

Идентификация нового сайта метилирования в промоторном районе гена *Sept9* для диагностики гепатоцеллюлярной карциномы

Н.Л. Лазаревич^{1,2}, П.М. Абрамов¹, М.Д. Федорова¹, И.Ф. Кустова¹, Д.А. Шавочкина¹, А.Н. Катаргин¹, Н.П. Киселева¹, Н.А. Дьякова¹, И.В. Ботезату¹, В.Н. Кондратова¹, Н.Е. Кудашкин¹, Ю.И. Патютко¹, А.В. Лихтенштейн¹, С.В. Винокурова¹

¹ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России; Россия, 115478 Москва, Каширское шоссе, 24;

²биологический факультет ФГБОУ ВО «Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова»; Россия, 119991 Москва, Ленинские горы, 1, стр. 12

Контакты: Наталия Леонидовна Лазаревич lazarevich.nl@gmail.com

Введение. Ежегодно во всем мире от гепатоцеллюлярной карциномы (ГЦК) умирают более 600 тыс. человек. Заболевание часто выявляется на поздних стадиях и во многих случаях является некурабельным. Ранняя диагностика и мониторинг развития рецидивов ГЦК продолжают оставаться существенной проблемой клинической онкологии. Это определяет актуальность поиска высокочувствительных и специфичных биомаркеров для неинвазивной диагностики ГЦК.

Цель исследования — идентификация гиперметилированного при ГЦК локуса в промоторном районе гена септин 9 (*Sept9*) на основании анализа общедоступных данных метиломных исследований; экспериментальная валидация метилирования на пилотной панели парных клинических образцов пациентов с ГЦК, а также образцов ткани пациентов с доброкачественными опухолями печени и лимфоцитов здоровых доноров.

Материалы и методы. Для анализа метиломных данных были использованы выборки ГЦК TCGA, гепатоцеллюлярной аденомы из депозитария GEO (*Gene Expression Omnibus*), а также клеток периферической крови и тканей здоровых доноров Methbank. Экспериментальную валидацию уровней метилирования идентифицированного сайта проводили на пилотной выборке клинических образцов с использованием метода бисульфитного пиросеквенирования на приборе PyroMark Q24.

Результаты. На основании анализа метиломных данных нами был выбран сайт *cg20275528*, который характеризуется высоким уровнем метилирования в тканях ГЦК и минимальными уровнями метилирования в клетках неопухолевого ткани печени, гепатоцеллюлярной аденомы и периферической крови здоровых доноров. Экспериментальная проверка на пилотной выборке клинических образцов показала, что уровень метилирования маркерного сайта в ГЦК (медиана 42 %) значительно выше, чем в неопухолевых тканях печени (медиана 3 %) и доброкачественных новообразованиях (медиана 1,5 %) и превышает пороговое значение в ГЦК по сравнению с парными образцами прилегающей неопухолевого ткани печени в 20 (66,6 %) из 30 исследованных случаев. Показана принципиальная возможность детекции метилирования *cg20275528* в циркулирующей ДНК плазмы больных ГЦК.

Заключение. Полученные результаты позволяют предположить, что разработанный и апробированный в этой работе подход к поиску и экспериментальной верификации диагностически значимых маркеров может быть использован для выявления новых дифференциально метилированных сайтов и разработки новых подходов к неинвазивной диагностике ГЦК.

Ключевые слова: гепатоцеллюлярная карцинома, маркеры метилирования, септин 9, жидкостная биопсия

Для цитирования: Лазаревич Н.Л., Абрамов П.М., Федорова М.Д. и др. Идентификация нового сайта метилирования в промоторном районе гена *Sept9* для диагностики гепатоцеллюлярной карциномы. Успехи молекулярной онкологии 2019;6(4):26–37.

DOI: 10.17650/2313-805X-2019-6-4-26-37

Identification of a new methylation site in the *Sept9* promoter region for the diagnosis of hepatocellular carcinoma

N.L. Lazarevich^{1,2}, P.M. Abramov¹, M.D. Fedorova¹, I.F. Kustova¹, D.A. Shavochkina¹, A.N. Katargin¹, N.P. Kisseljova¹, N.A. Dyakova¹, I.V. Botetzatu¹, V.N. Kondratova¹, N.E. Kudashkin¹, Yu.I. Patyutko¹, A.V. Lichtenstein¹, S.V. Vinokurova¹

¹N.N. Blokhin National Medical Research Center of Oncology, Ministry of Health of Russia; 24 Kashirskoe Shosse, Moscow 115478, Russia;

²Biological Faculty, M.V. Lomonosov Moscow State University; Build. 12, 1 Leninskie Gory, Moscow 119991, Russia

Background. Over 600,000 people die from hepatocellular carcinoma (HCC) each year worldwide. The disease is often detected at advanced stages and in many cases is not curable. Early diagnostic and monitoring of HCC recurrences remains a substantial problem in clinical oncology. That determines the need for a search for highly sensitive and specific biomarkers for the non-invasive of HCC diagnostics.

The objective of the study. Identification of the hypermethylated locus in the promoter region of the septin 9 (*Sept9*) gene based on the annotated methylomes from the public databases. Experimental validation of methylation on a pilot panel of paired clinical samples of patients with HCC, as well as tissue samples from patients with benign liver tumors and lymphocytes from healthy donors.

Materials and methods. To analyze the methyl data, samples of HCC from TCGA, hepatocellular adenoma from GEO (Gene Expression Omnibus) depository, peripheral blood cells and tissues of healthy donors from Methbank were used. Experimental validation of methylation levels of the identified site was carried out on a pilot panel of clinical samples by bisulphite pyrosequencing using PyroMark Q24.

Results. Based on the analysis of methylome data, we selected cg20275528 site, which is characterized by high level of methylation in HCC tissues and minimal levels of methylation in non-tumor liver tissue, hepatocellular adenoma and peripheral blood of healthy donors. Experimental testing on a pilot panel of clinical specimens showed that the level of marker site methylation in HCC (42 % median) is significantly higher than in non-tumor liver tissues (3 % median) and benign neoplasms (1.5 % median) and exceeds the threshold value in HCC compared to paired samples of adjacent non-tumor liver tissue in 20 out of 30 studied cases (66.6 %). The general possibility for cg20275528 methylation detection in circulating DNA of plasma in HCC patients was shown.

Conclusion. The obtained results indicate that the approach to the detection and experimental verification of diagnostically significant markers developed and tested in this study can be used to identify new differentially methylated sites and to establish new approaches for non-invasive HCC diagnosis.

Key words: hepatocellular carcinoma, methylation markers, septin 9, liquid biopsy

For citation: Lazarevich N.L., Abramov P.M., Fedorova M.D. et al. Identification of a new methylation site in the Sept9 promoter region for the diagnosis of hepatocellular carcinoma. *Uspekhi molekulyarnoy onkologii = Advances in Molecular Oncology* 2019;6(4):26–37. (In Russ.).

