

УЧРЕДИТЕЛЬ:  
ОАО «ИЗДАТЕЛЬСТВО  
"МЕДИЦИНА"»

ОБЩЕРОССИЙСКАЯ  
ОБЩЕСТВЕННАЯ  
ОРГАНИЗАЦИЯ  
«НАУЧНО-ПРАКТИЧЕСКОЕ  
ОБЩЕСТВО СПЕЦИАЛИСТОВ  
ЛАБОРАТОРНОЙ МЕДИЦИНЫ»

# Д КЛИНИЧЕСКАЯ ЛАБОРАТОРНАЯ ДИАГНОСТИКА

11  
2014

Clinical Laboratory Diagnostics

Е Ж Е М Е С Я Ч Н Ы Й    Н А У Ч Н О - П Р А К Т И Ч Е С К И Й    Ж У Р Н А Л

НОЯБРЬ

Журнал основан в январе 1955 г.

**Почтовый адрес**  
**ОАО «Издательство "Медицина"»**  
115088, Москва, Новоостоповская ул.,  
д. 5, строение 14

Телефон редакции:  
8-495-430-03-63,  
E-mail: clin.lab@yandex.ru

**Зав. редакцией Л. А. Шанкина**

**ОТДЕЛ РЕКЛАМЫ**

Тел. 8-495-678-64-84

**Ответственность за достоверность  
информации, содержащейся в рекламных  
материалах, несут рекламодатели**

Художественный редактор

*М. Б. Белякова*

Переводчик *В. С. Нечаев*

Корректор *В. С. Смирнова*

Технический редактор *Т. В. Нечаева*

Сдано в набор 18.09.2014.  
Подписано в печать 13.11.2014.  
Формат 60 × 88<sup>1</sup>/<sub>8</sub>.  
Печать офсетная.  
Печ. л. 8,00.  
Усл. печ. л. 7,84.  
Уч.-изд. л. 9,67.  
Заказ 715.

**E-mail: oao-meditsina@mail.ru**  
**WWW страница: www.medlit.ru**

ЛР N 010215 от 29.04.97 г.

Все права защищены. Ни одна часть этого издания не может быть занесена в память компьютера либо воспроизведена любым способом без предварительного письменного разрешения издателя.

Журнал представлен в базе данных Российского индекса научного цитирования (РИНЦ) и в следующих международных информационно-справочных изданиях: Abstracts of Microbiology, Adis International Ltd Reactions Weekly, Chemical Abstracts (Print), Chemical Titles, EBCOhost Biological Abstracts (Online), Elsevier BV EMBASE, Elsevier BV Scopus, Excerpta Medica, Abstract Journals, Index Medicus, Index to Dental Literature, National Library of Medicine PubMed, OCLC Article First, OCLC MEDLINE, Reactions Weekly (Print), Thomson Reuters Biological Abstracts (Online), Thomson Reuters BIOSIS Previews, VINITI RAN Referativnyi Zhurnal, Ulrich's International Periodicals Directory.

Отпечатано в ООО "Подольская Периодика", 142110, г. Подольск, ул. Кирова, 15

**Индекс 71442 — для индивидуальных подписчиков**  
**Индекс 71443 — для предприятий и организаций**

Подписка через Интернет: [www.akc.ru](http://www.akc.ru),  
[www.pressa-ef.ru](http://www.pressa-ef.ru)  
Подписка на электронную версию:  
[elibrary.ru](http://elibrary.ru)

ISSN 0869-2084. Клини. лаб. диагностика.  
2014. № 11. 1—64.

## РЕДАКЦИОННАЯ КОЛЛЕГИЯ:

**Главный редактор В. Н. ТИТОВ**

А. Б. ДОБРОВОЛЬСКИЙ, В. В. ДОЛГОВ, Г. Н. ЗУБРИХИНА, А. А. ИВАНОВ, С. А. ЛУГОВСКАЯ, А. Ю. МИРОНОВ (зам. главного редактора), В. Т. МОРОЗОВА, А. С. ПЕТРОВА, Л. М. ПИМЕНОВА (ответственный секретарь), Л. М. СКУИНЬ, А. А. ТОТОЛЯН, И. П. ШАБАЛОВА

