE, Ransom RC, et al. The evolving relationship of wound healing and tumor stroma. JCI Insight. 2018;3(18):e99911. doi:10.1172/jci.insight.99911.
9. Smolyaninov AB, Khrupina AS, Yurkevich YuV, et al. Use of hydroxyethylcellulose polymer as a carrier for allogeneic fibroblasts in thermal burns treatment. Herald of North-Western State Medical University named after I. I. Mechnikov. 2013;5(4):7-12. (In Russ.) Смолянинов А. Б., Хрупина А. С., Юркевич Ю. В. и др. Использование полимера гидроксизтилцеллюлозы в качестве носителя для аллогенных фибробластов при лечении последствий термических ожогов. Вестник Северо-Западного государственного медицинского университета им. И. И. Мечникова. 2013;5(4):7-12. EDN RWBUXB.
10. Vagner DO, Zinoviev EV, Krylov KM, et al. Experience in the clinical use of allogeneic fibroblasts in patients with severe burns. Herald of North-Western State Medical University named after I. I. Mechnikov. 2018;10(3):65-72. (In Russ.) Вагнер Д. О., Зиновьев Е. В., Крылов К. М. и др. Опыт клинического применения аллогенных фибробластов у пострадавших с обширными ожогами кожи. Вестник Северо-Западного государственного медицинского университета им. И. И. Мечникова. 2018;10(3):65-72. doi:10.17816/mechnikov201810365-72.
11. Sturtzel C. Endothelial Cells. Adv Exp Med Biol. 2017;1003:71-91. doi:10.1007/978-3-319-57613-8_4.
12. Alvandi Z, Bischoff J. Endothelial-Mesenchymal Transition in Cardiovascular Disease. Arterioscler Thromb Vasc Biol. 2021;41(9):2357-69. doi:10.1161/ATVBAHA.121.313788.
13. Deng D, Zhang Y, Tang B, Zhang Z. Sources and applications of endothelial seed cells: a review. Stem Cell Res Ther. 2024;15(1):175. doi:10.1186/s13287-024-03773-6.

Анализ возможности применения результатов секвенирования транскриптома при выборе лекарственной терапии пациентов с колоректальным раком

Апалько С.В.^{1,2}, Шиманский В.С.^{1,2}, Кель А.³, Сушенцева Н.Н.^{1,2}, Тюкавина Н.В.¹, Коваленко С.А.¹, Щербак С.Г.^{1,2}

¹СПбГБУЗ "Городская больница № 40 Курортного района". Санкт-Петербург, Россия; ²ФГБОУ ВО "Санкт-Петербургский государственный университет". Санкт-Петербург, Россия; ³geneXplain GmbH Н. Вольфенбюттель, Германия

Цель. Исследование применимости данных РНК (рибонуклеиновая кислота)-секвенирования с последующим выявлением мастер-регуляторов для предсказания эффективности таргетной терапии у пациентов с колоректальным раком.

Материал и методы. Были использованы образцы тканей трех пациентов с колоректальным раком, полученные из послеоперационного материала. Все пациенты получали паллиативную противоопухолевую лекарственную терапию в стандартных режимах в соответствии с локализацией опухоли и статусом мутаций в генах *RAS* и *BRAF*. Было проведено секвенирование транскриптома опухолевой и здоровой ткани каждого пациента и проведен поиск мастер-регуляторов в опухолевой ткани.

Результаты. В результате исследования для каждого пациента был найден список мастер-регуляторов и спрогнозированы возможные терапевтические агенты, наиболее подходящие для подавления опухолевого процесса.

Заключение. Показана возможность применения компьютерного анализа молекулярного профиля аденокарциномы кишечника для предсказания эффективности терапии, однако для определения клинического потенциала данной методики требуется проведение исследования на расширенной выборке.

Ключевые слова: РНК-секвенирование, колоректальный рак, транскриптом, мастер-регуляторы, таргетная терапия.

Отношения и деятельность: нет.

Поступила 01/09-2024

Рецензия получена 05/09-2024

Принята к публикации 16/09-2024



Для цитирования: Апалько С.В., Шиманский В.С., Кель А., Сушенцева Н.Н., Тюкавина Н.В., Коваленко С.А., Щербак С.Г. Анализ возможности применения результатов секвенирования транскриптома при выборе лекарственной терапии пациентов с колоректальным раком. *Кардиоваскулярная терапия и профилактика*. 2024;23(11):4174. doi: 10.15829/1728-8800-2024-4174. EDN YWSGPM

Potential of using transcriptome sequencing data in choosing therapy for patients with colorectal cancer

Apalko S.V.^{1,2}, Shimansky V.S.^{1,2}, Kel A.³, Sushentseva N.N.^{1,2}, Tyukavina N.V.¹, Kovalenko S.A.¹, Shcherbak S.G.^{1,2}

¹Kurortny District City Hospital № 40. Saint Petersburg, Russia; ²Saint Petersburg State University. Saint Petersburg, Russia; ³geneXplain GmbH. Wolfenbüttel, Germany

Aim. To study the applicability of RNA (ribonucleic acid) sequencing with master regulator identification for predicting the effectiveness of targeted therapy in patients with colorectal cancer.

Materials and methods. Tissue samples from three patients with colorectal cancer obtained from postoperative material were used. All patients received palliative antitumor therapy in standard regimens in accordance with the tumor location and the status of *RAS* and *BRAF* gene mutations. The transcriptome of tumor and healthy tissue of each patient was sequenced, and master regulators in the tumor tissue were analyzed.

Results. A list of master regulators was found for each patient and possible therapeutic agents most suitable for suppressing the tumor process were predicted.

Conclusion. The potential of computer analysis of the molecular profile of colorectal adenocarcinoma in predicting the effectiveness of therapy is shown. However, to determine the clinical potential of this technique, a study on a wider sample is required.

Keywords: RNA sequencing, colorectal cancer, transcriptome, master regulators, targeted therapy.

*Автор, ответственный за переписку (Corresponding author):

e-mail: svetlana.apalko@gmail.com

[Апалько С.В.* — к.б.н., биолог, начальник сектора биобанкирования и трансляционной медицины, заведующая ЛМД и АМ, ORCID: 0000-0002-3853-4185, Шиманский В.С. — биолог, ORCID: 0000-0001-5662-8663, Кель А. — PhD, главный исполнительный директор и руководитель отдела безопасности, ORCID: 0000-0001-6775-2467, Сушенцева Н.Н. — биолог, начальник лаборатории, ORCID: 0000-0002-5100-5229, Тюкавина Н.В. — зав. отделением, врач-онколог высшей квалификационной категории, ORCID: 0000-0001-5113-0057, Коваленко С.А. — зав. онкологическим отделением, хирург-онколог высшей категории, ORCID: 0000-0002-5850-0599, Щербак С.Г. — д.м.н., профессор, заслуженный врач РФ, главный врач, ORCID: 0000-0001-5036-1259].

Relationships and Activities: none.

Apalko S. V.* ORCID: 0000-0002-3853-4185, Shimansky V. S. ORCID: 0000-0001-5662-8663, Kel A. ORCID: 0000-0001-6775-2467, Sushentseva N. N. ORCID: 0000-0002-5100-5229, Tyukavina N. V. ORCID: 0000-0001-5113-0057, Kovalenko S. A. ORCID: 0000-0002-5850-0599, Shcherbak S. G. ORCID: 0000-0001-5036-1259.

*Corresponding author: svetlana.apalko@gmail.com

Received: 01/09-2024

Revision Received: 05/09-2024

Accepted: 16/09-2024

For citation: Apalko S. V., Shimansky V. S., Kel A., Sushentseva N. N., Tyukavina N. V., Kovalenko S. A., Shcherbak S. G. Potential of using transcriptome sequencing data in choosing therapy for patients with colorectal cancer. *Cardiovascular Therapy and Prevention*. 2024; 23(11):4174. doi: 10.15829/1728-8800-2024-4174. EDN YWSGPM

ДЭГ — дифференциально экспрессирующиеся гены, ЛП — лекарственные препараты, МР — мастер-регуляторы, РНК — рибонуклеиновая кислота.

Ключевые моменты

Что известно о предмете исследования?

- РНК-секвенирование является в настоящий момент приоритетным методом выявления дифференциально экспрессирующихся генов и получения ценной информации для оценки патологических состояний.
- Выявление генов мастер-регуляторов (МР) может быть основой для разработки новых способов лекарственной терапии.

Что добавляют результаты исследования?

- Показана принципиальная возможность использования данных РНК-секвенирования с последующим выявлением МР при выборе таргетной терапии для пациентов с колоректальным раком.
- Лекарственная терапия, назначенная без учёта анализа МР, может быть не оптимальна.

Key messages

What is already known about the subject?

- RNA sequencing is currently the priority method for identifying differentially expressed genes and obtaining valuable information for assessing pathological conditions.
- Identification of master regulator (MR) genes can be the basis for developing novel therapies.

What might this study add?

- The fundamental potential of RNA sequencing with MR identification in choosing targeted therapy for patients with colorectal cancer is shown.
- Therapy prescribed without taking into account MR analysis may not be optimal.

Введение

Анализ мультиомных данных по измерению активности генов, экспрессии белков или изменениям метаболома становится стандартным подходом к характеристике патологического состояния пораженного организма или ткани. Все чаще некоторые из этих методов применяются в комбинированном подходе, что приводит к получению больших наборов многопрофильных данных [1, 2]. Тем не менее, проблема выявления основных молекулярных механизмов, отличающих данное патологическое состояние от нормы, остается открытой. Механизм развития болезни может быть описан посредством построения моделей перестройки клеточных регуляторных путей, например, в результате генетических или эпигенетических изменений, влияющих на активность соответствующих генов. Реконструкция специфических для заболевания регуляторных путей может помочь идентифицировать потенциальные мастер-регуляторы (МР) соответствующего патологического процесса, что в свою очередь открывает возможности для разработки новых подходов к лечению. В настоящее время набирает популярность гипотеза о том, что воздействие на определенные МР может остано-

вить патологический процесс и устранить причину заболевания [3].

Традиционные биоинформационные подходы, применяемые для анализа мультиомных данных, дают лишь очень ограниченное представление о причинах наблюдаемых явлений и поэтому мало способствуют пониманию молекулярных механизмов патологического процесса. В транскриптомных исследованиях такого рода, как правило, только выявляются дифференциально экспрессирующиеся гены (ДЭГ), но вся цепь молекулярных событий, приведших к дифференциальной экспрессии, остаётся невыясненной [4]. В противоположность этому, применяемый нами метод был разработан для интерпретации данных, связанных с этиологией патологического состояния. Этот подход дополняет классический анализ ДЭГ и включает в себя два основных этапа:

1) анализ промоторов и энхансеров ДЭГ на предмет выявления факторов транскрипции, участвующих в их регуляции и, таким образом, важных для изучаемого процесса;

2) реконструкция сигнальных путей, которые активируют эти факторы транскрипции, и идентификация МР на вершине таких путей.

Таблица 1

Данные пациентов, принимавших участие в исследовании

№ пациента	Пол	Возраст, лет	Диагноз	Продолжительность жизни после начала лечения (мес.)
1	Ж	61	Рак восходящего отдела ободочной кишки pT3N0/cM1. Метастазы в печени. <i>RAS</i> , <i>BRAF</i> -дикий тип	29,1
2	Ж	60	Рак сигмовидной кишки pT3N2b/cM1. Метастазы в печени. <i>RAS</i> , <i>BRAF</i> -дикий тип	25,7
3	Ж	69	Рак ректосигмоидного отдела толстой кишки pT4aN1/cM1. Метастазы в печени, легких. <i>K-RAS</i> +	51,9

Результаты, полученные после реконструкции сигнальных путей, используют в поиске лекарственных препаратов (ЛП), пригодных для ингибирования (или активации) идентифицированных молекулярных мишеней в контексте изучаемого заболевания. Поиск осуществляется в базах данных уже известных ЛП. Это, так называемое повторное открытие лекарств (*drug repurposing*), — новая парадигма в фармакологии с целью преодоления кризиса, связанного с дороговизной и недостаточной эффективностью создания нового ЛП к каждой отдельной клеточной мишени [5]. Этот шаг выполняется с использованием информации из базы данных HumanPSD™ (The Human Proteome Survey Database), а также базы данных спектров биологической активности 2245 химических соединений, рассчитанных с помощью программы PASS (Prediction Activity Structure Substances) на основе подхода (Q)SAR (Quantitative Structure-Activity Relationship).

Описанный целостный подход позволяет в конце концов получить способ воздействия на весь набор патологически изменённых регуляторных путей в клетке, находящихся под контролем определённых МР. В настоящий момент за рубежом уже выполнено несколько исследований такого рода [5–7].

Целью настоящей работы является анализ применимости данных РНК (рибонуклеиновая кислота)-секвенирования с последующим выявлением МР для предсказания эффективности таргетной терапии у российских пациентов с колоректальным раком.

Материал и методы

В настоящем исследовании использовали образцы ткани трех пациентов с колоректальным раком, полученные из послеоперационного материала. Характеристика пациентов представлена в таблице 1. Все пациенты подписали информированное добровольное согласие на участие в исследовании. Форма информированного согласия и иные документы в рамках данного научно-исследовательского проекта были одобрены на заседании № 119 Экспертного совета по этике СПб ГБУЗ "Городская больница № 40" 9 февраля 2017г.

Все пациенты на момент включения в исследование имели метастатическую стадию заболевания и по-

лучали стандартные схемы противоопухолевой терапии в зависимости от локализации опухоли и статуса мутаций в генах *RAS* и *BRAF*. Пациент 1 с левосторонней локализацией опухоли и генами *RAS* и *BRAF* дикого типа получил 3 линии терапии. В 1 линии проведена химиотерапия по схеме mFOLFOX6¹, в комбинации с панитумумабом, во второй mFOLFOX6 в сочетании с бевацизумабом, в 3 линии FOLFIRI² с рамучирумабом. Второй пациент в связи с правосторонней локализацией опухоли в 1 линии получил комбинацию mFOLFOX6 с бевацизумабом, во 2 линии FOLFIRI с рамучирумабом. У пациента 3 была выявлена мутация гена *KRAS*, в связи с чем в 1 линии применялась схема mFOLFOX6 с бевацизумабом, во 2 линии так же mFOLFOX6 с бевацизумабом, в 3 линии FOLFIRI с афлиберцептом, в 4 линии регографениб и в 5 линии FOLFIRI с афлиберцептом. Для каждого пациента был проведен анализ как опухолевой, так и здоровой ткани. Из образцов была выделена РНК методом фенол-хлороформной экстракции и проведено секвенирование транскриптома с использованием реагентов KAPA mRNA HyperPrep Kit (Roche) на секвенаторе MiSeq (Illumina). Прочтения, полученные в ходе секвенирования, прошли контроль качества в программе FastQC³. Далее прочтения были выровнены на референсный геном человека версии hg38 с помощью программы bowtie [8]. Подсчет прочтений, относящихся к конкретным генам, выполнен пакетом featureCounts [9]. Выявление ДЭГ и поиск МР, а также составление схем метаболитических сетей и МР проведены с помощью собственных алгоритмов geneXplain⁴. Дополнительно был выполнен анализ промоторов и энхансеров ДЭГ на предмет выявления факторов транскрипции, участвующих в их регуляции, с использованием базы данных TRANSFAC[®] совместно с алгоритмами идентификации сайтов связывания TF Match и CMA (Composite Module Analyst). Реконструкция сигнальных путей, активируемых найденными факторами транскрипции, а также идентификация МР проведена с применением базы данных по передаче сигналов TRANSPATH[®] и специальных алгоритмов поиска графов, реализованных в программном обеспечении "Genome Enhancer".

¹ FOL — кальция фолинат (лейковорин), F — фторурацил, OX — оксалиплатин.

² FOL — кальция фолинат (лейковорин), F — фторурацил, IRI — иринотекан.

³ <http://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc/>.

⁴ <http://genexplain.com>.

Результаты

Для всех образцов ткани были получены результаты РНК-секвенирования, в ходе анализа которых были обнаружены ДЭГ и мутации в нескольких генах, важных для назначения ЛП. Так, для пациента 2 выявлены мутации в гене *BRCA2*, а для пациента 3 — мутации в генах *BRCA2*, *P53* и *KRAS*.

Поскольку пациент 3 имел наибольшую продолжительность жизни после начала лечения (таблица 1), представляло интерес более подробно исследовать образцы его опухолевой ткани. В валике опухоли обнаружена *KRAS*-мутация (p.G12S c.34G>A), в то время как в центре она отсутствует. Мутации гена *BRCA1* (p.K1183R c.3548A>G и p.1136R c.3667A>G) присутствуют в здоровой ткани, но не выявлены в опухолевой. Экспрессия гена *RNF43* отсутствует в здоровой ткани и в валике, но присутствует в центре опухоли, что может указывать на герминальную природу мутации. Проведенное сравнение профилей экспрессии в центре и валиках опухоли пациента 3 показало высокую корреляцию, свидетельствующую о том, что это одна и та же опухоль, с ~4000 общими генами, находящимися в состоянии повышенной экспрессии. Тем не менее, наблюдается некоторая гетерогенность: в каждой части опухоли экспрессируются ~1000 уникальных генов, в основном не кодирующих РНК. В частности, для валика опухоли характерна повышенная экспрессия генов *IRAK1*, *PELE1*, *IRF1*, *MYD88*, *AKR1C4* и *E2F7*. В центре опухоли обнаружены следующие сверхэкспрессированные гены: *DHFR*, *DCK*, *POLR3G*, *STAT1*, *IL10RB* и *MAP3K1*.

На основании анализа ДЭГ были найдены МР, приведенные в таблице 2. Выявленные изменённые метаболические пути для каждого пациента представлены на рисунках 1-3 Приложения. Полученные МР были проранжированы в соответствии с их расчетным вкладом в нарушения экспрессии генов в опухолевой ткани. Ранжирование проводилось согласно оценке значимости транскрипционного фактора, рассчитываемого внутренними алгоритмами geneXplain для выявления уровня регуляции, на котором действует фактор. Основываясь на этом списке, алгоритм также подобрал наиболее подходящие ЛП, в случае пациентов 1 и 2, отличающиеся от назначенных в клинике. Это регорафениб, целекоксиб, трастузумаб и бевацизумаб для пациента 1, регорафениб и ларотректиниб для пациента 2. В случае пациента 3 расчеты показали, что основное лечение было назначено верно, но его можно было бы дополнить препаратами олапариб, целекоксиб и куркумин.

Обсуждение

Согласно исследованиям, непрерывная активация каскада рецептора эпидермального фактора роста (кодируемого геном *EGFR*) является одной из

Таблица 2

Список генов, кодирующих обнаруженные мастер-регуляторы, для каждого пациента

Пациент 1	Пациент 2	Пациент 3
<i>CD14</i>	<i>PTK2</i>	<i>GSK3B</i>
<i>ANAPC11</i>	<i>NTRK2</i>	<i>ERBB2</i>
<i>RICTOR</i>	<i>HSPA1A</i>	<i>AURKA</i>
<i>MTOR</i>	<i>ILIRAP</i>	<i>SYK</i>
<i>IRAK2</i>	<i>MET</i>	<i>MAPKAP1</i>
<i>ERBB2</i>	<i>DUSP16</i>	<i>PKN2</i>
<i>MAPK9</i>	<i>ANAPC4</i>	<i>CASP3</i>
<i>TLR4</i>	<i>HRAS</i>	<i>IRAK4</i>
<i>PAK2</i>		<i>MELK</i>
<i>ANAPC2</i>		<i>CSNK1G1</i>
<i>MAPK8</i>		<i>EPHB2</i>
<i>IRAK1</i>		<i>MAPK14</i>
<i>PDPK1</i>		<i>VEGFA</i>
<i>ANAPC1</i>		<i>ACPI</i>
<i>PSMC3</i>		<i>CDK1</i>
<i>EGFR</i>		<i>RICTOR</i>
<i>PSMC3</i>		<i>PSMA&</i>
<i>EGF</i>		<i>IRAK2</i>
<i>PSMC5</i>		<i>SRC</i>
<i>CDC26</i>		<i>CSNK1G2</i>
<i>MAPK14</i>		<i>PRR5</i>
<i>ANPC5</i>		<i>PDPK1</i>
<i>CDC16</i>		<i>UBE21</i>
<i>MYD88</i>		<i>CCNA2</i>
<i>LBP</i>		
<i>PSMA7</i>		
<i>E4F1</i>		
<i>CDK2</i>		
<i>CDC23</i>		
<i>ANAPC7</i>		
<i>TOLLIP</i>		
<i>LY96</i>		
<i>KLH22</i>		
<i>SRC</i>		

основных причин образования опухолей [10]. Причиной подобного события могут быть значительное увеличение количества рецепторов на мембране клетки, мутации в структуре самого рецептора, приводящие к активации в отсутствие лиганда, или мутации в молекулах других участников каскада, способных привести к его запуску независимо от статуса *EGFR*. Гены *BRAF*, *KRAS* и *NRAS* являются непосредственными участниками RAS-каскада. Мутации в этих генах ассоциированы с колоректальным раком и являются биомаркерами, позволяющими оценить прогноз заболевания и перспективы использования таргетных ЛП. Полимеразная цепная реакция (ПЦР)-тест на выявление этих мутаций является неотъемлемой частью комплекса исследований опухолевой ткани, т.к. определенные варианты генотипов напрямую влияют на выбор

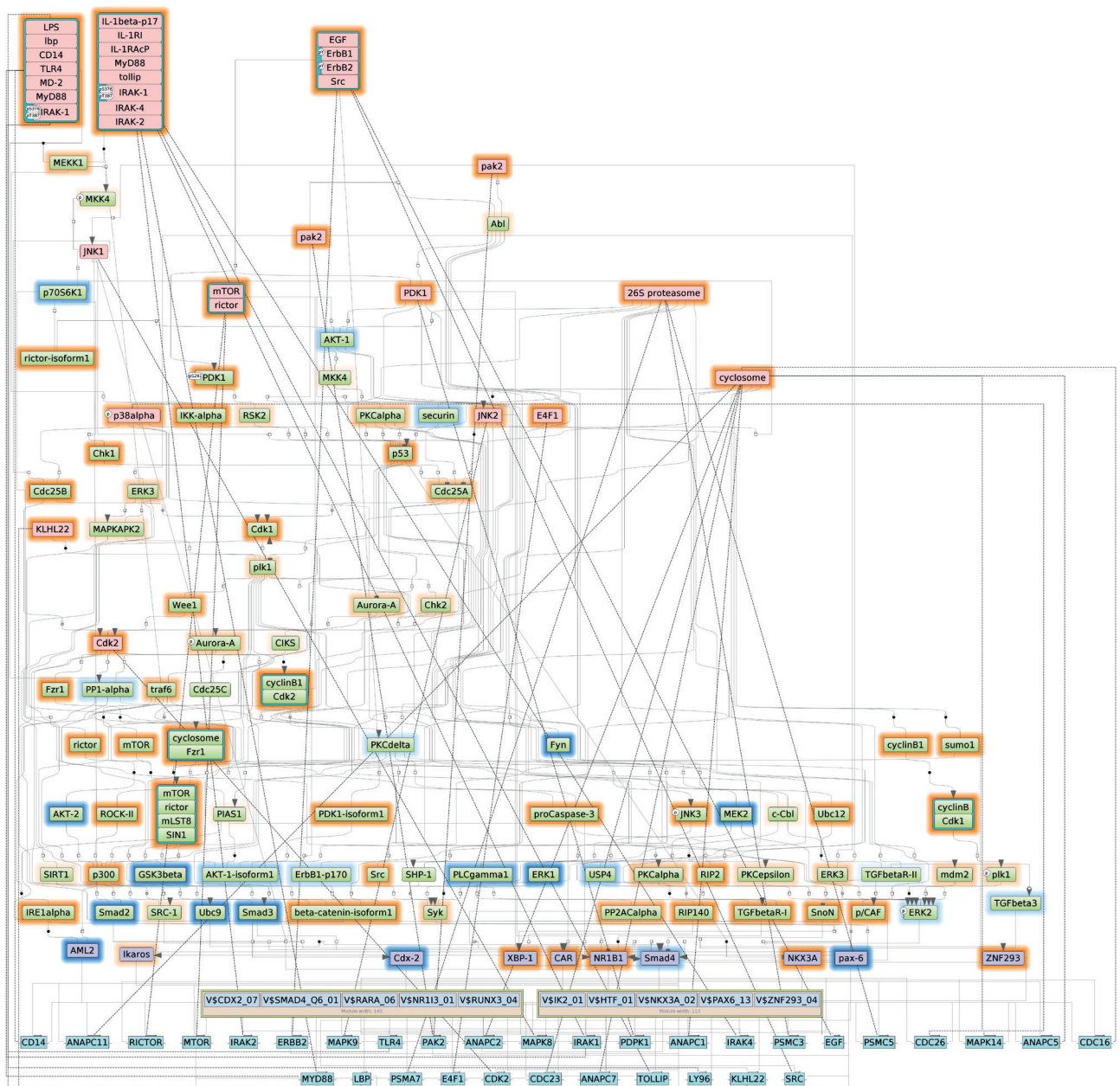


Рис. 1 Схема метаболических сетей и МР пациента 1.

Примечание: схема составлена на основании анализа дифференциальной экспрессии генов при сравнении здоровой и опухолевой ткани с помощью собственных алгоритмов geneXplain. МР обозначены красными прямоугольниками, факторы транскрипции — синими прямоугольниками, зеленые прямоугольники — промежуточные молекулы, которые были добавлены в сеть во время поиска МР из выбранных транскрипционных факторов. Оранжевыми и синими рамками выделены молекулы, которые кодируются генами с повышенной и пониженной регуляцией, соответственно. МР — мастер-регуляторы.

и эффективность ЛП, используемых в противоопухолевой терапии [11].

У пациентов 1 и 2 не было выявлено мутаций в генах RAS-каскада, что, как правило, является положительным прогностическим признаком. Больным с подобной генетической картиной обычным назначением являются препараты, влияющие на фактор роста эндотелия сосудов VEGF (vascular

endothelial growth factor) или его рецепторы [12]. В дополнение к стандартному курсу химиотерапии, в т.ч. с иринотеканом, этим двум пациентам добавлен бевацизумаб или рамуцирумаб. Бевацизумаб, селективно связывается с VEGFA и блокирует его связывание с рецепторами, замедляя, тем самым, рост и темпы васкуляризации опухоли [13]. Рамуцирумаб ингибирует рецептор VEGFR2 и не по-

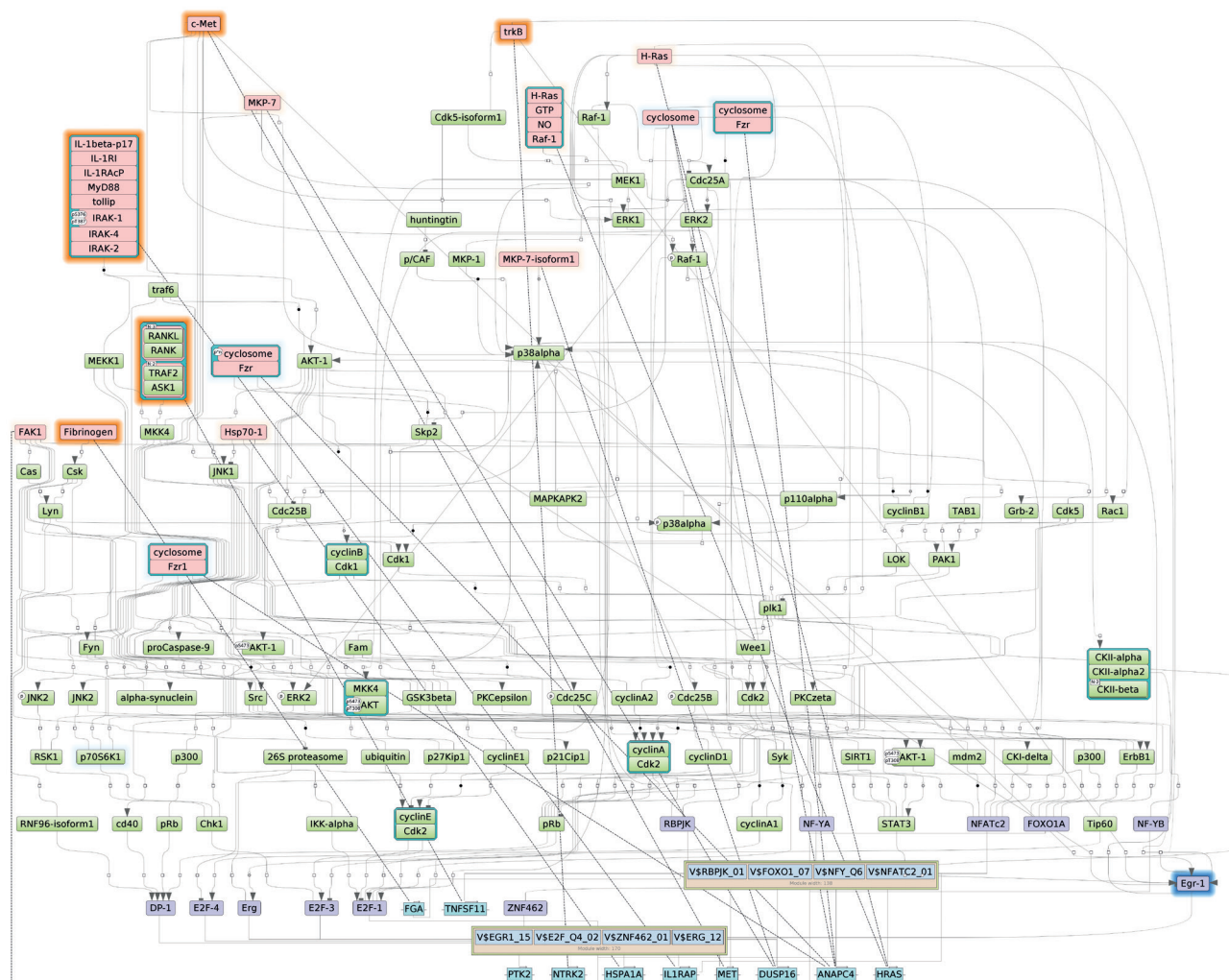


Рис. 2 Схема метаболических сетей и МР пациента 2.

Примечание: схема составлена на основании анализа дифференциальной экспрессии генов при сравнении здоровой и опухолевой ткани с помощью собственных алгоритмов geneXplain. МР обозначены красными прямоугольниками, факторы транскрипции — синими прямоугольниками, зеленые прямоугольники — промежуточные молекулы, которые были добавлены в сеть во время поиска МР из выбранных транскрипционных факторов. Оранжевыми и синими рамками выделены молекулы, которые кодируются генами с повышенной и пониженной регуляцией, соответственно. МР — мастер-регуляторы.

звolyет связываться с ним его лигандам: VEGFA, VEGFC и VEGFD. Таким образом, нейтрализуется их способность к активации пролиферации через каскад протеинкиназ p44/p42. Иринотекан ингибирует фермент топоизомеразу 1, участвующий в синтезе дезоксирибонуклеиновой кислоты (ДНК) [14].

Несмотря на позитивный прогноз, в обоих случаях лечение дало только временный эффект стабилизации и частичного регресса опухоли с последующим прогрессированием и летальным исходом. Согласно нашим результатам, у пациента 1 были более приоритетные лекарственные мишени, и персонализированный подбор препаратов на основании анализа ДЭГ и МР теоретически мог бы

повысить эффективность противоопухолевой терапии. В список возможных терапевтических мишеней вошли белки, кодируемые генами *EGF*, *EGFR*, *ERBB2*, *SRC*, *mTOR* и *PDK1* (таблица 2). VEGFA же, на который была нацелена таргетная терапия, находится только на 71-м месте в ранжированном списке МР, что указывает на его второстепенную роль в патогенезе аденокарциномы кишечника у пациента 1. В связи с этим схема лечения могла бы быть иной и более эффективной. Препаратами выбора могли бы стать регорафениб, являющийся ингибитором широкого спектра протеинкиназ, участвующих в ангиогенезе опухоли [14], целекоксиб, специфично блокирующий циклооксигеназу-2 [15],

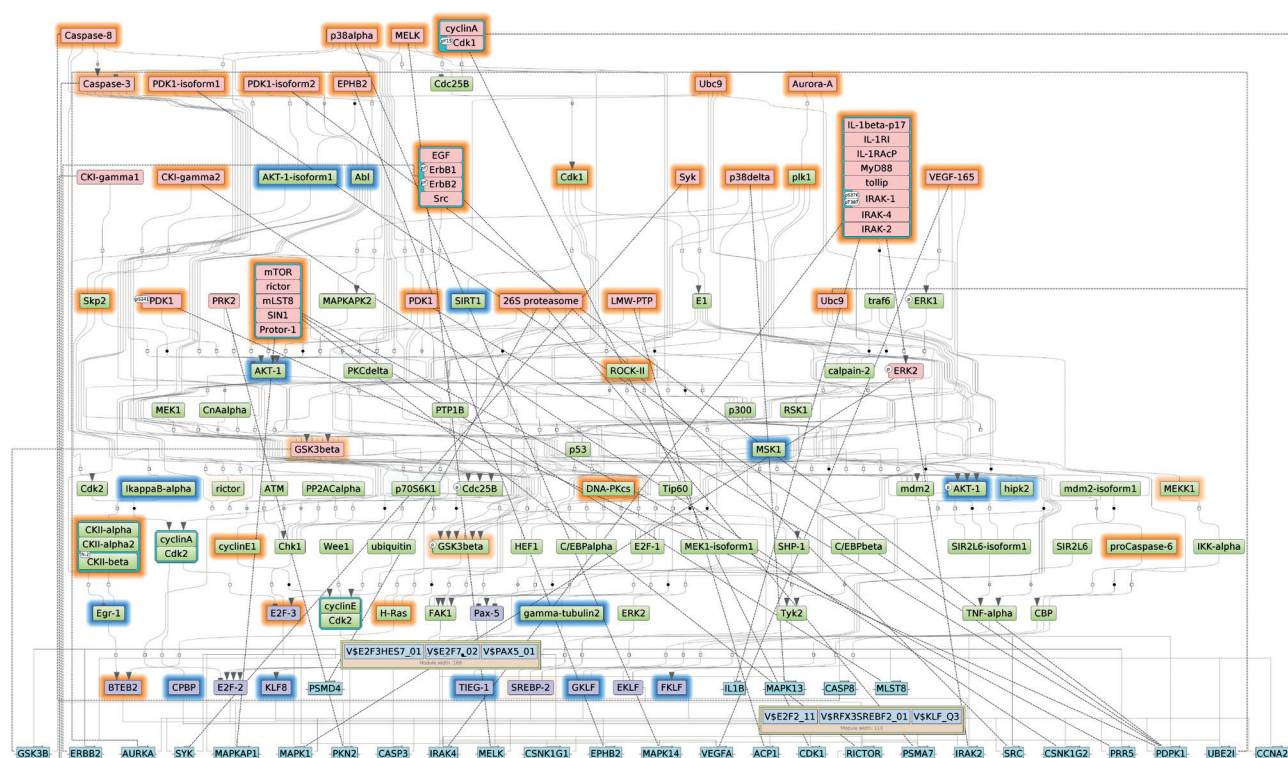


Рис. 3 Схема метаболических сетей и МР пациента 3.

Примечание: схема составлена на основании анализа дифференциальной экспрессии генов при сравнении здоровой и опухолевой ткани с помощью собственных алгоритмов geneXplain. МР обозначены красными прямоугольниками, факторы транскрипции — синими прямоугольниками, зеленые прямоугольники — промежуточные молекулы, которые были добавлены в сеть во время поиска МР из выбранных транскрипционных факторов. Оранжевыми и синими рамками выделены молекулы, которые кодируются генами с повышенной и пониженной регуляцией, соответственно. МР — мастер-регуляторы.

и трастузумаб, взаимодействующий с внеклеточным доменом рецептора 2 эпидермального фактора роста человека ERBB2 [16]. Эту терапию можно было бы дополнить бевацизумабом, что, вероятно, улучшило бы результаты лечения и обеспечило бы более долгосрочную стабилизацию состояния.

Перейдем к пациенту 2, который получал аналогичное лечение. Изначально у пациента наблюдалась стабилизация состояния, однако вскоре последовало прогрессирование, сопровождавшееся метастазированием в легкие и печень, что в конечном итоге привело к летальному исходу. Использование бевацизумаба и рамуцирумаба могло быть неэффективным, поскольку их мишени не попадают в спектр МР данной опухоли. Вместо этого более значимыми целями для лечения могли бы быть такие молекулы, как с-MET и NTRK2. Последний, хотя обычно экспрессируется в мозге, иногда может быть активен в опухолях⁵. В данном случае наиболее перспективными препаратами являются регорафениб — пероральный мультикиназный ин-

гибитор, в т.ч. специфичный к PDGFRA [14], и ларотректиниб, который был одобрен к применению при колоректальном раке в 2020г [17].

Рассмотрим пациента 3, у которого изначально присутствовали метастазы в легких и печени. Пациенту были назначены стандартные схемы химиотерапии в сочетании с анти-VEGF терапией бевацизумабом и далее афлиберцептом. В результате лечения наблюдался частичный регресс опухоли. Продолжительность жизни пациента, несмотря на наличие мутации в гене *KRAS* составила 51 мес.

В данном случае видим, что наличие МР VEGFA (таблица 2) сыграло ключевую роль, т.к. бевацизумаб, нацеленный на этот фактор, оказал положительное влияние на лечение. Тем не менее, согласно списку найденных МР, VEGFA занимает 23-е место по значимости, что указывает на то, что назначенный бевацизумаб не покрывает все возможные терапевтические мишени, что могло обусловить лишь частичный эффект противоопухолевой терапии.

Согласно расчетам, одной из наиболее эффективных мишеней является ген *PDPK1*, и для блокировки кодируемого им белка применяют препарат целексикс [15]. Еще одной интересной мишенью является продукт гена *GSK3B*, который, хотя и известен как негативный биомаркер колоректально-

⁵ Романько А.А., Мулкиджан Р.С., Сайтова Е.С. и др. Исследование перестроек генов NTRK в опухолях разных локализаций. Вопросы онкологии. 2023;3S. URL: <https://cyberleninka.ru/article/n/issledovanie-perestroek-genov-ntrk-v-opuholyah-raznyh-lokalizatsiy> (дата обращения: 08.11.2024).

го рака, обычно связан с другими типами рака, например, с раком легких [18].

Помимо поиска МР одним из важных этапов подбора таргетной терапии является анализ мутаций. Мы можем использовать имеющиеся данные РНК-секвенирования для поиска вариантов и анализа генетической гетерогенности опухоли. Хотя транскриптомный метод менее точен, чем геномный, он подходит для поставленной задачи. Исследование этим методом опухолевого материала пациента 3 выявило мутации в генах *BRCA2*, *P53* и *KRAS*. Причём оказалось, что опухоль в значительной степени гетерогенна. Обнаруженная в валике опухоли, но не в центре *KRAS*-мутация (p.G12S c.34G>A) может объяснить частичный регресс опухоли при наличии мутантного статуса, что указывает на возможность лечения с использованием ингибиторов EGFR [14]. Наличие мутации *BRCA2* (p.V2466A c.7397C>T) является показанием к использованию препарата олапариба, приводящего к задержке прогрессирования опухоли в организмах с дефицитом BRCA [16].

