

© КОСТЮК С. В., КОНЬКОВА М. С., ЕРШОВА Е. С., КОНДАКОВА Ю. А., БУДЗИНСКИЙ Р. М., ШАДРИНА В. В.

УДК 577.213.3+611.018.54:616.43/45-008.9-056.7

DOI: 10.20333/2500136-2019-2-37-46

ВЛИЯНИЕ ВНЕКЛЕТОЧНОЙ ДНК И НУКЛЕАЗНОЙ АКТИВНОСТИ ПЛАЗМЫ НА ТЕЧЕНИЕ МУКОВИСЦИДОЗА

С. В. Костюк¹, М. С. Конькова¹, Е. С. Ершова¹, Ю. А. Кондакова², Р. М. Будзинский¹, В. В. Шадрина³¹Медико-генетический научный центр, Москва 115522, Российская Федерация²Городская детская клиническая больница скорой медицинской помощи, Новосибирск 630007, Российская Федерация³Пермский государственный медицинский университет им. Академика Е. А. Вагнера, Пермь 614000, Российская Федерация

Цель исследования Определение состава и роли вкДНК и нуклеазной активности плазмы крови при поражении дыхательных путей у детей, больных муковисцидозом.

Материал и методы. Проводилось исследование концентрации вкДНК и эндонуклеазной активности в плазме детей с муковисцидозом. Концентрация плазменной вкДНК исследована у 115 детей, а уровень нуклеазной активности у 117 больных и 49 здоровых детей соответствующего возраста и пола. ВкДНК выделяли методом фенольной экстракции.

Результаты. Показатель вкДНК оказался ниже значений группы здоровых детей ($p < 0,05$). Также отмечалось снижение нуклеазной активности при обострении бронхолегочного процесса ($p < 0,05$). При снижении функции легких ($ОФВ_1 < 80\%$) концентрация вкДНК снижалась. Больные со сниженной функцией легких и повышенной потребностью в бронходилататорах имели низкую нуклеазную активность.

Заключение. Изменение концентрации и состава вкДНК, а также уровень нуклеазной активности у больных МВ может иметь значение для прогнозирования тяжести течения заболевания. Расшировка качественного состава вкДНК при муковисцидозе требует дальнейшего изучения для определения его роли в развитии хронического воспалительного процесса. Изучение вкДНК и нуклеазной активности при МВ может быть использовано в разработке нового патогенетического лечения.

Ключевые слова: муковисцидоз, педиатрия, вкДНК, внеклеточная ДНК, нуклеазная активность, легочная функция.

Конфликт интересов. Авторы декларируют отсутствие явных и потенциальных конфликтов интересов, связанных с публикацией настоящей статьи.

Для цитирования: Костюк СВ, Конькова МС, Ершова ЕС, Кондакова ЮА, Будзинский РМ, Шадрина ВВ. Влияние внеклеточной ДНК и нуклеазной активности плазмы на течение муковисцидоза. *Сибирское медицинское обозрение*. 2019;(2):37-46. DOI: 10.20333/2500136-2019-2-37-46

EFFECT OF EXTRACELLULAR DNA AND NUCLEASE PLASMA ACTIVITY ON THE COURSE OF CYSTIC FIBROSIS

S.V. Kostyuk¹, M. S. Kon'kova¹, E. S. Ershova¹, Yu. A. Kondakova², R. M. Budzinskiy¹, V. V. Shadrina³¹Research Center for Medical Genetic, Moscow 115522, Russian Federation²City Children's Clinical Emergency Hospital, Novosibirsk 630007, Russian Federation³Perm State Medical University named after Academician Ye. A. Wagner, Perm 614000, Russian Federation

The aim of the research is to determine composition and role of eDNA and plasma nuclease activity in respiratory tract in children with cystic fibrosis.

Material and methods. The study of eDNA and endonuclease activity in plasma of children with cystic fibrosis was conducted. Concentration of plasma eDNA was studied in 115 children, while the level of nuclease activity was studied in 117 patients and 49 healthy children of appropriate age and sex. eDNA was isolated by phenol extraction method.

Results. eDNA index was lower than the one in the group of healthy children ($p < 0,05$). Also, there was a decrease in nuclease activity during the acute bronchopulmonary process ($p < 0,05$). When lung function decreases ($FEV1 < 80\%$), eDNA concentration decreased too. Patients with reduced lung function and increased need for bronchodilators had low nuclease activity.

Conclusion. Changes in eDNA concentration and composition, as well as the level of nuclease activity in patients with CF, can be important for prognosing disease severity. Decoding qualitative composition of eDNA in case of cystic fibrosis requires further study to determine its role in chronic inflammatory process development. The study of eDNA and nuclease activity in case of CF can be used in the development of new pathogenetic treatment.

Key words: cystic fibrosis, paediatrics, eDNA, extracellular DNA, nuclease, pulmonary function.

Conflict of interest. The authors declare the absence of obvious and potential conflicts of interest associated with the publication of this article.

Citation: Kostyuk SV, Kon'kova MS, Ershova ES, Kondakova YuA, Budzinskiy RM, Shadrina VV. Effect of extracellular DNA and nuclease plasma activity on the course of cystic fibrosis. *Siberian Medical Review*. 2019;(2):37-46. DOI: 10.20333/2500136-2019-2-37-46

Введение

Муковисцидоз (МВ) – тяжелое наследственное заболевание с поражением практически всех систем организма. При муковисцидозе в результате нарушения проводимости хлорных каналов изменяется реология секретов, что приводит к нарушению функций преимущественно бронхолегочной и пищеварительной систем. Особенности изменений бронхолегочной

системы создают предпосылки к присоединению вторичной особенно патогенной инфекции и формированию хронического воспаления. Изучение маркеров воспаления при различных заболеваниях, в том числе и при муковисцидозе, представляет большой интерес.

Внеклеточная ДНК (вкДНК) – фракция ДНК, не связанная с клетками. Исследование роли вкДНК и ДНКазной активности в организме человека

неуклонно растет. Во многих исследованиях вкДНК рассматривали как маркер для диагностики при различных патологических состояниях организма. Накапливаются сведения о качественном и количественном составе внеклеточной ДНК при онкологических заболеваниях [1], во время беременности (ДНК плода), аутоиммунных заболеваниях [2], при радиационных поражениях, острых и хронических воспалительных заболеваниях [3], критических состояниях. В большинстве научных работ повышение концентрации внеклеточной ДНК наблюдалось при острой патологии и при обострении хронического процесса, в то время как снижение концентрации вкДНК чаще описано при хронических заболеваниях вне обострения [4].