## РЕДАКЦИОННЫЙ СОВЕТ:

А.Н. АРИПОВ (*Ташкент*), Т.В. ВАВИЛОВА (*Санкт-Петербург*), I. WATSON (*Великобритания, Ливерпуль*), А.Ж. ГИЛЬМАНОВ (*Уфа*), Д.А. ГРИЩЕНКО (*Красноярск*), В.С. ГУДУМАК (*Кишинев*), Н.Г. ДАШКОВА (*Москва*), В.А. ДЕЕВ (*Киев*), Т.И. ДОЛГИХ (*Омск*), С.А. ЕЛЬЧАНИНОВА (*Барнаул*), А.В. ИНДУТНЫЙ (*Омск*), А. KALLNER (*Швеция, Стокгольм*), А.И. КАРПИЩЕНКО (*Санкт-Петербург*), К.П. КАШКИН (*Москва*), Г.И. КОЗИНЕЦ (*Москва*), А.В. КОЗЛОВ (*Санкт-Петербург*), В.Г. КОЛБ (*Минск*), Г.В. КОРШУНОВ (*Саратов*), Г.М. КОСТИН (*Минск*), А.Г. КОЧЕТОВ (*Москва*), Н.Е. КУШЛИНСКИЙ (*Москва*), Г.Г. ЛУНЕВА (*Киев*), А.Р. МАВЗЮТОВ (*Уфа*), В.Н. МАЛАХОВ (*Москва*), Д.Д. МЕНЬШИКОВ (*Москва*), В.И. НИГУЛЯНУ (*Кишинев*), Е.Н. ОВАНЕСОВ (*Москва*), Ю.В. ПЕРВУШИН (*Ставрополь*), И.В. ПИКАЛОВ (*Новосибирск*), Ю.П. РЕЗНИКОВ (*Москва*), Д.Б. САПРЫГИН (*Москва*), С.Н. СУПЛОТОВ (*Тюмень*), О.А. ТАРАСЕНКО (*Москва*), И.С. ТАРТАКОВСКИЙ (*Москва*), А.Б. УТЕШЕВ (*Алматы*), Л.А. ХОРОВСКАЯ (*Санкт-Петербург*), С.В. ЦВИРЕНКО (*Екатеринбург*), А.Н. ШИБАНОВ (*Москва*), В.Л. ЭМАНУЭЛЬ (*Санкт-Петербург*), Г.А. ЯРОВАЯ (*Москва*)



«Издательство "МЕДИЦИНА"»

OAO IZDATEL'STVO  
"MEDITSINA"

THE ALL-RUSSIAN  
ORGANIZATION  
"THEORETICAL AND  
PRACTICAL SOCIETY  
OF SPECIALISTS  
OF LABORATORY  
MEDICINE"

# D KLINICHESKAYA LABORATORNAYA iagnostika

11  
2014

CLINICAL LABORATORY DIAGNOSTICS

SCIENTIFIC PRACTICAL MONTHLY JOURNAL

NOVEMBER

The Journal is founded in 1955.

**Mailing address:  
Izdatelstvo "MEDITSINA"**

115088, Moscow  
Novoostapovskaya str., 5, building 14

Editorial office phone:

8-495-430-03-63,

E-mail: [clin.lab@yandex.ru](mailto:clin.lab@yandex.ru)

**Managing editor L.A. Shankina**

**ADVERTISING DEPARTMENT**

Phone: 8-495-678-64-84

**The responsibility for credibility of  
information contained in advertising materials  
is accounted for advertisers**

Art editor *M.B. Belyakova*

Translator *V.S. Nechaev*

Proof-reader *V. S. Smirnova*

Layout editor *T.V. Nechaeva*

**E-mail: [oao-meditsina@mail.ru](mailto:oao-meditsina@mail.ru)**

**WWW page: [www.medlit.ru](http://www.medlit.ru)**

LR № 010215 of 29.04.1997

All rights reserved. Any part of this edition can not be entered computer memory nor be reproduced with any other mode without preliminary permission of editor in written form.

The Journal is presented in data base of the Russian index of scientific quotation (RiNZ) and in following I&R editions: Abstracts of Microbiology, Adis International Ltd Reactions Weekly, Chemical Abstracts (print), Chemical Titles, EBCOhost Biological Abstracts (Online), Elsevier BV EMBASE, Elsevier BV Scopus, Excerpta Medica, Abstract Journals, Index Medicus, Index to Dental Literature, National Library of Medicine PubMed, OCLC Article First, OCLC MEDLINE, Reactions Weekly (Print), Thomson Reuters Biological Abstracts (Online), Thomson Reuters BIOSIS Previews, VINITI RAN Referativnyi Zhurnal, Ulrich's International Periodicals Directory.

ISSN 0869-2084.