Гетерогенность опухоли проявилась и при анализе экспрессии в разных частях опухоли. Так, для валика опухоли характерна повышенная экспрессия генов, которые участвуют в сигнальных путях (*IL-1*, *TLR9*) и метаболизме белков (*IRAK1*, *PELE1*, *IRF1*, *MYD88*, *AKR1C4* и *E2F7*) [19, 20]. Обнаруженные в центре опухоли сверхэкспрессированные гены вовлечены в сигнальные пути (*IL-10*, *MAPK1/3*) и метаболизм нуклеиновых кислот (*DHFR*, *DCK*, *POLR3G*, *STAT1*, *IL10RB* и *MAP3K1*) [21]. Путь HIF-1 α (Hypoxia-inducible factor 1-alpha, фактор, индуцируемый гипоксией 1-альфа,) активируется при дефиците кислорода, типичен для центра солидных опухолей и запускает VEGF-сигнализацию [21]. В целом, HIF-1 α участвует в регуляции активности широкого спектра генов, задействованных в канцерогенезе [22], причем из-за особенностей оксигенации в центре опухоли и на периферии могут быть задействованы разные сигнальные пути.

Литература/References

1. Usova EI, Alieva AS, Yakovlev AN, et al. The role of multi-omics technologies and genetic analysis in the diagnosis and prediction of cardiovascular diseases. Russian Journal for Personalized Medicine. 2022;2(2):6-16. (In Russ.) Усова Е. И., Алиева А. С., Яковлев А. Н. и др. Роль мультиомиксных технологий и генетического анализа в диагностике и прогнозировании сердечно-сосудистых заболеваний. Российский журнал персонализированной медицины. 2022;2(2):6-16. doi:10.18705/2782-3806-2022-2-2-6-16.
2. Yalaev BI, Tyurin AV, Khusainova RI. Multiomics approaches to search for molecular-genetic predictors of osteoporosis. Genes & Cells. 2022;17(1):13-8. (In Russ.) Ялаев Б. И., Тюрин А. В., Хусайнова Р. И. Мультиомиксные подходы к поиску молекулярно-генетических предикторов остеопороза. Гены и Клетки. 2022;17(1):13-8. doi:10.23868/202205002.
3. Kalya M, BeiBbarth T, Kel AE. Master Regulators Associated with Poor Prognosis in Glioblastoma Multiforme. Biomed Khim. 2021;67(3):201-12. (In Russ.) Каля М., Бейсбарт Т., Кель А. Э. Мастер-регуляторы, связанные с плохим прогнозом при глиобластоме. Биомедицинская химия. 2021;67(3):201-12. doi:10.18097/PBMC20216703201.
4. Tsimberidou AM, Fountzilias E, Bleris L, et al. Transcriptomics and solid tumors: The next frontier in precision cancer medicine. Semin Cancer Biol. 2022;84:50-9. doi:10.1016/j.semcancer.2020.09.007.
5. Chung F-H, Chiang Y-R, Tseng A-L, et al. Functional module connectivity map (FMCM): A framework for searching repurposed drug compounds for systems treatment of cancer and an application to colorectal adenocarcinoma. PLoS ONE. 2014;9:e86299. doi:10.1371/journal.pone.0086299.
6. De Bastiani MA, Klamt F. Integrated transcriptomics reveals master regulators of lung adenocarcinoma and novel repositioning of drug candidates. Cancer Med. 2019;8:6717-29. doi:10.1002/cam4.2493.

На основании всех данных можно сделать вывод, что мишень VEGFA существует, и препарат бевацизумаб может быть применен, хотя он не является наиболее приоритетным, т.к. его значимость невысока. В качестве альтернативы используется афлиберцепт, который в последующем был назначен пациенту.

Итак, сочетание лечения с использованием бевацизумаба (или афлиберцепта) и куркумина представляется оптимальным вариантом, учитывая наличие мишеней VEGF и GSK3B.

Заключение

В результате настоящего исследования для каждого из трех пациентов был выявлен список МР, ранжированных относительно своей пригодности в качестве терапевтической цели на основе оценки влияния на экспрессию подконтрольных ДЭГ. Для пациентов 1 и 2 было показано, что, согласно нашим расчетам, выбранная таргетная терапия не была эффективной, поскольку при стандартной диагностике могли быть упущены индивидуальные особенности молекулярных путей, снижающие или полностью сводящие на нет действие некоторых лекарственных средств. У пациента 3 частично совпали спрогнозированные и примененные препараты, что, предположительно, и стало причиной последующей частичной ремиссии.

Таким образом, была проанализирована возможность применения данных по РНК-секвенированию с последующим выявлением ДЭГ и генов МР для предсказания эффективности терапии пациентов с аденокарциномой кишечника. В дальнейшем необходимы клинические исследования эффективности назначения лекарственной терапии на основе комплексного анализа МР.

Отношения и деятельность: все авторы заявляют об отсутствии потенциального конфликта интересов, требующего раскрытия в данной статье.

7. Vargas DM, De Bastiani MA, Parsons RB, et al. Parkinson's disease master regulators on substantia nigra and frontal cortex and their use for drug repositioning. *Mol Neurobiol*. 2021;58:1517-34. doi:10.1007/s12035-020-02203-x.
8. Langmead B, Trapnell C, Pop M, et al. Ultrafast and memory-efficient alignment of short DNA sequences to the human genome. *Genome Biol*. 2009;10:R25. doi:10.1186/gb-2009-10-3-r25.
9. Liao Y, Smyth GK, Shi W. featureCounts: an efficient general purpose program for assigning sequence reads to genomic features. *Bioinformatics*. 2014;30:923-30. doi:10.1093/bioinformatics/btt656.
10. Slugin E, Levchenko E, Imyanitov E, et al. Evaluation of the role of EGFR mutation in determining the tactics of surgical treatment of non-small cell lung cancer. *Issues in Oncology*. 2021;67(3):315-22. (In Russ.) Слугин Е., Левченко Е., Имянитов Е. и др. Оценка роли мутации EGFR при определении тактики хирургического лечения немелкоклеточного рака легкого. *Вопросы онкологии*. 2021;67(3):315-22. doi:10.37469/0507-3758-2021-67-3-315-322.
11. Toropovsky AN, Pavlova ON, Viktorov DA, et al. Molecular-genetic mechanisms of the signal cascade RAS-RAF-MEK-ERK associated with the development of the tumor process and the purpose of targeted drugs for colorectal cancer. *Bulletin of the Medical Institute "REAVIZ" (Rehabilitation, Doctor and Health)*. 2021;(4):25-35. (In Russ.) Тороповский А.Н., Павлова О.Н., Викторов Д.А., и др. Молекулярно-генетические механизмы сигнального каскада RAS-RAF-MEK-ERK, связанные с развитием опухолевого процесса и назначением таргетных препаратов при колоректальном раке. *Вестник медицинского института "РЕАВИЗ". Реабилитация, Врач и Здоровье*. 2021;(4):25-35. doi:10.20340/vmi-rvz.2021.4.MORPH.3.
12. Chekhonin VP, Shein SA, Korchagina AA, Gurina OI. VEGF in neoplastic angiogenesis. *Annals of the Russian academy of medical sciences*. 2012;(2):23-34. (In Russ.) Чехонин В.П., Шейн С.А., Корчагина А.А., Гурина О.И. Роль VEGF в развитии неопластического ангиогенеза. *Вестник Российской академии медицинских наук*. 2012;(2):23-34. doi:10.15690/vramn.v67i2.119.
13. Kuznetsova OM, Khadasheva ZS, Smirnova IP. Inhibitors of vascular endothelial growth factor and tyrosine kinase receptors as a direction of antiangiogenic therapy of tumours. *Chechen State University named after A.A. Kadyrov*. 2016;4(24):60-6. (In Russ.) Кузнецова О.М., Хадашева З.С., Смирнова И.П. Ингибиторы фактора роста эндотелия сосудов и тирозинкиназных рецепторов как направление антиангиогенной терапии опухолей. *Вестник Чеченского государственного университета им. А.А. Кадырова*. 2016;4(24):60-6.
14. Andreev DA, Zav'yalov AA, Kokushkin KA, Davydovskaya MV. The application of the modern target medications for the treatment of metastatic colorectal cancer. *Russian Journal of Evidence-Based Gastroenterology*. 2018;7(2):21-9. (In Russ.) Андреев Д.А., Завьялов А.А., Кокушкин К.А., Давыдовская М.В. Современные таргетные препараты в терапии метастатического рака прямой кишки. *Доказательная гастроэнтерология*. 2018;7(2):21-9. doi:10.17116/dokgastro20187221.
15. Savelieva OE, Perelmutter VM, Tashireva LA, et al. Inflammation as a therapeutic target in the complex treatment of malignant tumors. *Siberian Journal of Oncology*. 2017;16(3):65-78. (In Russ.) Савельева О.Е., Перельмутер В.М., Таширева Л.А. и др. Воспаление как терапевтическая мишень при комплексном лечении злокачественных опухолей. *Сибирский онкологический журнал*. 2017;16(3):65-78. doi:10.21294/1814-4861-2017-16-3-65-78.
16. Kachmazov AA, Bolotina LV, Kornietskaya AL, et al. Possibilities of therapeutic use of HER2-inhibitors in metastatic colorectal cancer: a case report. *Meditsinskiy sovet = Medical Council*. 2019;(19):126-31. (In Russ.) Качмазов А.А., Болотина Л.В., Корниетская А.Л. и др. Возможности таргетной терапии метастатического колоректального рака с гиперэкспрессией HER2: клинический случай. *Медицинский Совет*. 2019;(19):126-31. doi:10.21518/2079-701X-2019-19-126-131.
17. Cheporova MS, Cheporov SV, Tryakin AA. The choice of treatment for chemorefractory colon cancer. *Malignant tumours*. 2023;13(3):56-63. (In Russ.) Чепорова М.С., Чепоров С.В., Трякин А.А. Выбор лечения химиорефрактерного рака толстой кишки. *Злокачественные опухоли*. 2023;13(3):56-63. doi:10.18027/2224-5057-2023-13-3-56-63.
18. Shakoori A, Ougolkov A, Yu ZW, et al. Deregulated GSK3beta activity in colorectal cancer: its association with tumor cell survival and proliferation. *Biochem Biophys Res Commun*. 2005;334(4):1365-73. doi:10.1016/j.bbrc.2005.07.041.
19. Stukan AI, Murashko RA, Porkhanov VA, et al. The inflammatory tumor microenvironment and tumor cell plasticity in the pathogenesis of colorectal cancer. *P.A. Herzen Journal of Oncology*. 2021;10(4):66-74. (In Russ.) Стукань А.И., Мурашко Р.А., Порханов В.А. и др. Воспалительное опухолевое микроокружение и пластичность опухолевой клетки в патогенезе колоректального рака. *Онкология. Журнал им. П.А. Герцена*. 2021;10(4):66-74. doi:10.17116/onkolog20211004166.
20. Imyanitov EN. Clinical and molecular aspects of colorectal cancer: etiopathogenesis, prevention, and individualization of treatment. *Prakticheskaya onkologiya = Practical Oncology*. 2005;6(2):65-70. (In Russ.) Имянитов Е.Н. Клиномолекулярные аспекты колоректального рака: этиопатогенез, профилактика, индивидуализация лечения. *Практическая онкология*. 2005;6(2):65-70.
21. Zhukova AG, Kazitskaya AS, Sazontova TG, Mikhailova NN. Hypoxia-inducible factor (HIF): structure, function and genetic polymorphism. *Hygiene and sanitation*. 2019;98(7):723-8. (In Russ.) Жукова А.Г., Казицкая А.С., Сазонтова Т.Г., Михайлова Н.Н. Гипоксией индуцируемый фактор (HIF): структура, функции и генетический полиморфизм. *Гигиена и санитария*. 2019;98(7):723-8. doi:10.47470/0016-9900-2019-98-7-723-728.
22. Lyanova AA, Vladimirova LYu, Frantsiyants EM, et al. Molecular basis of modern targeted therapy for squamous cell carcinoma of the tongue and oral mucosa with monoclonal antibodies. *Malignant tumours*. 2017;7(4):77-87. (In Russ.) Лянова А.А., Владимирова Л.Ю., Франциянц Е.М. и др. Молекулярные основы современной таргетной терапии плоскоклеточного рака языка и слизистой дна полости рта моноклональными антителами. *Злокачественные опухоли*. 2017;7(4):77-87. doi:10.18027/2224-5057-2017-7-4-77-87.

Влияние многоциклического замораживания-оттаивания плазмы крови на результаты проведения неинвазивного пренатального тестирования

Уланова П. В., Антоненко А. Н., Доморацкая Е. А., Белов Р. О., Золотопуп А. А.,
Леонова В. С., Криницына А. А., Беленикин М. С.

Медико-генетическая лаборатория ООО "Эвоген". Москва, Россия

Цель. Оценить допустимость факта прохождения неинвазивного пренатального тестирования (НИПТ) в роли информативного критерия для определения качества плазмы крови (ПК) и внеклеточной дезоксирибонуклеиновой кислоты (ДНК) (вкДНК) в случае, когда на преаналитическом этапе используются пробирки со стабилизирующим составом, на примере образцов ПК, подвергнутых продолжительному хранению при комнатной температуре (+18°C) и многоциклическому замораживанию-оттаиванию.

Материал и методы. Образцы ПК подвергали 20 циклам замораживания-оттаивания (-80°C/+18°C), 20-дневному хранению при температуре +18°C с промежуточной оценкой состояния вкДНК. Количественный выход оценивали флуорометрически, степень фрагментации — с помощью полимеразной цепной реакции (ПЦР) в реальном времени, результаты НИПТ — через высокопроизводительное секвенирование.

Результаты. После многоциклического замораживания-оттаивания и длительного хранения ПК при комнатной температуре (+18°C) наблюдается снижение целостности вкДНК, уменьшение концентрации вкДНК к 20 циклу оттаивания и тенденция к увеличению концентрации к 20 сут. хранения ПК; несмотря на это, результаты НИПТ исследованных образцов показали высокую степень совпадения с результатами НИПТ референсных образцов.

Заключение. Показано, что один только факт успешного проведения НИПТ не может рассматриваться в качестве надежного и до-

статочного критерия оценки качества исходной ПК и правильной преаналитики. Это подчеркивает особую важность контроля условий транспортировки и хранения образцов ПК и цельной крови.

Ключевые слова: внеклеточная ДНК, условия хранения плазмы крови, биобанкирование, преаналитические факторы, неинвазивные пренатальные тесты.

Отношения и деятельность: нет.

Поступила 30/08-2024

Рецензия получена 01/10-2024

Принята к публикации 03/11-2024



Для цитирования: Уланова П. В., Антоненко А. Н., Доморацкая Е. А., Белов Р. О., Золотопуп А. А., Леонова В. С., Криницына А. А., Беленикин М. С. Влияние многоциклического замораживания-оттаивания плазмы крови на результаты проведения неинвазивного пренатального тестирования. *Кардиоваскулярная терапия и профилактика*. 2024;23(11):4172. doi: 10.15829/1728-8800-2024-4172. EDN GQSUNI

Effect of multiple plasma freeze-thaw cycles on non-invasive prenatal testing

Ulanova P. V., Antonenko A. N., Domoratskaya E. A., Belov R. O., Zolotopup A. A., Leonova V. S., Krinitsyna A. A., Belenikin M. S.
Medical genetics laboratory "Evogen". Moscow, Russia

Aim. To assess non-invasive prenatal testing (NIPT) as an informative criterion for quality of blood plasma and cell-free deoxyribonucleic acid (DNA) (cfDNA) in the case of using stabilization tubes at the preanalytical phase, in the example of plasma samples subjected to long-term storage at room temperature (+18°C) and multiple freeze-thaw cycles.

Material and methods. The plasma samples were subjected to 20 freeze-thaw cycles (-80°C/+18°C), 20-day storage at +18°C with an intermediate cfDNA assessment. The quantitative yield was assessed by fluorometry, while the fragmentation and NIPT data — using real-time polymerase chain reaction (PCR) and high-throughput sequencing, respectively.

Results. After multiple freeze-thaw cycles and long-term plasma storage at room temperature (+18°C), a decrease in the integrity and the concentration of cfDNA by the 20th thawing cycle, as well as a tendency to an increase in concentration by 20 days of storage were observed. Despite this, the NIPT results of the studied samples showed a high degree of coincidence with the NIPT data of the reference samples.

Conclusion. The mere fact of successful NIPT cannot be considered as a reliable and sufficient criterion for assessing the quality of initial plasma and correct preanalytics. This emphasizes the particular importance of monitoring the conditions for transporting and storing plasma and whole blood samples.

*Автор, ответственный за переписку (Corresponding author):

e-mail: ulanova@evogenlab.ru

[Уланова П. В. — биолог, ORCID: 0009-0003-6868-8489, Антоненко А. Н. — специалист по высокопроизводительному секвенированию, ORCID: 0009-0004-8003-8216, Доморацкая Е. А. — биолог, ORCID: 0000-0001-9946-2878, Белов Р. О. — специалист по высокопроизводительному секвенированию, ORCID: 0009-0009-4286-4791, Золотопуп А. А. — специалист по высокопроизводительному секвенированию, ORCID: 0000-0003-1962-0448, Леонова В. С. — врач-лабораторный генетик, ORCID: 0000-0002-2221-6916, Криницына А. А. — к.б.н., зам. зав. лабораторией, ORCID: 0000-0002-0653-3655, Беленикин М. С. — к.х.н., зав. лабораторией, директор по научно-исследовательской работе, ORCID: 0000-0002-6556-163X].

Keywords: cell-free DNA, blood plasma storage conditions, biobanking, preanalytical factors, noninvasive prenatal testing.

*Corresponding author: ulanova@evogenlab.ru

Relationships and Activities: none.

Received: 30/08-2024

Revision Received: 01/10-2024

Accepted: 03/11-2024

Ulanova P. V.* ORCID: 0009-0003-6868-8489, Antonenko A. N. ORCID: 0009-0004-8003-8216, Domoratskaya E. A. ORCID: 0000-0001-9946-2878, Belov R. O. ORCID: 0009-0009-4286-4791, Zolotopup A. A. ORCID: 0000-0003-1962-0448, Leonova V. S. ORCID: 0000-0002-2221-6916, Krinitsyna A. A. ORCID: 0000-0002-0653-3655, Belenikin M. S. ORCID: 0000-0002-6556-163X.

For citation: Ulanova P. V., Antonenko A. N., Domoratskaya E. A., Belov R. O., Zolotopup A. A., Leonova V. S., Krinitsyna A. A., Belenikin M. S. Effect of multiple plasma freeze-thaw cycles on non-invasive prenatal testing. *Cardiovascular Therapy and Prevention*. 2024;23(11):4172. doi: 10.15829/1728-8800-2024-4172. EDN QGSUNI

вкДНК — внеклеточная ДНК, ДНК — дезоксирибонуклеиновая кислота, НИПТ — неинвазивное пренатальное тестирование/неинвазивный пренатальный тест, ПК — плазма крови, ПЦР — полимеразная цепная реакция.

Ключевые моменты

Что известно о предмете исследования?

- Преаналитические факторы обработки и хранения плазмы крови (ПК) имеют непосредственное влияние на проведение исследований внеклеточной дезоксирибонуклеиновой кислоты (вкДНК).
- Не определены четкие границы максимально допустимого превышения циклов замораживания-оттаивания и времени хранения ПК при использовании стабилизирующих пробирок с консервантом в сравнении с пробирками с ЭДТА для целей неинвазивного пренатального тестирования (НИПТ).

Что добавляют результаты исследования?

- НИПТ с использованием пробирок со стабилизирующим составом для сбора образцов при несоблюдении преаналитических факторов хранения ПК (продолжительное хранение и многоциклическое замораживание-оттаивание) не может рассматриваться достаточным критерием оценки хорошего качества преаналитической обработки ПК.
- В большинстве работ, описывающих манипуляции с вкДНК, рекомендуется однократное замораживание-оттаивание ПК (что связано с использованием пробирок с ЭДТА); однако проведенные исследования с ПК, стабилизированной в пробирках с консервантом, позволяют сделать предположение о корректировке этих параметров (продолжительное хранение и многоциклическое замораживание-оттаивание) в сторону увеличения.

Key messages

What is already known about the subject?

- Preanalytical factors for processing and storing blood plasma have a direct impact on cell-free deoxyribonucleic acid (cfDNA) studies.
- Clear boundaries have not been defined for the maximum permissible excess of freeze-thaw cycles and plasma storage time when using stabilization tubes with a preservative compared to EDTA tubes for noninvasive prenatal testing (NIPT).

What might this study add?

- NIPT using stabilization tubes without observing the preanalytical factors for plasma storage (long-term storage and multiple freeze-thaw cycles) cannot be considered a sufficient criterion for assessing the good quality of preanalytical plasma processing.
- Most studies describing manipulations with cfDNA recommend a single plasma freeze-thaw (which is associated with the use of EDTA tubes); however, studies conducted with plasma stabilized in tubes with a preservative make it possible to assume that these parameters (long-term storage and multiple freeze-thaw cycles) should be adjusted upward.

Введение

Внеклеточные дезоксирибонуклеиновые кислоты (ДНК) (вкДНК, циркулирующие ДНК), циркулирующие в плазме крови (ПК) человека и других биологических жидкостях организма, появляются в результате таких процессов как апоптоз,

некроз, активная секреция, кроме того, обнаруживаемые в ПК вкДНК могут относиться к ДНК патогенов (бактерий, вирусов). Присутствие вкДНК в ПК у здоровых людей обусловлено процессом апоптоза гемопоэтических клеток [1, 2]. В кровотоке беременных присутствуют фетальные вкДНК,

основными механизмами возникновения которых являются апоптоз гемопоэтических клеток плода, перенос вкДНК плода через плаценту и разрушение трофобласта [3]. Количество циркулирующей ДНК плода зависит, помимо срока гестации и течения беременности, от других факторов, таких как наличие заболеваний у матери, масса тела, анеуплоидии, многоплодная беременность [4]. Функциональная роль вкДНК активно изучается, в частности они могут образовывать нуклео-протеиновые комплексы [5].

Из всех преаналитических переменных при обработке образцов цельной крови и ПК условия их хранения оказывают существенно влияют на качество вкДНК [6-12], однако информация по влиянию особенностей хранения ПК на качество вкДНК значительно варьирует. Общие положения сводятся к тому, что ПК, полученную после центрифугирования образца цельной крови с дальнейшим отбором супернатанта, отделенного от фракции клеток крови, рекомендуют кратко-срочно хранить при -20°C или долгосрочно при -80°C . Считается, что данные температурные режимы позволяют подавить процесс ферментативного расщепления ядерной и вкДНК дезоксирибонуклеазами (ДНКазы) [13]. По данным [11] хранение ПК при -80°C без влияния на количественные характеристики вкДНК при последующей экстракции должно продолжаться не >9 мес. При более длительном хранении ПК выход вкДНК может приводить к снижению количества экстрагируемой вкДНК на $\sim 30\%$ в год [14]. В то же время по другим данным [15], даже после 12 лет хранения ПК при сходных условиях, количество выделенной вкДНК из ПК онкобольных мало изменилось, а ее качество позволило провести анализ специфических последовательностей.

Важным аспектом практической работы для исследований вкДНК, в частности для неинвазивного пренатального тестирования (НИПТ), является понимание стабильности вкДНК в ПК, отделенной от форменных элементов крови, в условиях без замораживания — при хранении при комнатной температуре перед экстракцией вкДНК. Данных по этому вопросу немного, поэтому любые количественные данные о влиянии превышения сроков хранения ПК при комнатной температуре предоставят полезную информацию для преаналитической работы с вкДНК для проведения НИПТ.

Помимо сроков и условий хранения ПК очень важным параметром является количество циклов замораживания-оттаивания образцов ПК. Литературные данные разнятся, в одних работах существенных изменений концентраций вкДНК не выявляли [8], тогда как в других авторы отмечали не большое снижение целостности и качества вкДНК уже после трех циклов замораживания-оттаивания

с -80°C до комнатной температуры [13, 16], при этом даже однократное замораживание-оттаивание образцов ПК может привести к снижению процента обнаружения патологии плода при проведении НИПТ [17]. Несмотря на некоторые расхождения, большинство авторов сообщают об однозначно негативном влиянии фактора множественного замораживания-оттаивания и приводят рекомендации предпочтительного хранения вкДНК в виде элюата, а также разделения образцов ПК на несколько аликвот на этапе обработки цельной крови для предполагаемого сокращения влияния числа замораживаний-оттаиваний [13].

Вопрос о точном количестве циклов, вызывающих явную деградацию вкДНК и являющимся критичным для дальнейшего исследования вкДНК, остается открытым. Особенно это касается области практического применения вкДНК, в частности, проведение НИПТ, при котором значимым этапом является работа с ПК и вкДНК. В практическом аспекте важно тестирование границ стабильности и оптимальной подготовки образцов ПК к замораживанию для удобства дальнейшей работы и обеспечения максимально возможного качества, а также для обеспечения воспроизводимости результатов с течением времени и поиска ответа на вопрос: какое количество циклов замораживания-оттаивания ПК все же возможно без существенного влияния на качество. Еще одним из прикладных результатов ответа на этот вопрос является оптимизация хранения образцов ПК в биобанках. Если ориентироваться на хранение биоматериала каждого образца в минимально возможном числе криопробирок (пробирок, предназначенных для хранения при низких температурах), то в случае образцов, представляющих интерес (например, содержащих анеуплоидии), при дальнейших и валидационных исследованиях может требоваться чрезмерное многократное замораживание-оттаивание образца. В то же время, проведение предварительного алиquotирования всех поступающих образцов ПК на большое количество аликвот малого объема может привести к излишнему расходу материалов и емкостей хранения. И хотя, как правило, вопрос экономики хранения образцов при проведении научных исследований не рассматривается, он может вносить значительный вклад экономическую составляющую проводимых работ.

Цель настоящей работы — оценить допустимость факта прохождения НИПТ в роли информативного критерия для определения качества ПК и вкДНК, в случае, когда на преаналитическом этапе используются пробирки со стабилизирующим составом, на примере образцов ПК, подвергнутых продолжительному хранению при комнатной температуре ($+18^{\circ}\text{C}$) и многоциклическому замораживанию-оттаиванию.

Материал и методы

Образцы. Для проведения исследования использовали образцы ПК пациенток, находящихся на 10-14 нед. гестации после проведения традиционного пренатального скрининга. Все женщины подписали информированное согласие на проведение исследований и обработку персональных данных, включая данные анамнеза.

Для исследования факторов многоциклического замораживания-оттаивания было проанализировано 5 отдельных кейсов (4 — с наличием повышенного риска хромосомной патологии плода, 1 — без), для длительного хранения ПК — 10 (5 — с наличием повышенного риска хромосомной патологии плода, 5 — без).

Сбор и подготовка образцов для секвенирования. Исходным биоматериалом служила периферическая венозная кровь, собранная в одну пробирку с консервантами, стабилизирующими вкДНК (Streck Cell Free DNA BCT, США). Обработку первичного материала после взятия осуществляли согласно разработанным стандартным операционным процедурам. Кратко, полученные образцы подвергали 2-этапному центрифугированию, после чего ПК, за исключением нижней части объемом ~200 мкл, по 1 мл помещали в криопробирки. Всего для каждого образца было подготовлено 4 аликвоты ПК (каждая в двух повторах) — 1 контрольная проба (после однократного замораживания при -20°C , не подвергавшаяся длительному хранению) и 3 экспериментальных пробы (для 5, 10 и 20 циклов и 5, 10 и 20 сут. хранения). Подготовленные образцы ПК подвергали 20-кратному замораживанию-оттаиванию в режиме $-80^{\circ}\text{C}/+18^{\circ}\text{C}$ с промежуточной оценкой степени деградации и количественного выхода вкДНК на 5, 10 и 20 циклах, а также хранению в течение 20 сут. при температуре $+18^{\circ}\text{C}$ (комнатная температура) с оценкой через 5, 10 и 20 сут.

ВкДНК выделяли с использованием станции пробоподготовки MGISP-960 (MGI, Китай) и набора реагентов для выделения вкДНК Nucleic Acid Extraction Kit (BGI, Китай) по стандартному протоколу производителя. Подготовку библиотек ДНК для проведения НИПТ проводили с использованием той же станции пробоподготовки MGISP-960 (MGI, Китай) и набора реактивов MGIEasy Cell-free DNA Library Prep Set (BGI, Китай) с использованием стандартных протоколов производителя. Секвенирование проводили на BGISEQ-500 (BGI, Китай). Результаты высокопроизводительного секвенирования обрабатывали с использованием проприетарного программного обеспечения.

Оценка количественного выхода и деградации образцов вкДНК. Оценку количественного выхода и оценку деградации вкДНК проводили флуориметрическим способом с набором для измерения концентраций DeNovix dsDNA High Sensitivity Kit (DeNovix Inc., США) и с помощью полимеразной цепной реакции (ПЦР) в реальном времени с применением коммерческого набора для количественной и качественной оценки ДНК человека "QuantumDNA-Set" (Евроген, Россия) и амплификатора CFX96 Touch™ Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad, США) согласно инструкции производителя.

Различия оценивались с помощью непараметрического критерия Манна-Уитни путем сравнения численного эмпирического и критического значений (уровень значимости $p=0,05$) с использованием пакета Microsoft Excel 2018 (Майкрософт, США).

Результаты

Влияние многократных циклов замораживания-оттаивания ПК на качество вкДНК. Вначале была проведена флуориметрическая количественная оценка образцов вкДНК, полученных из ПК, подвергшейся многократным циклам замораживания-оттаивания $-80^{\circ}\text{C}/+18^{\circ}\text{C}$. Диапазон концентраций вкДНК для контрольных аликвот и экспериментальных образцов составил 0,195-0,249 нг/мкл. После 5 и 10 циклов замораживания-оттаивания проб статистически достоверных различий выявлено не было, тогда как к 20 циклу показано статистически значимое уменьшение концентрации вкДНК (рисунки 1 А).

При этом анализ оценки целостности тех же образцов, проводимый методом ПЦР в реальном времени через подсчет соотношений концентраций амплифицированных фрагментов разных длин, показал отсутствие четкой корреляции между количеством циклов замораживания-оттаивания и степенью фрагментации вкДНК. В отдельных пробах степень деградации резко увеличивается уже на 5 цикле, тогда как у других даже после 10 циклов замораживания-оттаивания вкДНК оставалась слабо деградированной. К 20 циклу наблюдалось увеличение степени фрагментации вкДНК во всех образцах.

При анализе расчетной концентрации фрагментов вкДНК размером 50 и 150 пар нуклеотидов (п.н.) было выявлено, что в контрольных образцах их концентрации примерно равны между собой (0,077 и 0,075 нг/мкл, соответственно), а далее, по мере того, как увеличивалось число циклов замораживания-оттаивания (5 и 10 циклов), концентрация более длинных фрагментов снижалась, тогда как концентрация коротких фрагментов оставалась практически на том же уровне (рисунок 1 Б). К 20 циклу концентрация более коротких фрагментов снижалась, тогда как концентрация более длинных фрагментов опять возрастала. Это может быть связано с тем, что при большом количестве циклов замораживания-оттаивания более длинные фрагменты вкДНК, которые также есть в образце, деградируют и начинают давать свой вклад.

Влияние многократных циклов замораживания-оттаивания ПК на результаты НИПТ. Далее, для одного из двух повторов тестовых образцов проводили выборочное секвенирование для определения сходимости результатов НИПТ внутри одного образца (таблица 1).

Для одного из пяти исследуемых образцов (№ 2) был выявлен повышенный риск трисомии по 13 хромосоме после 5 циклов замораживания-оттаивания, тогда как в контроле и в образцах, подвергшихся 10 и 20 циклам, трисомии не детектировалось. Кроме этого, в образцах, которые подвергали 5 и 10 циклам замораживания-оттаивания были выявлены

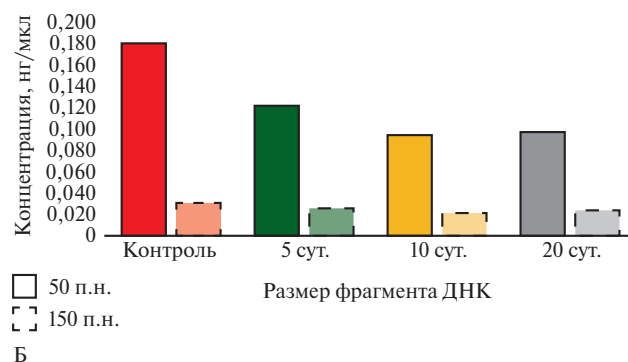
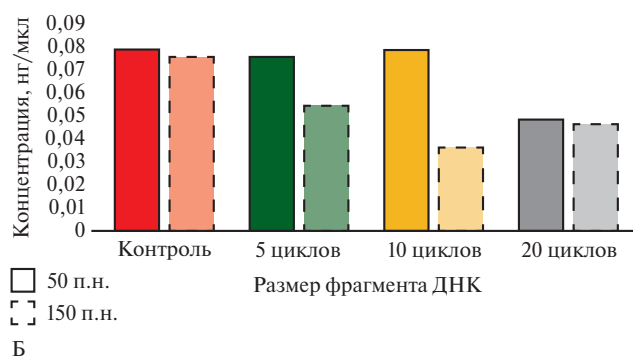
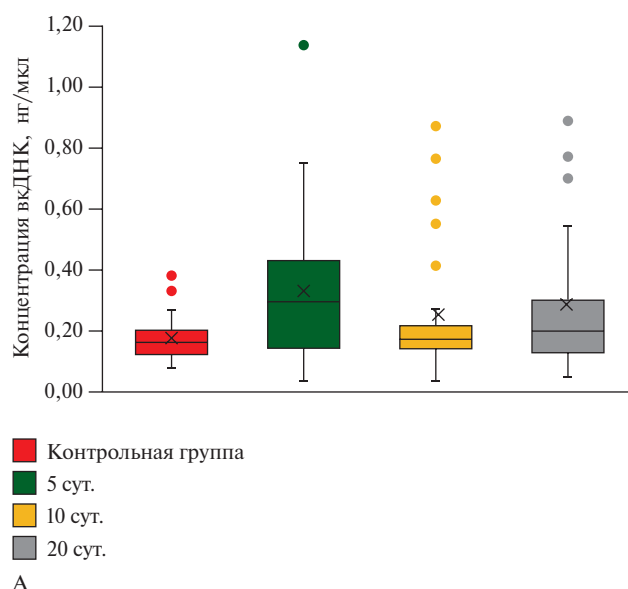
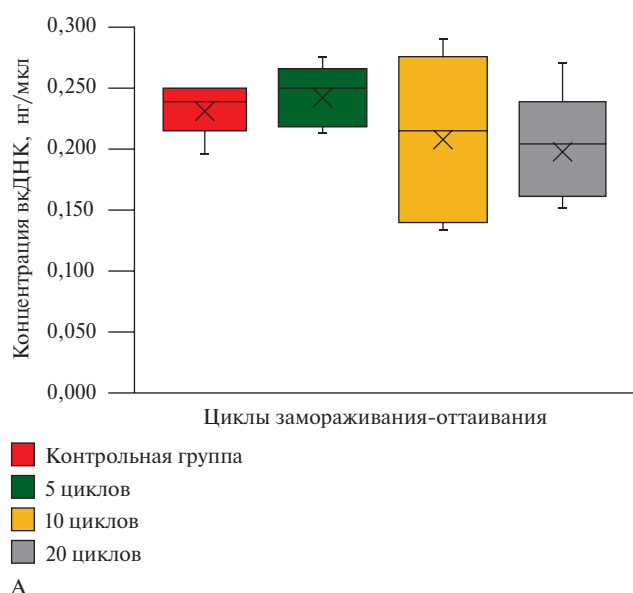


Рис. 1 Изменение концентрации вкДНК (А) и соотношений концентраций фрагментов 50 и 150 п.н. (Б), в препаратах ДНК, полученных из образцов ПК после разного количества циклов замораживания-оттаивания $-80^{\circ}\text{C}/+18^{\circ}\text{C}$.

Примечание: вкДНК — внеклеточная дезоксирибонуклеиновая кислота (ДНК), ПК — плазма крови, п.н. — пар нуклеотидов.

Рис. 2 Изменение концентрации вкДНК (А) и соотношений концентраций фрагментов 50 и 150 п.н. (Б), в препаратах ДНК, полученных из образцов ПК после разных сроков хранения при $+18^{\circ}\text{C}$.

Примечание: вкДНК — внеклеточная дезоксирибонуклеиновая кислота (ДНК), ПК — плазма крови.

делеции в 4, 7 и 3 и 4 хромосомах, соответственно, тогда как в контрольном образце и в образце, который прошел 20 циклов замораживания-оттаивания, таких вариантов не выявлено. Повышенный риск трисомии ($Z(\text{chr}13)=2,03$) в данном случае означает, что образец попадает в "серую" зону и может оцениваться как образец с наличием риска по хромосомным аномалиям, т.е., ложноположительный результат НИПТ, или как образец с отсутствием риска по хромосомным аномалиям — ложноотрицательный образец.

Контрольная проба образца № 4 секвенировалась в двух повторях. Секвенирование одного повторения контрольного образца № 4 детектировало высокий риск наличия дополнительной половой X хромосомы и аналогично кейсу образца номер № 2 — данный результат попадает в "серую" зону ($Q20(\%)=93,44$, $\text{Effective data}(M)=5,04$ при $[5, +\infty]$), фетальная фракция ≈ 4) и требуется по-

вторное проведение анализа. Результаты НИПТ, проводимые для второго повторения, показали улучшение параметров качества секвенирования ($(Q20(\%)=98,95$, $\text{Effective data}(M)=7,39$ при $[5, +\infty]$), фетальная фракция ≈ 5) и отсутствие повышенных рисков хромосомных аномалий. В экспериментальных образцах после 5, 10 и 20 циклов результаты НИПТ также соответствовали контролю.

В остальных проанализированных образцах различий в результатах НИПТ в контроле и после многократных циклов замораживания-оттаивания не обнаружено.