Целью настоящего исследования являлось определить состав и роль вкДНК и нуклеазной активности плазмы крови при поражении дыхательных путей у детей, больных муковисцидозом.

Материал и методы

В исследовании приняли участие 117 детей, больных муковисцидозом, из них 70 девочек и 47 мальчиков. Средний возраст больных составил $6,9 \pm 4,25$ лет. Дети были условно разделены на четыре возрастные группы: от 0 до 3 лет (34 человека), от 4 до 7 лет (43 человека), от 8 до 11 лет (24 человека), от 12 лет до 15 лет (11 человек), от 16 до 18 лет (5 человек). Диагноз муковисцидоз был установлен согласно диагностическим критериям Европейского Консенсуса (2017) и Национального Консенсуса «Муковисцидоз: определение, диагностические критерии, терапия» (2016). Детям было проведено комплексное клиническое обследование согласно Клиническим рекомендациям [5]. Кроме того, отдельно была проанализирована однородная группа больных из 37 детей с мутацией гена CFTR F508del в гомозиготном состоянии. Контрольная группа составила 49 здоровых детей соответствующего возраста и пола, без признаков острого респираторного заболевания в течение последних 2 месяцев. Концентрация вкДНК была определена у 115 детей, нуклеазная активность – у 117 детей. Протокол исследования был одобрен на заседании этического комитета при ФГБНУ «МГНЦ». Информированное добровольное согласие было получено от всех участников исследования.

Образцы крови собирали в пробирки вакутейнеры. Для получения плазмы крови в качестве антикоагулянта был выбран гепарин. Выбор между антикоагулянтом ЭДТА и гепарином в пользу гепарина обусловлен тем, что, помимо концентрации вкДНК, мы запланировали тестирование эндонуклеазной активности плазмы крови. ЭДТА же, связывая ионы магния, блокирует активность эндонуклеаз.

Образцы крови инкубировали при комнатной температуре в течение 30 мин и затем центрифугировали при 4000 оборотов, забирали в пробирку плазму 2 мл и более, замораживали при температуре минус 18-20 градусов до анализа.

Внеклеточную и геномную ДНК (соответственно, из плазмы и красных осадков периферической крови) выделяли экстракцией органическими растворителями.

Концентрацию геномной ДНК измеряли спектрофотометрически. Относительная стандартная ошибка измерения составляет ± 3 %. Для измерения концентрации вкДНК использовали флуоресцентный интеркалирующий краситель PicoGreen (Invitrogen), имеющий наибольшую чувствительность в отношении двухцепочечной нуклеиновой кислоты, и, согласно нашим данным, наименьшую погрешность измерения, связанную с фрагментацией ДНК и при возможном присутствии примесей. Измерение проводили в трех повторях для каждого образца на планшетном спектрофлуориметре EnSpire (PerkinElmer), для дополнительного исключения влияния примесей флуоресценцию определяли и после исчерпывающего гидролиза пробы ДНКазой. Относительная стандартная ошибка этого анализа составляет 12 ± 5 % от измеряемой величины и определяется процедурой выделения ДНК. Для контроля выделения и оценки фрагментации ДНК проводили электрофорез в 1 % агарозном геле.

Содержание высококопийных последовательностей генома определяли с помощью метода количественной дот-гибридизации с биотинированными зондами. Согласно данным, полученным ранее, этот метод малочувствителен к наличию разрывов и повреждений ДНК в отличие от ПЦР в реальном времени. Для этого пробы вкДНК денатурировали щелочью, затем нейтрализовали равным объемом 20-тикратного буфера SSC, титрованного до pH 4,0 фосфорной кислотой и сразу наносили на нитроцеллюлозный фильтр, каждый образец ДНК наносили в 3-5 повторях. Иммуобилизовали ДНК 90 мин при 80 С, затем фильтр смачивали в растворе $2 \times SSC$ и проводили предгибридизацию при 55°C в течение 15 мин. в буфере (2,5 нг/мл BSA; 2,5 нг/мл фикоил; 2,5 нг/мл поливинилпирролидон, 10 % додецилсульфат натрия, 0,1М ТРИС pH 7,6). Затем добавляли соответствующие биотинилированные зонды и инкубировали 1 час при 55 С.

Последовательности олигонуклеотидных зондов для определения митохондриальных повторов: (Biotin)-CGCTTCTGGCCACAGCACTTAAAC, (Biotin)-CCCATCATACTCTTTCACCCACAGCA; рибосомного повтора: (Biotin)-CTTAATGATCCTTCCGCAGGTTACCTAC, (Biotin)-TATCGGTCTCGTGCCGGTATTAGCCTTAG.

После отмывок (0,1 % SDS (2 раза по 10 мин) и $0,2 \times SSC$ и 0,1 % SDS (10 мин при 60 С), и блокировки фильтра (0,1 % обезжиренного молока, 0,1 % желатина, 0,05 МТрис-НCl, pH 7,5, 0,1М NaCl, 10 мин) биотин выявляли конъюгатом стрептавидин – щелочная фосфатаза («Sigma», США) с использованием субстрата BCIP-NBT, («Sigma», США). Гибридационный сигнал оценивали компьютерным анализом изображения фильтра с помощью, разработанной ранее программы «Images 6,0». Для построения

калибровочной зависимости количества определяемой последовательности в образце ДНК от гибридационного сигнала на фильтр наносили ДНК донора, для генома которого ранее было определено количество анализируемых последовательностей.

Проводилось исследование возрастных изменений в составе вкДНК пациентов с муковисцидозом в период обострения и ремиссии. Участники исследования были разделены на 4 группы: 1) 0-2 года; 2) 3-6 лет; 3) 7-10 лет; 4) 11-17 лет.

Потовый тест определяли методом проводимости на аппарате «Нанодакт» EliTechGroup Inc., США (при определении проводимости положительным результатом для муковисцидоза считается показатель: выше 80 ммоль/л; пограничным значением – 50-80 ммоль/л; нормальным – до 50 ммоль/л).