**EDITOR BOARD:**

**Editor-in-Chief V. N. TITOV**

A. B. DOBROVOLSKYI, V.V. DOLGOV, G.N. ZUBRICHINA, A.A. IVANOV, S.A. LUGOVSKAYA, A.Yu. MIRONOV (assistant editor-in-chief), V.T. MOROZOVA, A.S. PETROVA, L.M. PIMENOVA (executive editor), L.M. SKUIN', A.A. TOTOLYAN, I.P. SHABALOVA

**EDITORIAL COUNCIL:**

A.N. ARIPOV (*Tashkent*), T.V. VAVILOVA (*Sankt-Peterburg*), I. WATSON (*Great Britain, Liverpool*), A.Zh. GIL'MANOV (*Ufa*), D.A. GRITCHENKO (*Krasnoyarsk*), V.S. GUDUMAK (*Kishinev*), N.G. DASHKOVA (*Moscow*), V.A. DEEV (*Kiev*), T.I. DOLGIKH (*Omsk*), S.A. ELCHANINOVA (*Barnaul*), A.V. INDUTNY (*Omsk*), V.A. KALLNER (*Sweden, Stockholm*), A.I. KARPITCHENKO (*Sankt-Peterburg*), K.P. KASHKIN (*Moscow*), G.I. KOZINEC (*Moscow*), A.V. KOZLOV (*Sankt-Peterburg*), V.G. KOLB (*Minsk*), G.V. KORSHUNOV (*Saratov*), G.M. KOSTIN (*Minsk*), A.G. KOCHETOV (*Moscow*), N.E. KUSHLINSKII (*Moscow*), G.G. LUNEVA (*Kiev*), A.R. MAVZYTTOV (*Ufa*), V.N. MALACHOV (*Moscow*), D.D. MEN'SHIKOV (*Moscow*), V.I. NIGULYANU (*Kishinev*), E.N. OVANESOV (*Moscow*), Yu.V. PERVUCHIN (*Stavropol'*), I.V. PICALOV (*Novosibirsk*), Yu.P. REZNIKOVA (*Moscow*), D.B. SAPRIGIN (*Moscow*), S.N. SUPLOTOV (*Tyumen'*), O.A. TARASENKO (*Moscow*), I.S. TARTAKOVSKIY (*Moscow*), A.B. UTESHEV (*Almati*), L.A. CHOROVSKAYA (*Sankt-Peterburg*), S.V. TSVIRENKO (*Ekaterinburg*), A.N. SHIBANOV (*Moscow*), V.L. EMANUEL' (*Sankt-Peterburg*), G.A. YAROVAYA (*Moscow*)



IZDATEL'STVO "MEDITSINA"