Введение

Гепатоцеллюлярная карцинома (ГЦК) – преобладающая форма первичного рака печени, которая занимает 6-е место по распространенности и 4-е по смертности среди злокачественных новообразований в мире [1]. ГЦК характеризуется бессимптомным течением, поздними сроками диагностики и крайне неблагоприятным прогнозом [2]. Несмотря на то что наиболее высокая заболеваемость характерна для стран Азии и центральной Африки, за последние годы в развитых странах отмечена устойчивая тенденция к росту заболеваемости и смертности от ГЦК [3].

Эти обстоятельства определяют необходимость поиска диагностических маркеров и разработки методов, которые могли бы обеспечить повышение эффективности ранней диагностики ГЦК. В настоящее время основным клинически значимым белковым маркером для диагностики и мониторинга течения заболевания является альфа-фетопроtein [4], определяемый в сыворотке крови, однако чувствительность теста недостаточна для эффективной диагностики ГЦК (особенно ранних стадий). Ведется анализ эффективности использования совместно с альфа-фетопроteinом таких маркеров, как глипикан 3 (GPC3) и дес-гамма-карбоксипротромбин (DCP), однако чувствительность метода тестирования в случае ранних стадий заболевания остается недостаточной [5].

В настоящее время для диагностики онкологических заболеваний различных локализаций ведется поиск маркеров, основанных на метилировании ДНК. Эти маркеры имеют ряд преимуществ, которые делают их перспективными в качестве опухолевых маркеров для неинвазивной диагностики:

- метилированная ДНК достаточно стабильна в плазме крови и других биологических жидкостях;
- метилирование ДНК зачастую легче поддается оценке ввиду ее специфического расположения в промоторной области определенных генов;

- некоторые эпигенетические маркеры имеют важное значение для раннего выявления рака вследствие их участия в процессах канцерогенеза;
- метилирование может быть обнаружено с помощью чувствительных методик, основанных на полимеразной цепной реакции (ПЦР), в том числе с использованием малоинвазивных подходов жидкостной биопсии, позволяющих детектировать циркулирующие опухолевые маркеры в биологических жидкостях организма.

Поэтому маркеры метилирования ДНК обладают высоким потенциалом и широким спектром применения в качестве биомаркеров для ранней и неинвазивной диагностики различных форм опухолей [6, 7].

Одним из первых маркеров метилирования, для которых была доказана возможность диагностического использования в малоинвазивных методах жидкостной биопсии, стал CpG-богатый район в альтернативном промоторе V2 гена септин 9 (*Sept9*), расположенного в геномном локусе 17q25.3. Было установлено, что гиперметилирование этого участка – не только частое событие в тканях колоректальной карциномы, но и потенциальный диагностический маркер, который может быть выявлен в циркулирующей ДНК (цДНК), выделенной из плазмы крови пациентов с колоректальным раком [8]. Детальный анализ профиля метилирования CpG-сайтов в этом районе позволил картировать участок с максимальным уровнем метилирования в образцах колоректальной аденомы и карциномы – ампликон 5 (chr17:75369420-75369648 по сборке генома человека GRCh37/hg19) [9]. Эти исследования легли в основу разработки тест-системы mSept9 Epi proColon 2.0 (Epigenomics, Германия) – первого теста на основе анализа метилирования цДНК из плазмы крови, одобренного Управлением по санитарному надзору за качеством пищевых продуктов и медикаментов США для клинического использования при диагностике колоректального рака [10]. Гиперметилирование *Sept9* описано также при раке молочной железы, пищевода,

желудка, предстательной железы, вне- и внутриспеченочных желчных протоков [11].

Результаты нескольких исследований, опубликованных к настоящему времени, указывают на то, что гиперметилирование промотора гена *Sept9* также характерно и для ГЦК. При анализе профилей метилирования в 221 клиническом образце ГЦК методом гибридизации с использованием Illumina HumanMethylation450 Chip гиперметилирование промотора гена *Sept9* наблюдалось в 61 % проанализированных опухолей [12]. В экспериментальной статье, опубликованной в 2018 г., продемонстрирована возможность использования теста mSept9 Epi proColon 2.0 для диагностики ГЦК среди пациентов с алкоголь- или гепатитиндуцированным циррозом печени [13].

В то же время данные J. Li и соавт. свидетельствуют о том, что гиперметилирование CpG-богатого участка в промоторной области *Sept9* (chr17:75369766-75369791) может быть использовано для дифференциальной диагностики метастазов колоректального рака в печени от тканей ГЦК, в которых этот участок не метилирован [14]. Несогласованность существующих к настоящему времени данных литературы указывает на необходимость более точной детекции конкретных участков промоторной области *Sept9*, гиперметилирование которых характерно для ГЦК и может быть использовано для диагностики ГЦК методами жидкостной биопсии.

В настоящей работе мы провели анализ уровней метилирования промоторных сайтов гена *Sept9* на основании общедоступных баз данных, идентифицировали участки, максимально метилированные в образцах ГЦК по сравнению с образцами неопухолевых тканей печени, и провели экспериментальную верификацию полученных результатов на панели клинических образцов ГЦК и доброкачественных опухолей печени.

Материалы и методы

Анализ общедоступных баз данных метилового профилирования. Анализ метиломных данных был проведен с использованием выборки ГЦК Атласа генома опухолей (The Cancer Genome Atlas, TCGA-LIHC) [15] с помощью онлайн-сервера DiseaseMeth 2.0 (<http://bio-bigdata.hrbmu.edu.cn/diseasemeth>), депозитария первичных данных метиломных исследований генома человека GEO (Gene Expression Omnibus, <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo>), а также клеток периферической крови и тканей здоровых доноров Methbank 3.0 (<http://bigd.big.ac.cn/methbank>). Хромосомные координаты всех исследованных локусов приведены по сборке генома человека GRCh37/hg19, при необходимости конвертацию из других версий проводили с использованием сервиса LiftOver UCSC Genome Browser (<https://genome.ucsc.edu/cgi-bin/hgLiftOver>).

Клинические образцы. В работе были использованы 30 пар образцов нормальной и опухолевой тканей печени пациентов с гистологически верифицированным диагнозом ГЦК, 10 пар образцов ткани пациентов с добро-

качественными опухолями печени (фокальная нодулярная гиперплазия или гепатоцеллюлярная аденома), полученных при резекции опухолей в отделении опухолей печени и поджелудочной железы НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина, а также 23 образца клеток периферической крови здоровых доноров. Сбор образцов проводили после подписания пациентом информированного согласия на использование биологического материала. Кроме этого, в работе были использованы препараты архивных аутопсийных образцов тканей печени пациентов без опухолевых патологий печени. Сводная характеристика исследованных случаев ГЦК и доброкачественных опухолей печени представлена в табл. 1.