Микробиологическое исследование секрета дыхательных путей проводили в ФГБУ «НИЦЭМ им. Н. Ф. Гамалеи» Минздрава России.

Детям с 6 лет функцию внешнего дыхания определяли с помощью спирографа EasyOne Pro[®]. Оценивали объем форсированного выдоха на 1 сек (ОФВ₁) и функциональную жизненную емкость легких (ФЖЕЛ). При анализе показателей, полученных при исследовании ФВД, использовали должные величины по G. Polgar, V. Promadhat для детей [6,7]. Результаты выражали в процентах от должного значения: полученное значение/должное значение × 100 %. Физическое развитие оценивали с использованием программ WHO Anthro и WHO Anthro plus.

Статистический анализ проводился с помощью программного обеспечения IBM[®] SPSS[®] Statistics Version 17.0. Данные анализировали на соответствие распределения значений изучаемого признака закону нормального распределения. Данные представлены как медиана (Me) и квартили (Q1 - Q3). Статистический анализ проводили при помощи непараметрического теста U-критерия Манна-Уитни (для оценки различий между двумя независимыми выборками). Различия считались статистически значимыми при $p < 0,05$.

Результаты и обсуждение

При анализе анамнеза заболевания установлено, что диагноз был заподозрен на основе повышения иммунореактивного трипсиногена (ИРТ) у новорожденных при проведении неонатального скрининга на муковисцидоз (схема ИРТ/ИРТ). У 84 (71,8 %) детей результаты неонатального скрининга были положительные. 5 (4,3 %) детей имели отрицательные значения неонатального скрининга. У 28 (23,9 %) больных данных о скрининге не было. Диагноз муковисцидоз был подтвержден на основании положительных результатов потовой пробы. Медиана содержания электролитов пота составила 110 ммоль/л при первом определении и 104 ммоль/л при втором определении (97-119 ммоль/л и 81,5-117,5 ммоль/л). Средний возраст установления диагноза составил $1,8 \pm 2,3$ года. В дебюте заболевания у 13 (11,1 %) развился ме-кониальный илеус.

Генетическое исследование было проведено 111 пациентам. Две мутации были определены у 85 больных, одна известная мутация – у 24, не идентифицирован генотип – у 2 больных. Аллельная частота встречаемости мутации F508del составила 51,8 %, а количество гомозигот по данной мутации 34 человека. Кроме того, дополнительно выявлены мутации I и 2 класса, формирующие «тяжелый» фенотип у 26 пациентов. Мутации IV и V классов, определяющие «мягкий» фенотип выявлены у 20 пациентов. 5 пациентов имели «неопределенный фенотип».

На момент исследования 35 (29,9 %) имели признаки обострения бронхолегочного процесса. Полипозный синусит был выявлен у 10 (8,5 %) больных. Высев синегнойной инфекции и неферментирующей грамотрицательной флоры (НФМО) выявлен у 35 (29,9 %) пациентов и инфицирование золотистым стафилококком – у 66 пациентов (56,4 %), у 16 пациентов микробиологический диагноз не известен. В группе пациентов, гомозиготных по мутации F508del – синегнойная и другая грамотрицательная флора у 13 пациентов (38, 2%) и хронический высев золотистого стафилококка имели 18 пациентов (52,9 %) соответственно, у троих пациентов микробиологический диагноз неизвестен.

Концентрация вкДНК составила 452,00 (208,00-764,00) нг/мл в группе больных муковисцидозом, в группе контроля - 641,90 (368,00-1250,30) нг/мл, что было статистически значимо выше, чем при муковисцидозе ($p = 0,0005$). Нуклеазная активность в группе больных муковисцидозом составила 15,10 (8,40-21,20) Ед. акт., в группе контроля – 14,00 (7,70-22,00) Ед. акт., ($p = 0,4329$) (табл. 1).

У больных в период обострения бронхолегочного процесса, в сравнении с группой больных в ремиссии, не выявлено статистически значимого изменения концентрации вкДНК (табл. 2). В то же время, при обострении бронхолегочного процесса зарегистрировано снижение нуклеазной активности ($p < 0,05$).

Таблица 1

Показатели концентрации вкДНК (нг/мл) и нуклеазной активности плазмы (Ед. акт.), Me (Q1 -Q3)

Table 1

Indicators of concentration of eDNA (ng / ml) and plasma nuclease activity (Activity Unit), Me (Q1 -Q3)

Показатель	Больные	Контроль	Уровень значимости
n	115	49	
вкДНК	452,00 (208,00-764,00)	641,90 (368,00-1250,30)	0,0005
n	117	49	
Нуклеазная активность	15,10 (8,40-21,20)	14,00 (7,70-22,00)	0,4329

Таблица 2

Концентрация вкДНК(нг/мл) и нуклеазная активность (Ед. акт.) при обострении и ремиссии бронхолегочного процесса в общей группе и группе пациентов с генотипом F508del/F508del, Me (Q1-Q3)

Table 2

eDNA concentration (ng / ml) and nuclease activity (Unit) during acute state and remission of bronchopulmonary process in general group and in group of patients with genotype F508del / F508del, Me (Q1 -Q3)

Периоды болезни	Концентрация вкДНК	Уровень значимости	Нуклеазная активность	Уровень значимости
Общая группа				
Обострение (n =35)	350,00 (193,00-807,00)	0,7979	13,17 (7,10-18,60)	0,0362
Ремиссия (n = 77)	454,00 (208,00-759,00)		16,44 (9,70-23,20)	
Группа пациентов с генотипом F508del/F508del				
Обострение (n=13)	328,00 (158,00-493,00)	0,8068	10,40 (7,50-20,20)	0,0217
Ремиссия (n=21)	318,00 (208,00-687,00)		22,85 (11,20-25,40)	

Также проведен статистический анализ на выявление зависимости концентрации вкДНК и нуклеазной активности от других маркеров воспаления. Концентрация вкДНК и уровень нуклеазной активности не зависели от показателя СОЭ (при СОЭ менее 15 мм/ч уровень вкДНК составлял 493,00 (255-685) нг/мл, нуклеазной активности 16,10 (7,9-23,2) Ед. акт., при СОЭ более 15 мм/ч 328,00 (138,00-738,00) нг/мл и 10,40 (8,40-15,10) Ед. акт., соответственно (p=0,5670 и p=0,4346, соответственно)). При уровне лейкоцитов менее 10 x 10⁹/л концентрация вкДНК составила 289,50 (161,00-577,00) нг/мл, при лейкоцитозе более 10 x 10⁹/л отмечалось повышение концентрации вкДНК в плазме крови — 532,00 (320,00-1384,00) нг/мл (p=0,0619), зависимости между лейкоцитозом и уровнем нуклеазной активности не получено: 15,10 (8,40-21,20) Ед. акт., при уровне лейкоцитов менее 10 x 10⁹/л и 15,60 (7,50-16,30) Ед. акт., при уровне лейкоцитов более 10 x 10⁹ (p=0,3138).