СОДЕРЖАНИЕ	CONTENTS
<b>ПЕРСПЕКТИВЫ ЛАБОРАТОРНОЙ АНАЛИТИКИ</b>	
<i>Темпст П.</i> Кодирование по молекулярной массе синтетических биомаркеров при комплексном определении компонентов мочи: горизонты мониторинга заболеваний . . . . .	4
<i>Хьюгет Дж., Вейл А.</i> Цифровая ПЦР как новая технология и ее потенциальный вклад в молекулярную диагностику . . . . .	6
<i>Пател Р.</i> MALDI-TOFF-масс-спектрометрия: трансформативная протеомика для клинической микробиологии . . . . .	8
<i>Йесте А., Кинтана Ф.</i> Микрозонды антигенов для изучения аутоиммунных заболеваний . . . . .	10
<b>БИОХИМИЯ</b>	
<i>Владимиrowa С.Г., Тарасова Л.Н., Докшина И.А., Черепанова В.В.</i> Оценка чувствительности и специфичности метода определения С-реактивного белка при диагностике инфекционных осложнений у больных острым лимфобластным лейкозом, получающих химиотерапию . . . . .	17
<i>Плосконос М.В.</i> Применение эозина и йодистого пропидия для оценки жизнеспособности сперматозоидов человека . . . . .	22
<b>ГЕМАТОЛОГИЯ</b>	
<i>Кисилычина Д.Г., Луговская С.А., Наумова Е.В., Почтарь М.Е., Никитин Е.А., Долгов В.В.</i> Прогностическое значение оценки минимальной резидуальной болезни методом проточной цитофлуориметрии во время проведения терапии хронического лимфолейкоза . . . . .	26
<b>ЦИТОЛОГИЯ</b>	
<i>Лядов В.К., Ледин Е.В., Скрипкинова М.А.</i> Цитологическая диагностика аденокарциномы поджелудочной железы методом выделения по размеру циркулирующих опухолевых клеток из периферической крови [сообщение из практики] . . . . .	31
<i>Щерба С.Н., Савченко Г.М., Госпинович О.В.</i> Влияние пролонгированного проточно-аспирационного дренирования лапаротомных ран онкоколотрологических больных на цитологические параметры раневого секрета . . . . .	34
<b>ОБЩЕКЛИНИЧЕСКИЕ МЕТОДЫ</b>	
<i>Волкова И.А., Талан А.Е., Бучнева Е.А., Щербо С.Н.</i> Подсчет форменных элементов мочи при помощи автоматического анализатора Iris IQ 200 TM. . . . .	37
<b>ИММУНОЛОГИЯ</b>	
<i>Назарова Е.Л., Шардаков В.И., Демьянова В.Т., Загоскина Т.П., Зотина Е.Н.</i> Диагностика дефектов врожденного иммунитета при В-клеточных опухолях лимфатической системы . . . . .	39
<i>Бодиенкова Г.М., Алексеев Р.Ю.</i> Аутоантитела к нейрогормональным антигенам как критерий ранней диагностики и нейротоксикации у работающих в химических производствах . . . . .	42
<i>Терешков П.П., Максименя М.В., Фефелова Е.В., Витковский Ю.А., Караваева Т.М., Козлова А.В.</i> Прогностическая значимость некоторых иммунологических показателей слезной жидкости у пользующихся мягкими контактными линзами . . . . .	46
<b>МИКРОБИОЛОГИЯ</b>	
<i>Онищенко Г.Г., Коконова М.С., Мельников Д.Г., Меркулова О.В., Писцов М.Н., Бережной А.М., Маношкин А.В., Кулиш В.С., Петров А.А., Лыков М.В., Борисевич С.В.</i> Выделение, идентификация и молекулярно-биологическое исследование изолятов пандемического вируса гриппа А(H1N1) pdm09. . . . .	50
<i>Малафеева Э.В., Гульнева М.Ю., Носков С.М., Романов В.А.</i> Формирование биопленок условно-патогенными микроорганизмами, выделенными у больных с ревматическими заболеваниями. . . . .	53
<i>Иванова Е.И., Попкова С.М., Джиоев Ю.П., Ракова Е.Б., Немченко У.М., Рычкова Л.В.</i> Выявление шигатоксинпродуцирующих штаммов <i>Escherichia coli</i> в популяциях нормальной кишечной микрофлоры у детей с функциональными нарушениями желудочно-кишечного тракта. . . . .	56
<i>Дунаева Е.А., Миронов К.О., Дрибноходова О.П., Субботина Т.Е., Башмакова Е.Е., Ольховский И.А., Шипулин Г.А.</i> Количественное определение мутации V617F в гене JAK2 методом пиросеквенирования. . . . .	60
<b>PERSPECTIVES OF LABORATORY ANALYTICS</b>	
<i>Tempst P.</i> The coding according molecular mass of synthetic biomarkers under comprehensive testing of urine components: horizons of disease monitoring	4
<i>Hugett J., Whale A.</i> The digital polymerase chain reaction as a new technology and its potential input in molecular diagnostic	6
<i>Patel R.</i> MALDI-TOFF mass spectrometry: transformative proteomics in clinical microbiology	8
<i>Yeste A., Quitana F.</i> The microprobes of antigens for studying of autoimmune diseases	10
<b>BIOCHEMISTRY</b>	
<i>Vladimirova S.G., Tarasova L.N., Dokshina I.A., Cherepanova V.V.</i> The evaluation of sensitivity and specificity of technique of detection of C-reactive protein under diagnostic of infectious complications in patients with acute lymphoblastic leucosis receiving chemotherapy	17
<i>Ploskonos M.V.</i> The application of eosin and propidium iodide in evaluation of vitality of human spermatozoa	22
<b>HEMATOLOGY</b>	
<i>Kisilichina D.G., Lugovskaya S.A., Naumova E.V., Pochtart M.E., Nikitin E.A., Dolgov V.V.</i> The prognostic value of evaluation of minimal residual disease using technique of flow cytometry during application of therapy of chronic lymphatic leukemia	26
<b>CYTOLOGY</b>	
<i>Lyadov V.K., Ledin E.V., Skripnikova M.A.</i> The cytological diagnostic of adenocarcinoma of pancreas with technique of size separation of tumor cells circulating in peripheral blood (case report)	31
<i>Scherba S.N., Savchenko G.M., Gospirovich O.V.</i> The effect of prolonged flow aspiration drainage of laparotomy wounds of oncological coloproctologic patients on cytological parameters of wound secretion	34
<b>COMMON CLINICAL METHODS</b>	
<i>Volkova I.A., Talan A.E., Buchneva E.A., Scherbo S.N.</i> The count of urine corpuscles using automated analyzer Iris IQ 200 TM	37
<b>IMMUNOLOGY</b>	
<i>Nazarova E.L., Shardakov V.I., Demyanova V.T., Zagoskina T.P., Zotina E.N.</i> The diagnostic of defects of inborn immunity under B-cell tumors of lymphatic system	39
<i>Bodienkova G.M., Alekseev R.Yu.</i> The antibodies to neurohormonal anti-genes as a criterion of early diagnostic and neurointoxication in workers of chemical enterprises	42
<i>Tereshkov P.P., Maksimenia M.V., Fefelova E.V., Vitkovskii Yu.A., Karavaeva T.M., Kozlova A.V.</i> The prognostic significance of particular immunological indicators of lachrymal fluid in patients using soft contact lenses	46
<b>MICROBIOLOGY</b>	
<i>Onischenko G.G., Kokonova M.S., Melnikov D.G., Merkulova O.V., Pistsov M.N., Berejnoi A.M., Manoshkin A.V., Kulish V.S., Petrov A.A., Lykov M.V., Borisevitch S.V.</i> The separation, identification and molecular biologic analysis of isolates of pandemic influenza virus A(H1N1)pdm09	50
<i>Malafeeva E.V., Gulneva E.V., Noskov M.Yu., Romanov V.A.</i> The formation of bio-films by opportunistic microorganisms isolated from patients with rheumatic diseases	53
<i>Ivanova E.I., Popkova S.M., Djioev Yu.P., Rakova E.B., Nemchenko U.M., Rychkova L.V.</i> The detection of strains of <i>Escherichia coli</i> producing shiga toxin in populations of normal intestinal microbiota in children with functional disorders of gastrointestinal tract	56
<i>Dunaeva E.A., Mironov K.O., Dribnogradova O.P., Subbotina T.N., Bashmakova E.E., Olhovskii I.A., Shipulin G.A.</i> The quantitative testing of V617F mutation in gen JAK2 using pyrosequencing technique	60