Влияние длительного хранения ПК на качество вкДНК. Количественная оценка содержания вкДНК в образцах ПК, хранившихся продолжительное время при комнатной температуре ($+18^{\circ}\text{C}$), выявила значительный разброс концентраций внутри диапазона 0,18–1,18 нг/мл. При этом выход вкДНК через 10 сут. после хранения довольно резко

Таблица 1

Результаты выборочного секвенирования вкДНК, полученной из образцов ПК, подтвердившихся разному количеству циклов замораживания-оттаивания

Образец	ДНК плода (%) [3.50,50]	Z(chr13)	Z(chr18)	Z(chr21)	Тест (половые хромосомы)	Заболевание	Тест (Del/Dup)	Q20 (%) [93,100]	ГЦ (%) [38,42]	Пол плода
1-0	22,35	0,094	13,073	-0,034	Отрицательный	Chromosome 18q deletion Syndrome	del(18q22.1-q23.11.97M)	98,06	39,197	муж
1-5	25,362	0,814	13,979	0,717	Отрицательный	Chromosome 18q deletion Syndrome	del(18q22.1-q23.12.10M)	97,93	39,764	муж
1-10	18,48	-0,605	10,683	0,519	Отрицательный	Chromosome 18q deletion Syndrome	del(18q22.1-q23.10.24M)	99,13	38,304	муж
1-20	19,96	0,891	11,977	0,072	Отрицательный	Chromosome 18q deletion Syndrome	del(18q22.1-q23.11.91M)	98,19	39,398	муж
2-0	3,796	-0,125	-2,242	-1,104	XXX высокий риск (++++)	—	—	98,88	38	жен
2-5	3,785	2,027*	-0,867	0,709	XXX высокий риск (++++)	—	del(4p16.3-p11.48.65M)* del(7p15.2-p11.2.29.53M)*	98,72	39,13	жен
2-10	3,895	0,436	-1,247	0,709	XXX высокий риск (++++)	—	del(3p26.3-p11.1.89.44M)* del(4p16.3-p15.32.16.34M)* del(4p15.32-p11.31.21M)*	99,16	38,301	жен
2-20	3,854	0,092	-2,842	-0,757	XXX высокий риск (++++)	—	—	98,08	39,363	жен
3-0	14,192	-0,899	-2,818	16,424	Отрицательный	—	—	97,05	39,143	муж
3-5	12,595	-2,553	-1,27	18,947	Отрицательный	—	—	98,85	40,853	муж
3-10	11,294	-2,514	-2,339	12,437	Отрицательный	—	—	98,8	39,325	муж
3-20	12,252	-1,356	-0,62	14,078	Отрицательный	—	—	97,92	39,914	муж
4-0	4,019	-2,11	-1,342	-1,019	XXX высокий риск (++++)*	—	—	93,44	40,031	жен
4-0	5,191	-1,048	-1,607	-0,938	Отрицательный	—	—	98,95	39,841	жен
4-5	5,951	0,23	-0,254	0,405	Отрицательный	—	—	99,12	40,299	жен
4-10	4,293	-0,609	-1,663	-1,565	Отрицательный	—	—	98,46	40,237	жен
4-20	5,439	1,013	-1,102	-0,685	Отрицательный	—	—	99,03	39,832	жен
5-0	23,178	0,631	-0,411	0,555	XXX высокий риск (++++)	—	—	98,4	39,838	жен
5-5	21,961	-0,66	1,354	-0,005	XXX высокий риск (++++)	—	—	98,62	40,059	жен
5-10	21,439	-0,647	0,145	-1,008	XXX высокий риск (++++)	—	—	99,04	39,786	жен
5-20	19,486	-1,035	-1,14	0,419	XXX высокий риск (++++)	—	—	98,59	40,15	жен

Примечание: цифра после номера образца — количество циклов замораживания-оттаивания, жирным шрифтом выделены значения, указывающие на наличие трисомии по 18-й (образец 1), 21-й (образец 4) хромосомам или по половым (образец 2) хромосомам; курсивом и * обозначены различающиеся показатели; вкДНК — внеклеточная дезоксирибонуклеиновая кислота (ДНК), ПК — плазма крови, ГЦ — гуанин-цитозинный состав.

падал по сравнению с хранением в течение 5 сут. Через 20 сут. хранения ПК при комнатной температуре (+18°C) количество выделяемой вкДНК практически не менялось (рисунок 2 А).

При оценке индексов деградации было выявлено, что вкДНК в половине исследованных образцов, не подвергавшихся длительному воздействию комнатной температуры, имеет индекс деградации от 1,5 до 1,8, что трактуется как легкая степень деградации. Через 5 суток хранения индекс деградации незначительно увеличивался (максимальный индекс деградации в этой группе образцов составил 2,18), через 10 сут. хранения в единичных образцах наблюдается довольно сильная степень деградации вкДНК по сравнению с контрольными образцами, хранившимися по температуре -20°C. После 20 сут. хранения при +18°C по соотношениям концентраций фрагментов разной длины наблюдается средняя степень деградации образцов. При этом в образцах снижается расчетная концентрация коротких фрагментов вкДНК (50 п.н.) при практически неизменной расчетной концентрации фрагментов размером 150 п.н. (рисунок 2 Б).

Влияние длительного хранения ПК на результаты НИПТ. Выборочное проведение НИПТ с использованием образцов ПК после 5, 10 и 20 сут. хранения при температуре +18°C (таблица 2) не выявило появления ложноположительных и ложноотрицательных данных по хромосомным отклонениям. Однако в образце № 3 (rt) в варианте хранения 20 сут. при температуре +18°C анализ полученных результатов показал наличие делеций и дупликаций в 1, 6, 10, 12 и 22 хромосомах. При этом в образце ПК, хранившемся в замороженном состоянии, никаких инделей выявлено не было.

Обсуждение

Качественные и количественные характеристики образцов вкДНК, а также расчётные показатели концентраций фрагментов разного размера и доли фракции ДНК плода, полученных из ПК, подвергшейся влиянию неблагоприятных преаналитических факторов (длительное хранение при комнатной температуре, многократные циклы замораживания-оттаивания), оказались сопоставимыми с характеристиками, которые приводили другие исследователи в своих работах. Средняя доля вкДНК плода на 11-й нед. гестации составляет ~10% от общей вкДНК в материнском кровотоке [18].

Полученные нами данные показывают, что многоциклическое замораживание-оттаивание ПК: (1) негативно влияет на количественный выход вкДНК: наблюдалось снижение уровня вкДНК к 20 циклу замораживания-оттаивания, однако после 5 и 10 циклов статически достоверных изменений концентраций вкДНК не обнаружено (что согласуется с данными [8]); (2) к 20 циклу замораживания-

Таблица 2
Пример выборочных результатов секвенирования вкДНК, полученной из образцов ПК, подвергшихся разному сроку хранения при +18°C

Образец	ДНК плода (%) [3,50,50]	Z(chr13)	Z(chr18)	Z(chr21)	Тест (половые хромосомы)	Заболевание	Тест (Del/Dup)	Q20 (%) [93,100]	ГЦ (%) [38,42]	Пол плода
1(т)-0	19,873	-0,707	1,092	-1,673	Отрицательный	—	—	98,51	39,828	муж
1(т)-5	19,082	-0,469	0,516	-0,823	Отрицательный	—	—	97,28	40,672	муж
1(т)-10	21,963	-0,125	-1,646	0,442	Отрицательный	—	—	98,41	39,484	муж
1(т)-20	18,413	-0,119	-1,831	-1,1	Отрицательный	—	—	97,39	39,073	муж
2(т)-0	6,904	1,285	14,586	0,202	Отрицательный	—	—	95,87	39,989	жен
2(т)-5	8,354	-2,679	12,08	-2,086	Отрицательный	—	—	95,62	40,086	жен
2(т)-10	7,287	-1,181	16,403	-0,327	Отрицательный	—	—	98,13	40,972	жен
2(т)-20	7,541	0,231	13,575	-1,824	Отрицательный	—	—	97,83	38,83	жен
3(т)-0	12,082	-0,124	1,492	-1,343	Отрицательный	—	—	98,73	38,829	жен
3(т)-20	13,908	-1,326	-1,931	-1,311	Отрицательный	Chromosome 10q deletion Syndrome*	dup(1q12-q23.3,19.23M)* dup(6p22.2-p21.2,12.70M)* del(10q25.2-q26.3,22.73M)* dup(12q13.11-q14.1,10.14M)* del(22q13.1-q13.33,9.02M)*	98,99	40,53	жен
4(т)-0	11,151	-0,409	-0,859	-0,281	Отрицательный	—	—	99,04	40,444	муж
4(т)-10	11,878	-0,429	0,153	-1,317	Отрицательный	—	—	98,8	41,202	муж

Примечание: цифра после номера образца — количество суток хранения, выделены жирным курсивом и * обозначены различающиеся показатели; Rt — комнатная температура хранения (+18°C), вкДНК — внеклеточная дезоксирибонуклеиновая кислота (ДНК), ПК — плазма крови, ГЦ — гуанин-цитозиновый состав.

оттаивания приводит к увеличению степени фрагментации вкДНК во всех исследуемых образцах. По мере увеличения количества циклов меняется профиль распределения фрагментов по размеру: длинные фрагменты, вероятно, деградируют на более короткие, что согласуется с информацией авторов в работе [16].

При изучении фактора длительного хранения ПК при комнатной температуре (+18°C) было обнаружено, что при длительном воздействии положительной температуры наблюдается общая закономерность к увеличению концентраций вкДНК к 20 сут. хранения ПК при наблюдаемом увеличении через 5 сут. и уменьшении через 10 сут. по сравнению с 5-ю сут., однако с большим количеством выбывающихся данных по сравнению с контрольной группой. В работе [19] показано, что ~90% вкДНК в ПК находятся в составе экзосом, которые со временем могут распадаться и приводить к дальнейшему высвобождению вкДНК в ПК. Разброс данных, вероятно, может быть вызван нарушением стабилизации этих комплексов и полным высвобождением вкДНК к 20 сут. хранения. При оценке степени фрагментации образцов четкой связи между количеством циклов замораживания-оттаивания и степенью деградации не обнаруживается, однако после 10 и 20 циклов прослеживаются сильная и средняя степень деградации и изменения концентрации фрагментов вкДНК в отдельных образцах.

При снижении в образцах содержания фетальной фракции увеличивается вероятность появления ложноотрицательных результатов [20], а снижение на ~5% доли выявленных трисомий по 21, 13 и 18 хромосомам описано даже после однократного замораживания ПК при -80°C [17]. Это связывают не только со снижением уровня фетальной фракции вкДНК, но и с повышением гуанин-цитозинового

состава ДНК исследуемых образцов. По нашим оценкам результаты длительного хранения при комнатной температуре, а также циклы замораживания-оттаивания приводят к увеличению ложноположительных результатов НИПТ. К ложноположительным результатам ("появление" в результатах НИПТ малых структурных перестроек) приводит хранение образцов с нормальным уровнем фетальной фракции вкДНК в ПК в течение 20 сут. при комнатной температуре. Перечисленные выше отклонения результатов НИПТ свидетельствуют о необходимости четкого соблюдения преаналитических условий работы с ПК, поскольку их несоблюдение не приводит к явному выпадению результата НИПТ, и тем самым направлению биоматериала образца на повторный забор биоматериала.

Заключение

Таким образом, контроль за соблюдением корректных условий транспортировки и хранения ПК особенно важен при проведении НИПТ при использовании пробирок с консервантами, поскольку несоблюдение преаналитических условий не всегда может привести к явному и однозначному неудовлетворительному результату при проведении НИПТ, что могло бы служить явным сигналом необходимости повторного проведения исследования; в случаях таких отклонений на преаналитическом этапе один только факт успешного проведения НИПТ не может рассматриваться в качестве надежного и достаточного критерия оценки качества ПК и вкДНК, и может привести к некорректным результатам.

Отношения и деятельность: все авторы заявляют об отсутствии потенциального конфликта интересов, требующего раскрытия в данной статье.

Литература/References

1. Fleischhacker M, Schmidt B. Circulating nucleic acids (CNAs) and cancer—a survey. *Biochim Biophys Acta*. 2007;1775(1):181-232. doi:10.1016/j.bbcan.2006.10.001.
2. Moss J, Magenheimer J, Neiman D, et al. Comprehensive human cell-type methylation atlas reveals origins of circulating cell-free DNA in health and disease. *Nat Commun*. 2018;9:5068. doi:10.1038/s41467-018-07466-6.
3. Sekizawa A, Yokokawa K, Sugito Y, et al. Evaluation of bidirectional transfer of plasma DNA through placenta. *Hum Genet*. 2003;113:307-10. doi:10.1007/s00439-003-0987-4.
4. Zhou Y, Zhu Z, Gao Y, et al. Effects of maternal and fetal characteristics on cell-free fetal DNA fraction in maternal plasma. *Reprod Sci*. 2015;22(11):1429-35. doi:10.1177/1933719115584445.
5. Tamkovich SN, Tutanov OS, Serdukov DS, et al. Protein Content of Circulating Nucleoprotein Complexes. *Adv Exp Med Biol*. 2016;924:133-6. doi:10.1007/978-3-319-42044-8_26.
6. Maltseva AR, Illarionov RA, Vashukova ES, et al. Inventory and quality control of biosample collection from pregnant women at different gestational ages to search for early biomarkers of pregnancy complications. *Cardiovascular Therapy and Prevention*. 2023;22(11):3740. (In Russ.) Мальцева А. Р., Илларионов Р. А., Вашукова Е. С. и др. Инвентаризация и контроль качества "Коллекции биообразцов от беременных женщин на разных сроках гестации для поиска ранних биомаркеров осложнений беременности". *Кардиоваскулярная терапия и профилактика*. 2023;22(11):3740. doi:10.15829/1728-8800-2023-3740.
7. Morshneva A, Kozyulina P, Vashukova E, et al. Pilot screening of cell-free mtDNA in NIPT: Quality control, variant calling, and haplogroup determination. *Genes*. 2021;12(5). doi:10.3390/genes12050743.
8. Kondratskaya VA, Pokrovskaya MS, Doludin Yu, et al. Influence of preanalytical variables on the quality of cell-free DNA. *Biobanking of cell-free DNA material. Cardiovascular Therapy and Prevention*. 2021;20(8):3114. (In Russ.) Кондрацкая В. А., Покровская М. С., Долудин Ю. В. и др. Влияние преаналитических переменных на качество внеклеточной ДНК. Биобанкирование материала для выделения внеклеточной ДНК. *Кардиоваскулярная терапия и профилактика*. 2021;20(8):3114. doi:10.15829/1728-8800-2021-3114.
9. Vashukova ES, Tarasenko OA, Talantova OE, et al. Bioresource collection of blood components from pregnant women to identify

- fetal genetic features, as well as to search for genetic markers of gestational complications. Cardiovascular Therapy and Prevention. 2023;22(11):3742. (In Russ.) Вашукова Е. С., Тарасенко О. А., Талантова О. Е. и др. Создание биоресурсной коллекции компонентов крови беременных женщин для выявления генетических особенностей плода, а также для поиска генетических маркеров гестационных осложнений. Кардиоваскулярная терапия и профилактика. 2023;22(11):3742. doi:10.15829/1728-8800-2023-3742.
10. Bronkhorst AJ, Aucamp J, Pretorius PJ. Cell-free DNA: Preanalytical variables. Clin Chim Acta. 2015;450:243-53. doi:10.1016/j.cca.2015.08.028.
 11. Meddeb R, Pisareva E, Thierry AR. Guidelines for the Preanalytical Conditions for Analyzing Circulating Cell-Free DNA. Clin Chem. 2019;65(5):623-33. doi:10.1373/clinchem.2018.298323.
 12. Trigg RM, Martinson LJ, Parpart-Li, et al. Factors that influence quality and yield of circulating-free DNA: A systematic review of the methodology literature. Heliyon. 2018;4(7):e00699. doi:10.1016/j.heliyon.2018.e00699.
 13. El Messaoudi S, Rolet F, Mouliere F, et al. Circulating cell free DNA: Preanalytical considerations. Clin Chim Acta. 2013;424:222-30. doi:10.1590/s2175-97902018000117368.
 14. Sozzi G, Roz L, Conte D, et al. Effects of prolonged storage of whole plasma or isolated plasma DNA on the results of circulating DNA quantification assays. J Natl Cancer Inst. 2005;97(24):1848-50. doi:10.1093/jnci/dji432.
 15. Shaw JA, Page K, Blighe K, et al. Genomic analysis of circulating cell-free DNA infers breast cancer dormancy. Genome Res. 2012;22(2):220-31. doi:10.1101/gr.123497.111.
 16. Chan KC, Yeung SW, Lui WB, et al. Effects of preanalytical factors on the molecular size of cell-free DNA in blood. Clin Chem. 2005;51:781-4. doi:10.1373/clinchem.2004.046219.
 17. Xie X, Li F, Tan W, et al. The Effect of Freezing on Non-invasive Prenatal Testing. Sci Rep. 2019;9(1):6962. doi:10.1038/s41598-019-42980-7.
 18. Wang E, Batey A, Struble C, et al. Gestational age and maternal weight effects on fetal cell-free DNA in maternal plasma. Prenat Diagn. 2013;33(7):662-6. doi:10.1002/pd.4119.
 19. Fernando MR, Jiang C, Krzyzanowski GD, et al. New evidence that a large proportion of human blood plasma cell-free DNA is localized in exosomes. PLOS ONE. 2017;12(8):e0183915. doi:10.1371/journal.pone.0183915.
 20. Johansson LF, de Boer EN, de Weerd HA, et al. Novel Algorithms for Improved Sensitivity in Non-Invasive Prenatal Testing. Sci Rep. 2017;7:1838. doi:10.1038/s41598-017-02031.

Влияние условий хранения плазмы и сыворотки на уровни циркулирующих микроРНК

Сотникова Е. А., Киселева А. В., Мешков А. Н.

ФГБУ "Национальный медицинский исследовательский центр терапии и профилактической медицины" Минздрава России.
Москва, Россия

За последнее десятилетие циркулирующие малые некодирующие молекулы рибонуклеиновой кислоты (микроРНК) продемонстрировали свой потенциал в качестве малоинвазивных диагностических и прогностических биомаркеров различных заболеваний. В надежности и воспроизводимости количественной оценки циркулирующих микроРНК существенную роль играет стандартизация преаналитических и аналитических факторов, в т.ч. сбора, обработки и хранения биообразцов. На сегодняшний день единого мнения касательно различных способов нормализации данных, применяемых при анализе экспрессии циркулирующих микроРНК, нет. Цель настоящего обзора — рассмотреть современные оригинальные работы, в которых изучаются различные условия хранения биобанкированных образцов плазмы и сыворотки крови с последующим выделением для анализа циркулирующих микроРНК.

Ключевые слова: микроРНК, плазма, сыворотка, стандартизация, хранение, выделение, преаналитические факторы, аналитические факторы.

Отношения и деятельность: нет.

Поступила 04/09-2024

Рецензия получена 20/09-2024

Принята к публикации 23/09-2024



Для цитирования: Сотникова Е. А., Киселева А. В., Мешков А. Н. Влияние условий хранения плазмы и сыворотки на уровни циркулирующих микроРНК. *Кардиоваскулярная терапия и профилактика*. 2024;23(11):4180. doi: 10.15829/1728-8800-2024-4180. EDN KMPGLG

Effect of plasma and serum storage conditions on circulating microRNA levels

Sotnikova E. A., Kiseleva A. V., Meshkov A. N.

National Medical Research Center for Therapy and Preventive Medicine. Moscow, Russia

Over the past decade, circulating small non-coding ribonucleic acid molecules (microRNAs) have demonstrated their potential as minimally invasive diagnostic and prognostic biomarkers of various diseases. Standardization of preanalytical and analytical factors, including collection, processing and storage of biosamples, plays a significant role in the reliability and reproducibility of circulating microRNA quantification. To date, there is no consensus regarding the data normalization used in the analysis of circulating microRNA expression. The review aim is to consider modern original papers on various storage conditions of bio-banked plasma and serum samples with subsequent isolation of circulating microRNAs for analysis.

Keywords: microRNA, plasma, serum, standardization, storage, extraction, preanalytical factors, analytical factors.

Sotnikova E. A.* ORCID: 0000-0002-8395-4146, Kiseleva A. V. ORCID: 0000-0003-4765-8021, Meshkov A. N. ORCID: 0000-0001-5989-6233.

*Corresponding author:

sotnikova.evgeniya@gmail.com

Received: 04/09-2024

Revision Received: 20/09-2024

Accepted: 23/09-2024

For citation: Sotnikova E. A., Kiseleva A. V., Meshkov A. N. Effect of plasma and serum storage conditions on circulating microRNA levels. *Cardiovascular Therapy and Prevention*. 2024;23(11):4180. doi: 10.15829/1728-8800-2024-4180. EDN KMPGLG

Relationships and Activities: none.

кПЦР — количественная полимеразная цепная реакция с обратной транскрипцией, КТ — комнатная температура, мРНК — матричная РНК, микроРНК — малые некодирующие молекулы рибонуклеиновой кислоты, РНК — рибонуклеиновая кислота, Cq — cycle of quantification (значение пороговых циклов), NGS — next generation sequencing (секвенирование следующего поколения), PPP — platelet-poor plasma (бедная тромбоцитами плазма), PRP — platelet-rich plasma (богатая тромбоцитами плазма).

*Автор, ответственный за переписку (Corresponding author):

e-mail: sotnikova.evgeniya@gmail.com

[Сотникова Е. А.* — с.н.с. лаборатории молекулярной генетики Института персонализированной терапии и профилактики, ORCID: 0000-0002-8395-4146, Киселева А. В. — к.б.н., в.н.с., руководитель лаборатории молекулярной генетики Института персонализированной терапии и профилактики, ORCID: 0000-0003-4765-8021, Мешков А. Н. — д.м.н., руководитель Института персонализированной терапии и профилактики, ORCID: 0000-0001-5989-6233].

Ключевые моменты**Что известно о предмете исследования?**

- МикроРНК (малые некодирующие молекулы рибонуклеиновой кислоты) участвуют в пост-транскрипционной регуляции экспрессии генов и влияют на различные патологические состояния.
- Стандартизация преаналитических переменных представляет собой критический шаг в клинической реализации, а также в научных исследованиях циркулирующих микроРНК.

Что добавляют результаты исследования?

- Наибольшая стабильность микроРНК достигается при хранении сыворотки и плазмы при -80°C при минимизации числа циклов замораживания-оттаивания.

Key messages**What is already known about the subject?**

- MicroRNAs (small non-coding ribonucleic acid molecules) are involved in post-transcriptional regulation of gene expression and affect various pathological conditions.
- Standardization of preanalytical variables is a critical step in clinical implementation as well as in research of circulating microRNAs.

What might this study add?

- Maximum stability of microRNA is achieved by storing serum and plasma at -80°C while minimizing the number of freeze-thaw cycles.

Введение

Исследования циркулирующих микроРНК (малых некодирующих молекул рибонуклеиновых кислот), проведенные за последнее десятилетие, продемонстрировали их потенциал в качестве минимально инвазивных диагностических, прогностических и предиктивных биомаркеров, характеризующих широкий спектр патологических состояний [1-3]. МикроРНК представляют собой короткие (18-25 нуклеотидов), одноцепочечные, некодирующие РНК, которые участвуют в посттранскрипционной регуляции экспрессии генов посредством взаимодействия с матричной РНК (мРНК), приводящего к полной деградации целевой мРНК или подавлению экспрессии генов [1, 4, 5].

В плазме и сыворотке крови внеклеточные микроРНК защищены от деградации с помощью включения их в микровезикулы или экзосомы, или связью с белками [6-8]. Стоит отметить, что при сравнении плазмы и сыворотки, согласно результатам различных исследований микроРНК, сопоставимых результатов получено не было, что свидетельствует о необходимости использовать один и тот же тип образца последовательно на протяжении всего исследования и четко определять, как тип образца, так и его обработку [4, 5].

По мере развития исследований циркулирующих микроРНК как биомаркеров патологий человека накапливались данные, указывающие на влияние преаналитических и аналитических факторов на их уровни [3, 9]. Валидация результатов исследований микроРНК затруднена отсутствием аналитической (т.е. низкой межплатформенной согласованности) и постаналитической (т.е. стратегии нормализации) стандартизации. Влияние микроРНК на принятие медицинских решений ослабляется неопределенностью относительно значения изменений в их экспрессии [10]. В связи с этим

необходимость тщательного рассмотрения эффектов различных преаналитических и аналитических параметров, которые могут влиять на выделение и стабильность микроРНК, представляется актуальной задачей [6, 11, 12].

Цель обзора — рассмотреть современные оригинальные работы, изучающие различные условия хранения биобанкированных образцов плазмы и сыворотки крови с последующим выделением для анализа циркулирующих микроРНК.

Методологические подходы

Поиск литературных источников включал запросы в системах индексирования научных публикаций (Google Scholar, PubMed, eLIBRARY) по заголовкам, аннотациям и ключевым словам: "serum+microRNA"/"сыворотка+микроРНК" и "plasma+microRNA"/"плазма+микроРНК" с добавлением дополнительных переменных "preanalytical"/"pre-analytical"/"преаналитический", "storage"/"хранение", "extraction"/"isolation"/"выделение". В обзор были включены только оригинальные методологические исследования тотальной циркулирующей микроРНК за последние 15 лет.

Результаты

Преаналитические факторы. На основе систематического поиска было отобрано 19 методологических исследований, в которых изучали такие преаналитические и аналитические факторы, как хранение плазмы и сыворотки крови, а также выделение и хранение микроРНК (таблица 1). Из 18 работ 13 были проведены с использованием плазмы, 2 — плазмы и сыворотки, 4 — сыворотки.

Основным ограничением большинства включенных в обзор исследований является небольшой размер выборки: в двух работах было <3 образцов [15, 23], в двух были использованы пулированные

Таблица 1

Исследования, включенные в анализ

Ссылка	Выборка, человек	Биоматериал	Исследуемые преаналитические и аналитические факторы	Метод	Количество микроРНК	Эндогенные микроРНК, анализируемые с помощью кПЦР
McDonald JS, et al. (2011) [13]	4; 5*	сыворотка	хранение сыворотки, выделение микроРНК	кПЦР	3	miR-15b, miR-16, miR-24
Grasedieck S, et al. (2012) [14]	3	сыворотка	хранение сыворотки, циклы замораживания-оттаивания	кПЦР	4; 182*	miR-223, miR-451, miR-93, miR-24; Serum/Plasma Focus miRNA PCR panels
McAlexander MA, et al. (2013) [15]	1	плазма	выделение микроРНК	кПЦР	5	miR-16, miR-21, miR-34a, miR-126, miR-150
Moret I, et al. (2013) [16]	14	плазма	выделение микроРНК	микрочипы	5818	Affymetrix miRNA 3.0
Page K, et al. (2013) [17]	3; 20*	плазма	хранение плазмы, выделение микроРНК	кПЦР	384; 8*	hsa-miR-191, hsa-miR-21, hsa-miR-15b, hsa-miR-15b, hsa-miR-16, hsa-miR-16, hsa-miR-24, hsa-miR-155, hsa-miR-484; TLDA Pool A v2.0 Cards
Sourvinou IS, et al. (2013) [6]	60	плазма	хранение плазмы и микроРНК, выделение микроРНК	кПЦР	2	hsa-miR-21, hsa-miR-16
Monleau M, et al. (2014) [18]	10	сыворотка	выделение микроРНК	кПЦР	384	TaqMan Array Human MicroRNA panels A and B
Zhao H, et al. (2014) [19]	164	плазма	хранение плазмы, циклы замораживания-оттаивания	кПЦР	3	miR-16, miR-134, miR-346
Balzano F, et al. (2015) [20]	5	плазма	хранение плазмы	кПЦР	8	miR-125b-5p, miR-425-5p, miR-200b-5p, miR-200c-3p, miR-579-3p, miR-212-3p, miR-126-3p, miR-21-5p
Brunet-Vega A, et al. (2015) [2]	6	плазма	выделение микроРНК	кПЦР	6	miR-23a, miR-30c, miR-103, miR-124, miR-191, miR-451
Tan GW, et al. (2015) [21]	19	плазма	выделение микроРНК	кПЦР	16	hsa-let-7a, hsa-miR-135a, hsa-miR-141, hsa-miR-150, hsa-miR-155, hsa-miR-16, hsa-miR-17, hsa-miR-200a, hsa-miR-200b, hsa-miR-203, hsa-miR-20a, hsa-miR-20b, hsa-miR-21, hsa-miR-223, hsa-miR-29c, hsa-miR-30e
Glinge C, et al. (2017) [22]	12	сыворотка, плазма	хранение сыворотки и плазмы, циклы замораживания-оттаивания	кПЦР	3	miR-1, miR-21, miR-29b
Muth DC, et al. (2018) [23]	2	плазма	хранение плазмы, циклы замораживания-оттаивания	кПЦР	2	miR-16-5p, miR-21-5p
Wong RKY, et al. (2019) [24]	3	плазма	выделение микроРНК	NGS малых РНК, кПЦР	тотальная микроРНК; 10*	let-7d-3p, let-7g-5p, mir-10b-5p, mir-16-5p, mir-16-2-3p, mir-142-3p, mir-26b-5p, mir-223-3p, mir-451a, miR-93-5p
Faraldi M, et al. (2020) [10]	10	плазма	хранение плазмы	кПЦР	179	miRCURY LNA miRNA focus panel
Matias-Garcia PR, et al. (2020) [1]	6; 10*	плазма	хранение плазмы, циклы замораживания-оттаивания	кПЦР	9	miR-30c-5p, miR-103a-3p, miR-191-5p, miR-124-3p, miR-451a, miR-23a-3p, miR-93-5p, miR-24-3p, miR-23a-3p, miR-33b-5p
Купес Т, et al. (2022) [25]	8	сыворотка	хранение сыворотки	кПЦР	16	hsa-miR-361-5p, hsa-miR-28-5p, hsa-miR-194-5p, hsa-miR-125b-5p, hsa-miR-192-5p, hsa-miR-27b-3p, hsa-miR-151a-5p, hsa-miR-1260a, hsa-miR-100-5p, hsa-miR-151a-3p, hsa-miR-323b-5p, hsa-miR-99a-5p, hsa-miR-28-3p, hsa-miR-22-3p, hsa-miR-193a-5p, hsa-miR-193b-3p

Таблица 1. Продолжение

Ссылка	Выборка, человек	Биоматериал	Исследуемые преаналитические и аналитические факторы	Метод	Количество микроРНК	Эндогенные микроРНК, анализируемые с помощью кПЦР
Suzuki K, et al. (2022) [26]	18; 60*	плазма	хранение плазмы	NGS малых РНК	тотальная микроРНК	
Chan S-F, et al. (2023) [3]	4	сыворотка, плазма	хранение сыворотки и плазмы	кПЦР	356; 7*	hsa-miR-1973, hsa-miR-28-5p, hsa-miR-20b-5p, hsa-miR-363-3p, hsa-miR-451a, hsa-miR-1290, hsa-miR-10b-5p

Примечание: * — два значения указывают на разные выборки в исследовании, кПЦР — количественная ПЦР в режиме реального времени, ПЦР — полимеразная цепная реакция, NGS — секвенирование следующего поколения.

образцы от разных доноров [15, 17], в работе [6] отсутствует четкое описание выборки. Использование пулированных образцов или одного донора применялось для получения стандартного исходного образца [15]. В большинстве исследований размер выборки составлял от 3 до 19 человек, в двух — 60 [26] и 164 [19]. Следует отметить, что в работе Matias-Garcia PR, et al. (2020) сравнение проводилось между образцами, полученными от одних и тех же участников в разные годы [1], а в работе Balzano F, et al. (2015) сравнение образцов, хранившихся больше года, со свежими образцами были использованы образцы разных людей [20].

Ранее было показано, что на уровень микроРНК могут влиять различные факторы, такие как тип антикоагулянта крови, содержание тромбоцитов, степень гемолиза, условия хранения крови, плазмы и сыворотки, а также протокол центрифугирования [11]. Помимо рассматриваемых в данном обзоре параметров, в части исследований изучались и другие преаналитические факторы, а именно: разные антикоагулянты и типы пробирок [22, 26], влияние гемолиза эритроцитов на микроРНК плазмы и сыворотки [13], различные протоколы центрифугирования [3, 13, 17, 23], условия хранения крови [3, 17, 19, 22, 26].

Из 15 исследований, в которых были использованы образцы плазмы, в 13 антикоагулянты были на основе этилендиаминтетрауксусной кислоты, в двух — ACD (citric acid, trisodium citrate, dextrose, лимонная кислота, тринатрийцитрат, декстроза) [15, 23]. При центрифугировании образцов крови для получения плазмы и сыворотки происходит удаление таких клеточных компонентов, как тромбоциты, которые также содержат множество микроРНК [4, 9]. Так, плазма, полученная после двойного центрифугирования, считается бедной тромбоцитами плазмой (platelet-poor plasma, PPP) и содержит значительно меньше тромбоцитов по сравнению с плазмой, полученной после однократного центрифугирования, которая называется богатой тромбоцитами плазмой (platelet-rich plasma, PRP) [27]. В работе Chan S-F, et al. (2023) было показано, что повторное центрифугирование плазмы,

которая была заморожена после однократного центрифугирования, приводит к значимому снижению содержания тромбоцитов [3].

В 7 из 15 работ использовалась плазма или сыворотка, полученная после однократного центрифугирования (795-4000 g) [2, 14, 18, 20, 22, 25, 26], в 8 — после двойного (2500-15000 g) [3, 6, 10, 13, 15, 17, 21, 23], в 4 четко описанный протокол центрифугирования [1, 16, 19, 24] отсутствовал. Несмотря на то, что протокол двойного центрифугирования позволяет получить плазму с наименьшим содержанием тромбоцитов, в анализируемых исследованиях встречается использование плазмы как после одного, так и двух центрифугирований. В то же время стандартные протоколы приготовления плазмы в биобанках используют только одно центрифугирование, проведение после разморозки дополнительного центрифугирования приводит к снижению содержания тромбоцитов до их уровня в РРР, однако значимые различия сохраняются в уровнях микроРНК [28]. Из 19 включенных работ только в шести было указано, что использовались образцы из коллекций биобанков [1, 19, 20, 22, 25, 26].

Среди методов, применяемых для анализа микроРНК, количественная полимеразная цепная реакция (ПЦР) с использованием обратной транскрипции (кПЦР) является золотым стандартом для измерения микроРНК [21, 24]. При кПЦР для анализа полученных данных применяется метод относительной количественной оценки $2^{-\Delta\Delta C_q}$, основанный на определении значений пороговых циклов Cq (cycle of quantification) [29]. Кроме того, используются такие методы как секвенирование следующего поколения (next generation sequencing) и микрочипы. Однако NGS постепенно становится основным подходом для глобального профилирования микроРНК, поскольку оно потенциально более чувствительно по сравнению с анализом с использованием микрочипов и имеет преимущество в отсутствии необходимости заранее знать целевые последовательности [24].

кПЦР была наиболее часто используемым методом анализа микроРНК во включенных в обзор исследованиях (n=17), в двух применялось секве-

Таблица 2

Хранение сыворотки

Источник	Описание исследования
McDonald JS, et al. (2011) [13]	хранение сыворотки до 72 ч (24 ч, 48 ч, 72 ч) при -20°C, 4°C, КТ
Grasedieck S, et al. (2012) [14]	хранение сыворотки 10 дней при -80°C, -20°C, КТ; 20 мес. при -20°C, -80°C; до 10 лет при -20°C
Glinge C, et al. (2017) [22]	хранение сыворотки 24 ч и 4 дня при КТ
Курес Т, et al. (2022) [25]	хранение сыворотки 14 дней при -80°C
Chan S-F, et al. (2023) [3]	хранение сыворотки 3 дня при КТ (25°C), до 30 (3, 7, 30) дней при +4°C; до 360 (3, 7, 30, 90, 180, 360) дней при -20°C и -80°C

Примечание: КТ — комнатная температура.

Таблица 3

Хранение плазмы

Источник	Описание исследования
Page K, et al. (2013) [17]	хранение плазмы >12 лет при -8°C
Sourvinou IS, et al. (2013) [6]	хранение плазмы до 4 мес. (1 и 2 дня, 1 и 4 мес.) при 4°C, -20°C, -70°C
Zhao H, et al. (2014) [19]	хранение плазмы 6 мес. при -80°C, в жидком азоте
Balzano F, et al. (2015) [20]	хранение плазмы 6 и 12 мес., до 14 (3, 4, 10, 11, 14) лет при -80°C
Glinge C, et al. (2017) [22]	хранение плазмы 1 и 3 дня при КТ, 9 мес. при -80°C
Muth DC, et al. (2018) [23]	хранение плазмы (PRP и PPP) 24 ч при КТ (22°C)
Faraldi M, et al. (2020) [10]	хранение плазмы и PPP 24 часа при 4°C, КТ
Matias-Garcia PR, et al. (2020) [1]	хранение плазмы до 17 (2, 9, 17) лет при -180°C (жидкий азот)
Suzuki K, et al. (2022) [26]	хранение плазмы до 30 (1, 3, 5, 7, 30) дней при -20°C и +4°C; до 5 (3, 4, 5) лет при -80°C
Chan S-F, et al. (2023) [3]	хранение PPP до 7 (3, 7) дней при КТ (25°C), до 30 (3, 7, 14, 30) дней при +4°C, до 360 (3, 7, 14, 30, 60, 90, 180, 270, 360) дней при -20°C и -80°C

Примечание: КТ — комнатная температура, PPP — platelet-poor plasma (бедная тромбоцитами плазма), PRP — platelet-rich plasma (богатая тромбоцитами плазма).

нирование малых РНК [24, 26], в одном — микро-чипов [16]. Количество включенных в анализ микроРНК с использованием кПЦР варьировало от 2 до 384. Наиболее часто анализируемыми среди исследуемых эндогенных микроРНК были miR-16 (n=10), miR-21 (n=7), miR-24 (n=4), а среди экзогенных: cel-miR-39 (n=5) [6, 13, 15, 21, 22].

Хранение сыворотки. В обзор были включены пять исследований, в которых были проведены эксперименты по оценке влияния хранения сыворотки крови при разных температурах и длительности на уровень микроРНК (таблица 2).

Изучение влияния условий хранения сыворотки при комнатной температуре (КТ) было выполнено в 5 работах [3, 13, 14, 22]. Хранение сыворотки при КТ в течение 1, 2 и 3 дней [13], 1 и 4 дней [22], 3 дней [3] привело к значимому снижению концентрации исследованных микроРНК по сравнению с немедленным выделением микроРНК после получения сыворотки. Снижение уровней микроРНК также наблюдалось после 10 дней хранения при КТ по сравнению с температурой -80°C [14].

Хранение сыворотки при +4°C было проанализировано в двух исследованиях [3, 13], в результате которых было также показано значимое снижение в уровне изучаемых микроРНК по сравнению с немедленным выделением микроРНК после получения сыворотки: при хранении в течение 3 [13] и 30 дней [3]. Однако стоит заметить, что значимых различий при хранении в течение 3 и 7 дней в работе [3] отмечено не было.

Кроме того, в трех исследованиях были получены противоречивые результаты по хранению сыворотки при -20°C [3, 13, 14]. В одной работе хранение в течение 3 дней также приводило к снижению уровня микроРНК по сравнению с немедленным выделением микроРНК после получения сыворотки [13], тогда как в другой [3] значимых различий не было выявлено при хранении в течение 3, 7, 30, 90, 180, 360 дней, а также после 10 дней и 20 мес. хранения при -20°C по сравнению с -80°C [14]. В исследовании по хранению сыворотки до 10 лет было показано, что после 2 и 4 лет хранения наблюдалась только небольшая разница в уровнях микроРНК, тогда как значимое снижение было обнаружено после 6 лет, которое продолжалось после 10 лет хранения [14].