Количество рибосомальных и митохондриальных повторов в составе вкДНК было исследовано у 73 пациентов, 47 из них находилось в состоянии ремиссии, 26 – в состоянии обострения бронхолегочного процесса. Анализ полученных результатов не выявил статистически значимых различий по количеству рибосомальных (рДНК) и митохондриальных повторов в составе вкДНК в период обострения и ремиссии (табл. 3).

Таблица 3

Количество рибосомальных и митохондриальных повторов в составе вкДНК пациентов с муковисцидозом (общая выборка)

Table 3

The number of ribosomal and mitochondrial repeats in eDNA composition of patients with cystic fibrosis (total sample)

	Ремиссия			Обострение			Уровень значимости
	n	M±m	Me Q ₁ -Q ₃	n	M±m	Me Q ₁ -Q ₃	
Мит. повторы (число копий)	46	336,90±45,30	244,50 38,00-1838,00	26	348,70±78,90	223,50 18,00-1599,00	0,3544
Риб. повторы (число копий)	47	616,20±19,10	600,00 363,0-842,0	25	605,40±26,30	600,00 379,00-898,00	0,7720
Мит. повторы (в пересчете на ген. ДНК)	46	1,41±0,24	0,94 0,00-6,97	24	1,65±0,38	0,92 0,04-6,13	0,8479
Риб. повторы (в пересчете на ген. ДНК)	46	1,12±0,05	1,05 0,69-1,99	23	1,12±0,06	1,09 0,64-1,70	0,7073

При анализе содержания вкДНК в зависимости от возраста больных достоверных различий не выявлено (p>0.05). Максимальные показатели концентрации вкДНК 4433 нг/мл были получены в возрастной группе от 8 до 11 лет. Минимальные показатели вкДНК 0 были в возрастной группе до 3 лет (рис. 1).

С возрастом наблюдалась тенденция к снижению концентрации вкДНК, при этом, нуклеазная активность статистически значимо снижалась с возрастом (p< 0,05) (рис. 2). Оценка возрастных особенностей была продолжена на основе анализа количества рибосомальных и митохондриальных повторов в составе вкДНК пациентов с муковисцидозом различных возрастных групп (табл. 4). Содержание митохондриального повтора в образцах вкДНК в пересчете на содержание этого повтора в ДНК

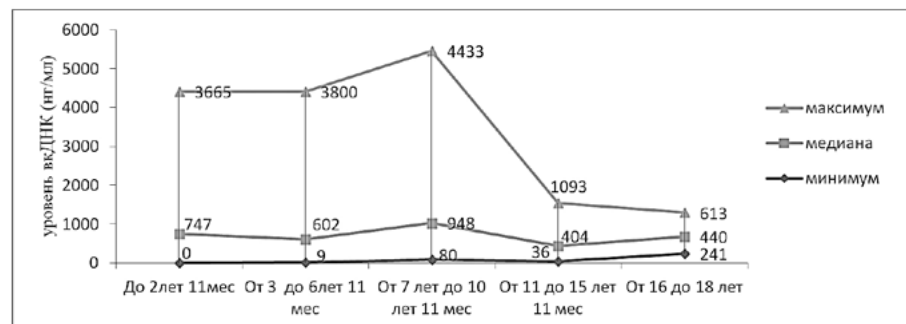


Рисунок 1. Распределение показателей вкДНК (нг/мл) в различных возрастных группах.

Figure 1. Distribution of eDNA indexes (ng / ml) in various age groups.

пациентов в возрасте 3-6 лет было статистически значимо ниже соответствующего параметра в группе детей до 3 лет: $0,98 \pm 0,33$ vs $2,27 \pm 0,54$ отн. ед. ($p=0,0098$). В группе детей 7-10 лет была отмечена выраженная тенденция к снижению содержания митохондриального повтора в составе вкДНК по сравнению с группой самых маленьких пациентов: $1,49 \pm 0,59$ против $2,27 \pm 0,54$ отн. ед. ($p=0,0760$). В старшей группе детей (11-17 лет) среднее содержание митохондриального повтора

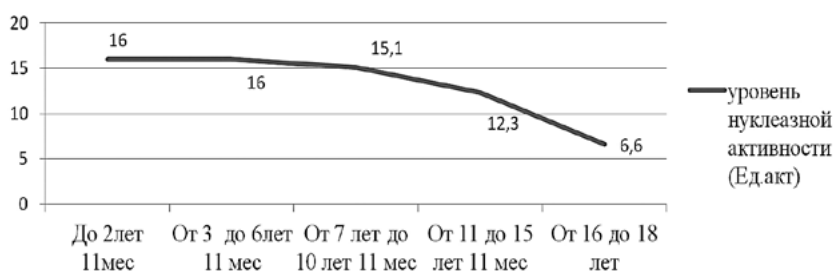


Рисунок 2. Значение нуклеазной активности в различных возрастных группах, (Ед. акт.).

Figure 2. Significance of nuclease activity in different age groups, (Activity Unit).