## ПЕРСПЕКТИВЫ ЛАБОРАТОРНОЙ АНАЛИТИКИ

© ТЕМПСТ П., 2014

УДК 616-006.04-07:616.633.964.4

Темпст П.

### КОДИРОВАННЫЕ ПО МАССЕ СИНТЕТИЧЕСКИЕ БИОМАРКЕРЫ И МУЛЬТИПЛЕКСНОЕ МОНИТОРИРОВАНИЕ МОЧИ: НОВЫЕ ГОРИЗОНТЫ В МОНИТОРИНГЕ БОЛЕЗНЕЙ

Paul Tempst. Mass-Encoded, Synthetic Biomarkers and Multiplexed Urinary Monitoring: New Frontiers in Disease Monitoring. *Clinical Chemistry* 2013; 59: 12, 1694-5.

В трактате о психологии науки Abraham H. Maslow отмечал, что если единственный инструмент, которым вы пользуетесь на практике, это молоток, то любая проблема, которую вы решаете, имеет тенденцию быть похожей на гвоздь [1]. Специалистами, которые применяют этот принцип при решении прикладных аналитических задач, использовании высоких технологий, являются те, кто занимается разработкой специфичных биомаркеров болезней. В зависимости от класса молекул, которые являются предметом исследования [нуклеиновые кислоты, белки или малые молекулы], методы определения биомаркеров могут быть классифицированы как геномика, протеомика; зависит это от тех компонентов, которые вызывают диагностический интерес. Неудивительно, что каждая диагностическая специальность использует аргументацию, которая основана только на доступных оценках. Разительным примером теории “молоток–гвоздь” может служить комплекс тестов протеомики, в котором на первый план выступает потребность определения белков, выполняющих в клетках “всю разнообразную работу”; транскрипция же дает только общее представление о структуре протеинов. Исследуя биомаркеры белков, особое внимание уделяют определению как концентрации протеинов, так и посттрансляционной модификации их молекул, используя для этого методы иммуногистохимии, масс-спектрометрии и в меньшей мере функциональные, биологические различия молекул.

Перспективы применения методов протеомики для определения белков сыворотки крови составляют ключевые критерии поисков наиболее достоверных, специфичных биомаркеров болезни в течение последних десятилетий. Не принимая во внимание немногие ранние успехи в определении таких биомаркеров, как CA125 и CEA, трудно говорить, что сочетание иммуногистохимия–масс-спектрометрия имело успех [2]. Определено это главным образом большими различиями в количестве отдельных протеинов; это существенно затрудняет обнаружение протеинов в нано- и субнанограммовой на 1 мл концентрации биомаркеров без предварительного фракционирования белков и пептидов. Эта область диагностики нуждается в новых идеях или в оживлении старых, таких как исследование не концентрации, а активности белков [ферментов] – активности биомаркеров. Действительно, одним из самых ранних маркеров рака

предстательной железы, о котором сообщалось в 1938 г., является повышение в сыворотке активности кислой фосфатазы.