Хранение сыворотки при -80°C было описано в трех исследованиях [3, 14, 25]. Значимых различий не было выявлено после 10 дней и 20 мес. хранения при -80°C по сравнению с -20°C [14] и при при -80°C в течение 360 дней по сравнению с немедленным выделением микроРНК после получения сыворотки [3], тогда как после хранения при температуре -80°C в течение 14 дней только для 1 из 16 микроРНК было продемонстрировано значимое снижение в уровне микроРНК по сравнению с образцами, хранившимися при температуре +4°C и выделенными в течение 24 ч [25].

Выявленные снижения в уровне микроРНК при хранении сыворотки вероятно могут свидетельствовать о деградации микроРНК в биообразцах [13]. Комплексный анализ 356 микроРНК продемонстрировал, что деградация коррелирует с их распространенностью, процентом GC и длиной микроРНК как в образцах сыворотки, так и в образцах PPP [3]. Однако в большинстве проанализированных работ показана высокая стабильность микроРНК в сыворотке при длительном хранении при -20°C и -80°C.

Хранение плазмы. В обзор были включены 10 исследований, в которых изучали влияние хранения плазмы разной длительности и при разных температурах на уровень микроРНК (таблица 3).

Хранение плазмы при КТ изучалось в 4 исследованиях [3, 10, 22, 23]. При сравнении количества микроРНК детектируемых в плазме крови, хранившейся 24 ч при КТ и замороженной немедленно при -80°C , были найдены значимые различия [10]. После инкубации плазмы в течение 24 ч или 4 дней [22], а также 3 и 7 дней [3] было выявлено значимое снижение уровня микроРНК по сравнению с немедленным выделением микроРНК после получения плазмы. Однако в работе Muth DC, et al. (2018) [23] значимых различий при хранении в течение 24 ч выявлено не было, что также подтверждается более ранним исследованием [30].

Изучение влияния условий хранения плазмы $+4^{\circ}\text{C}$ было проведено в 4 работах [3, 6, 10, 26]. Результаты двух из них демонстрируют снижение уровней эндогенных циркулирующих микроРНК при хранении образцов плазмы через 24 ч, 48 ч, 1 мес. и 4 мес. [6] и через 14 и 30 дней [3] по сравнению с немедленным выделением микроРНК после получения плазмы. Однако в работе Chan S-F, et al. (2023) [26] значимых различий в уровне микроРНК через 3 и 7 дней хранения получено не было. Кроме того, были выявлены значимые различия в количестве микроРНК в плазме после хранения в течение 24 ч по сравнению с замороженной немедленно при -80°C [10]. В исследовании Suzuki K, et al. (2022) [26] при хранении плазмы в течение 1, 3, 5, 7, и 30 дней значимых различий в уровне изучаемых микроРНК при сравнении с плазмой, хранившейся 1 час после центрифугирования при $+4^{\circ}\text{C}$, показано не было.

Хранение плазмы при -20°C оценивалось в трех исследованиях [3, 6, 26]. Снижение уровней микроРНК при хранении образцов плазмы было продемонстрировано через 24 ч, 48 ч, 1 мес. и 4 мес. [6] и через 270 дней [3] по сравнению с немедленным выделением микроРНК после получения плазмы. Стоит отметить, что в исследовании Chan S-F, et al. (2023) [3] при хранении в течение 3, 7, 14, 30, 60, 90, 180 и 360 дней значимых различий выявлено не было. В другой работе при хранении плазмы в течение 1, 3, 5, 7, и 30 дней не было показано значимых различий в уровне изучаемых микроРНК при сравнении с плазмой, хранившейся 1 ч после центрифугирования при -20°C [26].

Исследования по хранению плазмы при низких температурах (-70 , -80 , -180°C , жидкий азот) [1, 3, 6, 10, 17, 19, 20, 22, 26] можно разделить на краткосрочные (до 1 года) [3, 6, 10, 19, 20, 22, 26] и долгосрочные (от 1 до 14 лет) [1, 17, 20].

При краткосрочном хранении по сравнению с немедленным выделением микроРНК после по-

лучения плазмы снижение уровней микроРНК плазмы было продемонстрировано через 24 ч, 48 ч, 1 мес. и 4 мес. при -70°C [6], в то время как значимых различий в уровне микроРНК при хранении в течение 3, 7, 14, 30, 60, 90, 180, 270, 360 дней при -80°C [3], также, как и в течение 6 мес. в жидком азоте [19] и 6 и 12 мес. при -80°C выявлено не было [20]. При сравнении хранения при -80°C и в жидком азоте также не было получено значимых различий [19]. В другом исследовании при сравнении хранения плазмы в течение 9 мес. при -80°C с хранением в течение 1 дня значимых различий выявлено не было [22].

При анализе долгосрочного хранения было показано, что при сравнении с немедленным выделением микроРНК после получения плазмы хранение при -80°C в течение 12 лет демонстрирует схожие профили микроРНК, что подчеркивает потенциал анализа хранящихся в биобанках образцов [17]. В работе [26] хранение плазмы в течение 4 и 5 лет сравнивалось с 3 годами, значимые различия были получены только при 5-летнем сроке хранения. При сравнении образцов, хранившихся 3 года, со свежими образцами не было выявлено значимых различий, однако при хранении 4, 10 и 11 лет было обнаружено значимое снижение уровня 1 из 8 микроРНК, а при хранении 14 лет значимое снижение было показано для 7 из 8 микроРНК [20]. Кроме того, не было обнаружено различий при сравнении уровней микроРНК в образцах плазмы, хранившихся в течение 2 и 9 лет при -180°C , однако значимые различия были получены при хранении в течение 17 лет по сравнению с 2 и 9 годами [1]. Несмотря на довольно противоречивые данные о влиянии различных условий хранения на уровень микроРНК плазмы, большинство проведенных исследований показало, что наиболее стабильны микроРНК при -80°C .

Циклы замораживания-оттаивания. Циркулирующие микроРНК обычно сохраняются путем хранения при температурах, достаточно низких для значительного снижения активности РНКазы, а не путем химической фиксации [4]. Ранее было показано, что циклы замораживания-оттаивания могут потенциально влиять на несколько аналитов [4], и что 8 циклов замораживания-оттаивания плазмы имели минимальный эффект на уровни микроРНК [30].

В обзор были включены 5 исследований, в которых изучали влияние циклов замораживания-оттаивания плазмы и сыворотки крови на уровень микроРНК (таблица 4).

В обоих исследованиях, проведенных с использованием образцов сыворотки, хранившихся при -80°C , было выявлено снижение уровня микроРНК после 10 ежедневных циклов [14] и 4 циклов [22] замораживания-оттаивания при сравнении с образцами, хранившимися при -80°C .

Таблица 4

Циклы замораживания-оттаивания

Источник	Биоматериал	Описание исследования
Grasedieck S, et al. (2012) [14]	сыворотка	10 циклов при -80°С, длительность каждого 1 день
Zhao H, et al. (2014) [19]	плазма	1, 2, 4 цикла в жидком азоте, длительность каждого 2 нед.
Glinge C, et al. (2017) [22]	плазма, сыворотка	4 цикла при -80°С
Muth DC, et al. (2018) [23]	плазма	6 циклов при -80°С, длительность каждого 4 дня
Matias-Garcia PR, et al. (2020) [1]	плазма	4 цикла при -80°С

Из включенных в анализ работ, 4 были проведены с использованием образцов плазмы крови. Снижение уровней микроРНК при увеличении циклов замораживания-оттаивания было выявлено при сравнении с немедленным выделением РНК [19], а также после 4 циклов замораживания-оттаивания при сравнении с образцами, хранившимися при -80°С [22]. При исследовании влияния множественных циклов замораживания-оттаивания образцов плазмы на уровень микроРНК, было выявлено значимое снижение уровня одной из восьми исследуемых микроРНК [1]. Тогда как в работе Muth DC, et al. (2018) [23] после 6 циклов при -80°С при сравнении с образцами, полученными из свежей плазмы, значимых различий получено не было для PPP, тогда как для PRP однократное замораживание-оттаивание привело к снижению уровней микроРНК, а дополнительные циклы замораживания-оттаивания не имели последовательного дополнительного эффекта.

Эти результаты показывают, что в связи с противоречивыми результатами влияния циклов замораживания-оттаивания на микроРНК их следует минимизировать, а многократные измерения замороженного образца следует проводить с осторожностью для прямого сравнения результатов. Согласно результатам проведенных исследований, плазма с низким содержанием тромбоцитов менее чувствительна к замораживанию-оттаиванию, а уровни микроРНК в плазме, богатой тромбоцитами, не изменяются при дополнительных циклах замораживания-оттаивания после того, как произошло повреждение тромбоцитов.

Выделение микроРНК. Любой успешный маркер или набор маркеров должен быть достаточно стабильным во время и после процесса изоляции, чтобы обеспечить надежное обнаружение и измерение [15]. Отсутствие стандартизации является проблемой для столь необходимых сравнений исследований микроРНК. Биологические жидкости содержат небольшое количество РНК относительно клеток и тканей и, если обработка образцов не удаляет мелкие клетки и клеточные фрагменты, их

микроРНК могут преобладать в любом "внеклеточном" профиле микроРНК, точно так же, как РНК из гемолизированных образцов может влиять на профилирование [13, 15]. Техническим препятствием для изучения экспрессии микроРНК является отсутствие возможности надежного и эффективного выделения микроРНК из биологических образцов из-за их небольшого размера и их прикрепления к липидам и белкам, а также из-за присутствия ингибиторов ПЦР в биологических жидкостях [2, 6, 15]. В настоящее время для выделения доступно несколько коммерческих наборов, использование которых позволяет оптимизировать выделение малых РНК, либо в сочетании с тотальной РНК, либо в виде фракции, обогащенной малыми РНК, а экзогенные синтетические микроРНК были предложены в качестве внешних контролей для нормализации вариаций от образца к образцу в процедурах выделения РНК [6].

Из включенных в обзор исследований, сравнение наборов для выделения микроРНК из плазмы или сыворотки было проведено в 8 (таблица 5). Все исследования были проведены с помощью кПЦР, кроме двух: в исследовании Wong RKY, et al. (2019) [24] использовалось NGS, а в работе Moret I, et al. (2013) [16] — микрочипы. Кроме того, из 19 исследований, включенных в этот обзор, в одном набор для выделения микроРНК не был указан [19].

Только в двух исследованиях выделение микроРНК было выполнено из сыворотки крови, и наибольший выход микроРНК был получен с использованием наборов mirVana PARIS (Invitrogen, США) [13] и NucleoSpin miRNA Plasma (Macherey-Nagel, Германия) [18].

Сравнение наборов для выделения микроРНК из плазмы продемонстрировало, что методы на основе колонок работают лучше, чем TRIzol LS (Invitrogen, США), из-за присутствия органических и фенольных загрязняющих веществ в РНК [6, 16]. Из 15 наборов, представленных во включенных в обзор исследованиях, 7 были проанализированы только в одном из сравнений. В исследовании [2] все пять наборов дали сопоставимые количества РНК с точки зрения конечных значений Cq. Среди наборов для выделения микроРНК из плазмы чаще всего в сравнения были включены mirVana PARIS (Invitrogen, США) [6, 13, 16, 21] и miRNeasy Serum/Plasma Kit (Qiagen, Германия) [2, 15-17, 21, 24]. Каждый из этих наборов показал наилучшие результаты в трех сравнениях: mirVana PARIS (Invitrogen, США) — [6, 13, 21], miRNeasy Serum/Plasma Kit (Qiagen, Германия) — [2, 16, 17]. Стоит отметить, что между собой эти наборы сравнивались только в двух исследованиях, результаты которых оказались противоречивы [16, 21]: miRNeasy Serum/Plasma Kit (Qiagen, Германия) показал лучший результат в работе [16], а mirVana PARIS (Invitrogen, США) — в [21].

Таблица 5

Наборы для выделения микроРНК, рассматриваемые в разных исследованиях

Наборы для выделения микроРНК	McDonald JS, et al. (2011) [13]	Monleau M, et al. (2014) [18]	McAlexander MA, et al. (2013) [15]	Moret I, et al. (2013) [16]	Page K, et al. (2013) [17]	Sourvinou IS, et al. (2013) [6]	Brunet-Vega A, et al. (2015) [2]	Tan GW, et al. (2015) [21]	Wong RKY, et al. (2019) [24]
Биоматериал	сыворотка	сыворотка	плазма	плазма	плазма	плазма	плазма	плазма	плазма
Direct-zol RNA MiniPrep (Zymo Research, США)	0	0	0	0	0	0	2	0	0
High Pure miRNA Isolation Kit (Roche, США)	1	0	0	0	0	0	0	0	0
MagnaZol (Bioo Scientific, США)	0	0	0	0	0	0	0	0	2
miRCURY RNA Isolation Kit — Cell and Plant (Exiqon, Дания)	0	0	1	0	0	0	0	0	0
miRCURY RNA Isolation Kit — Biofluids (Exiqon, Дания)	0	0	2	0	0	0	2	2	0
miRNA purification kit (Norgen Biotek, Канада)	0	0	0	0	0	1	0	0	0
miRNeasy Mini Kit (Qiagen, Германия)	1	1	0	0	0	1	0	0	0
miRNeasy Serum/Plasma Kit (Qiagen, Германия)	0	0	1	2	2	0	2	1	1
mirPremier microRNA Isolation Kit (Sigma, США)	1	0	0	0	0	0	0	0	0
mirVana PARIS (Invitrogen, США)	2	0	0	1	0	2	0	2	0
mirVana miRNA Isolation Kit (Invitrogen, США)	0	0	1	0	1	0	0	0	0
NucleoSpin miRNA Plasma (Machereye-Nagel, Германия)	0	2	0	0	0	0	2	2	0
Plasma/Serum Circulating and Exosomal RNA Purification Mini Kit (Norgen Biotek, Канада)	0	1	0	0	0	0	2	1	0
QIAamp Circulating Nucleic Acids kit (Qiagen, Германия)	0	0	0	0	1	0	0	0	0
TRIzol LS (Invitrogen, США)	0	0	1	1	0	1	0	0	0

Примечание: 0 — набор не включен в исследование, 1 — набор включен в исследование, 2 — набор включен в исследование и показал лучший результат, микроРНК — малые некодирующие молекулы рибонуклеиновой кислоты.

Из всех включенных в обзор исследований набор mirVana PARIS (Invitrogen, США) использовался в 4 [6, 13, 16, 21], а miRNeasy Serum/Plasma Kit (Qiagen, Германия) — в 7 [2, 15-17, 20, 21, 24].

Наборы miRCURY RNA Isolation Kit — Biofluids (Exiqon, Дания) [2, 15, 21] и NucleoSpin miRNA Plasma (Machereye-Nagel, Германия) [2, 21] показали лучшие результаты во всех сравнениях, в которые были включены, в отличие от трех других наборов mirVana miRNA Isolation Kit (Invitrogen, США) [15, 17], miRNeasy Mini Kit (Qiagen, Германия) [6, 13] и TRIzol LS (Invitrogen, США) [6, 15, 16].

Только в одном из исследований методом анализа был NGS и сравнение двух наборов для выделения микроРНК проводилось в сочетании с разными наборами для приготовления библиотек [24].

Большая доля прочтений, картированных на микроРНК, была получена в библиотеках, подготовленных с помощью набора MagnaZol (Bioo Scientific, США) по сравнению с набором miRNeasy Serum/Plasma Kit (Qiagen, Германия) [24].

Отсутствие консенсуса относительно выделения микроРНК подчеркивает важность использования одного и того же метода выделения на протяжении всего исследования, чтобы свести к минимуму влияние искажающих переменных [4].

Для количественной оценки микроРНК доступны различные методы обнаружения (кПЦР, ми-

кросс-платформы, NGS), однако все они требуют нормализации для учета и коррекции вариаций между образцами. Различные методы нормализации приводят к противоречивым результатам анализа уровня экспрессии микроРНК [4]. Так, для нормализации данных кПЦР используют как добавляемые во время выделения экзогенные микроРНК "spike-in" (например, *Caenorhabditis elegans*: cel-miR-39, cel-miR-54, cel-miR-238), так и повсеместно экспрессируемые эндогенные РНК, например, малую ядерную РНК (мяРНК, snRNA) U6 или miR-16 [20]. В большинстве включенных в анализ исследований для нормализации использовались: cel-miR-39 [6, 13, 15, 21, 22]; cel-miR-54 [21]; miR-16 [13]. В двух работах метод нормализации данных кПЦР не описан [14, 24].

Таким образом, необходимо проявлять большую осторожность при выборе подходящей микроРНК, концентрация которой практически не зависит от преаналитических переменных [4]. Включение по крайней мере одной экзогенной контрольной микроРНК или панели экзогенных контрольных микроРНК во все образцы до выделения микроРНК имеет решающее значение для компенсации различий между различными образцами [5].

Кроме того, следует отметить, что в области количественной генетики при проведении статистического анализа необходимо применение поправки на множественные сравнения [31]. В результатах исследований, проведенных без использования поправки на множественные сравнения, может быть завышение уровня значимости и нахождение большого числа ложных ассоциаций [31]. Только в 6 из 19 включенных в обзор исследований была применена поправка на множественные сравнения [1, 2, 10, 16, 24, 26]. Из-за упомянутых ограничений выявленные и описанные ранее различия в преаналитических и аналитических факторах из-за неудовлетворительного статистического анализа могли быть обусловлены ложными обнаружениями.

Литература/References

- Matias-Garcia PR, Wilson R, Mussack V, et al. Impact of long-term storage and freeze-thawing on eight circulating microRNAs in plasma samples. *PLoS One*. 2020;15:e0227648. doi:10.1371/journal.pone.0227648.
- Brunet-Vega A, Pericay C, Quilez ME, et al. Variability in microRNA recovery from plasma: Comparison of five commercial kits. *Anal Biochem*. 2015;488:28-35. doi:10.1016/j.ab.2015.07.018.
- Chan S-F, Cheng H, Goh KK-R, Zou R. Preanalytic Methodological Considerations and Sample Quality Control of Circulating miRNAs. *J Mol Diagn*. 2023;25:438-53. doi:10.1016/j.jmoldx.2023.03.005.
- Khan J, Lieberman JA, Lockwood CM. Variability in, variability out: best practice recommendations to standardize pre-analytical variables in the detection of circulating and tissue microRNAs. *Clin Chem Lab Med*. 2017;55:608-21. doi:10.1515/cclm-2016-0471.
- Markou AN, Lianidou ES. The impact of pre-analytical factors on the reliability of miRNA measurements. *Curr Pathobiol Rep*. 2019;7:29-33. doi:10.1007/s40139-019-00191-9.
- Sourvinou IS, Markou A, Lianidou ES. Quantification of circulating miRNAs in plasma: effect of preanalytical and analytical parameters on their isolation and stability. *J Mol Diagn*. 2013;15:827-34. doi:10.1016/j.jmoldx.2013.07.005.
- Wang K, Zhang S, Weber J, et al. Export of microRNAs and microRNA-protective protein by mammalian cells. *Nucleic Acids Res*. 2010;38:7248-59. doi:10.1093/nar/gkq601.
- O'Brien J, Hayder H, Zayed Y, et al. Overview of MicroRNA biogenesis, mechanisms of actions, and circulation. *Front Endocrinol (Lausanne)*. 2018;9:402. doi:10.3389/fendo.2018.00402.
- Zhelankin AV, Iulmetova LN, Sharova EI. The Impact of the Anti-coagulant Type in Blood Collection Tubes on Circulating Extracellular Plasma MicroRNA Profiles Revealed by Small RNA Sequencing. *Int J Mol Sci*. 2022;23:10340. doi:10.3390/ijms231810340.
- Faraldi M, Sansoni V, Perego S, et al. Study of the preanalytical variables affecting the measurement of clinically relevant

Хранение микроРНК. Сравнение условий хранения микроРНК было проведено только в двух из проанализированных работ [6, 23]. Было показано, что выделенная микроРНК стабильна при -70°C в течение периода хранения до года. Анализ проводился с помощью количественной оценки уровня cel-miR-39 через 2, 6, 8, 9 и 12 мес. [6]. В другом исследовании была продемонстрирована стабильность микроРНК (на примере miR-16-5p) при 22°C в течение 0, 1, 3 и 7 дней до проведения кПЦР, а незначительное увеличение среднего Cq наблюдалось только через 7 дней при КТ [23]. Приведенные исследования доказывают относительную стабильность микроРНК при хранении.

Заключение

Стандартизация преаналитических переменных представляет собой критический шаг для клинических задач и научных проблем при определении циркулирующих микроРНК. Несмотря на их стабильность, количественные измерения циркулирующих микроРНК могут быть существенно подвержены как внешним, так и внутрииндивидуальным факторам. Условия хранения сыворотки и плазмы крови перед анализом, а также методы выделения, используемые для обнаружения микроРНК, являются важными преаналитическими переменными. Для того, чтобы анализ микроРНК мог быть реализован в клинических лабораторных условиях, необходимо установить стандартизированные протоколы условий хранения образцов, выделения и нормализации, обеспечивающих воспроизводимую и точную количественную оценку уровней циркулирующей микроРНК.

Отношения и деятельность: все авторы заявляют об отсутствии потенциального конфликта интересов, требующего раскрытия в данной статье.

- free-circulating microRNAs: focus on sample matrix, platelet depletion, and storage conditions. *Biochem Med.* 2020;30:010703. doi:10.11613/BM.2020.010703.
11. Kim SH, MacIntyre DA, Sykes L, et al. Whole blood holding time prior to plasma processing alters microRNA expression profile. *Front Genet.* 2021;12:818334. doi:10.3389/fgene.2021.818334.
12. Binderup HG, Madsen JS, Heegaard NHH, et al. Quantification of microRNA levels in plasma - Impact of preanalytical and analytical conditions. *PLoS One.* 2018;13:e0201069. doi:10.1371/journal.pone.0201069.
13. McDonald JS, Milosevic D, Reddi HV, et al. Analysis of circulating microRNA: preanalytical and analytical challenges. *Clin Chem.* 2011;57:833-40. doi:10.1373/clinchem.2010.157198.
14. Grasedieck S, Schöler N, Bommer M, et al. Impact of serum storage conditions on microRNA stability. *Leukemia.* 2012;26:2414-6. doi:10.1038/leu.2012.106.
15. McAlexander MA, Phillips MJ, Witwer KW. Comparison of methods for miRNA extraction from plasma and quantitative recovery of RNA from cerebrospinal fluid. *Front Genet.* 2013;4:83. doi:10.3389/fgene.2013.00083.
16. Moret I, Sánchez-Izquierdo D, Iborra M, et al. Assessing an improved protocol for plasma microRNA extraction. *PLoS One.* 2013;8:e82753. doi:10.1371/journal.pone.0082753.
17. Page K, Guttery DS, Zahra N, et al. Influence of plasma processing on recovery and analysis of circulating nucleic acids. *PLoS One.* 2013;8:e77963. doi:10.1371/journal.pone.0077963.
18. Monleau M, Bonnel S, Gostan T, et al. Comparison of different extraction techniques to profile microRNAs from human sera and peripheral blood mononuclear cells. *BMC Genomics.* 2014;15:395. doi:10.1186/1471-2164-15-395.
19. Zhao H, Shen J, Hu Q, et al. Effects of preanalytic variables on circulating microRNAs in whole blood. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2014;23:2643-8. doi:10.1158/1055-9965.EPI-14-0550.
20. Balzano F, Deiana M, Dei Giudici S, et al. miRNA Stability in Frozen Plasma Samples. *Molecules.* 2015;20:19030-40. doi:10.3390/molecules201019030.
21. Tan GW, Khoo ASB, Tan LP. Evaluation of extraction kits and RT-qPCR systems adapted to high-throughput platform for circulating miRNAs. *Sci Rep.* 2015;5:9430. doi:10.1038/srep09430.
22. Glinge C, Clauss S, Boddum K, et al. Stability of circulating blood-based MicroRNAs — pre-analytic methodological considerations. *PLoS One.* 2017;12:e0167969. doi:10.1371/journal.pone.0167969.
23. Muth DC, Powell BH, Zhao Z, et al. miRNAs in platelet-poor blood plasma and purified RNA are highly stable: a confirmatory study. *BMC Res Notes.* 2018;11:273. doi:10.1186/s13104-018-3378-6.
24. Wong RKY, MacMahon M, Woodside JV, et al. A comparison of RNA extraction and sequencing protocols for detection of small RNAs in plasma. *BMC Genomics.* 2019;20:446. doi:10.1186/s12864-019-5826-7.
25. Kupec T, Bleilevens A, Iborra S, et al. Stability of circulating microRNAs in serum. *PLoS One.* 2022;17:e0268958. doi:10.1371/journal.pone.0268958.
26. Suzuki K, Yamaguchi T, Kohda M, et al. Establishment of pre-analytical conditions for microRNA profile analysis of clinical plasma samples. *PLoS One.* 2022;17:e0278927. doi:10.1371/journal.pone.0278927.
27. Cheng HH, Yi HS, Kim Y, et al. Plasma processing conditions substantially influence circulating microRNA biomarker levels. *PLoS One.* 2013;8:e64795. doi:10.1371/journal.pone.0064795.
28. Binderup HG, Houliind K, Madsen JS, et al. Pre-storage centrifugation conditions have significant impact on measured microRNA levels in biobanked EDTA plasma samples. *Biochem Biophys Rep.* 2016;7:195-200. doi:10.1016/j.bbrep.2016.06.005.
29. Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the 2- $\Delta\Delta$ CT Method. *Methods.* 2001;25:402-8. doi:10.1006/meth.2001.1262.
30. Mitchell PS, Parkin RK, Kroh EM, et al. Circulating microRNAs as stable blood-based markers for cancer detection. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2008;105:10513-8. doi:10.1073/pnas.0804549105.
31. Goeman JJ, Solari A. Multiple hypothesis testing in genomics. *Stat Med.* 2014;33:1946-78. doi:10.1002/sim.6082.

Биобанки в исследованиях сердечно-сосудистых заболеваний

Гусакова А. М., Кравченко Е. С., Суслова Т. Е., Попов С. В., Бощенко А. А.

НИИ кардиологии — филиал ФГБНУ "Томский национальный исследовательский медицинский центр РАН". Томск, Россия

Выполнен систематический обзор научных публикаций открытой базы PubMed, eLibrary.ru, каталогов биоресурсных коллекций BBMRI-ERIC (Biobanking and Biomolecular Resources Research Infrastructure — European Research Infrastructure Consortium) и научных исследований международного регистра клинических исследований ClinicalTrials.gov на глубину 15 лет, целью которого явился поиск приоритетных направлений использования биобанков в кардиологии. Установлено, что ключевыми направлениями исследований биобанков крови и ткани сердца является изучение патогенетических механизмов возникновения и развития заболеваний сердца и сосудов, создание инновационных методов диагностики, лечения и профилактики сердечно-сосудистых заболеваний (ССЗ). Применение современных технологий, таких как геномика, транскриптомика, протеомика и метаболомика, позволяет идентифицировать кандидатные маркеры, выявлять новые молекулярные мишени для лекарственной терапии, диагностические и терапевтические подходы при ССЗ. Одним из многообещающих направлений является поиск и изучение полигенных шкал риска возникновения ССЗ и предикторов развития неблагоприятных сердечно-сосудистых событий. Анализ регистра клинических испытаний выявил еще одну важную сферу применения биобанков — клинические исследования, в рамках которых биобанки являются ключевым ресурсом образцов крови и ткани, а также клинических, социально-демографических, лабораторных и инструмен-

тальных данных. Таким образом, исследования с использованием ресурсов биобанков необходимы для изучения патогенетических механизмов ССЗ, выявления новых протеомных биомаркеров и генетических факторов, совершенствования методов диагностики, профилактики и лечения.

Ключевые слова: биобанк, биобанкирование, сердечно-сосудистые заболевания, кардиология, клинические исследования, геном.

Отношения и деятельность. Работа выполнена в рамках темы ФНИ 122020300043-1 НИИ кардиологии Томского НИМЦ.

Поступила 29/08-2024

Рецензия получена 07/10-2024

Принята к публикации 15/10-2024



Для цитирования: Гусакова А. М., Кравченко Е. С., Суслова Т. Е., Попов С. В., Бощенко А. А. Биобанки в исследованиях сердечно-сосудистых заболеваний. *Кардиоваскулярная терапия и профилактика*. 2024;23(11):4170. doi: 10.15829/1728-8800-2024-4170. EDN XHRBDO



Biobanks in cardiovascular disease research

Gusakova A. M., Kravchenko E. S., Suslova T. E., Popov S. V., Boshchenko A. A.

Cardiology Research Institute — branch of the Tomsk National Research Medical Center. Tomsk, Russia

A systematic review of publications from the PubMed and eLibrary.ru databases, Biobanking and Biomolecular Resources Research Infrastructure — European Research Infrastructure Consortium (BBMRI-ERIC) and ClinicalTrials.gov studies was carried out for 15 years. The aim was to find priority areas for the use of biobanks in cardiology. The key areas of research on blood and heart tissue biobanks are the study of pathogenetic mechanisms, creation of innovative methods for diagnosis, treatment and prevention of cardiovascular diseases (CVDs). The use of modern technologies such as genomics, transcriptomics, proteomics and metabolomics allows identifying candidate markers, revealing new molecular targets for drug therapy, diagnostic and therapeutic approaches for CVD. One of the promising areas is the search and study of polygenic scores of CVD risk and predictors of adverse cardiovascular events. Analysis of the registry revealed another important area of biobank application — clinical trials, in which biobanks are a key resource of blood and tissue

samples, as well as clinical, paraclinical, and socio-demographic data. Therefore, studies using biobank resources are necessary to study the pathogenetic mechanisms of CVD, identify new proteomic biomarkers and genetic factors, as well as to improve diagnostics, prevention and treatment.

Keywords: biobank, biobanking, cardiovascular diseases, cardiology, clinical trials, genome.

Relationships and Activities. The work was carried out within the topic 122020300043-1 of the Cardiology Research Institute of the Tomsk National Research Medical Center.

Gusakova A. M.* ORCID: 0000-0002-3147-3025, Kravchenko E. S. ORCID: 0000-0002-1235-9956, Suslova T. E. ORCID: 0000-0001-9645-6720, Popov S. V. ORCID: 0000-0002-9050-4493, Boshchenko A. A. ORCID: 0000-0001-6009-0253.

*Автор, ответственный за переписку (Corresponding author):

e-mail: anna@cardio-tomsk.ru

[Гусакова А. М.* — к. фарм. н., с. н. с. отделения клинической лабораторной диагностики, ORCID: 0000-0002-3147-3025, Кравченко Е. С. — м. н. с. отделения клинической лабораторной диагностики, ORCID: 0000-0002-1235-9956, Суслова Т. Е. — к. м. н., зав. отделением клинической лабораторной диагностики, ORCID: 0000-0001-9645-6720, Попов С. В. — д. м. н., академик РАН, директор, ORCID: 0000-0002-9050-4493, Бощенко А. А. — д. м. н., зам. директора по научной работе, ORCID: 0000-0001-6009-0253].

*Corresponding author: anna@cardio-tomsk.ru

Received: 29/08-2024

Revision Received: 07/10-2024

Accepted: 15/10-2024

For citation: Gusakova A. M., Kravchenko E. S., Suslova T. E., Popov S. V., Boshchenko A. A. Biobanks in cardiovascular disease research. *Cardiovascular Therapy and Prevention*. 2024;23(11):4170. doi: 10.15829/1728-8800-2024-4170. EDN XHRBDO

АБА — аневризма брюшной аорты, АС — аортальный стеноз, ВПС — врожденный порок сердца, ДКМП — дилатационная кардиомиопатия, ГКМП — гипертрофическая кардиомиопатия, ИБС — ишемическая болезнь сердца, ИИ — клиническое исследование, ЛЖ — левый желудочек, ЛП(а) — липопротеин(а), ПШР — полигенная шкала риска, СН — сердечная недостаточность, ССЗ — сердечно-сосудистые заболевания, ФП — фибрилляция предсердий, ФР — фактор(ы) риска, ЭИБ — электронная история болезни, ЭМК — электронная медицинская карта, BBMRI-ERIC — Biobanking and Biomolecular Resources Research Infrastructure — European Research Infrastructure Consortium (терминологический словарь Европейской исследовательской инфраструктуры), GWAS — genome-wide association studies (полногеномные исследования ассоциаций).

Ключевые моменты

Что известно о предмете исследования?

- Биобанки являются важным неотъемлемым инструментом современных исследовательских проектов в области медицины.
- Крупные исследования с обширными коллекциями высококачественных биологических образцов в сочетании с клиническими, социально-демографическими, лабораторными и инструментальными данными необходимы для лучшего понимания этиологии сердечно-сосудистых заболеваний и изучения механизмов их развития.

Что добавляют результаты исследования?

- Показаны приоритетные направления применения биобанков в области кардиологии.
- Исследования с использованием ресурсов биобанков необходимы для изучения патогенетических механизмов возникновения и развития заболеваний сердца и сосудов, поиска и анализа полигенных факторов риска возникновения заболеваний и предикторов развития неблагоприятных сердечно-сосудистых событий, а также для проведения клинических исследований.

Key messages

What is already known about the subject?

- Biobanks are an important integral tool of modern research projects in medicine.
- Large studies with comprehensive collections of high-quality biological samples in combination with clinical, paraclinical and socio-demographic data are necessary for a better understanding of the etiology and pathogenesis of cardiovascular diseases.

What might this study add?

- Priority areas for the use of biobanks in cardiology are shown.
- Research using biobank resources is necessary to study the pathogenetic mechanisms of cardiovascular diseases, as well as to search and analyze polygenic risk factors and predictors of adverse cardiovascular events and conduct clinical trials.

Введение

Сердечно-сосудистые заболевания (ССЗ) остаются ведущей причиной высокой заболеваемости и смертности во всем мире, на их долю приходится ~17,9 млн смертей в год [1-3]. Согласно данным Росстата Российской Федерации, в последние годы наблюдается снижение уровня смертности от патологий сердечно-сосудистой системы, однако неуклонно растет заболеваемость хроническими неинфекционными болезнями системы кровообращения, в т.ч. ишемической болезнью сердца (ИБС), артериальной гипертензией, цереброваскулярными заболеваниями¹. Причины ССЗ включают сложное взаимодействие между предрасполагающими генетическими факторами, образом жизни, состоянием окружающей среды и здоровья [4].

В настоящее время важным и неотъемлемым инструментом исследовательских проектов в области медицины являются биобанки.

Спрос на высококачественные и клинически аннотированные биообразцы возрастает с каждым годом, в т.ч. в связи с беспрецедентным ростом уровня проводимых исследований в области геномного секвенирования и биоинформатики. Биобанки являются основным ресурсом для исследований в области транскриптомики, протеомики, метаболомики. Они широко используются в геномике, представляя богатый ресурс для анализа ассоциаций по всему геному, генетической эпидемиологии, исследований структуры и функции генома человека.

В ходе планирования и проведения биомедицинских исследований значительное количество времени тратится на поиск, сбор, характеристику биологического материала. Биобанки осуществляют структурированный сбор и хранение коллекций биоматериала пациентов с различными характеристиками, с хорошо аннотированными клиническими и патологоанатомическими данными. Предоставляя быстрый доступ к биологическому материалу пациентов с определенными заболеваниями,

¹ Здравоохранение в России. 2023: Стат.сб. Росстат. М., 2023. 179 с.

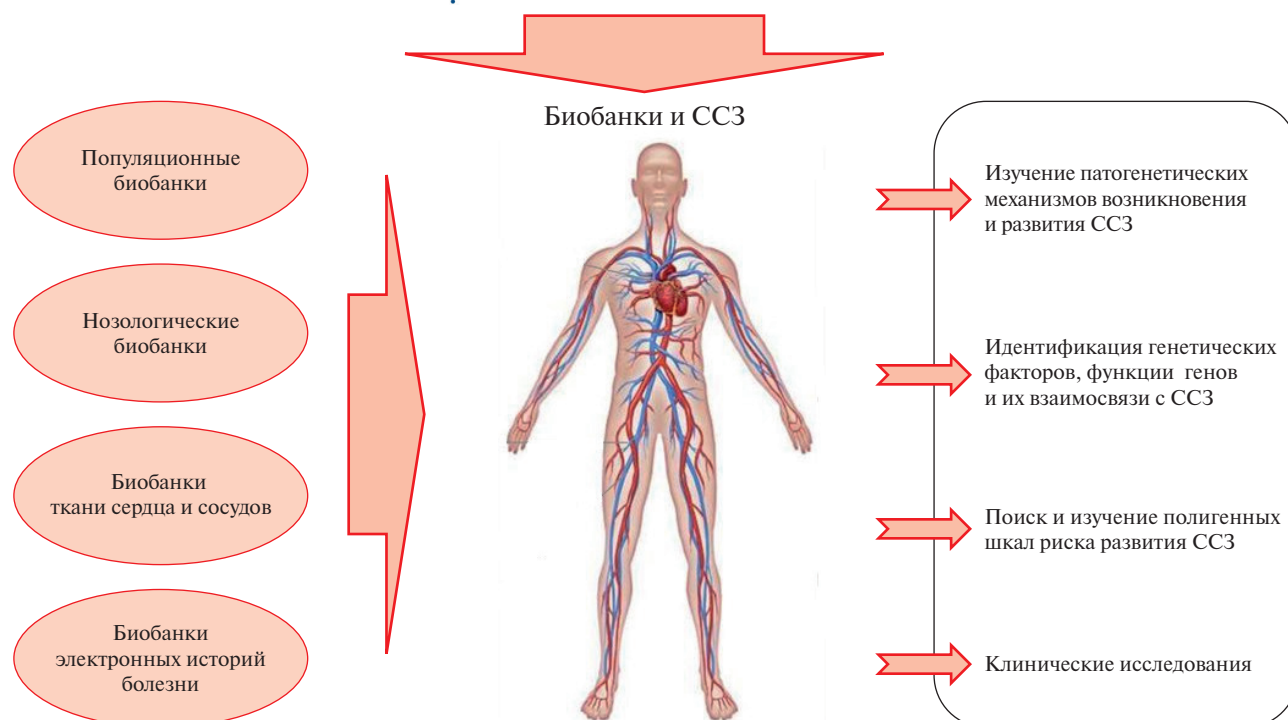


Рис. 1 Ключевые направления использования биобанков в исследованиях ССЗ на основании данных поисковых ресурсов. Примечание: ССЗ — сердечно-сосудистые заболевания.

биобанки существенным образом сокращают время проведения исследовательской работы и способствуют более быстрому внедрению результатов исследования в клиническую практику.

Востребованность и эффективность биобанков во многом зависит от высокого качества, количества и доступности биологических образцов разных типов и форматов. Стандартизация процессов, связанных с процедурами сбора, обработки, транспортировки, систематизации, хранением и контролем качества обеспечивает качество биоматериала, воспроизводимость исследований и совместимость с другими биобанками.

Цель настоящего обзора — поиск приоритетных направлений применения биобанков в кардиологии, а также анализ результатов исследований, достижений и открытий в области ССЗ, полученных с использованием ресурсов биобанков.