Выделение препаратов геномной ДНК и цДНК из плазмы крови. Выделение геномной ДНК проводили из замороженных в жидком азоте образцов неопухолевых и опухолевых тканей печени, масса которых не превышала 30 мг, с помощью набора для выделения геномной ДНК Wizard SV Genomic DNA Purification System (Promega, США) согласно протоколу производителя. Выделение геномной ДНК из образцов периферической крови (100 мкл) выполняли с помощью набора для выделения геномной ДНК DNeasy Blood & Tissue Kit (Qiagen, США) согласно протоколу производителя. Выделение цДНК проводили из 1 мл плазмы крови с использованием набора QIAamp ccfDNA/RNA kit (Qiagen, США). Концентрацию препаратов ДНК определяли с помощью флуориметра Qubit (Invitrogen, США).

Бисульфитная конверсия ДНК. Бисульфитную обработку геномной ДНК из тканей ГЦК, прилежащей неопухолевой ткани печени и клеток периферической крови проводили с использованием набора реактивов EZ DNA Methylation-Gold Kit TM (Zymo Research, США) согласно протоколу производителя. ДНК элюировали в 40 мкл буфера для элюции. Элюат, содержащий очищенную модифицированную ДНК, пригодную для ПЦР-анализа, хранили при температуре -20°C . Бисульфитную обработку цДНК из плазмы крови пациентов с ГЦК проводили с использованием набора EZ DNA Methylation-Lightning Kit (Zymo Research, США) согласно протоколу производителя. ДНК элюировали в 20 мкл буфера для элюции и хранили при температуре -20°C .

Аmplификация бисульфитно-модифицированной ДНК и пиросеквенирование. Амплификацию бисульфитно-модифицированной ДНК проводили с праймерами, специфичными к участку последовательности ампликона 5 *Sept9*, содержащему целевой CpG-динуклеотид (cg20275528). Дизайн праймеров для амплификации бисульфитно-обработанной ДНК и последующего пиросеквенирования выполнен с использованием программы MethylPrimer 2.0 (<http://www.urogene.org/methylprimer2> [16]). После оптимизации условий бисульфитной конверсии образцов геномной ДНК и цДНК плазмы крови были отработаны оптимальные условия амплификации и последующего пиросеквенирования.

Таблица 1. Клинические характеристики опухолевых образцов, включенных в исследование

Table 1. Clinical characteristics of tumor samples included in the study

Характеристика Characteristic	Число случаев, n Number of cases, n
Гепатоцеллюлярная карцинома <i>Hepatocellular carcinoma</i>	
Хронический вирусный гепатит: Chronic viral hepatitis:	
нет no	21
HBV	4
HCV	5
Пол, мужской/женский Gender, male/female	20/10
Возраст (среднее ± SD), лет Age (average ± SD), years	55,5 ± 16,8
Стадия TNM: TNM stage:	
I	4
II	11
III	11
IV	4
Размер опухоли, максимальное измерение, см: Tumor size, maximum dimension, cm	
≤5	10
5–10	8
>10	12
Внутрипеченочные метастазы: Intrahepatic metastasis:	
есть yes	7
нет no	23
Метастазирование в регионарные лимфатические узлы: Regional lymph node metastasis:	
есть yes	2
нет no	25
НД ND	3
Отдаленные метастазы: Distant metastasis:	
есть yes	1
нет no	29

Характеристика Characteristic	Число случаев, n Number of cases, n
Инвазия в сосуды: Vascular invasion:	
есть yes	17
нет no	13
Степень дифференцировки (по Эдмондсон–Стейнер): Differentiation degree (Edmondson–Steiner):	
G ₁	3
G ₂	16
G ₃	7
G _x	4
Уровень АФП, нг/мл: AFP level, ng/ml:	
низкий (<50) low (<50)	13
высокий (>50) high (>50)	11
НД ND	6
Очаги некроза в опухолевом узле: Necrotic areas in the tumor node:	
есть yes	21
нет no	9
Цирроз: Cirrhosis:	
есть yes	13
нет no	17
Доброкачественные образования печени <i>Benign liver tumors</i>	
Фокальная нодулярная гиперплазия/ аденомы Focal Nodular Hyperplasia/adenomas	5/5
Пол, мужской/женский Gender, male/female	5/5
Возраст (среднее ± SD), лет Age (average ± SD), years	38,0 ± 10,1
Размер опухоли, максимальное измерение, см: Tumor size, maximum dimension, cm	
≤5	4
5–10	4
>10	2

Окончание табл. 1
End of table 1

Характеристика Characteristic	Число случаев, n Number of cases, n
Уровень АФП, нг/мл: AFP level, ng/ml:	
низкий (<50) low (<50)	8
высокий (>50) high (>50)	0
НД ND	2
Очаги некроза в узле: Necrotic areas in the tumor node:	
есть yes	3
нет no	7

Примечание. HBV – вирус гепатита В; HCV – вирус гепатита С; НД – нет данных; G_x – уровень дифференцировки не применим; АФП – альфа-фетопротеин.
Note. HBV – hepatitis B virus; HCV – hepatitis C virus; ND – no data, G_x – level of differentiation is not applicable; AFP – alpha fetoprotein.

Использовали 2 праймера: один модифицирован биотином на 5'-конце для последующей иммобилизации на стрептавидиновой сефарозе в процессе пиросеквенирования (SEP9-CpG1 R 5'-RGAATCR GACATAATAASTAATAAACA-3'), второй – немодифицированный праймер (SEP9-CpG1 F 5'-TYGGYGGTTAGTTTTGTA-3').

Для амплификации использовали термостабильную hot-start полимеразу SmarTaq в составе готовой смеси реактивов для ПЦР-анализа – 5X MasDDTaqMIX (Диалат, Россия).

Амплификацию проводили в объеме 25 мкл. Смесь для выполнения реакции содержала: 5 мкл смеси 5X MasDDTaqMIX, специфические праймеры и 2 мкл бисульфитно обработанной ДНК. Постановку ПЦР проводили на амплификаторе T100 (Bio-Rad, США) по следующей программе: 95 °C – 3 мин; 95 °C – 15 с, 48 °C – 15 с, 72 °C – 20 с (45 циклов). Продукты ПЦР анализировали электрофорезом в 1,8 % агарозном геле на буфере TAE. Пробы ПЦР содержали только 1 полосу, соответствующую продукту с ожидаемой длиной 138 пар оснований.

Пиросеквенирование выполняли на приборе PyroMark Q24 (Qiagen, США) с использованием специфического праймера для секвенирования (SEP9-CpG1 S 5'-GGTTAGTTTTGTATTGTAGGAG-3'). Анализируемая на пиросеквенаторе последовательность YGYGGYGYGGYGT TTTAGTTAGYGYGTAG содержит 7 CpG-динуклеотидов, целевой сайт метилирования (cg20275528) отмечен подчеркиванием. Полученные в результате секвенирования последовательности анализировали с помощью программного обеспечения

PyroMark Q24 Advanced Software, позволяющего проводить количественный анализ уровня метилирования сайтов. Изменение уровня метилирования в опухолевой ткани ГЦК рассчитывали как разность между процентом метилирования в ДНК из опухолевой и неопухолевой тканей тех же пациентов. Изменение уровня метилирования в опухолевой ткани ГЦК выше 20 % принимали за положительный уровень метилирования, ниже 20 % – за отрицательный. Статистический анализ данных проводили с помощью программы GraphPad Prism 7.0.