Обзор данных о протеоме плазмы крови человека в новейшей версии Атласа пептидов [<http://www.peptideatlas.org/>] указывает на присутствие в сыворотке крови около 60 примерно из 570 протеаз *in vivo*, которые перечислены в базе данных о пептидазах MEROPS [<http://merops.sanger.ac.uk/>]. Согласно этим данным, протеазы составляют одно из самых многочисленных семейств ферментов, активность которых можно определить в крови. Основная функция протеаз состоит в лизисе пептидных связей; биологическая роль их весьма разнообразна. Они могут принимать участие в механизме патологии, в частности при раке, способствуя как прогрессированию болезни, так и ее подавлению. Самые ранние наблюдения за активностью протеаз в крови и перспективы их использования для мониторинга течения болезни сделаны столетия назад. С тех пор появляются в различных журналах единичные сообщения о нарушении регуляции активности протеаз у больных раком; это, однако, не оказало существенного влияния на диагностический процесс в клинике.

Протеазы крови 10 лет назад приобрели «дурную славу», когда появились сообщения об использовании компонентов протеома [пептидома] сыворотки крови с целью диагностики рака яичников и других органов. Повышение и снижение концентрации связанных с болезнью белков, участков спектрограммы на платформах SELDI, хорошо документировано. Несмотря на это диагностическое значение количественных изменений, о которых сообщалось в научных журналах, окончательно понято не было.

Позже удалось выяснить, что большая часть пептидаз сыворотки крови формирует при определении «гнездные группы», последовательности, которые при повышении активности экзопептидаз определяют активность реакций протеолиза. То же касается активности пептидаз в каскаде свертывания крови, деградации компонентов системы комплемента; но это могут быть и результаты реакций протеолиза *ex vivo*. Все это может приводить к ошибочным результатам измерения, когда преаналитические условия не были достаточно жестко проконтролированы. На основе этих наблюдений раз-

Адрес для связи: Memorial Sloan-Kettering Cancer Center, New York, NY 10065. E-mail: p-tempst@mskcc.org.

Перевод статьи публикуется в соответствии с соглашением между редколлегией журналов “Clinical Chemistry” и “Клиническая лабораторная диагностика”.

работаны унифицированные методы определения активности протеаз сыворотки крови, качественно новый тип диагностической технологии, в которой используются меченые субстраты пептидов и эталоны пептидов, устойчивые к деградации. Это позволяет провести надежные количественные измерения с повышением достоверности мониторинга рецидивов опухолей [4].

Определение *in vitro* профиля активности протеаз в плазме, сыворотке крови каждым из применяемых методов сопряжено с необходимостью многократного разведения ферментов до бесконечно малой концентрации белка, который секретируют в кровоток небольшая опухоль или гибнущие ткани. Почки быстро экскретируют протеазы с мочой, поэтому невозможно определить их наличие даже при использовании самых чувствительных методов анализа, включая масс-спектрометрию [5]. К тому же методы *in vitro* не всегда позволяют мониторировать активность протеаз, которые являются активными только будучи экспрессированы на поверхности опухолевых, стволовых клеток и в микроокружении опухоли. Недавно G. Kwong и соавт. сообщили о синтетических биомаркерах с кодированной массой и описали новый, инновационный подход к измерению активности протеаз *in vivo*. Это важный шаг к исключению указанных выше ограничений методов при определении *in vitro* [6].

В предложенном методе используются синтетические пептиды в качестве субстратов протеолиза; к тому же они изначально прикреплены к носителям – наночастицам [“наночервям”]; вводят субстраты внутривенно. Носители доставляют пептиды к месту патологического процесса, будь это очаг фиброза в печени или дырчатые сосуды ангиогенной опухоли. Одновременно носители субстрата исключают возможность его выделения с мочой ранее, чем он будет подвергнут действию специфических протеаз. Наличие свободных пептидов далее можно определить в моче и измерить с помощью метода масс-спектрометрии. Этот процесс будет в определенной мере облегчен благодаря концентрированию почками пептидов плазмы более чем на порядок и сравнительно небольшой сложности определения протеома/пептидома мочи. На модели метастатического колоректального рака у мышей авторы обнаружили опухоль размером около 150 мм<sup>3</sup>, используя метод введения мобилизованных субстратов – “наночервей” и проведя анализ мочи. Определение же САЕ в сыворотке крови оказалось достоверным только при опухоли размером не менее 1300 мм<sup>3</sup>.