Методологические подходы

Выполнена оценка каталогов биоресурсных коллекций по ССЗ в электронном каталоге консорциума по исследованию биобанкинга и биомолекулярных ресурсов (Biobanking and Biomolecular Resources Research Infrastructure — European Research Infrastructure Consortium, BBMRI-ERIC). В настоящее время инфраструктура консорциума BBMRI-ERIC охватывает 34 страны и включает в себя 479 биобанков и центров биомолекулярных ресурсов,

содержащих 1611 коллекций биообразцов². Поиск проведен по категории "сердечно-сосудистые заболевания" (cardiovascular diseases) и включал такие дополнительные критерии поиска, как "биологические образцы, данные о клинических симптомах, медицинские записи" (biological samples, data on clinical symptoms, medical reports). Критериям поиска удовлетворяли 67 биобанков со 139 коллекциями.

Проведен поиск публикаций в базах данных PubMed и eLibrary.ru по ключевым словам: биобанк или биобанкинг (biobank or biobanking), каждое из которых сочеталось со словами "сердечно-сосудистые заболевания" (cardiovascular diseases). Проведен анализ информации, представленной в оригинальных полнотекстовых статьях, обзорах литературы, метаанализах. Глубина исследования составила 15 лет. Из 458 источников, обнаруженных на этапе первоначального скрининга, только 278 публикаций соответствовали всем критериям поиска. Для дальнейшего анализа отобрано 42 публикации.

Выполнен анализ данных международного регистра клинических испытаний ClinicalTrials.gov³. Из 102 исследований для дальнейшего анализа было отобрано 11, удовлетворяющих критериям поиска по заболеванию (сердечно-сосудистые заболевания; cardiovascular diseases) и дополнительным

² <https://directory.bbmri-eric.eu>.

³ <https://clinicaltrials.gov/>.

Таблица 1

**Биобанки с коллекциями биологических образцов пациентов с ССЗ
(данные каталога BVMRI-ERIC)**

Название	Количество коллекций	Количество образцов	Типы биообразцов	Диагнозы
Biobank Graz (Австрия)	17	490517	Цельная кровь, сыворотка крови, плазма крови, лейкоцитарно-тромбоцитарный концентрат, моча, срезы тканей, фрагменты тканей	ГБ, ИБС, заболевания системы кровообращения, ОИМ, стенокардия, последующий ИМ, некоторые текущие осложнения после ОИМ, кардиомегалии, ГБ почек, кардиомиопатии, первичная легочная гипертензия, легочное сердце и заболевания малого круга кровообращения, другие легочно-сердечные заболевания, другие формы ССЗ
MedUni Wien Biobank (Австрия)	18	30894	Плазма крови, сыворотка крови, моча, РНК	СН, Заболевания системы кровообращения, ИБС, ОИМ, ФП и ТП, формы ССЗ
Central Biobank University Medical Center Göttingen (Германия)	6	20075	Цельная кровь, сыворотка крови, плазма крови, лейкоцитарно-тромбоцитарный концентрат, моча, РНК, клеточные линии	Стеноз аорты (клапана), СН, ОИМ, кардиомиопатия
Hannover Unified Biobank (Германия)	3	898	Цельная кровь, сыворотка крови, плазма крови, ДНК	СН, застойная СН, левожелудочковая недостаточность, СН неуточненная, острый и подострый эндокардит, эндокардит и поражения сердечных клапанов при заболеваниях, классифицированных в других рубриках, заболевания системы кровообращения
Amsterdam UMC Biobank: Location AMC (Нидерланды)	4	3010-30100	Сыворотка крови, плазма крови, ДНК	ССЗ, ОИМ, болезнь сердца неуточненная
BioBank Maastricht UMC (Нидерланды)	4	3100-31000	Сыворотка крови, плазма крови, ДНК, кДНК/мРНК	СД 2 типа, атеросклероз, эссенциальная (первичная) ГБ, стенокардия, ОИМ, последующий ИМ, некоторые текущие осложнения после ОИМ, др. острые ИБС, атеросклеротическая болезнь сердца, болезнь сердца неуточненная
Durrer Center (Нидерланды)	26	8630-86300	Цельная кровь, сыворотка крови, плазма крови, клетки крови, моча, ДНК, РНК, ткани	Эссенциальная (первичная) ГБ, кардиомиопатии (ГКМП, ДКМП), семейная изолированная ДКМП, СН, атеросклеротическая болезнь сердца, нарушения обмена липопротеинов и другие липидемии, гиперхолестеринемия, атеросклероз, ОИМ, неревматические поражения аортального клапана, эндокардит, ФП и ТП, другие венозные эмболии и тромбозы, другие сердечные аритмии, остановка сердца неуточненная, врожденный порок сердца неуточненный, болезнь сердца неуточненная, инсульт не уточненный, как кровотечение или инфаркт

Примечание: ГБ — гипертоническая болезнь, ГКМП — гипертрофическая кардиомиопатия, ДКМП — дилатационная кардиомиопатия, ДНК — дезоксирибонуклеиновая кислота, ИБС — ишемическая болезнь сердца, ИМ — инфаркт миокарда, кДНК — комплементарная ДНК, мРНК — матричная рибонуклеиновая кислота, ОИМ — острый ИМ, РНК — рибонуклеиновая кислота, СД — сахарный диабет, СН — сердечная недостаточность, ССЗ — сердечно-сосудистые заболевания, ФП и ТП — фибрилляция и трепетание предсердий, BVMRI-ERIC — Biobanking and Biomolecular Resources Research Infrastructure — European Research Infrastructure Consortium (терминологический словарь Европейской исследовательской инфраструктуры).

терминам (биобанк/биобанкирование; biobank/bio-banking), а также включающих >5 тыс. участников.

На рисунке 1 схематически представлена структура обзора.

Результаты и обсуждение

Терминология, современное состояние, типы биобанков

Согласно российскому глоссарию биобанков РФ, под биобанком понимается организация или подразделение организации, которая может принимать, обрабатывать, хранить и распространять

биологические образцы и ассоциированные с ними данные для текущих и будущих исследований, диагностики и терапии в соответствии со стандартными операционными процедурами и включает в себя полный комплекс мероприятий, связанных с его функционированием⁴.

Биобанки играют ключевую роль в современной биомедицинской науке. Коллекции высококачественных биоматериалов разных типов и форматов,

⁴ ГОСТ Р 71251-2024. Биотехнология. Биобанкинг. Термины и определения: дата введения 2024-05-01.

собранные с соблюдением этических требований и стандартов лабораторной обработки и хранения, с полноценной и качественной клинической аннотацией оказывают содействие развитию здравоохранения и медицинских исследований, включая исследования в области передовых методов лечения заболеваний сердца.

В настоящее время мировой рынок биобанкирования переживает растущий спрос, что обусловлено увеличением числа исследований в области протеомики, геномики и метаболомики, а также растущей значимостью биобанков в клинических исследованиях.

По данным ресурса "Global Bank Directory, Tissue Banks, and Biorepositories", централизованного информационного ресурса по существующим сегодня биобанкам, в США насчитывается 163 биобанка, а в Европе — 90. Всего же в мировом каталоге зарегистрированы 332 биобанка⁵.

Типы биобанков, используемые в исследованиях ССЗ

Многочисленные исследования, направленные на изучение ССЗ, используют ресурсы биобанков разных типов и назначений. Одним из них являются биобанки, ориентированные на исследование популяции. *Популяционные биобанки* собирают биологические образцы от отдельных лиц из широкой демографической популяции, проводят комплексное обследование различных групп населения для определения профиля биомаркеров, свойственных данной популяции и с целью изучения роли индивидуальной генетической восприимчивости и воздействия внешних факторов в развитии конкретных заболеваний [5].

Крупномасштабные популяционные биобанки изучают широкий круг вопросов в области эпидемиологии, патогенеза и профилактики ССЗ. Значительный вклад в популяционный биобанкинг вносят крупные популяционные когортные исследования и национальные репозитории, для которых участники выбираются случайным образом из общей популяции [6]. Яркими примерами являются Биобанк Великобритании (UK Biobank), проект CONSTANCES (Франция), German National Cohort, LifeLines (Нидерланды), FinnGen (Финляндия) и проект All of Us (США). В сочетании с обширными клиническими и физиологическими данными популяционные биобанки способствуют оценке естественной частоты возникновения и прогрессирования распространенных заболеваний в изначально здоровой популяции. Еще одним фокусом внимания популяционных биобанков является изучение биомаркеров, которые являются предикторами начала заболеваний, а также их связь с новыми заболеваниями или со снижением функции органов.

Значительный размер выборки популяционных биобанков позволяет проводить масштабные исследования генетической основы различных заболеваний, в т.ч. полногеномные исследования ассоциаций (GWAS — genome-wide association studies), и получать новые важные сведения о генетических детерминантах как распространенных, так и редких фенотипов ССЗ [5, 7].

Нозологические биобанки собирают, изучают и хранят биоматериал пациентов с определенным заболеванием. Ресурсы биобанков, специализирующихся на ССЗ, способствуют лучшему пониманию этиологии данных заболеваний, изучению причин их прогрессирования, поиску новых биомаркеров, выявлению и оценке генетических факторов, улучшению диагностики, повышению эффективности лечения заболеваний сердца и созданию новых терапевтических стратегий.

Примером, нозологического биобанка является Японский Биобанк (BioBank Japan), который содержит образцы и данные >270 тыс. пациентов с 51 целевым заболеванием, в т.ч. с ССЗ.

По состоянию на август 2024г в электронном каталоге консорциума BVMRI-ERIC критериям поиска по биобанкам и коллекциям, ассоциированным с ССЗ, удовлетворяли 67 биобанков. При детальном анализе обнаружено, что коллекции биоматериала от пациентов с ССЗ собирают только 36 биобанков. 110 коллекций и подколлекций включают различный биологический материал пациентов с атеросклерозом, артериальной гипертензией, острым инфарктом миокарда, остановкой сердца, аритмиями, кардиомегалией, гипертрофической кардиомиопатией (ГКМП), хронической сердечной недостаточностью (СН), аневризмой аорты, миокардитом, эндокардитом. В таблице 1 представлены биобанки, имеющие >3 коллекций биологических образцов пациентов с ССЗ, с указанием нозологических диагнозов.

В России на сентябрь 2024г членами Национальной ассоциации биобанков и специалистов по биобанкированию (НАСБИО)⁶ являются 35 биобанков, 10 из которых собирают коллекции от пациентов с ССЗ (таблица 2).

Различают сегментацию рынка биобанков в зависимости от *типа собираемых образцов*. Цельная кровь и её производные остаются наиболее часто используемыми объектами в исследованиях ССЗ. В последнее время востребованы и активно используются образцы нуклеиновых кислот (ДНК (дезоксирибонуклеиновая кислота), РНК (рибонуклеиновая кислота), кДНК (комплементарная ДНК)/мРНК (матричная РНК), микроРНК). Эмбриональные и постнатальные стволовые клетки, клеточные линии, различные биологические жидкости и фрагмен-

⁵ <http://specimencentral.com/biobank-directory>.

⁶ www.nasbio.ru.

Таблица 2

Биобанки с коллекциями биологических образцов пациентов с ССЗ в России

Название	Количество образцов	Типы биообразцов	Диагнозы
ФГБУ "НМИЦК им. акад. Е. И. Чазова" Минздрава России (г. Москва)	35000	Цельная кровь, сыворотка крови, ткани сердца	ССЗ
ФГБУ "НМИЦ им. В. А. Алмазова" Минздрава России Биобанк (г. Санкт-Петербург)	50000	Цельная кровь, сыворотка крови, плазма крови, лейкоцитарная фракция периферической крови, моноклеарная фракция костного мозга, костный мозг, ДНК, фрагменты тканей, культуры клеток, моча, спинномозговая жидкость	Сердечно-сосудистая, гематологическая, эндокринологическая, акушерско-гинекологическая патологии, врожденные изолированные и сочетанные пороки развития, нейромышечные заболевания с вовлечением в патологический процесс сердечной мышцы, редкие генетические синдромы, эпидемиологический проект ЭССЕ, образцы от жителей Ленинграда, переживших блокаду
НИИ кардиологии Томского НИМЦ, криобанк биологических образцов (г. Томск)	3000	Цельная кровь, сыворотка крови, плазма крови, ДНК, РНК, фрагменты тканей	ОИМ, резистентная АГ, ФП, кардиомиопатии у детей и взрослых (гипертрофическая, дилатационная, аритмогенная), синдромные и несиндромные аневризмы аорты, миокардиты, жизнеугрожающие нарушения ритма сердца у детей и взрослых
ФГБУ "НМИЦ терапии и профилактической медицины" Минздрава России Лаборатория "Банк биологического материала" (г. Москва)	848000	Цельная кровь, сыворотка, плазма	ССЗ (ИБС, аритмии, кардиомиопатии и др.), патология желудочно-кишечного тракта, ожирение и другие нозологии; репрезентативная выборка российского населения, собранная в рамках исследований ЭССЕ-РФ, ЭССЕ-РФ2, ЭССЕ-РФ3
ФГБУ "Центр стратегического планирования и управления медико-биологическими рисками здоровья" (г. Москва)	*	Образцы микробиоты	Образцы микробиоты человека от здорового населения (взрослых и детей) и пациентов с различными патологиями (ССЗ, заболевания кишечника, эндокринологические нарушения, аутоиммунные заболевания)
СПБ ГБУЗ "Городская больница № 40", Биобанк (г. Санкт-Петербург)	200000	Цельная кровь, плазма крови, сыворотка крови, лейкоцитарная фракция, моноклеарные клетки периферической крови, ткань, цереброспинальная жидкость, моча, ДНК, РНК, цельная кровь и лейкоцитарная фракция со стабилизатором РНК	ССЗ, онкологические заболевания (солидные опухоли: рак желудка, рак поджелудочной железы, рак толстой и прямой кишки, рак предстательной железы, рак молочной железы, рак яичников, рак матки), доброкачественные неоплазии ЖКТ, морбидное ожирение и состояние после бариатрического вмешательства, COVID-19, состояния после COVID-19, нейродегенеративные заболевания (болезнь Альцгеймера, болезнь Паркинсона, рассеянный склероз), беременные женщины, условно-здоровые доноры
ФГБОУ ДПО "Российская медицинская академия непрерывного профессионального образования" Минздрава России, Биоресурсная коллекция (г. Москва)	*	Цельная кровь, плазма крови, буккальный эпителий, моча	АГ, острый коронарный синдром, ФП, стенозирующий атеросклероз артерий нижних конечностей, тромбоз вен/артерий сетчатки, ишемический инсульт и другие
ФГБОУ ВО "Башкирский государственный медицинский университет" Минздрава России, Биобанк (г. Уфа)	*	Цельная кровь, ткани	Онкологические, ССЗ и другие

ты тканей также являются ценными объектами для биобанкирования. По данным 2023г ткани человека были крупнейшим сегментом, на долю которого пришлось ~38% всего собираемого биоматериала⁷.

⁷ Biobanking market research report by product and service, by sample type, and by region. <https://www.marketresearchfuture.com/reports/biobanking-market-5967>.

Биобанкирование тканей сердечно-сосудистой системы предоставляет уникальную возможность использовать образцы сердца и сосудов для трансляционных исследований СН, клапанных и аортальных заболеваний, и других патологий. Ткани из сердечно-сосудистых биобанков могут быть использованы исследователями во множестве проектов, включая изучение белков цитоскеле-

Таблица 2. Продолжение

Название	Количество образцов	Типы биообразцов	Диагнозы
ФГБОУ ВО "Уральский государственный медицинский университет" Минздрава России, Биобанк (г. Екатеринбург)	1500	Сыворотка крови, ротовая жидкость	ССЗ, большие акушерские синдромы, эндометриоз, онкологические заболевания
ООО "Арсбиомедика" (г. Санкт-Петербург)	60000	Производные крови (преимущественно плазма двойной открутки, но также стандартная плазма, сыворотка и светлый слой лейкоцитов), образцы ткани и их производные (парафиновые блоки и гистопрепараты), жизнеспособные клетки	Онкология, гематология, ревматология и воспалительные заболевания, гастроэнтерология, дерматология, ССЗ, неврология, редкие заболевания, эндокринные и метаболические заболевания

Примечание: * — данные отсутствуют, АГ — артериальная гипертензия, ДНК — дезоксирибонуклеиновая кислота, ЖКТ — желудочно-кишечный тракт, ИБС — ишемическая болезнь сердца, ОИМ — острый инфаркт миокарда, РНК — рибонуклеиновая кислота, ССЗ — сердечно-сосудистые заболевания, ФП — фибрилляция предсердий, ЭССЕ-РФ — Эпидемиология сердечно-сосудистых заболеваний в регионах Российской Федерации, ЭССЕ-РФ2 — ЭССЕ-РФ. Второе исследование, ЭССЕ-РФ3 — ЭССЕ-РФ. Третье обследование), COVID-19 — COroNa VIrus Disease 2019 (коронавирусная инфекция 2019г).

та, мембранных белков, сократительной механики кардиомиоцитов, экспрессии белков при кардиомиопатиях, регенерации миокарда после травмы и многих других [8].

Предоставляя образцы донорских тканей сердца человека и пациентов с различными патологиями, Сиднейский кардиологический банк (Sydney Heart Bank, Австралия) способствует открытию геномных, протеомных и функциональных особенностей СН, обеспечивает проведение трансляционных исследований. Биобанк врожденных пороков сердца (ВПС) (CHD-Biobank, Германия) собирает биоматериалы от пациентов с любым диагностированным ВПС. Коллекция сердечной ткани включает 1143 образца тканей от 556 пациентов после операции на открытом сердце. Из-за редкости и неоднородности фенотипов ВПС данный биобанк обеспечивает всеобъемлющую базу для исследований в области ВПС [9]. Институт CVPPath (США) имеет один из крупнейших в своем роде биобанков тканей, содержащий >7 тыс. аутопсийных сердец, собранных при вскрытии пациентов, умерших внезапной смертью.

Важные шаги в понимании патофизиологии атеросклероза были сделаны благодаря изучению большого количества образцов атеросклеротических бляшек, полученных из биобанков атеросклеротических тканей. Белки локальных бляшек являются источником биомаркеров с высокой прогностической ценностью для будущих сердечно-сосудистых событий [10].

Следует упомянуть еще одну категорию — биобанки, связанные с электронными историями болезни (ЭИБ). Данный вариант стал возможен благодаря широкому распространению компьютерных техно-

логий и массовому переходу медицинских учреждений к электронным вариантам создания и хранения записей при оказании помощи пациенту. Использование ЭИБ, электронных медицинских карт (ЭМК) и других документов, в которые естественным образом собирается информация в процессе обследования и лечения пациентов, является ещё одним вариантом получения клинических и других видов данных. К преимуществам такого подхода относятся широкий спектр получаемых данных, проспективный характер имеющейся информации, большая точность информации, отсутствие ошибок, связанных с переносом данных, более низкая стоимость создания клинической аннотации. Сегодня наличие огромных объемов цифровых данных, зафиксированных в ЭИБ, в сочетании с появлением геномных данных в системах здравоохранения открывает новые исследовательские направления и возможности улучшения управления здравоохранением [11]. Более широкое внедрение ЭИБ и создание биобанков, связанных с ЭИБ и ЭМК, предоставляют беспрецедентные возможности для трансляционных и внедренческих исследований [11].

Ключевые направления применения биобанков в исследованиях ССЗ

В базе данных PubMed за последние 15 лет было опубликовано ~240 тыс. оригинальных полнотекстовых статей, обзоров литературы, метаанализов, ассоциированных с термином "сердечно-сосудистые заболевания". Из них, только 458 публикаций были связаны с биобанками или биобанкированием.

Поиск и изучение данных литературы позволили выявить приоритетные направления исследований в области кардиологии.

1. Идентификация генетических факторов, функций генов и взаимосвязи генов с заболеваниями

Генетические исследования на основе биобанков позволяют получить ключевую информацию о генетических детерминантах как распространенных, так и редких сердечно-сосудистых фенотипов, способствуют открытию связей с различными ССЗ, включая ИБС и артериальную гипертензию [12].

Существующие знания о генетических вариантах, влияющих на риск ИБС, в значительной степени основаны на анализе GWAS распространенных вариантов нуклеотидных последовательностей. Исследования GWAS доказали, что генетическая архитектура большинства распространенных заболеваний человека является сложной [13]. В настоящее время GWAS-исследования проводятся для определения генетических детерминант, связанных с атеросклерозом, ИБС, фибрилляции предсердий (ФП), острым коронарным синдромом, артериальной гипертензией, включая поиск патогенных вариантов.

Недавний метаанализ консорциума CARDIoGRAMplusC4D, в котором приняли участие в общей сложности 194427 человек с 63746 случаями ИБС, увеличил общее число локусов предрасположенности к ИБС до 46, что в совокупности объясняет ~10% наследуемости ИБС [12].

Для выявления генетических вариаций, лежащих в основе ФП, было проведено GWAS с участием >1 млн человек из шести источников (HUNT, deCODE, MGI, DiscovEHR, UK Biobank и Консорциум AFGen). Многие из выявленных вариантов риска находятся вблизи генов, которые связаны с развитием серьезных пороков сердца (*GATA4*, *MYH6*, *NKX2-5*, *PITX2*, *TBX5*) или вблизи генов, важных для функции и целостности поперечнополосатых мышц (*CFL2*, *MYH7*, *PKP2*, *RBM20*, *SGCG*, *SSPN*) [14].

Представления о патогенезе многих ССЗ возникают на основе наблюдений за тканью атеросклеротических бляшек человека. Van Koeveerden ID, et al. (2017) выполнили исследование атеросклеротических бляшек, полученных во время операций на сердце и сосудах или при аутопсии, что позволило им сформировать понимание основного субстрата артериального тромбоза [15].

Shah S, et al. (2020) сообщают о результатах метаанализа GWAS для СН, включающего 47309 случаев СН и 930014 контрольных лиц европейского происхождения из 26 исследований Консорциума HERMES, который обнаружил 12 независимых вариантов в 11 геномных локусах, связанных с СН, каждый из которых демонстрировал одну или несколько ассоциаций с ИБС, ФП или сниженной функцией левого желудочка (ЛЖ), что предполагает их общую генетическую этиологию [16].

Levin MG, et al. (2022), используя данные из различных биобанков (HERMES, Penn Medicine Biobank, eMERGE, Mount Sinai BioMe, Geisinger

DiscovEHR, FinnGen и Global Biobank Meta-Analysis Initiative), провели большой многородственный GWAS, включающий 115150 случаев СН и 1550331 контрольных лиц. Они идентифицировали 47 локусов, связанных с заболеванием, из которых 39 были подтверждены в независимой репликационной когорте [17].

Joseph J, et al. (2022) провели GWAS с использованием Программы США "Миллион ветеранов" (MVP) для оценки отдельной генетической архитектуры СН с сохраненной и сниженной фракцией выброса ЛЖ (СНсФВ и СНнФВ) [18]. Они идентифицировали 13 генетических локусов, связанных с СНнФВ, по сравнению с только одним локусом для СНсФВ.

Tadros R, et al. (2023) провели GWAS >5 тыс. случаев ГКМП и >35 тыс. участников UK Biobank с доступными для анализа данными магнитно-резонансной томографии сердца [19]. Было обнаружено 32 новых локуса, связанных с ГКМП. Анализ образцов ткани сердца пациентов с ГКМП с использованием нисходящей протеомики на основе масс-спектрометрии высокого разрешения выявил общий паттерн измененных саркомерных протеоформ в тканях пациентов с ГКМП [20].

Zheng S, et al. (2023) провели крупнейший на сегодняшний день GWAS дилатационной кардиомиопатии (ДКМП), включающий >14255 случаев ДКМП из консорциума HERMES [21]. Было обнаружено, что гены, участвующие в межклеточной адгезии и взаимодействии клеток с матриксом, играют роль в патогенезе ДКМП.

За последнее десятилетие достижения в области технологий машинного обучения в сочетании с большими наборами изображений из репозитория биобанков способствовали быстрому расширению возможностей по измерению и генотипированию особенностей аорты, что привело к идентификации десятков генетических ассоциаций [22]. Эти знания способствуют пониманию механизмов заболеваний грудной аорты, включая аневризму и расслоение аорты, коарктацию аорты или нарушения функции аорты. Используя ресурс программы "Миллион ветеранов", были идентифицированы 14 новых геномных локусов, связанных с риском аневризмы брюшной аорты (АБА), исследованы фенотипические последствия артериального давления на АБА, идентифицированы варианты риска АБА, связанные с аневризмами в других сосудистых руслах, и разработана полигенная шкала риска (ПШР), которая идентифицирует подгруппу населения со значительно повышенным генетическим риском АБА независимо от семейного анамнеза [23].

2. Изучение патогенетических механизмов возникновения и развития заболеваний сердца и сосудов

В настоящее время биобанки предлагают исследователям уникальные возможности для изуче-

ния патогенетических механизмов возникновения и развития заболеваний сердца и сосудов, тем самым продвигая разработку новых диагностических методов и стратегий лечения. Использование современных геномных технологий, в т.ч. секвенирования следующего поколения, позволяет системно подойти к изучению молекулярных механизмов развития сердечно-сосудистых пороков развития и связанных с ними долгосрочных заболеваний.

На сегодняшний день мультиомные подходы выявили многогранную этиологию ССЗ, включая геномные, протеомные и метаболомные нарушения [24]. Zhao Q, et al. (2023) провели скрининг потенциальных патогенных генов коронарного атеросклероза. В ходе работы были выявлены новые гены, связанные с коронарным атеросклерозом, и предложена потенциальная биологическая функция этих генов [25].

В рамках исследования ADAPT (Arrhythmia and Conduction Disorders: TowArD Pathophysiology Based Treatment) для лучшего понимания патофизиологии различных аритмий, гетерогенности клинических проявлений и их прогноза был разработан биобанк "ADAPT" (Нидерланды), который осуществляет систематический и качественный сбор биоматериала и данных пациентов с сердечными аритмиями или с риском их возникновения⁸. Посредством использования ресурсов популяционных и нозологических биобанков расширяются базы знаний о специфических патогенных вариантах саркомерных генов, а также генах, кодирующих структурные белки, белки цитоскелета, ионные каналы, белки цикла кальция, ядерные белки или транскрипционные факторы и даже митохондриальные гены.

Образцы миокарда ЛЖ донорских сердец и пациентов с СН были использованы в протеомных и метаболомных исследованиях. Li M, et al. (2020) обнаружили новые механизмы молекулярных изменений при СН, включая ремоделирование внеклеточного матрикса, воспалительную сигнализацию, окислительный стресс, митохондриальную дисфункцию и метаболизм аминокислот с разветвленной цепью [26]. Sim CB, et al. (2021) провели секвенирование РНК образцов апикальной области ЛЖ, полученных от донорских сердец без клинических признаков ССЗ, что позволило идентифицировать рецептор прогестерона как ключевой медиатор транскрипционного программирования во время созревания кардиомиоцитов у представителей обоих полов [27].

Популяционные биобанки идеально подходят для определения референтных значений биомаркеров. Определение их статистического распределения в общей популяции или у здоровых людей является важным шагом при оценке нового биомар-

кера и предпосылкой для оценки его способности выявлять определенную патологию [6].

Как известно, высокие концентрации липопротеина (а) (Лп(а)) предсказывают возникновение атеросклеротических ССЗ среди взрослого населения среднего возраста в контексте как первичной, так и вторичной профилактики, с линейным градиентом риска по всему распределению. Patel AP, et al. (2019) изучили Лп(а) у 460506 участников UK Biobank среднего возраста. Была дана количественная оценка риска возникновения атеросклеротических ССЗ по всему спектру наблюдаемых концентраций Лп(а) [28].

Shelbaya K, et al. (2024) были обнаружены новые биомаркеры, имеющие причинно-следственную связь с аортальным стенозом (АС). Используя серийную высокопроизводительную протеомику, мультимодальную кардиальную визуализацию и активное наблюдение за событиями в тщательно фенотипированном проспективном когортном исследовании ARIC (Atherosclerosis Risk In Communities) было показано, что матриксная металлопротеиназа 12 является потенциальным новым циркулирующим биомаркером риска АС, а белок C1QTNF1 (complement C1q tumor necrosis factor-related protein 1) — новой предполагаемой целью для предотвращения прогрессирования АС [29].

В исследовании NATURE-PARADOX (Naturally Randomized Trial of Titrating Cumulative Exposure to LDL to Solve the Prevention Paradox) использовались генетические данные из реестра UK Biobank для создания биомаркера кумулятивного воздействия уровня холестерина липопротеинов низкой плотности и оценки его связи с основными сердечно-сосудистыми событиями [30].

Создание крупномасштабных глубоко фенотипированных биобанков, каталогизирующих различные состояния и подтипы заболеваний, позволяет получить глубокие знания об этиологии заболеваний, одновременно определяя новые целевые кандидаты лекарств [31]. Наиболее известный случай в области открытия защитных вариантов касается PCSK9 (proprotein convertase subtilisin/kexin type 9 пропротеиновая конвертаза субтилизин/кексин типа 9) и гиперхолестеринемии. Первоначально миссенс-варианты в гене PCSK9 были связаны с аутосомно-доминантной гиперхолестеринемией. После тестирования вариантов PCSK9 с потерей функции, сначала на мышах, затем с помощью генетического эпидемиологического подхода на людях было продемонстрировано, что у людей с естественным "нокаутом" PCSK9 наблюдались значительно более низкие уровни холестерина липопротеинов низкой плотности. Эти исследования привели к разработке препаратов эволокумаб и алирокумаб [31].

С использованием ресурсов биобанков проводится изучение предикторов развития неблаго-

⁸ <https://clinicaltrials.gov/study/NCT04776642>.

приятных сердечно-сосудистых событий. В исследовании Hirata M, et al. (2017) приняли участие 141612 участников Японского БиоБанка. Анализ причин смерти показал, что ССЗ стали причиной смерти у 27,6% пациентов с сердечно-сосудистой патологией [32]. Проведение эпидемиологических исследований с привлечением биобанков позволяет оценить уровень распространенности ССЗ и их факторов риска (ФР), а также прогнозировать их развитие на популяционном уровне.

3. Поиск и изучение полигенных шкал риска развития ССЗ

С использованием ресурсов биобанков, включающих как геномные данные, так и электронные медицинские записи, было обнаружено множество ассоциаций между генетическими вариантами и интересующими фенотипами.

Полигенный риск заболевания представляет собой совокупный вклад многочисленных распространенных генетических вариантов (частота минорного аллеля $>0,01$), индивидуально дающих небольшие или умеренные эффекты [33].

Потенциальным применением ПШР является стратификация медикаментозного лечения. Данные исследований FOURIER (Further Cardiovascular Outcomes Research With PCSK9 Inhibition in Subjects With Elevated Risk) и ODYSSEY OUTCOMES (Evaluation of Cardiovascular Outcomes After an Acute Coronary Syndrome During Treatment With Alirocumab) показали, что общегеномная ПШР из ~6,6 млн вариантов не обеспечивает лучших показателей в прогнозировании пользы лечения от терапии ингибитором PCSK9, по сравнению с ограниченной ПШР [34]. В результате анализа 4-х исследований статинов — JUPITER (Justification for the Use of Statins in Primary prevention: an Intervention Trial Evaluating Rosuvastatin), ASCOT (Anglo-Scandinavian Cardiac Outcomes Trial), CARE (Cholesterol And Recurrent Events) и PROVE-IT-TIMI22 (PRavastatin Or AtorVastatin Evaluation and Infection Therapy-Thrombolysis in Myocardial Infarction 22), пациенты с высоким бременем генетического риска получили наибольшую относительную и абсолютную клиническую пользу от терапии статинами [35]. В клиническом исследовании Damask A, et al. (2020) обследовали 11953 пациента, ранее госпитализированных с инфарктом миокарда или нестабильной стенокардией, и пришли к выводу, что пациенты с высоким генетическим риском могут получить больше пользы от лечения алирокумабом, чем пациенты с низким генетическим риском [36]. Исследование с участием 14298 пациентов с атеросклеротическими ССЗ дало идентичные результаты для другого ингибитора PCSK9 — эволокумаба [37].

Marston NA, et al. (2023) в своей работе обнаружили, что 6,7 млн однонуклеотидных полиморфизмов ПШР ФП обеспечивают сильный, не-

зависимый прогноз риска для инцидентной ФП у пациентов с установленными ССЗ, который сильнее многих установленных клинических ФР. Добавление ПШР ФП к клиническим оценкам риска и биомаркерам обеспечивало значительное улучшение прогнозирования риска ФП, а сочетание клинического риска, ПШР и уровня NT-proBNP (N-концевого промозгового натрийуретического пептида) может быть оптимальным подходом к оценке риска развития ФП [38].

Используя метааналитический подход и результаты GWAS для ИБС и связанных с ИБС признаков у жителей Восточной Азии, в обучающей выборке из 2800 пациентов с ИБС и 2055 контрольных лиц, была разработана ПШР, включающая 540 генетических вариантов [39]. Было установлено, что ПШР позволяет стратифицировать людей по различным категориям риска ИБС и дополнительно уточнять стратификацию риска, демонстрируя большой потенциал по выявлению лиц с высоким риском для целевого вмешательства [39].

У 200 тыс. человек европейского происхождения выявлено шесть локусов, гены которых положительно регулируют артериальное давление. Генетическая оценка риска, основанная на 29 значимых для всего генома вариантах, была связана с артериальной гипертонией, толщиной стенки ЛЖ, инсультом и ИБС, но не с заболеваниями почек [40].

Pirruccello JP, et al. (2020) в ходе исследования с участием 36041 доноров UK Biobank и 2184 пациентов из исследования MESA (Multi-Ethnic Study of Atherosclerosis) идентифицировали 45 генетических локусов, связанных со структурой и функцией сердца, многие из которых являются общепризнанными генами для менделевских кардиомиопатий. Установлено, что полигенная оценка конечного систолического объема ЛЖ тесно связана с ДКМП в общей популяции [41].

С целью разработки алгоритма прогнозирования абсолютного 10-летнего риска атеросклеротических ССЗ были задействованы данные 464547 участников UK Biobank с полным набором из 203 консолидированных ФР, связанных с атеросклерозом и его последствиями. Используя 25 наиболее значимых ФР, определенных с помощью выбора признаков, предложена сокращенная модель с удовлетворительными характеристиками [42].

4. Клинические исследования

Анализ регистра клинических испытаний выявил еще одну важную сферу применения биобанков — клинические исследования (КИ), в рамках которых биобанки являются ключевым ресурсом образцов крови и ткани, клинических, социально-демографических, лабораторных и инструментальных данных. Из 102 КИ, отобранных для анализа, 15 исследований предполагают воспользоваться

Таблица 3

Проекты клинических исследований по созданию биобанков (биоколлекций), ориентированных на ССЗ (>5 тыс. участников; данные ресурса ClinicalTrials.gov)

Идентификационный номер	Название	Цель	Количество участников	Характеристики исследования	Патология
NCT 05930899	Translational-Omics in Aortic Stenosis (TOmAS) Biobank, Канада	Сохранение биоматериала и клинических данных, собранных у пациентов с ССЗ, а также у участников контрольной группы с целью проведения будущих исследований по оценке новых протеомных, транскриптомных и эпигеномных маркеров ССЗ	10000	случай-контроль проспективное	различные ССЗ
NCT 02804269	Molecular and Imaging Studies of Cardiovascular Health and Disease (Biobank), Сингапур	Сбор биологических образцов, информации о состоянии здоровья и данных визуализации для изучения ССЗ	5000	когортное ретроспективное	различные ССЗ
NCT 04212455	A Cohort Study on Biomarkers of Hypertension in Guangdong Province (GDP Study), Китай	Изучить связь между биомаркерами и неблагоприятными исходами у пациентов с АГ	50000	когортное проспективное	АГ
NCT 02306200	Cardiovascular Health Improvement Project (CHIP), США	Создание биобанка клинической информации, образцов ДНК, плазмы и тканей аорты пациентов с ССЗ, а также здоровых людей	9999	случай-контроль проспективное	различные ССЗ, патология аорты
NCT 04974775	Swecrit Biobank — Blood Samples from Critically Ill Patients and Healthy Controls (SWECRIT), Швеция	Создать биобанк образцов для последующего анализа циркулирующих веществ в периферической крови и генетических вариаций с целью оценки тяжести заболевания, оценки неврологического прогноза, его динамики у тяжелобольных пациентов	8500	когортное	остановка сердца, сепсис, грипп, травма
NCT 06435585	Responders and Non-responders in the Management of Heart Failure — Significance of Genetic Influence and Identification of Novel Informative Biomarkers (Responders), Швеция	Создать высококачественный биобанк, состоящий из плазмы крови, цельной крови и мочи, для проведения генетического, протеомного и метаболомного анализов, а также анализа различных биомаркеров, представляющих интерес для пациентов с СН	5000	когортное проспективное	СН
NCT 01204645	Karolinska Cardiorenal Theme-centre and StockholmHeartbank, Швеция	Создать биобанк (крови, ДНК, плазмы) пациентов с ОКС для фундаментальных и клинических исследований	10000	когортное проспективное	ОКС, после коронарографии
NCT 04654650	Prospective Registry and Biobank for Long-term Observational Studies in Adult Patients With Pulmonary Hypertension, Германия	Проспективный регистр, включающий пациентов с диагнозом легочной гипертензии	5000	когортное проспективное	легочная гипертензия
NCT 04615065	Acutelines: a Large Biobank Aiming to Improve Early Recognition of Acute Diseases, Contribute to the Development of Personalized Medicine and Optimize Short- and Long-term Outcome, Нидерланды	Содействовать междисциплинарным исследованиям этиологии и развития острых заболеваний с помощью систематически собираемых биоматериалов и медицинских данных в различные временные точки, как в течение болезни пациента, так и после выздоровления	35000	когортное проспективное	шок, тромбозы, анафилаксия, сепсис и другие неотложные состояния
NCT 03228459	The ILERVAS Project: Assessing the Prevalence of Subclinical Vascular Disease and Hidden Kidney Disease (ILERVAS), Испания	Выявить неизвестные факторы, обуславливающие наличие и прогрессирование атеросклероза, метаболического синдрома, преддиабета и скрытых заболеваний почек, а также оценить влияние артериального ультразвука на сердечно-сосудистые события и смертность в популяции с низким/умеренным сердечно-сосудистым риском	16660	когортное проспективное	факторы риска ССЗ

Таблица 3. Продолжение

Идентификационный номер	Название	Цель	Количество участников	Характеристики исследования	Патология
NCT 04650529	Gyeongsang National University Hospital Registry (GNUH), Республика Корея	Изучение долгосрочных клинических результатов и предикторов неблагоприятных исходов после ЧКВ	10000	когортное проспективное	ЧКВ при ИБС

Примечание: АГ — артериальная гипертензия, ДНК — дезоксирибонуклеиновая кислота, ИБС — ишемическая болезнь сердца, ОКС — острый коронарный синдром, ССЗ — сердечно-сосудистые заболевания, СН — сердечная недостаточность, ЧКВ — чрескожное коронарное вмешательство.