Результаты

Идентификация специфических для ГЦК сайтов гиперметилирования гена *Sept9* на основании данных метилового профилирования. Поиск CpG-сайтов промоторного участка гена *Sept9*, гиперметилированных в образцах ГЦК, был проведен на основании анализа общедоступных данных метиломных исследований образцов неопухолевой ткани печени и ГЦК, полученных с использованием платформы для гибридизации с ДНК-микрочипами Infinium Human Methylation 450K Bead Chip (Illumina, США), включающей более 480 тыс. специфических локусов метилирования генома человека [17]. Для анализа была использована последовательность, находящаяся между ампликонами 4 и 6 и содержащая ампликон 5 (chr17:75368900-75370620, GRCh37/hg19), по данным литературы характеризующийся наибольшей степенью дифференциального метилирования в опухолях различного происхождения [9]. Этот участок содержит 12 локусов, включенных в Infinium Human Methylation 450K Bead Chip (табл. 2).

На первом этапе отбора был проведен анализ первичных данных профилей метилирования неопухолевой ткани печени и ГЦК из выборки TCGA-LIHC [15]. В выборку вошел 371 образец гистологически подтвержденных случаев ГЦК и 50 образцов неопухолевой ткани печени от пациентов с ГЦК. Данные, отражающие долю метилирования каждого из 12 исследуемых локусов, были загружены из базы данных DiseaseMeth 2.0 [18]. Анализ этих результатов продемонстрировал существенную гетерогенность метилирования внутри исследуемого участка.

На 1-м этапе из рассмотрения были исключены локусы с высоким фоновым уровнем в неопухолевой ткани печени, медианные значения уровня метилирования которых для выборки неопухолевой ткани превышали 5 % и/или доля случаев с более чем 20 % уровнем метилирования которых превышала 10 % (cg19554255, cg02884239, cg05184938, cg02320862). После этого были отобраны варианты с высоким уровнем метилирования в ткани ГЦК, для которых медианное значение метилирования по выборке было выше 40 % и/или доля образцов с более чем 40 % уровнем метилирования превышала 65 % (cg06848185, cg20275528, cg12783819). Два из выбранных локусов находятся в ампликоне 5, один непосредственно прилегает к ампликону 4.

Таблица 2. Уровни метилирования 12 геномных локусов в промоторной части гена *Sept9* по результатам анализа открытых баз данных
Table 2. Methylation levels of 12 genomic loci in the promoter part of the *Sept9* gene based on the results of analysis of open databases

Координаты Coordinates	chr17: 75368902	chr17: 75369051	chr17: 75369055	chr17: 75369091	chr17: 75369219	chr17: 75369224	chr17: 75369228	chr17: 75369484	chr17: 75369657	chr17: 75369939	chr17: 75370284	chr17: 75370611
Маркерный сайт Marker site	cg06848185	cg19554255	cg16779463	cg17300544	cg03804136	cg15044248	cg02884239	cg20275528	cg12783819	cg05184938	cg02320862	cg12985929
Медиана, TCGA-LIHC печень, % Median, TCGA-LIHC liver, %	1,9	5,5	1,7	4,5	4	1,4	6,4	1,6	2,45	10,1	19,5	3,2
Доля положительных случаев (≥ 20 %), TCGA-LIHC печень ($n = 50$), % Percentage of positive cases (≥ 20 %), TCGA-LIHC liver ($n = 50$), %	2	0	0	0	0	0	0	2	4	12	44	2
Медиана, TCGA-LIHC ГЦК, % Median, TCGA-LIHC HCC, %	48,3	34	33,8	63,7	46,4	47,9	30,7	49,7	54	40,8	66,3	34,9
Доля положительных случаев (≥ 20 %), TCGA-LIHC ГЦК ($n = 371$), % Percentage of positive cases (≥ 20 %), TCGA-LIHC HCC ($n = 371$), %	65,8	60,1	57,7	61,5	59,3	60,1	58,8	66,6	70,9	74,4	81,7	67,1
Разница средних значений опухолевых и нормальных образцов Difference between average values of tumor and normal samples	0,359	0,267	0,315	0,44	0,353	0,372	0,223	0,378	0,413	0,254	0,36	0,303
<i>p</i> -value (t-test)	0	0	1,625E-12	0	1,624E-12	1,624E-12	1,624E-12	1,624E-12	0	0	0	1,624E-12

Окончание табл. 2
End of table 2

Координаты Coordinates	chr17: 75368902	chr17: 75369051	chr17: 75369055	chr17: 75369091	chr17: 75369219	chr17: 75369224	chr17: 75369228	chr17: 75369484	chr17: 75369657	chr17: 75369939	chr17: 75370284	chr17: 75370611
Медиана, клетки периферической крови, % Median, peripheral blood cells, %	2,2	3,2	3,7	3,5	5,8	2,5	4,0	1,8	2,6	4,1	7,9	3,2
Медиана, аденомы, % Median, adenomas, %	3,0	7,2	3,5	2,1	5,4	2,2	8,3	1,1	3,9	8,5	15,2	3,3
Доля положительных случаев ($\geq 20\%$), аденомы ($n = 50$), % Percentage of positive cases ($\geq 20\%$), adenomas ($n = 50$), %	6	4	4	6	4	6	4	6	10	18	40	10

Примечание. Жирным шрифтом отмечены параметры, удовлетворяющие условиям, описанным в тексте. Разница средних значений опухолевых и нормальных образцов и статистическая достоверность различий в выборке TCGA-LIHC вычислена с помощью сервиса DiseaseMeth (t-тест Стьюдента). Сайт, выбранный для дальнейшего исследования, выделен красным фоном.

Note. Parameters satisfying the conditions described in the text are marked in bold font. The difference between the average values of tumor and normal samples and the statistical reliability of the differences in the sample TCGA-LIHC was calculated using the service DiseaseMeth (t-test Student). The site selected for further study is highlighted in red background.

Важный критерий для выбора опухолиспецифических маркеров, используемых для жидкостной биопсии, — их минимальный фоновый уровень в тканях и клетках, вносящих вклад в общий пул ДНК, циркулирующих в биологических жидкостях организма. Поскольку важным источником цДНК плазмы и сыворотки крови являются клетки периферической крови, на следующем этапе отбора мы сравнили уровни метилирования исследуемых локусов по данным базы Methbank [19], которая включает данные о метилировании образцов крови 4577 здоровых доноров разного возраста, а также от 38 до 322 образцов 8 типов нормальных тканей человека.

Все 3 отобранных сайта демонстрировали низкий (менее 5 %) уровень метилирования в клетках периферической крови здоровых доноров. Минимальный уровень метилирования (1,8 %) был отмечен для сайта cg20275528. Важно отметить, что, по данным сервера Methbank, уровень метилирования всех 12 локусов, расположенных в исследуемом районе, в нормальных тканях молочной железы, кишечника, печени, почки, легкого, щитовидной железы, предстательной железы, кожи не превышает 1 %.