Формирование синтетических биомаркеров и технические детали нового метода довольно сложны, однако авторы нашли оригинальный способ обойти те препятствия, которые обусловлены физиологическими особенностями функции почек. В дополнение к связыванию с “наночервями” расщепляемые пептидные субстраты связаны и с не поддающимся гидролизу переносчиком пептидов-субстратов; исполняли эту процедуру удлинения с помощью фибринопептида. Это облегчало фильтрацию через гломерулы нефрона пептидов, которые содержали D-аминокислоты, предупреждало протеолиз. При этом в частично гидролизованных субстратах происходит образование “репортера” с фиксированной мо-

лекулярной массой. Это позволяет обойтись без спектрометрического анализа и интерпретации сложной смеси пептидов, которая может образоваться при деградации субстрата экзопептидазами *in vivo*. Кроме того, “репортер” метят стабильно мечеными тяжелыми изотопами <sup>13</sup>C или <sup>15</sup>N в составе аминокислотных остатков в разных положениях; это позволяет получить интактные пептиды с идентичной массой, но с различными фрагментами, которые можно мониторировать с помощью тандемной масс-спектрометрии, технологии, именуемой “кодирование массы”. Кодированную массу можно подвергнуть многоплановому количественному определению, что сходно с технологией, которая среди специалистов известна как iTRAQ [изобарические субстраты для относительного и абсолютного количественного определения]; метод позволяет мониторировать одновременно 10 разных субстратов.

Диагностическое значение синтетических маркеров и нового метода показано на экспериментальных моделях рака на животных, однако предстоит долгий и трудный путь, прежде чем это будет воспринято клиницистами и использовано для специфической диагностики или прогноза или как метод мониторинга рецидива болезни. Сложностями исследования является также [как и в случае исследований *in vitro* [4]] отсутствие информации относительно того, какие именно протеазы расщепляют синтетические субстраты-биомаркеры. Хотя 10 субстратов, приведенных в сообщении G. Kwong и соавт. [6], являются мишенями для гидролиза металлопротеиназой 9, можно сказать, что их будут гидролизовать также трипсин и химотрипсин. Кодирование массы может позволить аккуратно “отщипить” протеазами короткие пептиды и собрать их в уникальные панели “пептидно-червячных” биомаркеров. Методы можно оптимизировать для использования в качестве высокочувствительных тестов онкологических заболеваний и даже для диагностики специфических форм рака.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Maslow A.H. *The psychology of science: a reconnaissance*. New York: HarperCollins; 1966; 15.
2. Rifai N., Gillette M.A., Carr S.A. Protein biomarker discovery and validation: the long and uncertain path to clinical utility. *Nat. Biotechnol.* 2006; 24: 971-83.
3. Villanueva J., Shaffer D.R., Philip J., Chaparro C.A., Erdjument-Bromage H., Olshen A.B. et al. Differential exoprotease activities confer tumor-specific serum peptidome patterns. *J. Clin. Invest.* 2006; 116: 271-84.
4. Villanueva J., Nazarian A., Lawlor K., Yi S.S., Robbins R.J., Tempst P. A sequence-specific exopeptidase activity test [SSEAT] for functional biomarker discovery. *Mol. Cell. Proteomics.* 2008; 7: 509-18.
5. Hori S.S., Gambhir S.S. Mathematical model identifies blood biomarker-based early cancer detection strategies and limitations. *Sci. Transl. Med.* 2011; 3: 109ra116.
6. Kwong G.A., von Maltzahn G., Murugappan G., Abudayyeh O., Mo S., Papayannopoulos I.A. et al. Massencoded synthetic biomarkers for multiplexed urinary monitoring of disease. *Nat. Biotechnol.* 2013; 31: 64-71.

Поступила 16.01.14

Received 16.01.14

© ХЬЮГЕТ ДЖ., ВЕЙЛ А., 2014

УДК 616-074/-078:577.27

Хьюгет Дж.\*, Вейл А.

## ЦИФРОВАЯ ПЦР КАК НОВАЯ ТЕХНОЛОГИЯ И ЕЕ ПОТЕНЦИАЛЬНЫЙ ВКЛАД В МОЛЕКУЛЯРНУЮ ДИАГНОСТИКУ

Molecular and Cell Biology, LGC Ltd., Teddington, UK [Clinical Chemistry. 2013; 59[12]: 1691-3]

Новейшее использование ПЦР – цифровая ПЦР [dPCR, цПЦР] – на протяжении двух десятилетий участвует в развитии химии ферментов и разработке тестов, придавая им замечательную прецизионность и правильность. ПЦР достигается путем выполнения предельного разведения ДНК в последовательность индивидуальных реакций ПЦР [или их фракций]. Предельное разведение, предшествующее разделению в реакциях нанопотоочной и эмульсионной химии, основывается на случайном распределении структур ДНК и том факте, что статистика Пуассона может быть использована для измерения количеств ДНК, присутствующих в данной пропорции в положительных подразделениях. И более того, этот метод работает: результаты, полученные с помощью этой технологии, имеют линейный характер и метод способен обнаруживать и количественно оценивать мельчайшие количества структур ДНК [1, 2].