ресурсами существующих биобанков, 20 проектов планируют создание собственного биобанка или биоколлекций, и оставшиеся 67 — будут проводить КИ и создавать собственный биобанк. В таблице 3 представлены основные характеристики и цели КИ по созданию биобанков (биоколлекций), ориентированных на ССЗ, с количеством участников >5 тыс.

Объединенные усилия двух биобанков в исследовании UNICORN (United CORoNary Biobanks) (n=2000), направлены на проверку гипотезы о наличии различий в ФР, клинических проявлениях ИБС и биохимических закономерностях среди этнических групп. Для этого собирается кровь и клинические характеристики пациентов различных этнических групп (европеоиды, китайцы, индийцы и малайцы), которые наблюдаются в течение 5 лет после проведенной коронарной катетеризации на предмет возникновения серьезных сердечно-сосудистых событий.

В рамках проекта Mayo Clinic AVC Registry and Biobank (n=1000) выявляют новые или измененные генетические варианты, которые вызывают аритмогенную желудочковую кардиомиопатию, и определяют биомаркеры, которые прогнозируют начало и прогрессирование заболевания. Для изучения патогенеза и риска разрыва АБА, а также для установления связи между прогрессированием АБА и сывороточной экспрессией протеаз и цитокинов в рамках исследования PARIS (Predicting Aneurysm Growth and Rupture With Longitudinal Biomarkers) (n=790) проспективно собираются образцы крови, ткани аорты, клинические характеристики пациентов и данные визуализации.

Для поиска генов и изучения биологических путей, вызывающих синдромы аритмии и другие заболевания в КИ "Biospecimen Repository for Cardiac Arrhythmias at the Cleveland Clinic" (n=2000) в биорепозиторий собирают комплекс фенотипических данных и образцы крови и/или тканей субъектов без аритмий и пациентов, перенесших кардиохирургические операции или обследования по поводу аритмий.

Когортное КИ INTERCATH (A Diseased Cohort Based Epidemiologic, Prospective, Single Center Cohort Study for Novel Research in Cardiovascular Risk Prediction Using a Sophisticated Biobank) (n=5000)

с использованием ресурсов биобанков направлено на обнаружение генетических вариантов, биомаркеров и клинических сердечно-сосудистых ФР, которые связаны с конкретными фенотипами ИБС (и ассоциированных с ними коронарных патологий). Результаты данного исследования, как ожидается, позволят улучшить индивидуальную стратификацию риска, будут способствовать изучению патогенеза заболевания и поиску потенциальных терапевтических целей.

Проблемы биобанкирования в научных исследованиях

Несмотря на широкие перспективы и значительные достижения биобанков в исследованиях ССЗ, существует ряд проблем, с которыми сталкивается отрасль биобанкирования. Барьерами для научных исследований, использующих ресурсы биобанков, выступают разнообразие образцов, отсутствие единых стандартов их сбора и хранения, интеграции и анализа информации, налаженных и разносторонних связей в области обмена данными.

Различия в качестве биообразцов между биоресурсными коллекциями или центрами особенно проблематичны при геномном, протеомном и метаболомном анализе, учитывая их чрезвычайную чувствительность. Некоторые биоактивные молекулы из-за специфических свойств, таких как нестабильность, очень низкая концентрация, неспецифическая адгезия к материалам, используемым для аналитического процесса, осложняют отбор проб, биобанкирование и биоконсервацию и, следовательно, затрудняют адекватный качественный и количественный анализ. Решением для сбора образцов высокого качества является стандартная операционная процедура [43].

Клинические данные, полученные из медицинских записей и ЭИБ, должны быть точными, полными и стандартизированными по всем коллекциям биообразцов, чтобы облегчить исследования, связывающие молекулярные профили с моделями прогрессирования и исхода заболевания [44].

В эпоху больших данных к основным этическим проблемам относятся вопросы, касающиеся информированного согласия, конфиденциальности и защиты данных. Согласно международным соглашениям и принципам по этике исследова-

ний, информированное согласие должно гарантировать добровольное участие и освещать вопросы приватности [45, 46]. С юридической точки зрения соблюдение соответствующих правил защиты данных и биоэтических стандартов необходимо для обеспечения соответствия деятельности биобанков международным и национальным правовым требованиям [4].

Таким образом, усилия по координации, гармонизации и последовательной стандартизации информации о сборе, доступе и исследовательской деятельности в области биологических ресурсов и данных о людях позволят биобанку интегрироваться в мировую сеть биобанкирования и научных исследований.

Заключение

Обширные коллекции высококачественных биологических образцов в сочетании с клиническими, социально-демографическими, лаборатор-

ными и инструментальными данными позволяют проводить широкомасштабные исследования для изучения патогенетических механизмов возникновения и развития ССЗ. Биобанки являются востребованным и необходимым ресурсом для рандомизированных КИ, наблюдательных исследований с большими данными, популяционных исследований для изучения ШПР ССЗ, выявления новых генетических факторов и биомаркеров различных физиологических и патофизиологических состояний, а также для идентификации терапевтических и диагностических мишеней, совершенствования методов диагностики, профилактики и содействия разработке эффективных персонализированных подходов к лечению, основанных на генетической и мультимедийной информации каждого пациента.

Отношения и деятельность. Работа выполнена в рамках темы ФНИ 122020300043-1 НИИ кардиологии Томского НИМЦ.

Литература/References

- Boytsov SA, Pogosova N, Ansheles AA, et al. Cardiovascular prevention 2022. Russian national guidelines. Russ J Cardiol. 2023;28(5):5452. (In Russ.) Бойцов С.А., Погосова Н.В., Аншелес А.А. и др. Кардиоваскулярная профилактика 2022. Российские национальные рекомендации. Российский кардиологический журнал. 2023;28(5):5452. doi:10.15829/1560-4071-2023-5452.
- Townsend N, Kazakiewicz D, Lucy Wright F, et al. Epidemiology of cardiovascular disease in Europe. Nat Rev Cardiol. 2022;19(2):133-43. doi:10.1038/s41569-021-00607-3.
- Gaidai O, Cao Y, Loginov S. Global Cardiovascular Diseases Death Rate Prediction. Curr Probl Cardiol. 2023;48(5):101622. doi:10.1016/j.cpcardiol.2023.101622.
- Xu W, Liang X, Chen L, et al. Biobanks in chronic disease management: a comprehensive review of strategies, challenges, and future directions. Heliyon. 2024;10(11):e32063. doi:10.1016/j.heliyon.2024.e32063.
- Coppola L, Cianflone A, Grimaldi AM, et al. Biobanking in health care: evolution and future directions. J Transl Med. 2019;17(1):172. doi:10.1186/s12967-019-1922-3.
- Lieb W, Strathmann EA, Röder C, et al. Population-based biobanking. Genes (Basel). 2024;15(1):66. doi:10.3390/genes15010066.
- Kopylova OV, Ershova AI, Borisova AL, et al. Specifics of creating clinical abstract of biospecimens. Cardiovascular Therapy and Prevention. 2023;22(11):3855. (In Russ.) Копылова О.В., Ершова А.И., Борисова А.Л. и др. Особенности формирования клинической аннотации биообразцов. Кардиоваскулярная терапия и профилактика. 2023;22(11):3855. doi:10.15829/1728-8800-2023-3855.
- Zhu Y, Jackson D, Hunter B, et al. Models of cardiovascular surgery biobanking to facilitate translational research and precision medicine. ESC Heart Fail. 2022;9(1):21-30. doi:10.1002/ehf2.13768.
- Pickardt T, Niggemeyer E, Bauer UM, et al. Competence network for congenital heart defects investigators. A biobank for long-term and sustainable research in the field of congenital heart disease in Germany. Genom Proteom Bioinform. 2016;14(4):181-90. doi:10.1016/j.gpb.2016.03.003.
- Scholtes VP, de Vries JP, Catanzariti LM, et al. Biobanking in atherosclerotic disease: opportunities and pitfalls. Curr Cardiol Rev. 2011;7(1):9-14. doi:10.2174/157340311795677707.
- Abul-Husn NS, Kenny EE. Personalized medicine and the power of electronic health records. Cell. 2019;177(1):58-69. doi:10.1016/j.cell.2019.02.039.
- Small AM, O'Donnell CJ, Damrauer SM. Large-scale genomic biobanks and cardiovascular disease. Curr Cardiol Rep. 2018;20(22). doi:10.1007/s11886-018-0969-8.
- Koch S, Schmidtke J, Krawczak M, et al. Clinical utility of polygenic risk scores: a critical 2023 appraisal. J Community Genet. 2023;14:471-87. doi:10.1007/s12687-023-00645-z.
- Nielsen JB, Thorolfsson RB, Fritsche LG, et al. Biobank-driven genomic discovery yields new insight into atrial fibrillation biology. Nat Genet. 2018;50(9):1234-9. doi:10.1038/s41588-018-0171-3.
- van Koeveerden ID, Vrijenhoek JE, de Borst GJ, et al. Biobanking in carotid artery disease: translation to clinical practice. J Cardiovasc Surg (Torino). 2017;58(2):178-86. doi:10.23736/S0021-9509.17.09859-7.
- Shah S, Henry A, Roselli C, et al. Genome-wide association and Mendelian randomisation analysis provide insights into the pathogenesis of heart failure. Nat Commun. 2020;11:163. doi:10.1038/s41467-019-13690-5.
- Levin MG, Tsao NL, Singhal P, et al. Genome-wide association and multi-trait analyses characterize the common genetic architecture of heart failure. Nat Commun. 2022;13(1):6914. doi:10.1038/s41467-022-34216-6.
- Joseph J, Liu C, Hui Q, et al. Genetic architecture of heart failure with preserved versus reduced ejection fraction. Nat Commun. 2022;13(1):7753. doi:10.1038/s41467-022-35323-0.
- Tadros R, Zheng SL, Grace C, et al. Large-scale genome-wide association analyses identify novel genetic loci and mechanisms in hypertrophic cardiomyopathy. medRxiv. 2023. doi:10.1101/2023.01.28.23285147.
- Tucholski T, Cai W, Gregorich ZR, et al. Distinct hypertrophic cardiomyopathy genotypes result in convergent sarcomeric proteoform profiles revealed by top-down proteomics. Proc Natl Acad Sci USA. 2020;117(40):24691-700. doi:10.1073/pnas.2006764117.

21. Zheng S, Henry A, Cannie D, et al. Genome-wide association analysis reveals insights into the molecular aetiology underlying dilated cardiomyopathy. *medRxiv*. 2023. doi:10.1101/2023.09.28.23295408.
22. Chou E, Pirruccello JP, Ellinor PT, et al. Genetics and mechanisms of thoracic aortic disease. *Nat Rev Cardiol*. 2023;20:168-80. doi:10.1038/s41569-022-00763-0.
23. Klarin D, Verma SS, Judy R, et al. Genetic architecture of abdominal aortic aneurysm in the million veteran program. *Circulation*. 2020;142:1633-46. doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.120.047544.
24. Doran S, Arif M, Lam S, et al. Multi-omics approaches for revealing the complexity of cardiovascular disease. *Brief Bioinform*. 2021;22:bbab061. doi:10.1093/bib/bbab061.
25. Zhao Q, Liu R, Chen H, et al. Transcriptome-wide association study reveals novel susceptibility genes for coronary atherosclerosis. *Front Cardiovasc Med*. 2023;10:1149113. doi:10.3389/fcvm.2023.1149113.
26. Li M, Parker BL, Pearson E, et al. Core functional nodes and sex-specific pathways in human ischaemic and dilated cardiomyopathy. *Nat Commun*. 2020;11:2843. doi:10.1038/s41467-020-16584-z.
27. Sim CB, Phipson B, Ziemann M, et al. Sex-specific control of human heart maturation by the progesterone receptor. *Circulation*. 2021;143:1614-28. doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.120.051921.
28. Patel AP, Wang M, Pirruccello JP, et al. Lp(a) (Lipoprotein[a]) concentrations and incident atherosclerotic cardiovascular disease: new insights from a Large National Biobank. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2021;41(1):465-74. doi:10.1161/ATVBAHA.120.315291.
29. Shelbaya K, Arthur V, Yang Y, et al. Large-scale proteomics identifies novel biomarkers and circulating risk factors for aortic stenosis. *J Am Coll Cardiol*. 2024;83(5):577-91. doi:10.1016/j.jacc.2023.11.021.
30. Gupta K, Hinkamp C, Andrews T, et al. Highlights of cardiovascular disease prevention studies presented at the 2023 European Society of Cardiology Congress. *Curr Atheroscler Rep*. 2023;25:965-78. doi:10.1007/s11883-023-01164-5.
31. Hicks MA, Hou CYC, Iranmehr A, et al. Target discovery using biobanks and human genetics. *Drug Discovery Today*. 2020;25(2):438-45. doi:10.1016/j.drudis.2019.09.014.
32. Hirata M, Nagai A, Kamatani Y, et al. Overview of BioBank Japan follow-up data in 32 diseases. *J Epidemiol*. 2017;27(3S):S22-8. doi:10.1016/j.je.2016.12.006.
33. Klarin D, Natarajan P. Clinical utility of polygenic risk scores for coronary artery disease. *Nat Rev Cardiol*. 2022;19(5):291-301. doi:10.1038/s41569-021-00638-w.
34. Arnold N, Koenig W. Polygenic risk score: clinically useful tool for prediction of cardiovascular disease and benefit from lipid-lowering therapy? *Cardiovasc Drugs Ther*. 2021;35(3):627-35. doi:10.1007/s10557-020-07105-7.
35. Mega JL, Stitzel NO, Smith JG, et al. Genetic risk, coronary heart disease events, and the clinical benefit of statin therapy: an analysis of primary and secondary prevention trials. *Lancet*. 2015;385(9984):2264-71. doi:10.1016/S0140-6736(14)61730-X.
36. Damask A, Steg PG, Schwartz GG, et al. Patients with high genome-wide polygenic risk scores for coronary artery disease may receive greater clinical benefit from alirocumab treatment in the ODYSSEY OUTCOMES trial. *Circulation*. 2021;141:624-36. doi:10.1161/Circulationaha.119.044434.
37. Marston NA, Kamanu FK, Nordio F, et al. Predicting benefit from evolocumab therapy in patients with atherosclerotic disease using a genetic risk score results from the FOURIER trial. *Circulation*. 2021;141:616-23. doi:10.1161/Circulationaha.119.043805.
38. Marston NA, Garfinkel AC, Kamanu FK, et al. A polygenic risk score predicts atrial fibrillation in cardiovascular disease. *Eur Heart J*. 2023;44(3):221-31. doi:10.1093/eurheartj/ehac460.
39. Lu X, Liu Z, Cui Q, et al. A polygenic risk score improves risk stratification of coronary artery disease: a large-scale prospective Chinese cohort study. *Eur Heart J*. 2022;43(18):1702-11. doi:10.1093/eurheartj/ehac093.
40. Ehret GB, Munroe PB, Rice KM, et al. Genetic variants in novel pathways influence blood pressure and cardiovascular disease risk. *Nature*. 2011;478(7367):103-9. doi:10.1038/nature10405.
41. Pirruccello JP, Bick A, Wang M, et al. Analysis of cardiac magnetic resonance imaging in 36,000 individuals yields genetic insights into dilated cardiomyopathy. *Nat Commun*. 2020;11:2254. doi:10.1038/s41467-020-15823-7.
42. Kesar A, Baluch A, Barber O, et al. Actionable absolute risk prediction of atherosclerotic cardiovascular disease based on the UK Biobank. *PLoS ONE*. 2022;17(2):e0263940. doi:10.1371/journal.pone.0263940.
43. Gerner C, Costigliola V, Golubnitschaja O. Multiomic patterns in body fluids: technological challenge with a great potential to implement the advanced paradigm of 3p medicine. *Mass Spectrom Rev*. 2020;39(5-6):442-51. doi:10.1002/mas.21612.
44. Dagher G. Quality matters: International standards for biobanking. *Cell Prolif*. 2022;55(8):e13282. doi:10.1111/cpr.13282.
45. Pokrovskaya MS, Borisova AL, Metelskaya VA, et al. Role of biobanking in managing large-scale epidemiological studies. *Cardiovascular Therapy and Prevention*. 2021;20(5):2958. (In Russ.) Покровская М.С., Борисова А.Л., Метельская В.А. и др. Роль биобанкирования в организации крупномасштабных эпидемиологических исследований. *Кардиоваскулярная терапия и профилактика*. 2021;20(5):2958. doi:10.15829/1728-8800-2021-2958.
46. Tzortzatou-Nanopoulou O, Akyüz K, Goisauf M, et al. Ethical, legal, and social implications in research biobanking: A checklist for navigating complexity. *Dev World Bioeth*. 2023;1-12. doi:10.1111/dewb.12411.

Факторы преаналитического этапа, влияющие на уровни циркулирующих микроРНК плазмы и сыворотки крови

Сотникова Е. А., Киселева А. В., Мешков А. Н.

ФГБУ "Национальный медицинский исследовательский центр терапии и профилактической медицины" Минздрава России.
Москва, Россия

Циркулирующие микроРНК являются перспективными биомаркерами различных заболеваний, однако их использование в клинических лабораторных условиях требует высокочувствительных, воспроизводимых, надежных и устойчивых методов, позволяющих проводить их точную количественную оценку в плазме и сыворотке крови. Преаналитическая фаза исследований, проводимых с использованием биобразцов, состоит из их сбора, обработки, хранения и транспортировки. Преаналитические условия остаются основными искажающими факторами в исследованиях микроРНК, а стандартизация этих условий, осуществляемая в биобанках, может оказать положительное влияние на воспроизводимость результатов исследований и возможность их сравнения. Целью обзора является рассмотрение основных современных оригинальных исследований, посвященных изучению преаналитических факторов, которые являются важным источником различий в исследованиях, посвященных циркулирующим микроРНК, на этапах от взятия крови до получения плазмы или сыворотки.

Ключевые слова: микроРНК, преаналитические факторы, плазма, сыворотка, центрифугирование, антикоагулянты, хранение крови.

Отношения и деятельность: нет.

Поступила 04/09-2024

Рецензия получена 12/09-2024

Принята к публикации 18/10-2024



Для цитирования: Сотникова Е. А., Киселева А. В., Мешков А. Н. Факторы преаналитического этапа, влияющие на уровни циркулирующих микроРНК плазмы и сыворотки крови. *Кардиоваскулярная терапия и профилактика*. 2024;23(11):4179. doi: 10.15829/1728-8800-2024-4179. EDN SQPPKZ



Preanalytical factors affecting the plasma and serum levels of circulating microRNAs

Sotnikova E. A., Kiseleva A. V., Meshkov A. N.

National Medical Research Center for Therapy and Preventive Medicine. Moscow, Russia

Circulating microribonucleic acids (microRNAs) are promising biomarkers of various diseases, but their clinical laboratory use requires highly sensitive, reproducible, reliable and sustainable methods for their accurate plasma and serum quantification. The preanalytical phase of studies conducted using biospecimens consists of their collection, processing, storage and transportation. Preanalytical conditions remain the main distorting factors in microRNA studies, and standardization of these conditions, carried out in biobanks, can improve the reproducibility of results and their comparison. The review aim is to consider the main contemporary original studies on preanalytical factors, which are an important source of variability in studies on circulating microRNAs at the stages from blood collection to plasma or serum production.

Keywords: microRNA, preanalytical factors, plasma, serum, centrifugation, anticoagulants, blood storage.

Relationships and Activities: none.

Sotnikova E. A.* ORCID: 0000-0002-8395-4146, Kiseleva A. V. ORCID: 0000-0003-4765-8021, Meshkov A. N. ORCID: 0000-0001-5989-6233.

*Corresponding author: sotnikova.evgeniya@gmail.com

Received: 04/09-2024

Revision Received: 12/09-2024

Accepted: 18/10-2024

For citation: Sotnikova E. A., Kiseleva A. V., Meshkov A. N. Preanalytical factors affecting the plasma and serum levels of circulating microRNAs. *Cardiovascular Therapy and Prevention*. 2024;23(11):4179. doi: 10.15829/1728-8800-2024-4179. EDN SQPPKZ

кПЦР — количественная полимеразная цепная реакция в режиме реального времени с обратной транскрипцией, КТ — комнатная температура, ПЦР — полимеразная цепная реакция, РНК — рибонуклеиновая кислота, ЭДТА — этилендиаминтетрауксусная кислота, АСД-В — citric acid, trisodium citrate, dextrose (лимонная кислота, тринатрийцитрат, декстроза), СТАД — citrate-theophylline-adenosine-dipyridamole (цитрат натрия, теофиллин, аденозин и дипиридамон), PPP — platelet-poor plasma (бедная тромбоцитами плазма), PRP — platelet-rich plasma (богатая тромбоцитами плазма), PMV — platelet-derived microvesicles (микровезикулы тромбоцитов).

*Автор, ответственный за переписку (Corresponding author):

e-mail: sotnikova.evgeniya@gmail.com

[Сотникова Е. А.* — с.н.с. лаборатории молекулярной генетики Института персонализированной терапии и профилактики, ORCID: 0000-0002-8395-4146, Киселева А. В. — к.б.н., в.н.с., руководитель лаборатории молекулярной генетики Института персонализированной терапии и профилактики, ORCID: 0000-0003-4765-8021, Мешков А. Н. — д.м.н., руководитель Института персонализированной терапии и профилактики, ORCID: 0000-0001-5989-6233].

Ключевые моменты**Что известно о предмете исследования?**

- Внеклеточные микроРНК присутствуют в плазме и сыворотке крови и потенциально могут быть использованы в качестве биомаркеров различных заболеваний.
- Преаналитическая фаза исследований, включающая сбор, обработку, хранение и транспортировку биообразцов, может играть важную роль в надежности и воспроизводимости количественной оценки циркулирующих микроРНК.

Что добавляют результаты исследования?

- Отсутствие стандартизации протоколов обработки образцов для анализа циркулирующих микроРНК плазмы и сыворотки крови ключевым образом влияет на воспроизводимость результатов исследований.
- Экспериментальные данные противоречивы и не позволяют установить оптимальные условия для всех этапов пробоподготовки.

Key messages**What is already known about the subject?**

- Cell-free microRNAs are present in plasma and serum and can potentially be used as biomarkers of various diseases.
- The preanalytical phase of studies, including collection, processing, storage and transportation of biospecimens, can play an important role in the reliability and reproducibility of circulating microRNA quantification.

What might this study add?

- No standardization of sample processing protocols for the analysis of circulating microRNAs in plasma and serum has a key impact on the reproducibility of study results.
- Experimental data are contradictory and do not make it possible to establish optimal conditions for all sample preparation stages.

Введение

Микрорибонуклеиновые кислоты (микроРНК) — это короткие, одноцепочечные, некодирующие РНК длиной 18–25 нуклеотидов, которые функционируют как посттранскрипционные регуляторы экспрессии генов [1, 2]. Внеклеточные микроРНК присутствуют в биологических жидкостях организма, в т.ч. в плазме и сыворотке крови [3]. В кровотоке внеклеточные микроРНК защищены от деградации, поскольку они включены в микровезикулы или экзосомы, связаны с липопротеинами высокой плотности или комплексом AGO2 (семейство белков Argonaute) [4, 5].

Относительно высокая стабильность микроРНК в биологических жидкостях (например, плазме, сыворотке, моче, слюне), малоинвазивность процедуры взятия крови, быстрое высвобождение из межклеточной жидкости в кровяной ток при развитии патологии, а также возможность классифицировать особенности течения заболевания, его стадию, степень тяжести и другие клинические особенности с помощью профилей экспрессии микроРНК, обусловили повышенный интерес к оценке целесообразности их применения в качестве малоинвазивных биомаркеров для диагностики широкого спектра заболеваний [6–8]. Однако использование циркулирующих микроРНК в качестве биомаркеров в клинической практике требует высокочувствительных, воспроизводимых, надежных и устойчивых методов, позволяющих проводить их точную количественную оценку в плазме и сыворотке крови [8, 9].

Преаналитические условия остаются основными искажающими факторами в исследованиях ми-

кроРНК [10]. Преаналитическая фаза исследований, проводимых с использованием биообразцов, включает их сбор, обработку, хранение и транспортировку. Все этапы могут существенно влиять на биологическую и химическую сохранность образцов и играют важную роль в надежности и воспроизводимости количественной оценки циркулирующих микроРНК [6, 10]. Однако в настоящее время консенсус по методологическим параметрам, используемым при исследовании уровней экспрессии циркулирующих микроРНК, отсутствует [8].

В обзоре Van Der Schueren C, et al. (2024) была проанализирована частота упоминания преаналитических переменных в исследованиях РНК плазмы и было выявлено, что из 22 преаналитических переменных, входящих в три влияющие на анализ категории (забор крови, приготовление плазмы и выделение РНК), только три были указаны достаточно информативно более чем в половине работ (200 исследованиях 2018г и 2023г): проводилась ли очистка РНК, метод очистки и использованная фракция плазмы [11]. Процент представленных переменных варьировался от 4,6 до 54,6% (среднее значение 24,84%) в 2023г и от 4,6 до 57,1% (среднее значение 28,60%) в 2018г, что свидетельствует о недостаточности информации о преаналитических переменных в публикациях результатов исследований внеклеточных РНК [11].

Отсутствие воспроизводимости между исследованиями [9, 12] свидетельствует о том, что для получения достоверных результатов необходимо следовать рекомендациям по повышению стабильности и воспроизводимости количественного определения

Таблица 1

Исследования, включенные в анализ

Источник	Выборка, человек	Биоматериал	Метод	Исследуемые преаналитические факторы	Количество микроРНК	Анализируемые эндогенные микроРНК
Kirschner MB, et al. (2011) [19]	37	Плазма	кПЦР	Гемолиз	2	miR-16, miR-451
McDonald JS, et al. (2011) [15]	8; 10	Сыворотка	кПЦР	Центрифугирование, гемолиз	3	miR-15b, miR-16, miR-24
Cheng HH, et al. (2013) [20]	3	Сыворотка, плазма	кПЦР	Центрифугирование	11, 365	hsa-let-7a, hsa-miR-16, hsa-miR-92a, hsa-miR-122, hsa-miR-124a, hsa-miR-141, hsa-142-3p, hsa-miR-205, hsa-miR-210, hsa-miR-223, hsa-miR-451; miRNA Ready-to-Use PCR, Human panel I, V1.M
Kirschner MB, et al. (2013) [21]	3; 5	Плазма	кПЦР	Гемолиз	754 7	hsa-miR-15b, hsa-miR-16, hsa-miR-24, hsa-miR-451, hsa-miR-92a, hsa-miR-155, hsa-miR-625; TaqMan Array Human MicroRNA A+B Cards Set v3.0
Page K, et al. (2013) [22]	5	Плазма	кПЦР	Центрифугирование, хранение крови	384; 8	hsa-miR-191, hsa-miR-21, hsa-miR-15b, hsa-miR-15b, hsa-miR-16, hsa-miR-16, hsa-miR-24, hsa-miR-155, hsa-miR-484; TLDA Pool A v2.0 Cards
Zhao H, et al. (2014) [23]	164	Плазма	кПЦР	Хранение крови	3	miR-16, miR-134, miR-346
Binderup HG, et al. (2016) [12]	10	Плазма	кПЦР	Центрифугирование	14	miR-142-3p, miR-145, miR-16, miR-26a, miR-28, miR-301, miR-30a-5p, miR-30d, miR-328, miR-331, miR-335, miR-340, miR-92a, miR-93
Basso D, et al. (2017) [24]	3	Сыворотка, плазма	Микрочипы	Сбор биообразцов, центрифугирование, хранение крови, транспортировка	2006	Agilent SureprintG3 Human miRNA
Glinge C, et al. (2017) [25]	12	Сыворотка, плазма	кПЦР	Сбор биообразцов, хранение крови, транспортировка	3	miR-1, miR-21, miR-29b
Binderup HG, et al. (2018) [9]	1	Плазма	кПЦР, цифровая капельная ПЦР	Сбор биообразцов, центрифугирование	3	miR-92a, miR-126, miR-16
Muth DC, et al. (2018) [26]	2	Плазма	кПЦР	Центрифугирование	2	miR-16-5p, miR-21-5p
Murray MJ, et al. (2018) [27]	1; 2; 7	Сыворотка, плазма	кПЦР	Сбор биообразцов, центрифугирование, хранение крови	8; 106	hsa-miR-451a, hsa-miR-23a-3p, hsa-miR-30b-5p, hsa-miR-30c-5p, hsa-miR-191-5p, hsa-miR-130b-3p, hsa-miR-146a-5p, hsa-miR-26a-5p; 106 микроРНК, из исследования Page K, et al. (2013) [22] со значениями Ct <35
Ward Gahlawat A, et al. (2019) [28]	6; 8	Плазма	кПЦР	Сбор биообразцов, хранение крови	6	miR-16, miR-451a; miR-148b, miR-652, miR-376c, miR-200c
Faraldi M, et al. (2020) [29]	10	Плазма	кПЦР	Сбор биообразцов, центрифугирование	179	Exiqon miRCURY LNA miRNA focus panel
Mussbacher M, et al. (2020) [30]	6	Плазма	кПЦР	Сбор биообразцов, центрифугирование, гемолиз, хранение крови	12	miR-223-3p, miR-197-3p, miR-150-5p, miR-23a-3p, miR-191-5p, miR-320a, miR-24-3p, miR-21-5p, miR-126-3p, miR-27-3p, miR-28-3p, miR-451a
Kim SH, et al. (2021) [8]	5	Плазма	кПЦР	Гемолиз, хранение крови	179	Exiqon Serum/Plasma Focus miRNA PCR panel
Suzuki K, et al. (2022) [31]	18	Плазма	NGS малых РНК	Сбор биообразцов, хранение крови	тотальная микроРНК	—

Таблица 1. Продолжение

Источник	Выборка, человек	Биоматериал	Метод	Исследуемые преаналитические факторы	Количество микроРНК	Анализируемые эндогенные микроРНК
Zhelankin AV, et al. (2022) [32]	10	Плазма	NGS микроРНК, кПЦР	Сбор биообразцов	тотальная микроРНК; 11	hsa-miR-223-3p, hsa-miR-126-3p, hsa-miR-21-5p, hsa-miR-150-5p, hsa-miR-16-5p, hsa-miR-92a-3p, hsa-miR-451a, hsa-miR-23a-3p, hsa-miR-30e-5p
Chan S-F, et al. (2023) [10]	4; 5; 6; 10	Сыворотка, плазма	кПЦР	Сбор биообразцов, гемолиз, центрифугирование, хранение крови	356; 7	hsa-miR-1973, hsa-miR-28-5p, hsa-miR-20b-5p, hsa-miR-363-3p, hsa-miR-451a, hsa-miR-1290, hsa-miR-10b-5p; MiRXES Lab Pte. Ltd. multiplexed quantitative RT-PCR
Sun J, et al. (2023) [33]	4	Плазма	NGS РНК	Хранение крови	тотальная микроРНК	—
Wakabayashi I, et al. (2024) [34]	5	Сыворотка, плазма	Микрочипы	Хранение крови	2632	TRT-XR520 3D-Gene miRNA Oligo chip

Примечание: микроРНК — микро рибонуклеиновая кислота, ПЦР — полимеразная цепная реакция, кПЦР — количественная полимеразная цепная реакция в режиме реального времени с обратной транскрипцией, NGS — next generation sequencing (секвенирование следующего поколения).

циркулирующей микроРНК [13], учитывать влияние таких параметров, как дизайн исследования и анализ данных [14], преаналитические условия [15] и методика профилирования микроРНК [6, 16, 17], поскольку каждый отдельный шаг в методологической процедуре может потенциально иметь большое влияние на обнаружение микроРНК [18].

Цель обзора — рассмотрение основных современных оригинальных исследований, посвященных изучению преаналитических параметров на этапах от взятия крови до получения плазмы или сыворотки.

Методологические подходы

Поиск литературных источников проводился по заголовкам, аннотациям и ключевым словам в системах индексирования научных публикаций (Google Scholar, PubMed, eLIBRARY) с использованием следующих запросов: "serum+microRNA"/"сыворотка+микроРНК" и "plasma+microRNA"/"плазма+микроРНК" с добавлением дополнительных переменных "preanalytical"/"pre-analytical"/"преаналитический", "storage"/"хранение", "processing"/"обработка", "centrifugation"/"центрифугирование", "anticoagulant"/"антикоагулянт". Глубина поиска составила 15 лет. В обзор были включены только оригинальные методические исследования тотальной циркулирующей микроРНК.

Результаты

Преаналитические факторы. Несмотря на растущее внимание к циркулирующим микроРНК, особенно полученным из плазмы или сыворотки крови, как к перспективным кандидатам на роль биомаркеров для выявления различных патологических состояний, их использование в клинических условиях затруднено. Различные факторы влияют на уровни

микроРНК по отдельности или в сочетании, например, тип антикоагулянта крови, содержание тромбоцитов, степень гемолиза, а также процедурные различия, например, время и условия хранения крови, плазмы и сыворотки, протокол центрифугирования и способ выделения микроРНК [8].

В обзор были включено 21 методологическое исследование, направленное на изучение следующих преаналитических факторов: сбор, обработка, хранение, транспортировка биообразцов (таблица 1). Из всех включенных в обзор исследований, большинство посвящены анализу только плазмы (n=14), в остальных изучали и плазму, и сыворотку.

Среди методов анализа микроРНК в анализируемых работах преобладала количественная полимеразная цепная реакция (ПЦР) в режиме реального времени с обратной транскрипцией (кПЦР) (n=16) или цифровая капельная ПЦР [9], в одной из них помимо кПЦР использовалось секвенирование микроРНК [32]. В остальных применялся анализ с помощью микрочипов (n=2) [24, 34], секвенирование РНК (n=1) [33] и малых РНК (n=1) [31].

Ограничением большинства исследований является небольшой размер выборки. Только в 4 исследованиях размер выборки превышал 20 образцов [9, 19, 23, 31], из них >100 образцов было только в одном [23]. В двух исследованиях все образцы для отдельных экспериментов были получены от одного донора [9, 27].

Многие исследования были не лишены недостатков в описании преаналитических факторов. Например, в одной работе [23] не указан набор для выделения микроРНК и протокол центрифугирования, а в другой не описано, как была выполнена нормализация данных кПЦР [28].

При проведении статистического анализа в области количественной генетики необходимо приме-

Таблица 2

Исследования,
сравнивающие разные антикоагулянты

Источник	Антикоагулянты/пробирки
Basso D, et al. (2017) [24]	K ₂ ЭДТА, цитрат натрия, литий-гепарин, ACD-B
Glinge C, et al. (2017) [25]	ЭДТА, цитрат, литий-гепарин
Mussbacher M, et al. (2020) [30]	ЭДТА, цитрат натрия, CTAD
Suzuki K, et al. (2022) [31]	Na ₂ ЭДТА, K ₂ ЭДТА, цитрат натрия, фторид натрия
Zhelankin AV, et al. (2022) [32]	K ₂ ЭДТА, цитрат натрия, ACD-B, CTAD

Примечание: ЭДТА — этилендиаминтетрауксусная кислота, ACD-B — citric acid, trisodium citrate, dextrose (лимонная кислота, тринатрийцитрат, декстроза), CTAD — citrate-theophylline-adenosine-dipyridamole (цитрат натрия, теofilлин, аденозин и дипиридабол).

нение поправки на множественные сравнения [35], отсутствие которой приводит как к завышению уровня значимости, так и нахождению большого числа ложных ассоциаций. Из 21 рассматриваемой работы поправка на множественные сравнения была упомянута в 7 [8, 20, 29–32, 34].

Сбор биообразцов. В ходе многочисленных исследований было показано, что уровни ряда микроРНК в плазме и сыворотке значимо различаются. Так, сравнительный анализ 985 микроРНК, показал, что уровень 249 микроРНК был значимо выше в сыворотке, а 50 — в плазме [34]. В отсутствие сопоставимых результатов важно использовать один тип образцов последовательно на протяжении всего исследования [1].

В работе Binderup HG, et al. (2018) проводили последовательный забор 30 образцов крови у одного донора с помощью одной венопункции. При сравнении средних уровней микроРНК в первых и последних 10 пробирках, вне зависимости от способа нормализации, статистически значимых различий не выявлено [9].

Chan S-F, et al. (2023) оценили уровень гемоглобина, а также относительный уровень эритроцитарных и тромбоцитарных микроРНК в плазме после центрифугирования, при использовании для забора крови пробирок разного объема (6 и 10 мл) и не выявили значимых различий [10].

Неправильная обработка крови может привести к загрязнению клеточным материалом, в т.ч. в результате гемолиза, активации или присутствия тромбоцитов, и изменениям в профиле микроРНК, которые не связаны с патологическими состояниями [10, 21]. Влияние гемолиза эритроцитов на микроРНК плазмы и сыворотки изучалось в ряде работ [15, 19, 21, 30]. Было показано, что в зависимости от уровня гемолиза в образце вызванные им изменения затрагивают до 65% (88/136) детектированных микроРНК плазмы [21]. Были проведены исследования по изучению связи использованных антикоагулянтов

и пробирок разных производителей [27, 28, 31, 32], а также времени и условий хранения крови [8, 10, 34] с гемолизом.

Большинство исследований по изучению влияния этапа забора крови на циркулирующие микроРНК плазмы касаются используемых антикоагулянтов (таблица 2).

Пробирки, содержащие антикоагулянты на основе этилендиаминтетрауксусной кислоты (ЭДТА) и цитрата натрия, были включены во все сравнительные исследования, направленные на изучение влияния антикоагулянтов. Литий-гепарин [24, 25], ACD-B (citric acid, trisodium citrate, dextrose; лимонная кислота, тринатрийцитрат, декстроза) [24, 32], CTAD (citrate-theophylline-adenosine-dipyridamole; цитрат натрия, теofilлин, аденозин и дипиридабол) [30, 32] были включены в два исследования каждый.

В плазме, полученной с использованием литий-гепарина, исследуемые микроРНК не были детектированы в обеих работах [24, 25]. Glinge C, et al. (2017) не обнаружили значимых различий в уровнях исследуемых микроРНК в плазме, полученной с другими антикоагулянтами [25], а в работе Basso D, et al. (2017) микроРНК, выделенная из плазмы с другими антикоагулянтами, была оценена как высококачественная [24].

Mussbacher M, et al. (2020) обнаружили значимое повышение уровней микроРНК в ЭДТА-плазме и усиление этого эффекта со временем при хранении при комнатной температуре (КТ) [30]. В рекомендациях этого исследования CTAD указан как предпочтительный антикоагулянт [30]. Zhelankin AV, et al. (2022) выявили различия в микроРНК профилях образцов плазмы, полученных с использованием калиевой соли ЭДТА (K₂ЭДТА), и полученных с использованием других включенных в исследование антикоагулянтов, и предположили, что это связано с повышенным уровнем гемолиза в образцах с ЭДТА [32]. Suzuki K, et al. (2022) обнаружили повышенный уровень эритроцитарных микроРНК, в образцах, полученных с использованием цитрата натрия и фторида натрия, и отдают предпочтение ЭДТА в качестве антикоагулянта [31].