Таблица 4

Количество рибосомальных и митохондриальных повторов в составе вкДНК пациентов с муковисцидозом различных возрастных групп

Table 4

Number of ribosomal and mitochondrial repeats in eDNA composition of patients with cystic fibrosis in different age groups

Ремиссия							
Возраст		Митохондриальный повтор			Рибосомальный повтор		
		M±m	Me Q ₁ -Q ₃	Уровень значимости	M±m	Me Q ₁ -Q ₃	Уровень значимости
До 3 лет n=8 (1)	Копийность	541,00± 194,70	387,50 131,00-1838,00	—	674,90± 51,50	688,50 446,00-825,00	—
	В пересчете на ген.ДНК	2,27± 0,54	2,20 0,52-5,31	—	1,25± 0,12	1,22 0,81-1,67	—
3-6 лет n=18 (2)	Копийность	241,10± 35,00	191,00 38,00-555,00	p _{1,2} =0,0670	583,50± 27,50	590,00 363,00-774,00	p _{1,2} =0,1053
	В пересчете на ген. ДНК	0,98± 0,33	0,60 0,10-6,32	p _{1,2} =0,0098	1,03± 0,06	0,96 0,69-1,79	p _{1,2} =0,1917
7-10 лет n=12 (3)	Копийность	375,50± 83,70	279,50 111,00-944,00	p _{1,3} =0,5120 p _{2,3} =0,2825	622,40± 36,60	598,00 423,00-841,00	p _{1,3} =0,4470 p _{2,3} =0,4429
	В пересчете на ген. ДНК	1,49± 0,59	0,43 0,00-6,97	p _{1,3} =0,0760 p _{2,3} =0,7947	1,12± 0,11	1,06 0,70-1,99	p _{1,3} =0,2937 p _{2,3} =0,7037
11-17 лет n=7 (4)	Копийность	297,60± 76,40	361,00 51,00-537,00	p _{1,4} =0,4519 p _{2,4} =0,5632 p _{3,4} =0,7037	626,40± 54,50	607,00 396,00-842,00	p _{1,4} =0,6025 p _{2,4} =0,4524 p _{3,4} =0,8741
	В пересчете на ген. ДНК	1,41± 0,48	1,11 0,16-3,28	p _{1,4} =0,2716 p _{2,4} =0,5251 p _{3,4} =0,8121	1,20± 0,12	1,12 0,74-1,63	p _{1,4} =0,6854 p _{2,4} =0,2147 p _{3,4} =0,4281
Обострение							
Возраст		Митохондриальные повторы			Рибосомальные повторы		
		M±m	Me Q ₁ -Q ₃	Уровень значимости	M±m	Me Q ₁ -Q ₃	Уровень значимости
До 3 лет n=4 (1)	Копийность	224,80± 61,70	214,00 98,00-373,00	—	529,80± 56,60	534,50 403,00-647,00	—
	В пересчете на ген.ДНК	0,86± 0,18	0,85 0,45-1,31	—	0,94± 0,10	0,90 0,75-1,21	—
3-6 лет n=8 (2)	Копийность	513,00± 180,80	338,50 18,00-1599,00	p _{1,2} =0,2696	658,50± 35,50	626,00 589,00-898,00	p _{1,2} =0,2027
	В пересчете на ген.ДНК	2,17± 0,71	1,26 0,04-6,08	p _{1,2} =0,1488	1,21± 0,08	1,16 0,94-1,56	p _{1,2} =0,1066
7-10 лет n=8 (3)	Копийность	163,90± 54,10	105,00 18,00-375,00	p _{1,3} =0,5083 p _{2,3} =0,1182	572,40± 60,50	546,00 379,00-789,00	p _{1,3} =0,7768 p _{2,3} =0,2243
	В пересчете на ген.ДНК	0,58± 0,27	0,23 0,04-1,56	p _{1,3} =0,3374 p _{2,3} =0,1752	1,05± 0,15	0,99 0,64-1,65	p _{1,3} =0,9151 p _{2,3} =0,4014
11-17 лет n=5 (4)	Копийность	521,4± 255,20	267,00 18,00-1340,00	p _{1,4} =1,0000 p _{2,4} =0,6606 p _{3,4} =0,4649	673,30± 72,90	672,00 511,00-838,00	p _{1,4} =0,2482 p _{2,4} =0,9323 p _{3,4} =0,3951
	В пересчете на ген.ДНК	2,97± 1,18	3,48 0,14-6,13	p _{1,4} =0,7133 p _{2,4} =0,7144 p _{3,4} =0,1207	1,31± 0,16	1,31 0,94-1,70	p _{1,4} =0,1939 p _{2,4} =0,7989 p _{3,4} =0,2410

составило $1,41 \pm 0,48$ отн.ед. Этот показатель существенно ниже, чем у детей до 3-х лет, однако статистически значимых различий между группами обнаружено не было, возможно, в связи с малой численностью обеих групп.

В период обострения значимых возрастных различий по количеству митохондриальных и рибосомальных повторов в составе вкДНК обнаружено не было (табл. 5). При сравнении показателей детей разных возрастных групп в периоды обострения и ремиссии были выявлены приближающиеся к уровню значимости разнонаправленные колебания количества митохондриальных повторов у детей от 0 до 10 лет. Возможно, наблюдаемые колебания отражают высокую вариабельность данного параметра и связаны с малой численностью пациентов, обследованных в период обострения.

В выборке больных муковисцидозом в период обострения в составе вкДНК содержится $605,30 \pm 26,20$ копий рДНК (приводятся значение среднего и стандартной ошибки), в период ремиссии – $616,20 \pm 19,1$, копий рДНК, что значительно превышает число копий рДНК в группе здоровых детей ($94,80 \pm 18,10$ копий рДНК), соответственно $p < 10^{-13}$, $p < 10^{-10}$. При этом во всей выборке больных муковисцидозом не обнаружено различий по числу копий рДНК в период ремиссии и обострения ($p > 0,5$) (рис. 3).

При анализе уровня концентрации вкДНК и нуклеазной активности в зависимости от пола, достоверных различий не выявлено ($p > 0,0500$). При сравнении «тяжелых» и «мягких» генотипов имеется тенденция к более низким показателям концентрации вкДНК у больных, обладающих «тяжелыми» мутациями ($p = 0,0906$). Зависимости уровня нуклеазной активности от генотипа не выявлено.