Все эти результаты достижимы без калибровочной кривой, необходимой почти во всех других молекулярных методах точного измерения ДНК. По сравнению с количественной ПЦР в реальном времени [qPCR, кПЦР], цПЦР характеризуется как более прецизионная [3], лучше обнаруживающая редкие генетические варианты [4] и менее чувствительная к влиянию ингибиторов [5, 6]. Признание этих преимуществ естественно ведет к предположениям о потенциале цПЦР для молекулярной диагностики.

В журнале *Clinical Chemistry* представлены сообщения о двух исследованиях, которые демонстрируют уникальное клиническое применение цПЦР для измерения циркулирующих внеклеточных нуклеиновых кислот. V. Taly и соавт. [7] провели исследование применения цПЦР для изучения обнаружения в плазме крови больных раком редких мутаций внеклеточных ДНК, сочетающихся с опухолями. J. Beck и соавт. [8] сообщили, что во внеклеточных ДНК больных после трансплантации содержатся поддающиеся обнаружению количества ДНК из пересаженных органов и что мониторингирование таких ДНК может служить суррогатным маркером повреждения и отторжения трансплантата. Эти статьи демонстрируют 2 аспекта клинического применения цПЦР, а именно обнаружения редких мутаций и подсчета нуклеиновых кислот.

Обнаружение редких мутаций, при которых полиморфизм одиночных нуклеотидов присутствует среди преобладающего содержания последовательностей дикого типа, было предметом публикации, которая ввела термин “цифровая ПЦР” [9]. Ограничение цПЦР для измерения полиморфизмов одиночных нуклеотидов

состоит в том, что праймеры/пробы обычно также обнаруживают последовательности дикого типа [которые обычно не представляют интереса], хотя и со значительно меньшей эффективностью. Ограничение может вести к проблеме со специфичностью в случае преобладания последовательностей дикого типа, тем самым ограничивая и чувствительность метода. B. Volgelstein и K. Kinzler [9] продемонстрировали, что процесс ограничения разведения облегчает уменьшение отношения последовательностей дикого типа к мутантным последовательностям в каждой ПЦР, что приводит к улучшению чувствительности метода. V. Taly и соавт. [7] оценивали, действительно ли цПЦР может измерять ключевые мутации, присутствующие в солидных опухолях, исследуя внеклеточные ДНК, происходящие из опухоли. Мутации в таких генах, как KRAS [гомолог вирусного онкогена саркомы крыс Кирстена], способны предсказывать реакцию на лечение, тогда как обычные методы генотипирования требуют инвазивной биопсии опухоли. Следовательно, способность провести такое исследование в крови весьма желательна. V. Taly и соавт. [7] разработали метод для измерения семи мутаций в двух реакциях, в которых применена уникальная способность некоторых инструментов цПЦР к мультиплексному исследованию с использованием различных концентраций одного и того же флюорофора. Применение этого подхода мультиплексирования, который был предварительно иллюстрирован с экстрагируемой ДНК [10], к обычным клиническим образцам открывает возможность скрининга многих мест в простом формате.

По сравнению с одиночными реакциями мультиплексирование не только увеличивает число мишеней, измеряемых в одиночных реакциях [тем самым улучшая время исследования, стоимость и т.д.], но также уменьшает количество клинического материала, требуемого для проведения исследования множества однонуклеотидных полиморфизмов, путем измерения более одной мишени в одной реакции. Это свойство особенно важно при исследовании в плазме внеклеточных ДНК, когда при всех различиях присутствуют примерно 1000 геномных эквивалентов на 1 мл крови [11], и это позволяет в достаточной мере разводить пробу для анализа ДНК. J. Beck и соавт. [8] использовали альтернативный подход для подсчета внеклеточных ДНК в плазме при малом насыщении ими путем предварительной амплификации до применения цПЦР. Как и в исследовании V. Taly и соавт., J. Beck и соавт. также усилили способность цПЦР измерять микронные мутанты, и они использовали такие возможности цПЦР для измерения внеклеточных ДНК, происходящих

\* Адрес для связи: LGC Limited, Queens Rd, Teddington

TW11 0LY, UK. Fax \_44-020-89432767; e-mail: jim.huggett@lgc.co.uk.

Перевод статьи печатается в соответствии с договором между редакциями журналов “Clinical Chemistry” и “Клиническая лабораторная диагностика”.