Кроме того, в одном из исследований использовали 2 типа пробирок с K₂ЭДТА в качестве антикоагулянта: с разделительным гелем и без него. При немедленной заморозке плазмы на -80°С, количество обнаруженных микроРНК в плазме, собранной в пробирки без разделительного геля, было значительно меньше (96) по сравнению с плазмой в пробирках с разделительным гелем (161) [29].

В двух исследованиях [27, 28] проводилось сравнение использования пробирок для долгосрочного хранения крови, разработанных для предотвращения лизиса клеток и увеличения продолжительности хранения плазмы для анализа микроРНК. Более низкие уровни гемолиза были детектированы в об-

Таблица 3

Хранение крови		
Источник	Биоматериал	Условия хранения
Page K, et al. (2013) [22]	Плазма (ЭДТА)	Хранение крови 2 ч или 6 ч при КТ
Zhao H, et al. (2014) [23]	Плазма (ЭДТА)	Хранение крови 18 ч при КТ (25°С) при сравнении с немедленным получением плазмы
Basso D, et al. (2017) [24]	Сыворотка, плазма (ЭДТА, цитрат натрия, литий-гепарин, ACD-B)	Хранение и транспортировка крови до 9 ч при 2-8°С или КТ
Glinge C, et al. (2017) [25]	Сыворотка, плазма (ЭДТА)	Хранение крови (ЭДТА) до 3 дней (0, 4, 8, 12, 24, 72 ч), 24 ч и 4 дня при КТ; хранение крови (ЭДТА) 1 день и 9 мес. при -80°С; транспортировка крови, плазмы (ЭДТА) и сыворотки
Murray MJ, et al. (2018) [27]	плазма (ЭДТА)	Хранение крови до 14 дней (0, 2, 4, 7, 10, 14 дней) при КТ в пробирках для долгосрочного хранения разных производителей
Ward Gahlawat A, et al. (2019) [28]	Плазма (ЭДТА)	Хранение крови до 18 ч (4 ч, 12 ч, 18 ч) при КТ и 4°С, хранение крови до 7 дней при КТ в пробирках для долгосрочного хранения разных производителей
Mussbacher M, et al. (2020) [30]	Плазма (СТАВ, цитрат, ЭДТА)	Хранение крови до 24 ч (30 мин, 2 ч, 6 ч, 24 ч) при 4°С или КТ
Kim SH, et al. (2021) [8]	Плазма (ЭДТА)	Хранение крови до 24 ч (30 мин, 2 ч, 6 ч, 24 ч) при 4°С
Suzuki K, et al. (2022) [31]	Плазма (ЭДТА)	Хранение крови до 3 дней (1 ч, 1 день, 2 дня, 3 дня) при 4°С
Chan S-F, et al. (2023) [10]	Плазма (ЭДТА)	Хранение крови до получения плазмы на льду или при КТ до 7 ч
Sun J, et al. (2023) [33]	Плазма (ЭДТА)	Хранение крови до 24 ч (2 ч, 6 ч, 24 ч) при КТ (18-22°С) и 4°С
Wakabayashi I, et al. (2024) [34]	Сыворотка, плазма (ЭДТА)	Хранение крови до 3 ч при КТ перед получением плазмы или до 3 ч после получаса при КТ на образование сгустка перед получением сыворотки

Примечание: КТ — комнатная температура, ЭДТА — этилендиаминтетрауксусная кислота, ACD-B — citric acid, trisodium citrate, dextrose (лимонная кислота, тринатрийцитрат, декстроза).

разцах в Cell-Free DNA BCT (Streck) пробирках по сравнению с пробирками, содержащими ЭДТА, — гемолиз в них не был детектирован до 7 дня, тогда как в образцах с ЭДТА гемолиз был обнаружен в течение часа [27]. В исследовании Ward Gahlawat A, et al. (2019) в образцах плазмы, полученных из крови, хранившейся в пробирках Cell-Free DNA BCT (Streck) значимое повышение уровня гемолиза, оцененного с помощью микроРНК miR-451a было детектировано после 5 дней хранения, в пробирках Cell-Free DNA Collection Tube (Roche Diagnostics) — после 7 дней, в пробирках PAXgene Blood ccfDNA Tube (PreAnalytiX) и cf-DNA/cf-RNA Preservative tubes (Norgen Biotek Corp) не было детектировано после 7 дней [28].

Несмотря на то, что результаты некоторых исследований указывают на то, что ЭДТА может быть не лучшим выбором антикоагулянта для анализа циркулирующих микроРНК [30, 32], он остается одним из самых распространенных — из 13 исследований, включенных в настоящий обзор и не направленных на изучение влияния антикоагулянтов или типов используемых пробирок, антикоагулянты на основе ЭДТА были использованы в 12, в одном был использован ACD [26].

Хранение крови. Известно, что значительные изменения в концентрациях многих измеряемых аналитов может вызывать отложенная обработка биоматериала [1]. При проведении исследований может

потребоваться кратковременное хранение и транспортировка образцов крови из места сбора в лабораторию. Высвобождение микроРНК клеток крови во время хранения крови может влиять на уровень исследуемых микроРНК в плазме и сыворотке [33].

В таблице 3 представлены 12 исследований, в которых проводилось сравнение разных условий хранения (длительность и температурный режим) и/или транспортировки крови. Во всех 12 работах кровь была собрана в пробирки для получения плазмы, в 3 из них также анализировали кровь в пробирках для получения сыворотки [24, 25, 34]. Значения КТ, при которых были проведены исследования, приведены в трех публикациях [23, 24, 33].

Исследуемые условия хранения крови можно разделить на краткосрочные (до одного дня) [8, 10, 22-24, 30, 33] и на долгосрочные (от 3 до 14 дней) [25, 27, 28, 31].

В двух исследованиях изучалось влияние длительности хранения крови при КТ до получения сыворотки [25, 34]: значимых различий в уровне экспрессии 823 различных микроРНК при хранении в течение 3 ч обнаружено не было в работе [34], но в исследовании [25] уровень miR-21 был стабилен только в течение 24 ч, тогда как уровень miR-1 был стабилен в течение 4 дней.

В ряде работ изучали, как влияет на стабильность микроРНК длительность хранения при КТ до получения плазмы (ЭДТА) [22, 23, 25, 27, 28, 33, 34].

Таблица 4

Протоколы центрифугирования для различных типов образцов

Источник	Условия центрифугирования
Cheng HH, et al. (2013) [20]	Плазма: 1) 3400 g, 10 мин, КТ; PPP: 1) 3400 g, 10 мин, КТ; 2) 1940 g, 10 мин, 25°C; PRP: 1) 600 g, 10 мин, 25°C
Page K, et al. (2013) [22]	Плазма: 1) 1000 g, 10 мин, 4°C; 2) 1000 g, 10 мин, 4°C; Плазма: 1) 1000 g, 10 мин, 4°C; 2) 2000 g, 10 мин, 4°C; Плазма: 1) 1000 g, 10 мин, 4°C; 2) 10000 g, 10 мин, 4°C
Binderup HG, et al. (2016) [12]	PRP: 1) 3000 g, 15 мин; 2) 3000 g, 15 мин; Плазма: 1) 2000 g, 10 мин; Плазма: 1) 2000 g, 10 мин; хранение 1 нед. при -80°C; Плазма: 1) 2000 g, 10 мин; хранение 1 нед. при -80°C; 2) 3000 g, 30 мин; Плазма: 1) 2000 g, 10 мин; хранение 1 нед. при -80°C; 2) 3000 g, 15 мин; Плазма: 1) 2000 g, 10 мин; хранение 1 нед. при -80°C; 2) 3000 g, 15 мин; 3) 3000 g, 15 мин
Basso D, et al. (2017) [24]	Сыворотка, плазма: 1) 1200 g, 10 мин, КТ или 4°C; Сыворотка, плазма: 1) 1200 g, 10 мин, КТ или 4°C; 2) 2500 g, 15 мин, КТ или 4°C
Binderup HG, et al. (2018) [9]	PRP: 1) 3000 g, 30 мин, 18°C; PRP: 1) 3000 g, 15 мин, 18°C; 2) 3000 g, 15 мин, 18°C
Muth DC, et al. (2018) [26]	PRP: 1) 1300 g, 15 мин; PRP: 1) 1300 g, 15 мин; 2) 2500 g, 15 мин; 3) 2500 g, 15 мин
Murray MJ, et al. (2018) [27]	Плазма: 1) 1600 g, 10 мин; Плазма: 1) 1600 g, 10 мин; 2) 14400 g, 10 мин
Faraldi M, et al. (2020) [29]	Плазма: 1) 1300 g, 10 мин, КТ (22°C); PRP: 1) 1300 g, 10 мин, КТ (22°C); 2) 2500 g, 15 мин, КТ
Chan S-F, et al. (2023) [10]	PRP: 1) 1500 g, 15 мин; 2) 2500 g, 15 мин; PRP: 1) 1500 g, 15 мин; 2) 1500 g, 20 мин; PRP: 1) 1500 g, 15 мин; 2) 2000 g, 15 мин; PRP: 1) 1500 g, 15 мин; 2) 3000 g, 15 мин; PRP: 1) 1500 g, 15 мин; 2) 5000 g, 5 мин

Примечание: КТ — комнатная температура, ЭДТА — этилендиаминтетрауксусная кислота, PPP — platelet-poor plasma (бедная тромбоцитами плазма), PRP — platelet-rich plasma (богатая тромбоцитами плазма), SDP — Streck DNA plasma, SRP — Streck RNA plasma, 1) — первое центрифугирование, 2) — второе центрифугирование, 3) — третье центрифугирование.

Было показано, что хранение крови с ЭДТА до центрифугирования при КТ значительно изменяло уровни экспрессии анализируемых микроРНК: при сравнении результатов хранения при 2 ч и 6 ч [22], а также при хранении в течение 3 ч [34], 2 ч, 6 ч, 24 ч [30], 6 ч и 24 ч [33], 18 ч [23], 3 и 4 дней [25], и, наконец, а также в течение 14 дней [27] по сравнению с немедленным центрифугированием. В исследовании [28] было выявлено различие в уровнях экспрессии микроРНК после 18 ч хранения по сравнению с 4 ч [28]. Однако в исследовании [25] при хранении крови (ЭДТА) при КТ концентрации микроРНК не изменялись в течение 24 ч.

В двух исследованиях оценивали влияние на хранение крови типа пробирок для длительного хранения разных производителей [27, 28]. Один тип пробирок совпадал между исследованиями Cell-Free DNA (Streck), однако в работе [27] было показано увеличение уровней микроРНК с увеличением длительности хранения (0, 2, 4, 7, 10, 14 дней), в то время как в работе [28] общее содержание микроРНК оставалось стабильным в крови, хранящейся до 1 нед.

В ряде исследований оценивали, как влияет длительность хранения крови (ЭДТА) при 4°C [8, 10, 28, 30, 31, 33] на стабильность микроРНК. В боль-

шинстве работ показано, что при увеличении времени хранения крови при 4°C в течение 2 ч, 6 ч, 24 ч [8, 30], 24 ч [33], после 1 дня [31] при сравнении с немедленным центрифугированием наблюдалось изменение уровней экспрессии микроРНК, в работе Kim SH, et al. (2021) также показано значимое повышение гемолиза с увеличением времени хранения [8]. Однако в работе [28] значимых различий получено не было при хранении в 12 и 18 ч при сравнении с хранением в течение 4 ч.

Кроме того, было проведено изучение влияния хранения крови до получения плазмы на льду или при КТ до 7 ч [10], в результате которого было показано, что в образцах, хранившихся на льду, относительный уровень связанных с эритроцитами микроРНК, использовавшийся как индикатор гемолиза, был значительно выше, чем в образцах, хранившихся при КТ, в которых не было обнаружено значимых различий с образцами, обработанными немедленно. Как было показано ранее, хранение цельной крови на льду приводит к изменению качества плазмы и повреждению целостности мембраны тромбоцитов [36].

Лишь в одном из исследований было проведено хранение крови (ЭДТА) в течение 9 мес. при -80°C,

которое показало увеличение уровней экспрессии микроРНК по сравнению с длительностью хранения в течение 1 дня [25].

Таким образом, результаты большинства обсуждаемых исследований продемонстрировали, что уровни микроРНК значимо меняются уже после нескольких часов хранения крови как при КТ, так и при 4°С, и обработка образцов должна проводиться как можно быстрее после получения.

Транспортировка. Несмотря на то, что транспортировка биообразцов также является преаналитическим фактором, исследований, проводивших сравнение условий транспортировки, немного. В реальных клинических условиях многие диагностические тесты проводятся на аутсорсинге, и образцы крови необходимо отправлять до места проведения анализа [28]. Только в двух из включенных в обзор исследований проводилась оценка влияния транспортировки на биообразцы [24, 25]. В одном из них кровь в пробирках для получения сыворотки или с ЭДТА, а также плазма и сыворотка были помещены в шейкер при КТ на 1 или 8 ч, после чего оценивали концентрацию hsa-miR-1 и hsa-miR-21 [25]. В результате было показано, что после 8 ч экспрессия обеих микроРНК значимо снизилась в плазме, а miR-1 — в сыворотке цельной крови, тогда как после 1 ч воздействия никаких изменений не наблюдалось. Экспрессия микроРНК в обработанной ЭДТА цельной крови была стабильной после 1 или 8 ч воздействия. Образцы цельной крови вероятно являются более устойчивыми, чем разделенные фракции в условиях физического стресса, но они также демонстрируют схожую тенденцию к снижению уровней микроРНК с течением времени [25]. В другом исследовании кровь в пробирках для получения сыворотки и плазмы с разными антикоагулянтами была транспортирована до 9 ч при 2–8°С или КТ [24]. В результате было показано, что на выход микроРНК сыворотки метод хранения существенно не влиял, в то время как статистически значимый эффект хранения был обнаружен для плазмы ЭДТА и АСД-В [24].

Центрифугирование. Во время подготовки сыворотки и плазмы удаление клеточных компонентов обычно достигается путем центрифугирования. Конечная фракция плазмы может различаться по количеству остаточных тромбоцитов и микровезикул, в зависимости от скорости центрифугирования [32]. Тромбоциты содержат множество микроРНК, а условия подготовки плазмы могут вызывать активацию тромбоцитов и высвобождение микровезикул тромбоцитов (platelet-derived microvesicles, PMV), которые содержат специфические сигнатуры микроРНК. PMV составляют основную фракцию всех микровезикул в плазме. Даже следовые количества тромбоцитов или микрочастиц будут искусственно повышать уровни микроРНК и потенциально изменять профили экспрессии микроРНК, связанные

с заболеванием, поскольку концентрации микроРНК в клетках крови намного выше, чем в плазме или сыворотке [1]. Поэтому минимизация активации тромбоцитов *in vitro* является важным аспектом исследования циркулирующих микроРНК [32].

Исследования, направленные на изучение влияния протоколов центрифугирования образцов и установление оптимального протокола центрифугирования, приведены в таблице 4.

Анализ уровней трех микроРНК в плазме после трех последовательных центрифугирований показал, что более высокая концентрация исследованных микроРНК в плазме обусловлена клеточной контаминацией, а дополнительное ультрацентрифугирование при 355000 g привело лишь к незначительному снижению концентрации микроРНК; это указывает на то, что вклад экзосом и везикул в концентрацию исследованных микроРНК минимален [15].

В работе Cheng НН, et al. (2013) были оценены уровни циркулирующих микроРНК, остаточное количество тромбоцитов и содержание микрочастиц в плазме и сыворотке, подвергшихся разным способам обработки. После однократного центрифугирования при 3400 g, содержание тромбоцитов в плазме составило 28 тыс./мкл, повторное центрифугирование, в результате которого была получена бедная тромбоцитами плазма (platelet-poor plasma, PPP) снизило содержание тромбоцитов на 80–90%, а плазма, полученная с помощью центрифугирования при 600 g — богатая тромбоцитами плазма (platelet-rich plasma, PRP), содержала в 13–19 раз больше тромбоцитов. При сравнении PPP после фильтрации через 0,22 мкм фильтр и тромбоцитарного концентрата (ресуспендированный осадок, образовавшийся после получения PPP) уровни 71% детектированных микроРНК (199/282) различались [20].

В других исследованиях также было показано снижение общего выхода микроРНК [24], количества детектируемых микроРНК [29], концентрации отдельных микроРНК [26, 27], в т.ч. ассоциированных с тромбоцитами [29], при двойном центрифугировании плазмы по сравнению с однократным.

При этом, двойное центрифугирование оказывало гораздо меньший эффект на образцы сыворотки, чем плазмы [15], результаты, полученные Basso D, et al. (2017) при сравнении образцов сыворотки после одного или двух центрифугирований, показали, что профили экспрессии зависели преимущественно от температуры, а не от протокола центрифугирования [24].

Page K, et al. (2013) показали, что скорость второго центрифугирования плазмы влияет на количество детектированных микроРНК, которое составило 195 при 1000 g, 187 при 2000 g и 138 при 10000 g. Также было показано снижение уровня ассоциированных с тромбоцитами микроРНК (hsa-miR-24, hsa-miR-191, hsa-miR-197, hsa-miR-223) при

центрифугировании при 10000 g [22]. Однако в работе Chan S-F, et al. (2023) в плазме, полученной после второго центрифугирования при наибольшей из исследованных скоростей (5000 g), относительный уровень ассоциированных с тромбоцитами микроРНК был значимо повышен по сравнению с плазмой, полученной после второго центрифугирования при 1500 g, при этом при повышении скорости второго центрифугирования от 1500 g до 3000 g наблюдался тренд к понижению относительной концентрации тромбоцитарных микроРНК [10].

Были также изучены другие способы получения PPP: тройное центрифугирование [26] и продолжительное одиночное центрифугирование [9].

В ряде исследований, включенных в настоящий обзор и не направленных на изучение условий центрифугирования, была использована плазма, полученная после однократного центрифугирования (условия центрифугирования варьировали от 1200 g в течение 10 мин до 2500 g в течение 20 мин) [19, 25, 31, 34], в других — полученная после двойного (скорость второго центрифугирования варьировала от 2500 g до 12000 g) [8, 28, 30, 32, 33]. В двух исследованиях из первой группы были использованы образцы биобанков [25, 31]. Возможность получения PPP из замороженных образцов плазмы была проанализирована в ряде исследований [10, 12, 20].

Было показано, что при повторном центрифугировании плазмы, замороженной после однократного центрифугирования, происходит значимое снижение содержания тромбоцитов [20]. При двух последовательных центрифугированиях размороженной плазмы при 3000 g в течение 15 мин было показано снижение содержания тромбоцитов до значений, достигнутых в PPP, во всех десяти исследованных образцах, при одном центрифугировании при 3000 g в течение 30 мин — в шести образцах из десяти [12], также было показано снижение относительного уровня ассоциированных с тромбоцитами микроРНК по сравнению с плазмой, полученной при однократном центрифугировании и не подвергавшейся заморозке [10]. Однако в работе

Binderup HG, et al. (2016) уровни всех или большинства (в зависимости от использованной нормализации) исследованных микроРНК были значимо выше, чем в PPP [12].

Таким образом, хотя частота использования плазмы, полученной после одного и двух центрифугирований сопоставима, протоколы центрифугирования, позволяющие получить плазму с наименьшим содержанием тромбоцитов и наименьшей контаминацией тромбоцитарными микроРНК, включают два последовательных центрифугирования непосредственно после забора крови. При этом, актуальным остается вопрос использования образцов из коллекций биобанков. Стандартные протоколы приготовления плазмы, используемые в биобанках, включают одно центрифугирование, а проведение дополнительных центрифугирований после разморозки позволяет снизить до уровня PPP содержание тромбоцитов, но остаются значимые различия в уровнях микроРНК.

Заключение

Результаты исследований показывают, что различия в обработке образцов на каждом этапе пробоподготовки могут приводить к статистически значимым различиям в уровнях исследуемых микроРНК, и подтверждают необходимость унификации процессов пробоподготовки. Биобанки, использующие единые протоколы для всех образцов, позволяют решить эту задачу. В то же время, некоторые данные указывают на возможную неоптимальность наиболее распространенных практик, в т.ч. тех, которые применяются к образцам в коллекциях биобанков, что может потребовать разработки дополнительных протоколов обработки и анализа таких образцов. Для этого, а также для уточнения уже полученных противоречивых результатов необходимы дополнительные исследования.

Отношения и деятельность: все авторы заявляют об отсутствии потенциального конфликта интересов, требующего раскрытия в данной статье.

Литература/References

1. Khan J, Lieberman JA, Lockwood CM. Variability in, variability out: best practice recommendations to standardize pre-analytical variables in the detection of circulating and tissue microRNAs. Clin Chem Lab Med. 2017;55:608-21. doi:10.1515/cclm-2016-0471.
2. Markou AN, Lianidou ES. The impact of pre-analytical factors on the reliability of miRNA measurements. Curr Pathobiol Rep. 2019;7:29-33. doi:10.1007/s40139-019-00191-9.
3. Balzano F, Deiana M, Dei Giudici S, et al. miRNA Stability in Frozen Plasma Samples. Molecules. 2015;20:19030-40. doi:10.3390/molecules201019030.
4. Wang K, Zhang S, Weber J, et al. Export of microRNAs and microRNA-protective protein by mammalian cells. Nucleic Acids Res. 2010;38:7248-59. doi:10.1093/nar/gkq601.
5. O'Brien J, Hayder H, Zayed Y, et al. Overview of MicroRNA biogenesis, mechanisms of actions, and circulation. Front Endocrinol (Lausanne). 2018;9:402. doi:10.3389/fendo.2018.00402.
6. Blondal T, Jensby Nielsen S, Baker A, et al. Assessing sample and miRNA profile quality in serum and plasma or other biofluids. Methods. 2013;59:S1-6. doi:10.1016/j.ymeth.2012.09.015.
7. Reid G, Kirschner MB, van Zandwijk N. Circulating microRNAs: Association with disease and potential use as biomarkers. Crit Rev Oncol Hematol. 2011;80:193-208. doi:10.1016/j.critrevonc.2010.11.004.
8. Kim SH, MacIntyre DA, Sykes L, et al. Whole blood holding time prior to plasma processing alters microRNA expression profile. Front Genet. 2021;12:818334. doi:10.3389/fgene.2021.818334.

9. Binderup HG, Madsen JS, Heegaard NHH, et al. Quantification of microRNA levels in plasma — Impact of preanalytical and analytical conditions. *PLoS One*. 2018;13:e0201069. doi:10.1371/journal.pone.0201069.
10. Chan S-F, Cheng H, Goh KK-R, et al. Preanalytic Methodological Considerations and Sample Quality Control of Circulating miRNAs. *J Mol Diagn*. 2023;25:438-53. doi:10.1016/j.jmoldx.2023.03.005.
11. Van Der Schueren C, Decruyenaere P, Avila Cobos F, et al. Subpar reporting of pre-analytical variables in RNA-focused blood plasma studies. *Mol Oncol*. 2024. doi:10.1002/1878-0261.13647.
12. Binderup HG, Houliand K, Madsen JS, et al. Pre-storage centrifugation conditions have significant impact on measured microRNA levels in biobanked EDTA plasma samples. *Biochem Biophys Rep*. 2016;7:195-200. doi:10.1016/j.bbrep.2016.06.005.
13. Lee J-E, Kim Y-Y. Impact of preanalytical variations in blood-derived biospecimens on omics studies: Toward precision biobanking? *OMICS*. 2017;21:499-508. doi:10.1089/omi.2017.0109.
14. Nair VS, Pritchard CC, Tewari M, et al. Design and analysis for studying microRNAs in human disease: A primer on -omic technologies. *Am J Epidemiol*. 2014;180:140-52. doi:10.1093/aje/kwu135.
15. McDonald JS, Milosevic D, Reddi HV, et al. Analysis of circulating microRNA: preanalytical and analytical challenges. *Clin Chem*. 2011;57:833-40. doi:10.1373/clinchem.2010.157198.
16. Wang K, Yuan Y, Cho J-H, et al. Comparing the MicroRNA spectrum between serum and plasma. *PLoS One*. 2012;7:e41561. doi:10.1371/journal.pone.0041561.
17. Mestdagh P, Hartmann N, Baeriswyl L, et al. Evaluation of quantitative miRNA expression platforms in the microRNA quality control (miRQC) study. *Nat Methods*. 2014;11:809-15. doi:10.1038/nmeth.3014.
18. Matias-Garcia PR, Wilson R, Mussack V, et al. Impact of long-term storage and freeze-thawing on eight circulating microRNAs in plasma samples. *PLoS One*. 2020;15:e0227648. doi:10.1371/journal.pone.0227648.
19. Kirschner MB, Kao SC, Edelman JJ, et al. Haemolysis during sample preparation alters microRNA content of plasma. *PLoS One*. 2011;6:e24145. doi:10.1371/journal.pone.0024145.
20. Cheng HH, Yi HS, Kim Y, et al. Plasma processing conditions substantially influence circulating microRNA biomarker levels. *PLoS One*. 2013;8:e64795. doi:10.1371/journal.pone.0064795.
21. Kirschner MB, Edelman JJB, Kao SC-H, et al. The impact of hemolysis on cell-free microRNA biomarkers. *Front Genet*. 2013;4:94. doi:10.3389/fgene.2013.00094.
22. Page K, Guttery DS, Zahra N, et al. Influence of plasma processing on recovery and analysis of circulating nucleic acids. *PLoS One*. 2013;8:e77963. doi:10.1371/journal.pone.0077963.
23. Zhao H, Shen J, Hu Q, et al. Effects of preanalytic variables on circulating microRNAs in whole blood. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 2014;23:2643-8. doi:10.1158/1055-9965.EPI-14-0550.
24. Basso D, Padoan A, Laufer T, et al. Relevance of pre-analytical blood management on the emerging cardiovascular protein biomarkers TWEAK and HMGB1 and on miRNA serum and plasma profiling. *Clin Biochem*. 2017;50:186-93. doi:10.1016/j.clinbiochem.2016.11.005.
25. Glinge C, Clauss S, Boddum K, et al. Stability of circulating blood-based MicroRNAs — pre-analytic methodological considerations. *PLoS One*. 2017;12:e0167969. doi:10.1371/journal.pone.0167969.
26. Muth DC, Powell BH, Zhao Z, et al. miRNAs in platelet-poor blood plasma and purified RNA are highly stable: a confirmatory study. *BMC Res Notes*. 2018;11:273. doi:10.1186/s13104-018-3378-6.
27. Murray MJ, Watson HL, Ward D, et al. "Future-Proofing" Blood Processing for Measurement of Circulating miRNAs in Samples from Biobanks and Prospective Clinical Trials. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 2018;27:208-18. doi:10.1158/1055-9965.EPI-17-0657.
28. Ward Gahlawat A, Lenhardt J, Witte T, et al. Evaluation of Storage Tubes for Combined Analysis of Circulating Nucleic Acids in Liquid Biopsies. *Int J Mol Sci*. 2019;20:704. doi:10.3390/ijms20030704.
29. Faraldi M, Sansoni V, Perego S, et al. Study of the preanalytical variables affecting the measurement of clinically relevant free-circulating microRNAs: focus on sample matrix, platelet depletion, and storage conditions. *Biochem Med*. 2020;30:010703. doi:10.11613/BM.2020.010703.
30. Mussbacher M, Krammer TL, Heber S, et al. Impact of Anti-coagulation and Sample Processing on the Quantification of Human Blood-Derived microRNA Signatures. *Cells*. 2020;9:1915. doi:10.3390/cells9081915.
31. Suzuki K, Yamaguchi T, Kohda M, et al. Establishment of preanalytical conditions for microRNA profile analysis of clinical plasma samples. *PLoS One*. 2022;17:e0278927. doi:10.1371/journal.pone.0278927.
32. Zhelankin AV, Iulmetova LN, Sharova EI. The Impact of the Anticoagulant Type in Blood Collection Tubes on Circulating Extracellular Plasma MicroRNA Profiles Revealed by Small RNA Sequencing. *Int J Mol Sci*. 2022;23:10340. doi:10.3390/ijms231810340.
33. Sun J, Yang X, Wang T, et al. Evaluating the Effects of Storage Conditions on Multiple Cell-Free RNAs in Plasma by High-Throughput Sequencing. *Biopreserv Biobank*. 2023;21:242-54. doi:10.1089/bio.2022.0004.
34. Wakabayashi I, Marumo M, Ekawa K, et al. Differences in serum and plasma levels of microRNAs and their time-course changes after blood collection. *Pract Lab Med*. 2024;39:e00376. doi:10.1016/j.plabm.2024.e00376.
35. Goeman JJ, Solari A. Multiple hypothesis testing in genomics. *Stat Med*. 2014;33:1946-78. doi:10.1002/sim.6082.
36. Reid TJ, LaRussa VF, Esteban G, et al. Cooling and freezing damage platelet membrane integrity. *Cryobiology*. 1999;38:209-24. doi:10.1006/cryo.1999.2164.

Биоинформатический подход к обработке данных высокопроизводительного секвенирования молекул малых РНК

Жарикова А. А.^{1,2}, Вяткин Ю. В.^{1,2}, Киселева А. В.¹, Мешков А. Н.¹

¹ФГБУ "Национальный медицинский исследовательский центр терапии и профилактической медицины" Минздрава России. Москва; ²ФГБОУ ВО "Московский государственный университет им. М. В. Ломоносова". Москва, Россия

Высокопроизводительное секвенирование молекул малых РНК (рибонуклеиновых кислот) широко применяют для поиска маркеров, характерных для различных заболеваний, а также при изучении регуляции экспрессии генов. Протокол обработки данных состоит из множества этапов, включающих стадии анализа качества исходных данных и результатов секвенирования, картирования и исследования экспрессионного профиля детектируемых молекул малых РНК. Для реализации каждого шага исследования уже разработан целый арсенал программ и специфических пакетов. Инструментальная композиция итогового биоинформатического протокола критически важна для корректной обработки данных и возможности воспроизвести исследование. В настоящем обзоре описан наиболее универсальный протокол обработки результатов высокопроизводительного секвенирования молекул малых РНК, включающий все основные этапы и наиболее широко используемые программы.

Ключевые слова: малые РНК, некодирующие РНК, микроРНК, секвенирование, биоинформатический протокол.

Отношения и деятельность: нет.

Поступила 14/09-2024

Рецензия получена 16/10-2024

Принята к публикации 14/11-2024



Для цитирования: Жарикова А. А., Вяткин Ю. В., Киселева А. В., Мешков А. Н. Биоинформатический подход к обработке данных высокопроизводительного секвенирования молекул малых РНК. *Кардиоваскулярная терапия и профилактика*. 2024;23(11):4195. doi: 10.15829/1728-8800-2024-4195. EDN IRNCAQ



Bioinformatics approach to processing data from high-throughput sequencing of small RNA molecules

Zharikova A. A.^{1,2}, Vyatkin Yu. V.^{1,2}, Kiseleva A. V.¹, Meshkov A. N.¹

¹National Medical Research Center for Therapy and Preventive Medicine. Moscow; ²Lomonosov Moscow State University. Moscow, Russia

High-throughput sequencing of small ribonucleic acid (RNA) molecules is widely used to search for markers of various diseases, as well as to study the regulation of gene expression. The data processing protocol consists of many stages, including the stages of analyzing the initial data quality and sequencing results, mapping and studying the expression profile of the detected small RNA molecules. A whole arsenal of programs and specific packages has already been developed to implement each study step. The instrumental composition of the final bioinformatics protocol is critically important for the correct data processing and study reproduction. This review describes the most universal protocol for processing the results of high-throughput sequencing of small RNA molecules, including all the main stages and the most widely used programs.

Keywords: small RNA, non-coding RNA, microRNA, sequencing, bioinformatics protocol.

Relationships and Activities: none.

Zharikova A. A. * ORCID: 0000-0003-0723-0493, Vyatkin Yu. V. ORCID: 0000-0002-9056-8796, Kiseleva A. V. ORCID: 0000-0003-4765-8021, Meshkov A. N. ORCID: 0000-0001-5989-6233.

*Corresponding author:
azharikova89@gmail.com

Received: 14/09-2024

Revision Received: 16/10-2024

Accepted: 14/11-2024

For citation: Zharikova A. A., Vyatkin Yu. V., Kiseleva A. V., Meshkov A. N. Bioinformatics approach to processing data from high-throughput sequencing of small RNA molecules. *Cardiovascular Therapy and Prevention*. 2024;23(11):4195. doi: 10.15829/1728-8800-2024-4195. EDN IRNCAQ

*Автор, ответственный за переписку (Corresponding author):

e-mail: azharikova89@gmail.com

[Жарикова А. А. * — к.б.н., в.н.с. Института персонализированной терапии и профилактики, лаборатория молекулярной генетики, старший преподаватель факультета биоинженерии и биоинформатики, ORCID: 0000-0003-0723-0493, Вяткин Ю. В. — программист Института персонализированной терапии и профилактики, с.н.с. лаборатории геномной и медицинской биоинформатики Института перспективных исследований проблем искусственного интеллекта и интеллектуальных систем, ORCID: 0000-0002-9056-8796, Киселева А. В. — к.б.н., в.н.с. Института персонализированной терапии и профилактики, руководитель лаборатории молекулярной генетики, ORCID: 0000-0003-4765-8021, Мешков А. Н. — д.м.н., руководитель Института персонализированной терапии и профилактики, ORCID: 0000-0001-5989-6233].

Ключевые моменты

Что известно о предмете исследования?

- Одной из важных функций молекул малых РНК (рибонуклеиновых кислот) является регуляция генной экспрессии на посттранскрипционном уровне.
- Благодаря анализу дифференциальной экспрессии могут быть идентифицированы молекулы РНК разных классов, включая молекулы малых РНК, являющиеся потенциальными маркерами широкого спектра заболеваний.
- Программы для биоинформатического анализа отличаются скоростью работы, удобством использования, доступностью, набором дополнительных параметров и другими характеристиками.
- Разработка биоинформатического протокола анализа данных высокопроизводительного секвенирования способствует стандартизации преаналитических факторов, что является важным шагом в клиническом применении, а также научных исследованиях молекул малых РНК.

Что добавляют результаты исследования?

- Описан универсальный протокол обработки результатов высокопроизводительного секвенирования молекул малых РНК, все его основные этапы и наиболее широко используемые программы.

Key messages

What is already known about the subject?

- One of the important functions of small RNA molecules is the post-transcriptional regulation of gene expression.
- With differential expression, RNA molecules of different classes can be identified, including small RNA molecules, which are potential markers of a wide range of diseases.
- Bioinformatics analysis programs differ in operating speed, usability, availability, a set of additional parameters and other characteristics.
- The development of a bioinformatics protocol for analyzing high-throughput sequencing data contributes to the standardization of preanalytical factors, which is an important step in clinical application, as well as research of small RNA molecules.

What might this study add?

- A universal protocol for processing the results of high-throughput sequencing of small RNA molecules, its main stages and the most widely used programs are described.

Введение

Интерес к исследованию функций некодирующих (нкРНК) рибонуклеиновых кислот (РНК) разных классов стремительно растет. нкРНК вовлечены в регуляцию многих физиологических и патологических процессов в прокариотических и эукариотических организмах [1]. Группа нкРНК крайне гетерогенна по своему составу, единого устоявшегося варианта классификации не существует; более того, подходы к классификации приходится периодически пересматривать в связи с открытием новых групп нкРНК и уточнением функций уже известных молекул [2]. В генной разметке человека версии консорциума GENCODE¹ 46 — аннотировано ~63 тыс. генов и только ~20 тыс. из них кодируют матричные РНК [3].

Технологии высокопроизводительного секвенирования позволили детектировать различные РНК в любых биологических жидкостях, при этом совершенно необязательно заранее располагать информацией о последовательности этих РНК. С помощью исследований, подразумевающих стадию

анализа дифференциальной экспрессии, удалось идентифицировать молекулы РНК разных классов, включая молекулы малых РНК, являющиеся потенциальными маркерами ряда заболеваний, в т.ч. онкологических, сердечно-сосудистых и нейродегенеративных [4-6]. Удобный способ получения биологического материала, относительно быстрый лабораторный и биоинформатический анализ способствовали включению исследований на наличие характерных РНК-маркеров для детекции различных патологий в рутинную медицинскую практику.

По длине зрелой функциональной молекулы группу нкРНК условно делят на длинные и короткие, или малые РНК. Малые РНК характеризуют длиной <200 нуклеотидов и включают такие классы, как транспортные и рибосомальные РНК, микроРНК (малые некодирующие молекулы РНК длиной 18-25 нуклеотидов), малые ядерные (мяРНК, small nuclear RNA, snRNA) и малые ядрышковые РНК (мякРНК, small nucleolar RNA, snoRNA), piРНК (piwi-interacting RNA, piRNA), малые интерферирующие РНК (small interfering RNA, siRNA), повтор-ассоциированные короткие интерферирующие РНК (repeat-associated small interfering

¹ GENCODE. <https://www.encodegenes.org/> (13 September 2024).

RNA, rasiRNA), кольцевые РНК (circular RNA, circRNA), короткие шпильчатые РНК (кшРНК, short hairpin RNA, shRNA) и пр. [7, 8]. Малые РНК разных классов могут отличаться друг от друга механизмом созревания, посттранскрипционными модификациями, субклеточной локализацией, длиной, макромолекулярными партнерами, а также характерной ролью в жизнедеятельности клетки [7, 8]. Наибольшее распространение в качестве потенциальных терапевтических мишеней получили микроРНК.

МикроРНК — класс малых некодирующих РНК, которые представляют собой одноцепочечные молекулы РНК, обнаружены у растений, животных и некоторых вирусов. Впервые микроРНК была обнаружена в организме нематоды (*Caenorhabditis elegans*) в 1993г [9]. МикроРНК играют важную роль в процессе посттранскрипционной регуляции экспрессии генов, который реализуется посредством деградации транскриптов матричной РНК (мРНК) и ингибирования трансляции [10].

При реализации практически любого биоинформатического анализа есть возможность выбора из большого арсенала доступных программных продуктов. Можно подобрать альтернативные программы и их разнообразные сочетания, функционал которых будет по большей части воспроизводим. Однако даже программы, созданные для выполнения, на первый взгляд, одинаковой задачи, могут отличаться скоростью работы, удобством использования, доступностью, набором дополнительных параметров и прочими сопутствующими характеристиками. При разработке биоинформатического протокола анализа данных любого генома необходимо учитывать актуальное состояние доступного программного обеспечения, а также возможные специфические особенности анализируемых данных, которые могут повлиять на выбор софта.

Цель обзора — описание универсального протокола обработки результатов высокопроизводительного секвенирования молекул малых РНК, включающего все основные этапы и наиболее широко используемые программы.

Методологические подходы

Проведение поиска литературных источников было выполнено по заголовкам, аннотациям и ключевым словам в системах индексирования научных публикаций (Google Scholar, PubMed, eLIBRARY) с использованием следующих запросов: "малые РНК + биоинформатический", "микроРНК + биоинформатический", "small RNA + bioinformatics", "microRNA + bioinformatics", "microRNA + NGS", "small RNA + functions". В обзор были включены 19 оригинальных исследований 1993–2024гг, посвященных обработке результатов высокопроизводительного

секвенирования, в т.ч. молекул малых РНК, а также функциям, биогенезу и роли в жизнедеятельности клетки нкРНК.