Поскольку ГЦК относится к опухолям с наиболее низкой частотой морфологической верификации результатов дооперационного обследования (66,3 %) [20], важной диагностической задачей является достоверная дифференциация ГЦК от менее агрессивных форм первичных опухолей печени, например гепатоцеллюлярной аденомы. Для решения этой задачи мы использовали данные метилового анализа выборки, включающей 50 случаев гепатоцеллюлярной аденомы из депозитария первичных данных метилового исследования генома человека GEO (Gene Expression Omnibus, GSE43091). Для всех 3 выбранных

сайтов медианный уровень метилирования в ткани гепатоцеллюлярной аденомы не превышал 4 %, однако доля случаев, в которых уровень метилирования превышал 20 %, для локуса cg12783819 была выше, чем для остальных, и составила 10 %.

Для дальнейшего исследования нами был выбран сайт cg20275528, для которого в клетках неопухолевой ткани печени, гепатоцеллюлярной аденомы и периферической крови здоровых доноров были выявлены минимальные уровни метилирования (см. табл. 2).

Экспериментальная верификация гиперметилирования сайта cg20275528 при ГЦК методом бисульфитного пиро-секвенирования. В настоящем исследовании мы проанализировали уровень метилирования нового маркерного CpG-динуклеотида (cg20275528) в ампликоне 5 гена *Sept9* на пилотной выборке тканей ГЦК (30 случаев), парных образцов прилежащей неопухолевой ткани печени (30 случаев) и доброкачественных опухолей печени (5 случаев гепатоцеллюлярной аденомы, 5 случаев фокальной нодулярной гиперплазии печени) с помощью метода бисульфитного пиро-секвенирования. Сводная характеристика исследованных случаев представлена в табл. 1. Пиро-секвенирование проводили на приборе PyroMark Q24 (Qiagen, США), полученные в результате секвенирования последовательности анализировали с помощью программного обеспечения PyroMark Q24 Advanced Software, позволяющего проводить количественный анализ уровня метилирования сайтов.

На рис. 1 приведен пример пирограммы для участка гена *Sept9* в неопухолевой ткани печени и опухолевой ткани пациента 18 (ГК 18). Целевой CpG-динуклеотид (cg20275528) обозначен стрелкой. Как видно из пирограммы, уровень метилирования в опухолевой ткани ГЦК составляет 82 %, тогда как в нормальной прилежащей ткани печени — 2 %.

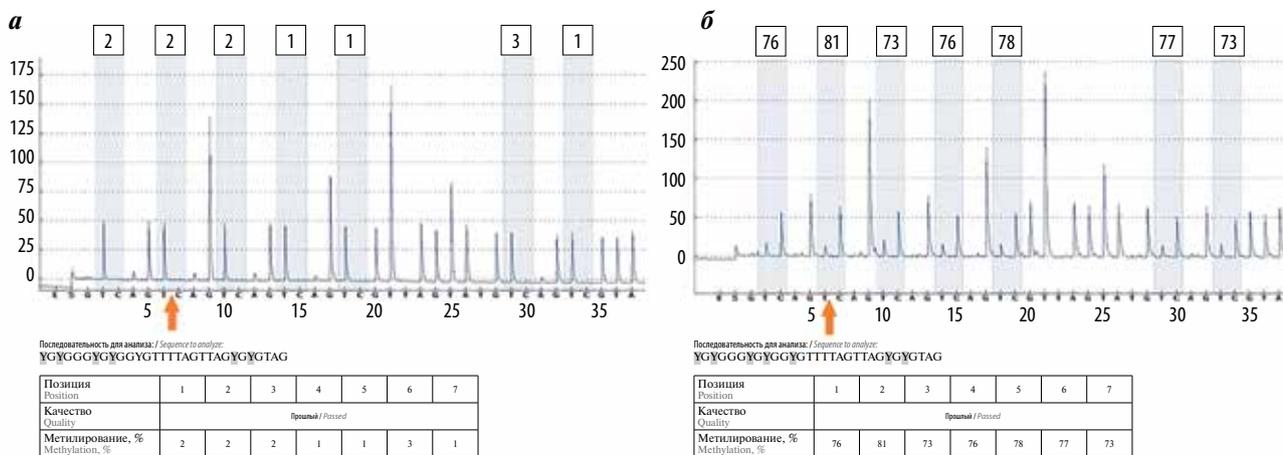


Рис. 1. Пример пирограммы промоторного участка гена *Sept9*: а — пирограммы геномной ДНК неопухолевой ткани печени; б — опухолевой ткани пациента 18 (ГК 18). По оси абсцисс указан порядок нуклеотидов; по оси ординат — уровень сигнала в относительных единицах. Голубым выделены 7 CpG-динуклеотидов, целевой CpG отмечен стрелкой. Процент метилирования указан над каждым CpG-динуклеотидом и в таблице под пирограммой

Fig. 1. Example of a pyrogram of the promoter region of the *Sept9* gene: а — pyrograms for genomic DNA from non-tumor liver tissue; б — tumor liver tissue of the patient 18 (HC 18). The abscissa axis indicates the nucleotide order; the ordinate axis represents detected light in relative units. The “light blue” regions highlight the analyzed CpG sites, arrow indicates the marker CpG site. Percentage of methylation for the respective CpG above them and in the table below

На рис. 2 представлены данные по уровню метилирования маркерного сайта в индивидуальных образцах опухолевой ткани (ГЦК), прилегающей неопухолевой ткани печени тех же пациентов (П) и образцах доброкачественных опухолей печени (ДО).

Полученные данные свидетельствуют о том, что уровень метилирования маркерного сайта в ГЦК (медиана 42 %) значительно выше, чем в неопухолевых тканях печени (медиана 3 %) или доброкачественных новообразованиях (медиана 1,5 %). Значительное

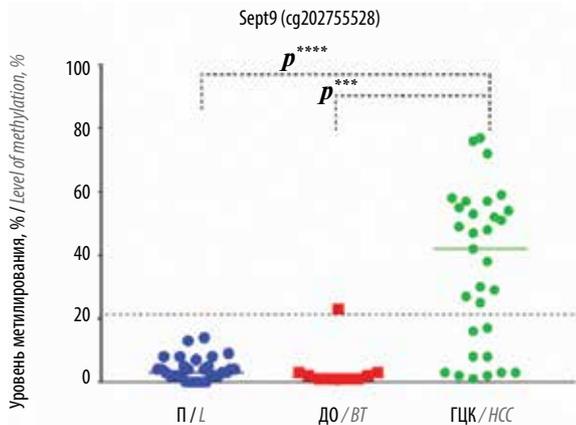


Рис. 2. Уровень метилирования маркерного сайта *cg20275528* в индивидуальных клинических образцах. ГЦК – опухолевые ткани (гепатоцеллюлярная карцинома); П – прилегающие неопухолевые ткани печени тех же пациентов; ДО – образцы доброкачественных опухолей печени. Пунктирной линией указан пороговый уровень метилирования – 20 %. *** $p < 0,0002$; **** $p < 0,0001$ по непараметрическому методу Фридмана