Таблица 5

Количество рибосомальных и митохондриальных повторов в составе вкДНК пациентов с муковисцидозом различных возрастных групп (сравнение периодов обострения и ремиссии)

Table 5

Number of ribosomal and mitochondrial repeats in eDNA composition of patients with cystic fibrosis in different age groups (comparison of acute state and remission periods)

Митохондриальный повтор						
Возраст		Ремиссия		Обострение		Уровень значимости
		M±m	Me Q ₁ -Q ₃	M±m	Me Q ₁ -Q ₃	
До 3 лет (1)	Копийность	541,00±194,70	387,50 131,00-1838,00	224,80±61,70	214,00 98,00-373,00	0,2027
	В пересчете на ген.ДНК	2,27±0,54	2,20 0,52-5,31	0,86±0,18	0,85 0,45-1,31	0,0745
3-6 лет (2)	Копийность	241,10±35,00	191,00 38,00-555,00	513,00±180,80	338,50 18,00-1599,00	0,2121
	В пересчете на ген.ДНК	0,98±0,33	0,60 0,10-6,32	2,17±0,71	1,26 0,04-6,08	0,0801
7-10 лет (3)	Копийность	375,50±83,70	279,50 111,00-944,00	163,90±54,10	105,00 18,00-375,00	0,0572
	В пересчете на ген.ДНК	1,49±0,59	0,43 0,00-6,97	0,58±0,27	0,23 0,04-1,56	0,3132
11-17 лет (4)	Копийность	297,60±76,40	361,00 51,00-537,00	521,40±255,20	267,00 18,00-1340,00	0,8710
	В пересчете на ген.ДНК	1,41±0,48	1,11 0,16-3,28	2,97±1,18	3,48 0,14-6,13	0,4168
Рибосомальный повтор						
Возраст		Ремиссия		Обострение		Уровень значимости
		M±m	Медиана Min-Max	M±m	Me Q ₁ -Q ₃	
До 3 лет (1)	Копийность	674,90±51,50	688,50 446,00-825,00	529,80±56,60	534,50 403,00-647,00	0,2027
	В пересчете на ген.ДНК	1,25±0,12	1,22 0,81-1,67	0,94±0,10	0,90 0,75-1,21	0,2027
3-6 лет (2)	Копийность	583,50±27,50	590,00 363,00-774,00	658,50±35,50	626,00 589,00-898,00	0,2764
	В пересчете на ген.ДНК	1,03±0,06	0,96 0,69-1,79	1,21±0,08	1,16 0,94-1,56	0,0710
7-10 лет (3)	Копийность	622,40±36,60	598,00 423,00-841,00	572,40±60,50	546,00 379,00-789,00	0,4757
	В пересчете на ген.ДНК	1,12±0,11	1,06 0,70-1,99	1,05±0,15	0,99 0,64-1,65	0,8953
11-17 лет (4)	Копийность	626,40±54,50	607,00 396,00-842,00	673,30±72,90	672,00 511,00-838,00	0,8501
	В пересчете на ген.ДНК	1,20±0,12	1,12 0,74-1,63	1,31±0,16	1,31 0,94-1,70	0,5083

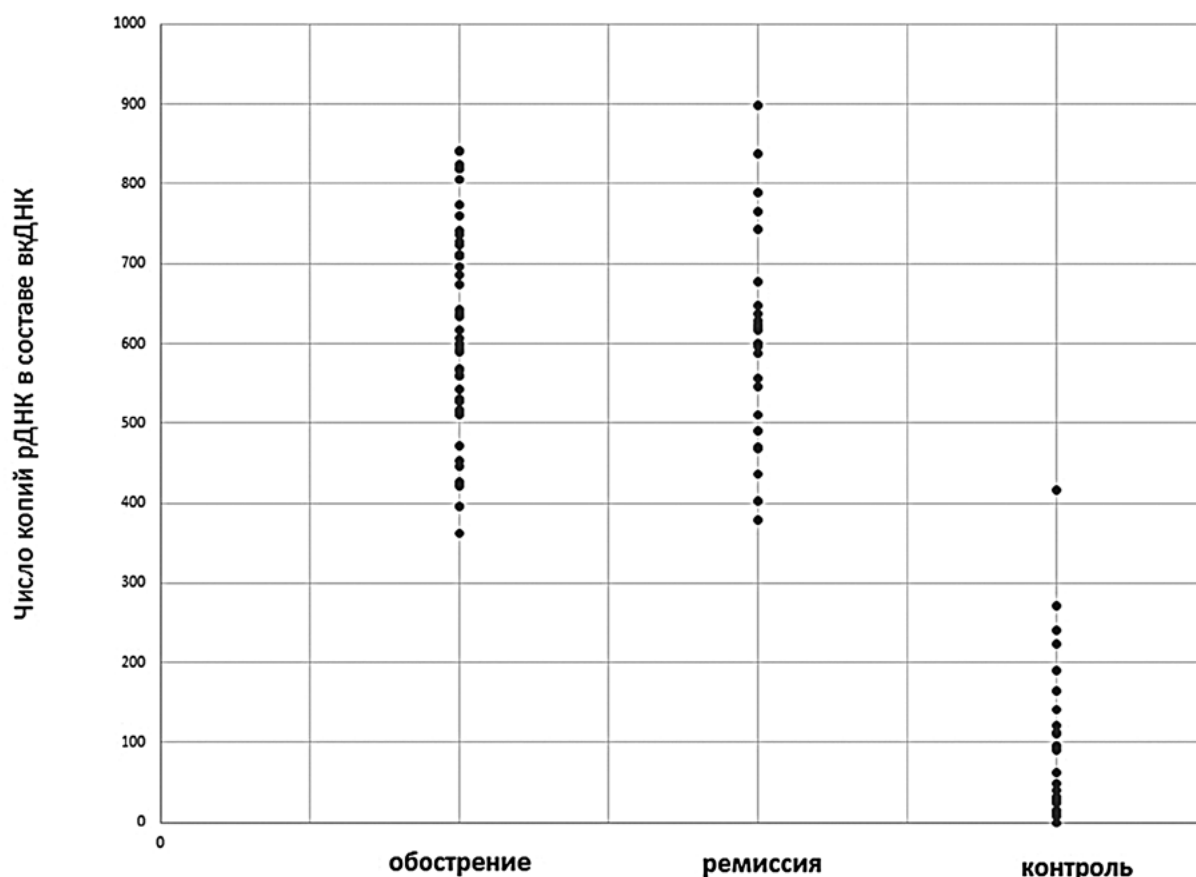


Рисунок 3. Распределение значений уровня рибосомальной ДНК в составе вкДНК в контроле и при муковисцидозе при обострении и ремиссии.