Результаты

Секвенирование и биоинформатический анализ малых РНК. Исследование фракции малых РНК с применением технологий высокопроизводительного секвенирования может преследовать разные цели, однако всегда подразумевает наличие экспериментального и биоинформатического этапов анализа. Экспериментальный этап включает экстракцию РНК, в т.ч. микроРНК, приготовление библиотек для секвенирования, включающее лигирование адаптеров, обратную транскрипцию, индексирование и амплификацию.

Различные протоколы экстракции малых РНК [11–13] и подготовки библиотек приводят к дифференцированному обнаружению микроРНК [13]. Во время подготовки библиотек систематические ошибки могут возникнуть во время лигирования адаптеров, что объясняется вторичными структурами, образованными между микроРНК и адаптерами, и в связи с этим использование вырожденных адаптеров является предпочтительным [14]. Применение уникальных идентификаторов молекул (unique molecular identifiers, UMI) позволяет корректировать ошибки ПЦР (полимеразной цепной реакции) [13]. В ходе пробоподготовки перед амплификацией уникальные идентификаторы молекул добавляют к каждому транскрипту микроРНК. Одним из коммерческих наборов с использованием UMI, является, например, QIAseq (Qiagen, Германия). Для подтверждения стабильности и воспроизводимости результатов, согласно рекомендациям консорциума ENCODE², необходимо располагать хотя бы двумя биологическими репликами.

На данный момент наибольшее распространение в научных и медицинских лабораториях по всему миру получили секвенаторы следующего поколения (next generation sequencing), поставляемые коммерческой компанией Illumina (США). В основе метода секвенирования, реализованного в данных приборах, лежит принцип секвенирования путем синтеза [15]. В результате процесса пробоподготовки получают одноцепочечные фрагменты дезоксирибонуклеиновой кислоты (ДНК) (или комплементарной ДНК в случае секвенирования РНК), которые закрепляют на твердой подложке, и с помощью фермента ДНК-полимеразы синтезируют комплементарную цепь, затем происходит непосредственно процесс секвенирования, реализованный в виде циклов. В ходе каждого цикла на подложку поступают нуклеотиды, меченные специфическими для каждого типа нуклеотида флуо-

² ENCODE. <https://www.encodeproject.org/> (13 September 2024).

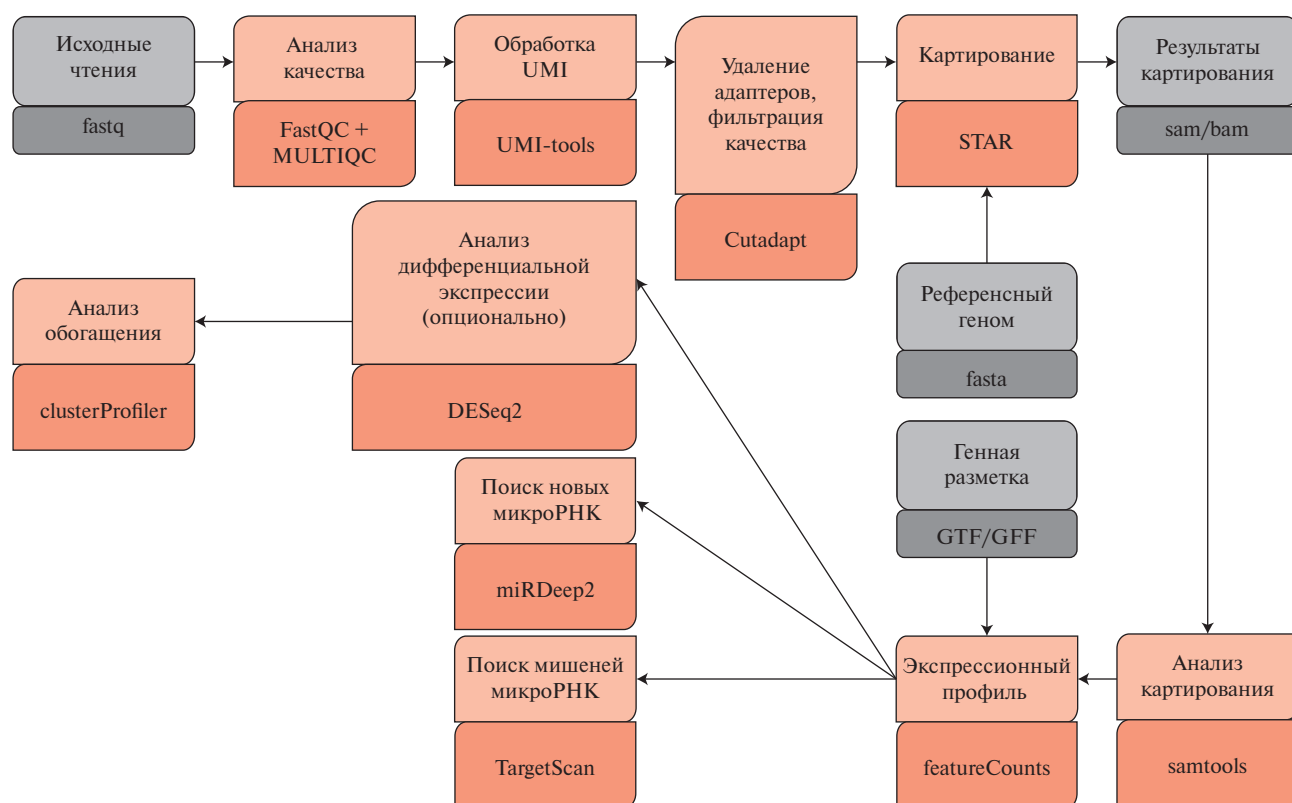


Рис. 1 Основные этапы биоинформатического анализа результатов секвенирования фракции малых РНК.

Примечание: микроРНК — малые некодирующие молекулы РНК длиной 18–25 нуклеотидов, UMI — unique molecular identifiers (уникальные идентификаторы молекул).

ресцентными метками; за счет дополнительной 3'-модификации поступающих нуклеотидов за один цикл секвенирования к матрице может присоединиться только один нуклеотид, флуоресценция инициируется с помощью лазера, результаты детектируются высокочувствительной камерой, затем блокирующая 3'-модификация удаляется и цикл может быть повторен. Еще одна технология высокопроизводительного секвенирования, используемая в приборах DNBSEQ (BGI/MGI, Китай/США), набирает популярность, в т.ч. и в российском сегменте. В основе метода лежит флуоресцентная детекция на поверхности проточной ячейки наночастиц ДНК, которые представляют собой амплифицированные по принципу "катящегося кольца" фрагменты ДНК.

По окончании процесса секвенирования прибор генерирует общий для всего запуска набор бинарных файлов, содержащих расшифровки полученных изображений, в формате bcl (binary base call) для приборов компании Illumina и в формате cal в случае BGI/MGI. Обычно в рамках одного запуска секвенатора komponуют несколько образцов, пометая библиотеки специфическими бар-кодами в ходе пробоподготовки, а встроенное программное обеспечение секвенатора позволяет получать файлы с чтениями для каждого образца в явном виде. Чтения, полученные в результате высоко-

производительного секвенирования, хранят в текстовых файлах формата FASTQ, где на каждый исследуемый образец приходится один FASTQ файл в случае одноконцевого протокола секвенирования или два парных FASTQ файла при парноконцевом секвенировании. Файлы bcl можно конвертировать в файлы FASTQ с помощью программы bcl2fastq, предоставляемой компанией Illumina (США). Для секвенирования фракции малых РНК ввиду длины целевых молекул допустимо использовать одноконцевой протокол с длиной чтений 75–100 нуклеотидов.

Традиционно биоинформатический анализ данных высокопроизводительного секвенирования полного цикла начинается с исходных или сырых чтений и подразумевает наличие нескольких стадий. В случае исследования экспрессионного профиля малых РНК анализ включает в себя: коррекцию последовательностей чтений при необходимости, картирование чтений на последовательность референсного генома, квантификация известных РНК на основании существующих генных разметок, дополнительно может быть реализована задача поиска новых РНК. На каждом этапе осуществляется контроль качества исходных чтений, результатов картирования чтений, квантификации и многое другое. Основные этапы биоинформатического анализа представлены на рисунке 1.

Анализ качества. Следующий этап анализа, характерный для любого протокола секвенирования — анализ качества полученных чтений, которое может быть оценено согласно разнообразным характеристикам. Разберем наиболее важные из них.

Первое, на что стоит обращать внимание — количество чтений, приходящихся на один образец. Согласно рекомендациям консорциума ENCODE², необходимо секвенировать как минимум 30 млн чтений на один образец. С помощью секвенирования желаемой фракции РНК можно установить концентрацию разнообразных транскриптов в популяции клеток. Чем выше экспрессируется та или иная РНК, тем чаще ее транскрипты будут попадать в пробу и тем большее количество чтений в итоге придется на соответствующий ген. От глубины секвенирования зависит итоговое разнообразие молекул малых РНК, которые удастся детектировать в результате эксперимента. При необходимости детектировать продукты заведомо низко экспрессируемых генов следует увеличивать глубину секвенирования.

Каждое основание каждого чтения детектируется и расшифровывается автоматически. Качество идентификации оснований оценивается с помощью метрики Phred quality score или Q-score, которая логарифмически зависит от вероятности ошибки при распознавании оснований [16]. Q-score может принимать значения от 0 до 40. Значение Q-score <20 (т.е. вероятность того, что основание детектировано неверно, составляет >0,01) принято считать неудовлетворительным. Современный уровень коммерческих наборов реагентов, приборов для секвенирования и алгоритмов детекции оснований позволяет получать значения Q-score >30.

Все вышеописанные характеристики качества чтений могут быть исследованы с помощью программы FastQC³, на вход которой требуется подать одноконцевые или парноконцевые FASTQ файлы. Возможности программы MultiQC⁴ позволяют создавать удобные отчеты, резюмирующие основные метрики качества сразу для нескольких образцов при необходимости.

Наличие этапа добавления UMI в ходе пробоподготовки предполагает специфическую биоинформатическую обработку полученных данных. Фрагменты, содержащие одинаковые молекулярные идентификаторы, получены в результате амплификации и должны быть объединены для установления количества чтений, отражающего биологическую представленность соответствующего транскрипта. Одним из наиболее распространенных инструментов для решения этой задачи является UMI-tools [17].

В чтениях могут содержаться и последовательности адаптеров, которые химически пришиваются к комплементарной ДНК в ходе пробоподготовки. Такие последовательности необходимо идентифицировать и удалять с помощью таких программ как Cutadapt⁵ или Trimmomatic [18]. Чтения, несущие технические последовательности, не удастся в дальнейшем картировать на последовательность референса.

Картирование чтений. Картирование чтений на референсный геном сопряжено с выбором как версии самого генома, так и подходящей программы для картирования. Одной из особенностей геномов эукариот является наличие большого количества повторяющихся последовательностей, что крайне затрудняет процесс сборки генома целиком при использовании коротких прочтений. Подавляющее большинство сборок референсных геномов несут существенный процент пропусков, а также неразрешенные последовательности в областях, обогащенных повторами, в основном это локусы генов рибосомальных РНК, центромер и теломер [19]. В наиболее актуальной версии сборки референсного генома человека, GRCh38 (hg38), расшифровано ~93% оснований [20]. Варианты сборки референсных геномов обновляются далеко не каждый год, а в случае *Homo sapiens* выход новой версии сборки является настоящим событием для научно-медицинского сообщества.

С развитием технологий секвенирования удалось разработать методики, позволяющие сразу расшифровывать длинные фрагменты ДНК, до нескольких тысяч нуклеотидов, хотя и с большим количеством ошибок. С помощью алгоритмической интеграции прочтений разной длины и качества удалось собрать референсный геном человека полностью, от теломеры до теломеры (консорциум "T2T", версия — CHM13), разрешив все проблемные локусы на каждой хромосоме [20]. Сборка CHM13 была опубликована в 2022г, однако переходить на работу с этой версией, особенно в рамках медицинских исследований, будут еще не один год. Многие базы данных, содержащие информацию о разметках генов, в т.ч. генов малых РНК, патогенных вариантах и прочей аннотации, могут использовать координаты только определенной версии референсного генома. Между версиями сборок координаты не сопоставляются напрямую. Существуют специализированные программы, например, LiftOver, позволяющие конвертировать набор координат, представленный относительно одной версии сборки в любую другую [21]. Такой подход, с одной стороны, дает возможность приводить информацию из разных источников к единой версии сборки

³ FastQC. <https://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc/> (13 September 2024).

⁴ MultiQC. <https://seqera.io/multiqc/> (13 September 2024).

⁵ Cutadapt. <https://cutadapt.readthedocs.io/en/stable/#> (13 September 2024).

референсного генома, с другой — может порождать проблемы неоднозначной или неполной конвертации. Выбор версии референсного генома зависит от поставленных задач, актуальности используемых баз данных и необходимости анализировать геномные локусы, обогащенные повторяющимися элементами. С точки зрения исследований малых РНК переход на версию CHM13 может быть вполне логичным, т.к. многие малые РНК, в т.ч. большинство рiРНК и часть микроРНК, закодированы в повторах разных классов [7].

Помимо последовательности референсного генома можно использовать последовательность референсного транскриптома и картировать чтения сразу на последовательности известных зрелых транскриптов [22]. Использование транскриптома в качестве референса лишает возможности находить новые РНК, что часто бывает актуально при работе с малыми РНК. Однако для многих организмов последовательности референсного генома просто не существует и наличие транскриптома позволяет использовать доступную информацию для проведения исследования. При выборе референса любого типа следует обращать внимание на качество сборки и полноту аннотации. Для подавляющего большинства основных модельных организмов, включая человека, существуют референсные последовательности генома, собранные до хромосом, и транскриптома с аннотацией основной массы генов в хорошем качестве [23]. Выбор стратегии картирования зависит от исследователя и поставленных задач.

Для работы с результатами высокопроизводительного секвенирования необходимо располагать файлами с референсами нужного типа и версии сборки. Стандартно файлы с нуклеотидными последовательностями хранят в формате FASTA [24]. На официальном сайте проекта Ensembl⁶ доступны последовательности референсных геномов разных версий сборок для более чем 50 позвоночных, включая человека, мышь, крысу, свинью и др., а также прочих широко используемых модельных организмов — дрозофила, нематода, данио-рерио и пр. В этом же репозитории можно получить FASTA файлы необходимых транскриптомов для соответствующих организмов.

В проектах по исследованию транскриптома среди наиболее используемых программ для картирования чтений на референс преобладают программы STAR [25] и HISAT2 [26]. Особенностью этих программ является наличие параметра, позволяющего картировать чтения с разрывом, что дает возможность учитывать процесс сплайсинга в ходе биоинформатического анализа. Вырезание интронов характерно при созревании белок-кодирующих

РНК, а способы процессинга малых РНК значительно отличаются и детекция чтений, попавших на экзон-экзонную границу не актуальна. Тем не менее, в стандартизованном в рамках проекта ENCODE² биоинформатическом протоколе анализа данных секвенирования малых РНК используют программу STAR, хотя она не всегда показывает лучшие результаты в сравнительных исследованиях [27, 28]. В некоторых протоколах все же используют такие программы для картирования как BWA⁷ и bowtie2⁸. Выбранную референсную последовательность необходимо проиндексировать, воспользовавшись соответствующей опцией выбранной программы для картирования.

Результаты картирования чтений на референс хранят в специализированных файлах формата BAM [24]. Это бинарные файлы, которые для каждого чтения содержат информацию о положении и количестве мест картирования на референсную последовательность, качестве картирования, редакционном расстоянии, описание картирования в закодированном виде, пользовательские тэги. При парноконцевом типе секвенирования в BAM файлах для каждого чтения сохраняется информация о результате картирования его пары.

Для работы с бинарными BAM файлами традиционно используют возможности программы Samtools⁹. Эта программа позволяет быстро получать разного рода сводную информацию, что дает возможность судить о результате картирования. Чтения приемлемого качества являются необходимым, но не достаточным условием успешного анализа. Одной из основных характеристик результатов картирования является процент чтений, нашедших свое место на референсной последовательности. Современный уровень развития лабораторного оборудования при корректном использовании и соблюдении всех мер, обеспечивающих чистоту помещения, позволяют получать >99% чтений, картированных на референс. Более низкий процент может свидетельствовать о контаминации проб материалом из других организмов, например, бактерий или грибов. Еще одной причиной недостаточной доли картированных чтений может быть наличие в них технических последовательностей, которые не были удалены на предыдущих этапах анализа.

Анализ BAM файлов позволяет выделить последовательности некартированных на целевой референс чтений в явном виде и проанализировать их, например, с помощью возможностей BLAST¹⁰.

⁶ Ensembl genome browser. <https://www.ensembl.org/index.html> (13 September 2024).

⁷ Burrows-Wheeler Aligner (BWA) <https://bio-bwa.sourceforge.net/> (13 September 2024).

⁸ Bowtie 2. <https://bowtie-bio.sourceforge.net/bowtie2/index.shtml> (13 September 2024).

⁹ Samtools. <https://www.htslib.org/> (13 September 2024).

¹⁰ BLAST. <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi> (13 September 2024).

В стандартных протоколах часто используют только уникально картированные чтения, т.е. такие чтения, которые закартированы на референсную последовательность только один раз. Программа Samtools [29] позволяет установить процент таких чтений. При детекции большого количества множественно картированных чтений стоит исследовать их отдельно. Такая ситуация может указывать на наличие большого количества рибосомальной РНК в пробе или экспрессии специфических РНК, пришедших из областей генома, обогащенных повторяющимися элементами, что может быть интересно. С помощью Samtools можно сортировать BAM файлы, упорядочивая чтения по координатам картирования или по уникальным идентификаторам чтений в лексикографическом порядке. Также у Samtools есть возможность создания дополнительного файла с индексами, что часто требуют программы на последующих этапах анализа. Рекомендовано хранить сортированные и проиндексированные BAM файлы [24].

Еще одной из часто используемых опций программы Samtools является возможность получать фрагмент BAM файла, содержащий чтения, которые оказались закартированы на определенный геномный локус или набор локусов. Можно получить BAM файл, например, для одной или нескольких хромосом, или для заведомо известных областей, несущих целевые гены. В случае исследования набора целевых локусов следует подать программе Samtools файл с координатами этих участков в формате BED [24].

С помощью Samtools можно конвертировать бинарный BAM файл в текстовый аналог — SAM файл [24]. Такие файлы можно просматривать в любом редакторе, однако хранить результаты картирования в файлах формата SAM не рекомендовано, т.к. они занимают значительно больше места и либо не воспринимаются программами для последующего анализа, либо их обработка может занимать значительно больше времени.

Профиль экспрессии. Следующий этап заключается в получении экспрессионного профиля, характерного для исследуемого образца, т.е. необходимо установить перечень известных генов, для которых детектирована экспрессия. Для этого нужно иметь файл с координатами и аннотацией известных генов. Важно следить, чтобы генная разметка была привязана к координатам выбранной версии референса с соответствующими именами хромосом. На сегодняшний день существует несколько консорциумов, которые занимаются составлением и уточнением генной разметки для разных организмов. В репозитории ENSEMBL⁶ хранятся файлы с доступной генной разметкой для многих организмов, включая человека и широко используемые модельные организмы. Проект GENCODE¹ пред-

ставляет одну из наиболее полных генных разметок для человека и мыши [3]. Стоит отметить, что разметка GENCODE последней версии представлена для сборки человеческого генома версии hg38, хорошо аннотирована, включая разметку в рамках неканонических хромосом, также в разметке представлено >20 тыс. генов длинных нкРНК и >7 тыс. генов малых нкРНК разных классов. База данных RefSeq¹¹ и консорциум FANTOM¹² также предоставляют свои версии генных разметок генома человека. Крайне важно следить за актуальным состоянием генной разметки, практически все консорциумы публикуют новые версии довольно часто. Так, проект GENCODE обновляет генную разметку генома человека ~2-3 раза/год. Генные разметки из разных источников и между разными релизами обычно минимально отличаются друг от друга по количеству белок-кодирующих генов, но могут драматически не соответствовать друг другу по композиции генов нкРНК. Также стоит обратить внимание на то, что некоторые гены могут изменить свой класс, например, для белок-кодирующей РНК может быть показана некодирующая функция. При формировании протоколов обработки данных удобно получать все необходимые референсные файлы из одного источника. Проект GENCODE предоставляет такую возможность и позволяет для человека и мыши помимо генной аннотации получить в формате fasta последовательность референсного генома, последовательности транскриптов для кодирующих и нкРНК, а также содержит файлы с разнообразной сопроводительной информацией, которая позволяет установить соответствия между идентификаторами транскриптов из разных источников (GENCODE, Ensembl, HGNC и др.). Базы данных Ensembl помимо генной разметки содержат, в т.ч. последовательности референсных геномов, транскриптов и белков. При формировании протоколов обработки данных удобно получать все необходимые референсные файлы из одного источника.

Для малых РНК существуют специализированные разметки. Одной из самых популярных баз данных, в которой собраны последовательности как еще непротранскрибированных, так и уже зрелых микроРНК является база miRBase¹³. В miRBase для человека репортировано >2500 зрелых последовательностей, в то время как в GENCODE¹ представлено ~1880 генов микроРНК. Гены рРНК в принципе не представлены практически ни в одной генной разметке от крупных консорциумов, для них также существуют специализированные базы данных, например,

¹¹ RefSeq database. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/refseq/> (13 September 2024).

¹² FANTOM consortium. <https://fantom.gsc.riken.jp/> (13 September 2024).

¹³ MicroRNA database (miRBase). <http://www.mirbase.org/> (13 September 2024).

piRNAdb¹⁴, piRNABank [30], piRBase¹⁵. Интересным и довольно специфическим классом малых РНК являются circRNA, которые также не представлены в канонических разметках, но координаты их генов можно получить в базах CircBank¹⁶, circRNADB [31], circAtlas¹⁷.

Реализация протокола секвенирования фракции малых РНК предполагает возможность поиска новых, не идентифицированных ранее, последовательностей малых РНК. Это довольно сложный процесс с алгоритмической точки зрения, тем не менее существует большое количество программ и пакетов, позволяющих искать новые РНК. Программа miRDeep2 [32] опирается на данные секвенирования и сопоставляет обнаруженные транскрипты с сигнатурой, характерной для последовательностей предшественников микроРНК. Есть и другие программы с аналогичными функциями: miRNAFold [33], Mirnovo [34] и пр.

Разметка генов обычно хранится в файлах формата GTF или GFF [24]. Это текстовые файлы, состоящие из 9 обязательных колонок. Из этих файлов можно получить информацию о координатах гена (имя хромосомы, начало и конец локуса), цепи, на которой закодирован ген, типе и идентификаторе гена. Структура GTF/GFF файлов позволяет хранить информацию не только о гене, но и обо всех его транскриптах, экзонах, старт- и стоп-кодонах, нетранслируемых областях (untranslated region, UTR), кодирующей последовательности (coding sequence, CDS). Тип аннотируемого локуса указан в третьей колонке (feature).

Для создания экспрессионного профиля образца существует несколько программ. Одна из самых распространенных и удобных в использовании программ для работы с данными секвенирования РНК — Htseq-count¹⁸, реализованная в рамках программы HTSeq. Однако для аннотации малых РНК Htseq-count может не подойти, т.к. программа работает только с уникально картированными чтениями и не способна разрешить случаи, когда чтение попадает на пересечение ≥ 2 аннотированных локусов. Гены малых РНК часто закодированы в нескольких копиях и могут быть расположены в интронах более длинных генов.

Альтернативой Htseq-count может послужить программа featureCounts¹⁹, которая доступна как

самостоятельная программа и как реализация на языке R в рамках пакета Rsubread²⁰. С помощью featureCounts можно обрабатывать множественно картированные, химерные, цепь-специфичные чтения, а также разрешать ситуации пересечений в генной разметке и добавлять дополнительные настройки параметров квантификации. Вне зависимости от выбора программы в результате получают текстовый файл, где напротив каждого идентификатора из генной разметки указано число чтений, которые были картированы в рамках соответствующего локуса, согласно выбранным параметрам аннотации. Htseq-count и featureCounts используют довольно схожие процедуры и приводят к очень схожим результатам, с расхождением $< 0,1\%$ [35].

Для выявления малых РНК, которые могли бы являться маркерами интересующих состояний, необходимо заранее разработать соответствующий дизайн исследования [36]. Целью такого исследования является поиск малых РНК, уровень экспрессии которых был бы выше в образцах определенного фенотипа, чем в контрольной группе. Предварительно необходимо тщательно отобрать образцы, которые могли бы составить целевую и контрольные группы приемлемого размера. Крайне важно следить за тем, чтобы сравниваемые выборки были равномерно нагружены метакarakterистиками, не касающимися предмета сравнения. Например, если образцы биологического материала получают от пациентов и здоровых добровольцев, то количество человек, половое, этническое и возрастное разнообразие, наличие сопутствующих заболеваний и пр. характеристики, поддающиеся контролю, должны быть максимально одинаково распределены в итоговых выборках.

Затем для каждого образца из выборки следует единообразно реализовать забор материала, пробоподготовку, секвенирование и рассчитать профиль экспрессии, как обсуждалось ранее. После чего проводится анализ, который выявляет статистически значимо дифференциально экспрессируемые гены. Реализовать этот анализ можно, например, с помощью такого пакета на языке R как DESeq2²¹. Одной из ключевых алгоритмических особенностей пакета DESeq2 является нормализация данных, которая корректирует различия в глубине секвенирования между образцами и стабилизирует дисперсию. Такой подход к нормализации позволяет повысить качество данных, учитывая возможные технические различия и естественную дисперсию в экспрессии индивидуальных генов, присущую всем живым организмам. Существуют альтернативные пакеты для

¹⁴ PIWI-interacting RNA (piRNA) Database (piRNAdb). <https://www.pirnadb.org/index> (13 September 2024).

¹⁵ piRBase. <http://bigdata.ibp.ac.cn/piRBase/> (13 September 2024).

¹⁶ CircBank Database. <http://www.circbank.cn/> (13 September 2024).

¹⁷ circAtlas 3.0 resource. <http://circatlas.biols.ac.cn/> (13 September 2024).

¹⁸ Htseq-count. https://htseq.readthedocs.io/en/release_0.11.1/count.html (13 September 2024).

¹⁹ featureCounts. <https://subread.sourceforge.net/featureCounts.html> (13 September 2024).

²⁰ Rsubread R package. <https://bioconductor.org/packages/release/bioc/html/Rsubread.html> (13 September 2024).

²¹ DESeq2 R package. <https://bioconductor.org/packages/release/bioc/html/DESeq2.html> (13 September 2024).

анализа дифференциальной экспрессии (например, *edgeR*²², *limma*²³), которые отличаются алгоритмическими подходами в реализации задач нормализации и сравнения. Использование разных подходов (*DESeq2*, *edgeR*, *limma*) привело к получению разного количества дифференциально экспрессируемых транскриптов, с максимальным количеством для *DESeq2* и минимальным для *limma* [27].

Функциональный анализ. В случае выявления дифференциально экспрессирующихся микроРНК следующим логичным шагом исследования может стать поиск специфических мишеней этих микроРНК. Каждая отдельная микроРНК может регулировать сотни мишеней [37]. Как эпигенетические регуляторы зрелые микроРНК могут комплементарно взаимодействовать с транскриптами белок-кодирующих генов, что потенциально приводит к деградации мРНК, либо блокирует процессы трансляции [38]. С другой стороны, индивидуальные мРНК могут взаимодействовать с несколькими микроРНК. Однако в отличие от растений, у животных для осуществления регуляции не требуется установления полной комплементарности между микроРНК и ее мишенями, что существенно затрудняет детекцию соответствующего функционального сайта связывания [10].

Доступные методы предсказания мишеней микроРНК используют информацию об их последовательности, учитывая комплементарность, эволюционную консервативность сайта связывания, а также доступность этого сайта. Примерами вычислительных инструментов могут служить *TargetScanHuman*²⁴, *RNAhybrid*²⁵, *miRanda* [39] и многие другие. На сегодняшний день разработано большое количество программ для поиска возможных мишеней микроРНК, включая алгоритмы, использующие подходы машинного обучения [40, 41]. Существуют базы данных, где уже собраны потенциальные пары микроРНК-мРНК для разных организмов.

²² *edgeR* R package. <https://bioconductor.org/packages/release/bioc/html/edgeR.html> (13 September 2024).

²³ *limma* R package. <https://bioconductor.org/packages/release/bioc/html/limma.html> (13 September 2024).

²⁴ *TargetScanHuman*. https://www.targetscan.org/vert_80/ (13 September 2024).

²⁵ *RNAhybrid*. <https://bibiserv.cebitec.uni-bielefeld.de/rnahybrid/> (13 September 2024).

Установление мишеней отдельных микроРНК не гарантирует понимания их функций. Для этого используют подход, подразумевающий, что микроРНК как регуляторы генной экспрессии, принимают участие в тех же биологических процессах, что и их целевые мРНК. Соответственно необходимо функционально проаннотировать мРНК и на основании полученных результатов сделать вывод о функциях микроРНК. Эту задачу можно решить с помощью анализа обогащения, который реализован в пакетах для языка R и веб-сервисах, например, *MSigDB*²⁶. Существует довольно много подходов, сервисов и пакетов, позволяющих по-разному посмотреть на анализ обогащения [42]. Наиболее часто анализ обогащения реализуют для баз данных метаболических путей *Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG)*²⁷, а также по коллекции функциональных аннотаций *Gene ontology (GO)*²⁸.

Заключение

Малые нкРНК играют важную регуляторную роль в жизнедеятельности клетки в норме и патологии. Исследования по использованию малых нкРНК в качестве биомаркеров заболеваний, терапевтических агентов или мишеней без сомнения представляют большой интерес для биомедицинской науки. Использование технологий высокопроизводительного секвенирования сопряжено с необходимостью разработки стандартизованных биоинформатических протоколов анализа полученных данных. При реализации таких протоколов можно выявить и до некоторой степени устранить возможные ошибки, допущенные в ходе пробоподготовки. Корректно спланированный биоинформатический анализ обеспечивает гарантию качества и воспроизводимости полученных результатов.

Отношения и деятельность: все авторы заявляют об отсутствии потенциального конфликта интересов, требующего раскрытия в данной статье.

Литература/References

- Shi J, Zhou T, Chen Q. Exploring the expanding universe of small RNAs. *Nat Cell Biol.* 2022;24:415-23. doi:10.1038/s41556-022-00880-5.
- Kopp F, Mendell JT. Functional classification and experimental dissection of long noncoding RNAs. *Cell.* 2018;172:393-407. doi:10.1016/j.cell.2018.01.011.
- Frankish A, Carbonell-Sala S, Diekhans M, et al. GENCODE: reference annotation for the human and mouse genomes in 2023. *Nucleic Acids Res.* 2023;51:D942-9. doi:10.1093/nar/gkac1071.
- Fazmin IT, Achercouk Z, Edling CE, et al. Circulating microRNA as a biomarker for coronary artery disease. *Biomolecules.* 2020;10:1354. doi:10.3390/biom10101354.
- Cui M, Wang H, Yao X, et al. Circulating MicroRNAs in cancer: Potential and challenge. *Front Genet.* 2019;10:626. doi:10.3389/fgene.2019.00626.
- Grasso M, Piscopo P, Confaloni A, et al. Circulating miRNAs as biomarkers for neurodegenerative disorders. *Molecules.* 2014;19:6891-910. doi:10.3390/molecules19056891.

7. Zharikova AA, Mironov AA. piRNAs: Biology and Bioinformatics. *Mol Biol (Mosk)*. 2016;50:80-8. doi:10.7868/S0026898416010225.
8. Choudhuri S. Small noncoding RNAs: biogenesis, function, and emerging significance in toxicology. *J Biochem Mol Toxicol*. 2010;24:195-216. doi:10.1002/jbt.20325.
9. Lee RC, Feinbaum RL, Ambros V. The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*. *Cell*. 1993;75:843-54. doi:10.1016/0092-8674(93)90529-y.
10. Bartel DP. MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. *Cell*. 2004;116:281-97. doi:10.1016/s0092-8674(04)00045-5.
11. McAlexander MA, Phillips MJ, Witwer KW. Comparison of methods for miRNA extraction from plasma and quantitative recovery of RNA from cerebrospinal fluid. *Front Genet*. 2013;4:83. doi:10.3389/fgene.2013.00083.
12. Page K, Guttery DS, Zahra N, et al. Influence of plasma processing on recovery and analysis of circulating nucleic acids. *PLoS One*. 2013;8:e77963. doi:10.1371/journal.pone.0077963.
13. Wong RKY, MacMahon M, Woodside JV, et al. A comparison of RNA extraction and sequencing protocols for detection of small RNAs in plasma. *BMC Genomics*. 2019;20:446. doi:10.1186/s12864-019-5826-7.
14. Sorefan K, Pais H, Hall AE, et al. Reducing ligation bias of small RNAs in libraries for next generation sequencing. *Silence*. 2012;3:4. doi:10.1186/1758-907X-3-4.
15. Hu T, Chitnis N, Monos D, Dinh A. Next-generation sequencing technologies: An overview. *Hum Immunol*. 2021;82:801-11. doi:10.1016/j.humimm.2021.02.012.
16. Ewing B, Hillier L, Wendl MC, et al. Base-calling of automated sequencer traces using phred. I. Accuracy assessment. *Genome Res*. 1998;8:175-85. doi:10.1101/gr.8.3.175.
17. Smith T, Heger A, Sudbery I. UML-tools: modeling sequencing errors in Unique Molecular Identifiers to improve quantification accuracy. *Genome Res*. 2017;27:491-9. doi:10.1101/gr.209601.116.
18. Bolger AM, Lohse M, Usadel B. Trimmomatic: a flexible trimmer for Illumina sequence data. *Bioinformatics*. 2014;30:2114-20. doi:10.1093/bioinformatics/btu170.
19. Miga KH, Newton Y, Jain M, et al. Centromere reference models for human chromosomes X and Y satellite arrays. *Genome Res*. 2014;24:697-707. doi:10.1101/gr.159624.113.
20. Aganezov S, Yan SM, Soto DC, et al. A complete reference genome improves analysis of human genetic variation. *Science*. 2022;376:eabl3533. doi:10.1126/science.abl3533.
21. Luu P-L, Ong P-T, Dinh T-P, et al. Benchmark study comparing liftover tools for genome conversion of epigenome sequencing data. *NAR Genom Bioinform*. 2020;2:lqaa054. doi:10.1093/nargab/lqaa054.
22. Conesa A, Madrigal P, Tarazona S, et al. A survey of best practices for RNA-seq data analysis. *Genome Biol*. 2016;17:13. doi:10.1186/s13059-016-0881-8.
23. Harrison PW, Amodé MR, Austine-Orimoloye O, et al. Ensembl 2024. *Nucleic Acids Res*. 2024;52:D891-9. doi:10.1093/nar/gkad1049.
24. Zhang H. Overview of sequence data formats. *Methods Mol Biol*. 2016;1418:3-17. doi:10.1007/978-1-4939-3578-9_1.
25. Dobin A, Davis CA, Schlesinger F, et al. STAR: ultrafast universal RNA-seq aligner. *Bioinformatics*. 2013;29:15-21. doi:10.1093/bioinformatics/bts635.
26. Kim D, Paggi JM, Park C, et al. Graph-based genome alignment and genotyping with HISAT2 and HISAT-genotype. *Nat Biotechnol*. 2019;37:907-15. doi:10.1038/s41587-019-0201-4.
27. Bezuglov V, Stupnikov A, Skakov I, et al. Approaches for sRNA analysis of human RNA-seq data: Comparison, benchmarking. *Int J Mol Sci*. 2023;24:4195. doi:10.3390/ijms24044195.
28. Ziemann M, Kaspi A, El-Osta A. Evaluation of microRNA alignment techniques. *RNA*. 2016;22:1120-38. doi:10.1261/rna.055509.115.
29. Danecek P, Bonfield JK, Liddle J, et al. Twelve years of SAMtools and BCFtools. *Gigascience*. 2021;10. doi:10.1093/gigascience/giab008.
30. Sai Lakshmi S, Agrawal S. piRNABank: a web resource on classified and clustered Piwi-interacting RNAs. *Nucleic Acids Res*. 2008;36:D173-7. doi:10.1093/nar/gkm696.
31. Chen X, Han P, Zhou T, et al. circRNADb: A comprehensive database for human circular RNAs with protein-coding annotations. *Sci Rep*. 2016;6. doi:10.1038/srep34985.
32. Friedländer MR, Mackowiak SD, Li N, et al. miRDeep2 accurately identifies known and hundreds of novel microRNA genes in seven animal clades. *Nucleic Acids Res*. 2012;40:37-52. doi:10.1093/nar/gkr688.
33. Tav C, Tempel S, Poligny L, et al. miRNAFold: a web server for fast miRNA precursor prediction in genomes. *Nucleic Acids Res*. 2016;44:W181-4. doi:10.1093/nar/gkw459.
34. Vitsios DM, Kentepozidou E, Quintais L, et al. Mirnov: genome-free prediction of microRNAs from small RNA sequencing data and single-cells using decision forests. *Nucleic Acids Res*. 2017;45:e177. doi:10.1093/nar/gkx836.
35. Agnelli L, Bortoluzzi S, Pruneri G. Bioinformatic pipelines to analyze lncRNAs RNAseq data. *Methods Mol Biol*. 2021;2348:55-69. doi:10.1007/978-1-0716-1581-2_4.
36. Chatterjee A, Ahn A, Rodger EJ, et al. A guide for designing and analyzing RNA-Seq data. *Methods Mol Biol*. 2018;1783:35-80. doi:10.1007/978-1-4939-7834-2_3.
37. Hans FP, Moser M, Bode C, et al. MicroRNA regulation of angiogenesis and arteriogenesis. *Trends Cardiovasc Med*. 2010;20:253-62. doi:10.1016/j.tcm.2011.12.001.
38. Khan J, Lieberman JA, Lockwood CM. Variability in, variability out: best practice recommendations to standardize pre-analytical variables in the detection of circulating and tissue microRNAs. *Clin Chem Lab Med*. 2017;55:608-21. doi:10.1515/ccm-2016-0471.
39. Enright A, John B, Gaul U, et al. MicroRNA Targets in *Drosophila*. *Genome Biol*. 2003;4:P8. doi:10.1186/gb-2003-4-11-p8.
40. Agarwal V, Bell GW, Nam J-W, et al. Predicting effective microRNA target sites in mammalian mRNAs. *Elife*. 2015;4. doi:10.7554/elife.05005.
41. Cihan M, Andrade-Navarro MA. Detection of features predictive of microRNA targets by integration of network data. *PLoS One*. 2022;17:e0269731. doi:10.1371/journal.pone.0269731.
42. Geistlinger L, Csaba G, Santarelli M, et al. Toward a gold standard for benchmarking gene set enrichment analysis. *Brief Bioinform*. 2021;22:545-56. doi:10.1093/bib/bbz158.