Fig. 2. The level of methylation of the marker site *cg20275528* in individual clinical samples. HCC – tumor specimens (hepatocellular carcinoma); L – adjacent non-tumor liver of the same patients; BT – benign tumors. The dotted line indicates the threshold level of methylation – 20 %. *** $p < 0,0002$; **** $p < 0,0001$ by the non-parametric Friedman

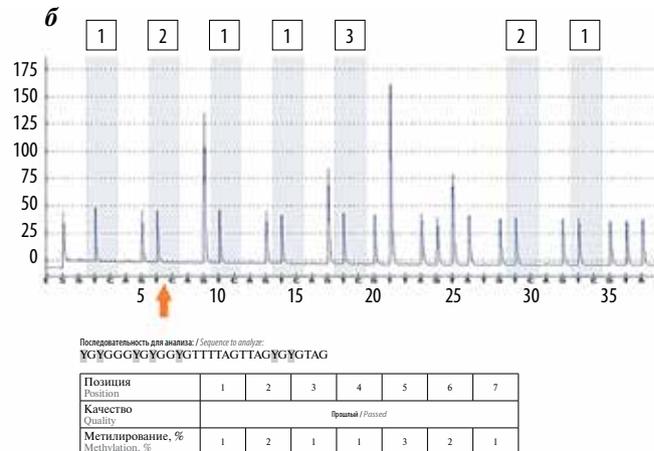
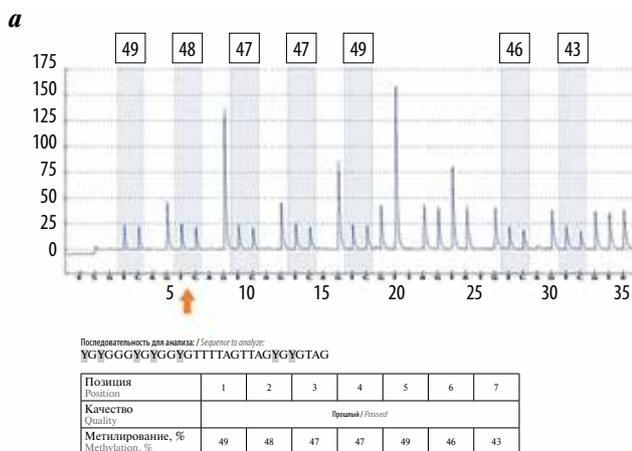


Рис. 3. Пример пинограммы промоторного участка гена *Sept9*: а – пинограммы циркулирующей ДНК (цДНК) пациента 17; б – цДНК пациента 18. По оси абсцисс указан порядок нуклеотидов; по оси ординат – уровень сигнала в относительных единицах. Голубым выделены 7 CpG-динуклеотидов, целевой CpG отмечен стрелкой. Процент метилирования указан над каждым CpG-динуклеотидом и в таблице под пинограммой

Fig. 3. Example of a pyrogram of the promoter region of the *Sept9* gene: a – pyrograms for circulating DNA (cDNA) form patient 17; б – cDNA form patient 18. The abscissa axis indicates the nucleotide order; the ordinate axis represents detected light in relative units. The “light blue” regions highlight the analyzed CpG sites, arrow indicates the marker CpG site. Percentage of methylation for the respective CpG above them and in the table below

повышение уровня метилирования маркерного сайта в ГЦК по сравнению с парными образцами прилегающей нормальной ткани печени обнаруживается в 20 (66,6 %) из 30 исследованных случаев. Эти результаты полностью согласуются с данными, полученными при анализе данных метилового профилирования образцов ГЦК из выборки TCGA-LIHC (см. табл. 1).

Кроме этого, в исследование были включены 5 архивных аутопсийных образцов печени без опухолевой или неопухолевой патологии печени, а также 7 аутопсийных образцов тканей печени с такими патологиями, как цирроз печени, диабет и стеатогепатит, а также лимфоциты здоровых доноров ($n = 23$). Гиперметилирование маркерного CpG-динуклеотида *Sept9* не выявлено ни в одном из контрольных образцов. Средний уровень метилирования маркерного сайта не превышал 4 %.

Полученные результаты полностью подтверждают наблюдения, сделанные нами при анализе баз данных, и свидетельствуют о достаточно высокой специфичности выбранного маркерного сайта метилирования, который может быть использован для дифференциальной диагностики ГЦК от доброкачественных новообразований и неопухолевых заболеваний печени.

На следующем этапе нами была апробирована возможность выявления уровня метилирования маркерного сайта во фракции цДНК пациентов с ГЦК. Для 2 пациентов с высоким (ГК 18) и низким (ГК 17) уровнем метилирования маркерного сайта *Sept9* в опухолевой ткани были проанализированы образцы цДНК, выделенной из 1 мл плазмы крови этих пациентов (рис. 3). Оба случая характеризовались большим размером опухолевого узла (> 10 см), наличием очагов некроза, отсутствием внутри- или внепеченочного метастазирования.

По данным бисульфитного секвенирования для пациента ГК 18 уровень метилирования маркерного сайта

в цДНК плазмы крови составил 42 %, тогда как для ГК 17 – 2 %, что коррелирует с уровнем метилирования этого сайта, выявленным в препаратах геномной ДНК, выделенной из опухолевой ткани пациентов (81 и 3 % для ГК 18 и 17 соответственно).

Эти результаты свидетельствуют о том, что низкий уровень фонового метилирования в нормальных тканях организма и значительная степень гиперметилирования сайта cg20275528 в тканях ГЦК позволяют уверенно детектировать опухольспецифическое метилирование этого маркера и демонстрируют принципиальную возможность его выявления в общем пуле цДНК, по крайней мере в опухолях достаточно большого размера, даже «грубым» методом бисульфитного пиросеквенирования.

Полученные нами данные позволяют рассматривать метилирование сайта cg20275528 гена *Sept9* как достаточно специфичный маркер ГЦК и указывают на целесообразность разработки высокочувствительных методов (капельная цифровая ПЦР (ddPCR), метод количественной ПЦР с последующим плавлением (DNA Melting Analysis, PCR-DMA)) [21, 22] для создания диагностических тест-систем, позволяющих выявлять aberrантное метилирование этого маркера методами жидкостной биопсии в клинических образцах плазмы крови пациентов с подозрением на первичный рак печени, для скрининга групп риска или мониторинга результатов лечения.