Figure 3. Distribution of values of ribosomal DNA level in eDNA structure in check group and in case of cystic fibrosis during acute period and remission.

Содержание вкДНК (нг/мл) снижалось при снижении функции внешнего дыхания, по показателю $ОФВ_1$. При $ОФВ_1$ более 100 % концентрация составила 967,50 (430,50-1457,50) нг/мл, а при $ОФВ_1$ менее 80 % – 230,00 (189,00-260,00) нг/мл, $p = 0,0317$. Не было выявлено статистически значимой зависимости значений $ОФВ_1$ от уровня нуклеазной активности. В отношении ФЖЕЛ отмечена тенденция к повышению содержания вкДНК при повышении функции легких, так при ФЖЕЛ до 60 % медиана нуклеазной активности составила 10,45 Ед. акт., 60-80 % – медиана нуклеазной активности составила 7,90 Ед. акт., от 80 до 100 % составила 12,25 Ед. акт., более 100 % – 15,55 Ед. акт., но без статистически значимой разницы между группами.

В группе больных с высевом синегнойной палочки и другой НФМО, в сравнении с группой пациентов с хронической стафилококковой инфекцией, не выявлено различий по концентрации вкДНК и нуклеазной активности. При анализе уровня вкДНК и нуклеазной активности в группе пациентов с генотипом F508del/F508del, в зависимости от микробиологического статуса, установлено повышение нуклеазной активности в группе больных с синегнойной инфекцией и другой НФМО ($p=0,018$) (табл. 6).

Таблица 6

Концентрация вкДНК (нг/мл) и нуклеазной активности (Ед. акт) в зависимости от микрофлоры дыхательного тракта в общей группе больных муковисцидозом и в группе пациентов с генотипом F508del/F508del, Me(Q1 -Q3)

Table 6

Concentration of eDNA (ng / ml) and nuclease activity (Activity Unit) depending on respiratory tract microflora in general group of patients with cystic fibrosis and in group of patients with genotype F508del / F508del, Me (Q1 -Q3)

Показатель	Микробиологический статус дыхательного тракта в общей группе		Уровень значимости
	Стафилококковая инфекция	Синегнойная инфекция и НФМО	
n	66	35	
вкДНК	503,50 (196,00-963,00)	361,00 (226,00-687,00)	0,6087
Нуклеазная активность	13,55 (8,12-17,77)	16,10 (7,10-25,40)	0,2979
Микробиологический статус дыхательного тракта в группе пациентов с генотипом F508del/F508del			
n	18	13	Уровень значимости
вкДНК	268,00 (160,50-533,50)	328,00 (276,00-687,00)	0,563
Нуклеазная активность	15,10 (9,70-22,50)	25,40 (10,50-28,70)	0,018

Терапия базисными препаратами, такими как гипертонический раствор, стероиды, азитромицин и другими антибиотиками не связана с изменениями концентрации вкДНК и уровнем нуклеазной активности. В группе пациентов, регулярно получающих бронходилататоры; уровень нуклеазной активности составил по медиане 13,00 Ед.акт. (7,50-17,50), а в группе без бронхорасширяющей терапии медиана нуклеазной активности составила 16,30 (10,40-22,85) Ед.акт, что статистически значимо выше (табл. 7).

Циркулирующая внеклеточная ДНК (вкДНК) присутствует в кровотоке и других биологических жидкостях как здоровых, так и больных людей. Концентрация вкДНК повышена при ряде патологий в период обострения (при аутоиммунных, сердечно-сосудистых, онкологических заболеваниях) и при воздействии повреждающих факторов [8, 9] вкДНК активно взаимодействует с клетками организма, активируя через рецепторы TLR9 NF-kB-сигнальный путь и вызывая реакцию воспаления. Концентрация вкДНК регулируется активностью эндонуклеаз [9].

У больных МВ очень вязкий секрет в дыхательном тракте, это связано с нарушением работы хлорного канала, вызванного мутациями в гене *CFTR* (данные Национального Консенсуса «Муковисцидоз: определение, диагностические критерии, терапия» (2016)). Известно, что у больных муковисцидозом в бронхиальном секрете накапливается вкДНК, основным источником являются нейтрофилы, что еще больше увеличивает вязкость мокроты и приводит к нарушению мукоцилиарного клиренса. В связи с чем требуется проведение регулярной муколитической терапии, в первую очередь, Дорназой альфа в качестве патогенетического лечения [5].

Первоначальное предположение авторов исследования о том, что в плазме крови пациентов с муковисцидозом концентрация внеклеточной ДНК (вкДНК) повышена, по сравнению со здоровым контролем, не подтвердилась. Показатель вкДНК оказался ниже значений группы здоровых детей (табл. 1).

При этом, уровень нуклеазной активности плазмы крови больных муковисцидозом снижался с возрастом ($p < 0,0001$) и одновременно прогрессировало заболевание.

Нами показано, что при нормальной функции легких, по данным спирометрии и показателю $ОФВ_1 > 80\%$, содержание вкДНК не отличается от показателей контрольной группы. При снижении функции легких ($ОФВ_1 < 80\%$) концентрация вкДНК понижается. Больные со сниженной функцией легких и повышенной потребностью в бронходилататорах имели низкую нуклеазную активность, что вероятно имеет компенсаторный характер.

Существует несколько гипотез о происхождении внеклеточной ДНК, основными из которых являются – образование пула внеклеточных нуклеиновых кислот в результате гибели клеток («гипотеза клеточной

Таблица 7

Концентрация вкДНК (нг/мл) и уровень нуклеазной активности (Ед.акт) при постоянном применении бронходилататоров, Me(Q1-Q3)

Table 7

eDNA concentration (ng / ml) and level of nuclease activity (Unit) in case of constant use of bronchodilators, Me(Q1-Q3)

Показатель	Прием бронходилататоров	Без бронходилататоров	Уровень значимости
n	55	53	
вкДНК	371,60 (190,20-740,00)	467,00 (243,00-945,00)	0,4664
Нуклеазная активность	13,00 (7,50-17,50)	16,30 (10,40-22,85)	0,03557

гибели») и активная секреция ДНК живыми клетками (гипотеза «метаболической ДНК») [10, 11, 12]. По-видимому, при МВ имеет место первый процесс, и повышение активности второго процесса. Преобладание первого или второго процесса находится в зависимости от стадии и длительности заболевания. Снижение концентрации вкДНК, на фоне повышенного повреждения ДНК клеток крови, могло быть обусловлено активацией эндонуклеазной активности плазмы крови [13]. Однако, в нашем исследовании четкой зависимости содержания вкДНК и нуклеазной активности не прослеживается. При этом исследователи не исключают, что при хроническом процессе, вызванном заболеванием или внешним воздействием, когда увеличивается эндонуклеазная активность плазмы крови, концентрация вкДНК не отражает реальный уровень повреждений ДНК и гибели поврежденных клеток [13].