Результаты, полученные в настоящей работе, дополняют наблюдение A. Oussalah и соавт. о том, что гиперметилирование промоторной области гена *Sept9* может быть использовано для дифференциальной диагностики ГЦК среди пациентов с алкоголь- и гепатитиндуцированным циррозом печени. Применение одобренного для клинического использования при колоректальном раке теста Epi proColon позволило уверенно детектировать с помощью малоинвазивного анализа плазмы крови около 80 % случаев ГЦК у этих групп пациентов и продемонстрировало более высокую диагностическую точность, чем анализ на онкоэмбриональный маркер альфа-фетопротеин [13]. В нашем исследовании мы не только локализовали сайт, демонстрирующий максимальный уровень гиперметилирования при минимальных фоновых значениях в неопухоловой ткани печени (независимо от наличия или отсутствия цирроза, хронической инфекции вирусами гепатита В или С, метаболических нарушений), но и продемонстрировали, что aberrантное метилирование локуса cg20275528 позволяет дифференцировать ГЦК от доброкачественных опухолей печени. Несомненно, для определения клинической ценности предложенного маркера целесообразно проведение дополнительных исследований на расширенных выборках пациентов с ГЦК разной этиологии.

Важно отметить, что, по данным анализа разных выборок образцов ГЦК смешанной этиологии ([12], TCGA-LIHC и это исследование), уровень метилирования промоторного участка гена *Sept9* в опухолевой ткани колеблется в интервале 60–70 %.

Опыт поиска диагностических маркеров ГЦК и других форм злокачественных новообразований свидетельствует о том, что наиболее перспективным подходом является использование не единичных маркеров, а их сочетаний [7]. Например, было показано, что сочетание с другими белковыми или метиломными маркерами существенно увеличивает чувствительность использования теста Epi proColon при диагностике колоректального рака [23, 24]. Это наблюдение определяет необходимость поиска и экспериментальной верификации дополнительных маркеров метилирования ГЦК.

Накопление значительного массива данных о профилях метилирования генома различных типов опухолевых и нормальных тканей, полученных методами гибридизации с микрочипами или метиломного секвенирования на представительных коллекциях клинических образцов, открывает значительные перспективы для рационального поиска чувствительных и специфичных маркеров для опухолей различной этиологии. Разработанный и апробированный в этой работе подход к поиску и экспериментальной верификации диагностически значимых маркеров может быть использован для выявления новых дифференциально метилированных сайтов и их сочетаний, которые бы обеспечили максимально чувствительное и специфичное выявление ГЦК, верификацию диагноза и мониторинг течения заболевания.

Заключение

Таким образом, в настоящей работе на основании анализа общедоступных баз данных метиломного профилирования нами выявлен локус гена *Sept9* cg20275528, характеризующийся значительной степенью гиперметилирования в тканях ГЦК и низким уровнем фонового метилирования в нормальных тканях организма и доброкачественных опухолях печени. Дифференциальное метилирование сайта cg20275528 экспериментально подтверждено на выборке клинических образцов российских пациентов с первичными опухолями печени методом бисульфитного секвенирования. На исследованной выборке пациентов с ГЦК частота гиперметилирования составляет 66,6 %, при этом в неопухоловых тканях печени и клетках периферической крови фоновый уровень метилирования крайне низок. Эти результаты открывают возможность для разработки на их основе чувствительных методов выявления опухольспецифической ДНК в плазме крови, которые могут быть использованы для дифференциальной диагностики ГЦК, мониторинга остаточной болезни и результатов лечения. Разработанный алгоритм поиска диагностически значимых сайтов метилирования может быть использован для идентификации дополнительных метиломных маркеров, которые могут быть включены в диагностические панели для высокоспецифической и чувствительной детекции ГЦК, а также других типов злокачественных новообразований.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

- Bray F, Ferlay J., Soerjomataram I. et al. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA Cancer J Clin* 2018. DOI: 10.3322/caac.21492.
- Llovet J.M., Zucman-Rossi J., Pikarsky E. et al. Hepatocellular carcinoma. *Nat Rev Dis Primers* 2016;2:16018. DOI: 10.1038/nrdp.2016.18.
- Kulik L., El-Serag H.B. Epidemiology and management of hepatocellular carcinoma. *Gastroenterology* 2019;156(2):477–91.e1. DOI: 10.1053/j.gastro.2018.08.065.
- Abelev G.I., Eraiser T.L. Cellular aspects of alpha-fetoprotein reexpression in tumors. *Semin Cancer Biol* 1999;9(2):95–107.
- Rich N., Singal A.G. Hepatocellular carcinoma tumour markers: current role and expectations. *Best Pract Res Clin Gastroenterol* 2014;28(5):843–53. DOI: 10.1016/j.bpg.2014.07.018.
- Gai W., Sun K. Epigenetic Biomarkers in Cell-Free DNA and Applications in Liquid Biopsy. *Genes (Basel)* 2019;10(1). DOI: 10.3390/genes10010032.
- Кустова И.Ф., Макарова А.С., Лазаревич Н.Л. Потенциал использования биомаркеров метилирования для диагностики и прогноза гепатоцеллюлярной карциномы методом жидкостной биопсии. *Успехи молекулярной онкологии* 2018;5(4):8–19. DOI: 10.17650/2313-805X-2018. [Kustova I.F., Makarova A.S., Lazarevich N.L. Potential of the use of methylation biomarkers for diagnostics and prognosis of hepatocellular carcinoma in liquid biopsy. *Uspekhi molekulyarnoy onkologii = Advances in Molecular Oncology* 2018;5(4):8–19. (In Russ.).]
- De Vos T., Tetzner R., Model F. et al. Circulating methylated SEPT9 DNA in plasma is a biomarker for colorectal cancer. *Clin Chem* 2009;55(7):1337–46. DOI: 10.1373/clinchem.2008.115808.
- Wasserkort R., Kalmar A., Valcz G. et al. Aberrant septin 9 DNA methylation in colorectal cancer is restricted to a single CpG island. *BMC Cancer* 2013;13:398. DOI: 10.1186/1471-2407-13-398.
- Epigenomics, 2016. Epi proColon®. Available at: https://www.accessdata.fda.gov/cdrh_docs/pdf13/P130001C.pdf. Accessed date: 1 October 2019.
- Shen N., Wang T., Li D. et al. Hypermethylation of the Sept9 gene suggests significantly poor prognosis in cancer patients: a systematic review and meta-analysis. *Front Genet* 2019;10:887. DOI: 10.3389/fgene.2019.00887.
- Villanueva A., Portela A., Sayols S. et al. DNA methylation-based prognosis and epidrivers in hepatocellular carcinoma. *Hepatology* 2015;61(6):1945–56. DOI: 10.1002/hep.27732.
- Oussalah A., Rischer S., Bensenane M. et al. Plasma mSEPT9: a novel circulating cell-free DNA-based epigenetic biomarker to diagnose hepatocellular carcinoma. *EBioMedicine* 2018;30:138–47. DOI: 10.1016/j.ebiom.2018.03.029.
- Li J., Zhou X., Liu X. Detection of colorectal cancer in circulating cell-free DNA by methylated CpG tandem amplification and sequencing. *Clin Chem* 2019;65(7):916–26. DOI: 10.1373/clinchem.2019.301804.
- Cancer Genome Atlas Research Network. Comprehensive and Integrative Genomic Characterization of Hepatocellular Carcinoma. *Cell* 2017;169(7):1327–41.e23. DOI: 10.1016/j.cell.2017.05.046.
- Li L.C., Dahiya R. MethPrimer: designing primers for methylation PCRs. *Bioinformatics* 2002;18(11):1427–31. DOI: 10.1093/bioinformatics/18.11.1427.
- Illumina, 2011. Available at: https://support.illumina.com/array/array_kits/infinium_humanmethylation450_beadchip_kit/downloads.html. Accessed date: 1 October 2019.
- Xiong Y., Wei Y., Gu Y. et al. DiseaseMeth version 2.0: a major expansion and update of the human disease methylation database. *Nucleic Acids Res* 2017;45(D1):D888–95. DOI: 10.1093/nar/gkw1123.
- Li R., Liang F., Li M. et al. MethBank 3.0: a database of DNA methylomes across a variety of species. *Nucleic Acids Res* 2018;46(D1):D288–95. DOI: 10.1093/nar/gkx1139.
- Состояние онкологической помощи населению России в 2017 году. Под ред. А.Д. Каприна, В.В. Старинского, Г.В. Петровой. М.: МНИОИ им. П.А. Герцена – филиал ФГБУ «НМИЦ радиологии» Минздрава России, 2018. 236 с. [State of oncological care in Russia in 2017. Eds.: A.D. Kaprin, V.V. Starinskiy, G.V. Petrova. Moscow: MNIOI im. P.A. Gertsena – filial FGBU “NMIRTS radiologii” Minzdrava Rossii, 2018. 236 p. (In Russ.).]
- Wittwer C.T., Herrmann M.G., Moss A.A., Rasmussen R.P. Continuous fluorescence monitoring of rapid cycle DNA amplification. *Biotechniques* 1997;22(1):130–1. DOI: 10.2144/97221bi01.
- Malentacchi F., Forni G., Vinci S., Orlando C. Quantitative evaluation of DNA methylation by optimization of a differential-high resolution melt analysis protocol. *Nucleic Acids Res* 2009;37(12):e86. DOI: 10.1093/nar/gkp383.
- Bergheim J., Semaan A., Gevensleben H. et al. Potential of quantitative SEPT9 and SHOX2 methylation in plasmatic circulating cell-free DNA as auxiliary staging parameter in colorectal cancer: a prospective observational cohort study. *Br J Cancer* 2018;118(9):1217–28. DOI: 10.1038/s41416-018-0035-8.
- Song L., Yu H., Jia J., Li Y. A systematic review of the performance of the SEPT9 gene methylation assay in colorectal cancer screening, monitoring, diagnosis and prognosis. *Cancer Biomark* 2017;18(4):425–32. DOI: 10.3233/CBM-160321.

Вклад авторов

Н.Л. Лазаревич: разработка концепции исследования, руководство работами, интерпретация данных, написание текста статьи, анализ баз данных;

П.М. Абрамов, А.Н. Катаргин: бисульфитная конверсия и пиросеквенирование;

М.Д. Федорова: дизайн праймеров, оптимизация условий, проведение полимеразной цепной реакции, бисульфитная конверсия и пиросеквенирование;

И.Ф. Кустова, Н.А. Дьякова, В.Н. Кондратова: выделение нуклеиновых кислот;

Д.А. Шавочкина, Н.Е. Кудашкин, Ю.И. Патютко: получение клинических образцов, сбор клинических данных;

Н.П. Киселева, И.В. Ботезату: дизайн праймеров, оптимизация условий, проведение полимеразной цепной реакции;

А.В. Лихтенштейн: разработка концепции исследования, руководство работами, интерпретация данных;

С.В. Винокурова: разработка концепции исследования, руководство работами, интерпретация данных, написание текста статьи, дизайн праймеров, оптимизация условий, проведение полимеразной цепной реакции.

Authors' contributions

N.L. Lazarevich: study design, general management, data interpretation, manuscript preparation, database analysis;

P.M. Abramov, A.N. Katargin: bisulfite conversion and pyrosequencing;

M.D. Fedorova: primer design, optimization of conditions, polymerase chain reaction, bisulfite conversion and pyrosequencing;
I.F. Kustova, Dyakova, V.N. Kondratova: isolation of nucleic acids;
D.A. Shavochkina, N.E. Kudashkin, Yu.I. Patyutko: nucleic acid isolation;
N.P. Kisseljova, I.V. Botezatu: primer design, optimization of conditions, polymerase chain reaction;
A.V. Lichtenstein: study concept design, general management, data interpretation;
S.V. Vinokurova: study concept design, general management, data interpretation, manuscript preparation, primer design, optimization of conditions, polymerase chain reaction.

ORCID авторов/ORCID of authors

Н.Л. Лазаревич/N.L. Lazarevich: <https://orcid.org/0000-0001-9560-1383>
П.М. Абрамов/P.M. Abramov: <https://orcid.org/0000-0002-7995-3490>
М.Д. Федорова/M.D. Fedorova: <https://orcid.org/0000-0002-8813-7516>
И.Ф. Кустова/I.F. Kustova: <https://orcid.org/0000-0001-6480-0793>;
Д.А. Шавочкина/D.A. Shavochkina: <https://orcid.org/0000-0001-7254-8356>
А.Н. Катаргин/A.N. Katargin: <https://orcid.org/0000-0002-7405-0671>
Н.П. Киселева/N.P. Kisseljova: <https://orcid.org/0000-0003-0236-4548>
Н.А. Дьякова/N.A. Dyakova: <https://orcid.org/0000-0002-7431-7129>
И.В. Ботезату/I.V. Botezatu: <https://orcid.org/0000-0002-0297-4963>
В.Н. Кондратова/V.N. Kondratova: <https://orcid.org/0000-0003-0614-8789>
Н.Е. Кудашкин/N.E. Kudashkin: <https://orcid.org/0000-0003-0504-585X>
Ю.И. Патютко/Yu.I. Patyutko: <https://orcid.org/0000-0002-5995-4138>
А.В. Лихтенштейн/A.V. Lichtenstein: <https://orcid.org/0000-0002-0190-5069>
С.В. Винокурова/S.V. Vinokurova: <https://orcid.org/0000-0003-1615-3928>

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.
Conflict of interest. The authors declare no conflict of interest.

Финансирование. Данное исследование выполняется в рамках экспериментального государственного задания Министерства здравоохранения Российской Федерации при координации ФГБУ «Центр стратегического планирования и управления медико-биологическими рисками здоровью» Минздрава России.

Financing. The study was performed as a part of an experimental state task from the Ministry of Health of the Russian Federation under supervision of the Center for Strategic Planning and Management of Medical and Biological Health Risks, Ministry of Health of the Russian Federation.

Информированное согласие. Все пациенты подписали информированное согласие на участие в исследовании.

Informed consent. All patients gave written informed consent to participate in the study.