Полученные данные свидетельствуют о наличии хронического процесса воспаления, сопровождаемого высоким уровнем гибели клеток. При высокой нуклеазной активности происходит накопление в составе вкДНК GC-обогащенных рибосомных повторов, устойчивых нуклеазному гидролизу. Накопление рДНК в составе вкДНК может приводить к активации воспалительных процессов, поскольку рДНК может служить лигандом рецепторов TLR9 и активировать TLR9- NF-kB- провоспалительные сигнальные пути.

Увеличение содержания GC - богатой рибосомальной ДНК (рДНК) является маркером хронических процессов вне обострения в организме, которые сопровождаются увеличением уровня гибели клеток организма, но не приводят к существенному увеличению общей концентрации циркулирующей ДНК [8, 14]. Вероятно, данные закономерности имеют место при хроническом микробно-воспалительном процессе в дыхательном тракте больных МВ и требуют дальнейшего изучения.

Было выявлено, что окисленные и ГЦ-обогащенные фрагменты вкДНК вызывают в клетках человека окислительный стресс, двунитевые разрывы

ДНК ядер клеток, активацию репарационных систем и адаптивный ответ. Окисленные фрагменты более эффективно проникают в клетки человека и стимулируют продукцию активных форм кислорода, что может провоцировать прогрессирование патологии [8].

Ранее было показано, что инъекция препарата высокомолекулярной ДНК, находящейся в комплексе с белками, активирует реакции гуморального и клеточного иммунитета, стимулирует фагоцитарную активность моноцитов крови по отношению как к грамположительным (*S. aureus*), так и к грамотрицательным (*Y. pseudotuberculosis*) микроорганизмам, увеличивая выживаемость мышей при введении смертельных доз возбудителя [15]. Кроме того, отмечается, что при введении ДНК интактным животным у них снижается уровень холестерина в сыворотке крови, повышается продукция простагландина Е, усиливаются репродуктивные функции. Авторы объясняют полученный результат тем, что «входящие в состав ДНК азотистые соединения (аденин и гуанин) являются структурной основой для низкомолекулярных биологически активных коферментов и кофакторов, лимитирующих биологические процессы во всех органах и тканях организма. В связи с этим они оказывают значительный и многосторонний эффект на клетки организма, увеличивая его метаболический пул без выраженного увеличения потребления кислорода» [15].

Возможно, что у пациентов с нормальными показателями спирометрии вкДНК играет метаболическую роль и отличается по составу вкДНК пациентов со сниженной функцией легких. Снижение концентрации вкДНК и изменение состава у больных может иметь значение для прогнозирования течения заболевания. Вероятно, не только количество, но и состав вкДНК играет роль в патогенезе поражения легких при муковисцидозе.

Расшифровка качественного состава вкДНК требует дальнейшего изучения для определения его роли в развитии хронического воспалительного процесса при МВ. В будущем возможна разработка алгоритмов прогнозирования тяжести течения МВ в зависимости от качественного и количественного состава вкДНК. Кроме того, изучение вкДНК при МВ может быть использовано в разработке нового патогенетического лечения.

Выводы:

1. В плазме крови пациентов с муковисцидозом концентрация внеклеточной ДНК (вкДНК) понижена по сравнению с показателями здоровых детей.

2. При нормальной функции легких (по данным ОФВ₁) содержание вкДНК не отличается от контроля, что свидетельствует о метаболической роли вкДНК. Снижение функции легких сопряжено со снижением концентрации вкДНК в плазме крови.

3. Обнаружено, что в выборке больных муковисцидозом, как в период обострения, так и в период ремиссии, происходит накопление рДНК в составе вкДНК.

4. Количество митохондриального повтора в составе вкДНК в период ремиссии у пациентов снижается с увеличением возраста.

5. Уровень нуклеазной активности плазмы крови больных муковисцидозом снижался с возрастом ($p < 0,0001$), одновременно прогрессировало заболевание.

6. При обострении бронхолегочного процесса и постоянном приеме бронходилататоров отмечался более низкий уровень нуклеазной активности плазмы.

Литература / References

1. Luke JJ, Oxnard GR, Pawletz CP, Camidge DR, Heymach JV, Solit DB, Johnson BE. Realizing the Potential of Plasma Genotyping in an Age of Genotype-Directed Therapy. *JNCI: Journal of the National Cancer Institute*. 2014; 106 (8): dju214. DOI:10.1093/jnci/dju214

2. Galeazzi M, Morozzi G, Piccini M, Chen J, Bellisai F, Fineschi S, Marcolongo R. Dosage and characterization of circulating DNA: Present usage and possible applications in systemic autoimmune disorders. *Autoimmunity Reviews*. 2003; (2): 50–55. DOI:10.1016/S1568-9972(02)00101-5

3. Gormally E, Hainaut P, Caboux E, Airoldi L, Autrup H, Malaveille C, Vineis P. Amount of DNA in plasma and cancer risk: A prospective study. *International Journal of Cancer*. 2004; (111): 746–749. DOI:10.1002/ijc.20327

4. Козлов ВА. Свободная внеклеточная ДНК в норме и при патологии. *Медицинская иммунология*. 2013;15(5):399-412. [Kozlov VA. Free extracellular DNA in normal state and under pathological conditions. *Medical Immunology (Russia)*. 2013;15(5):399-412. (In Russian)]

5. Клинические рекомендации. Кистозный фиброз (муковисцидоз) у детей / Под ред. Л.С. Намазовой-Барановой. Союз педиатров России. 2016. [Clinical recommendations. Cystic fibrosis (cystic fibrosis) in children. Union of Pediatricians of Russia. 2016. (In Russian)]

6. Polgar G, Varuni P. Pulmonary Function Testing In Children: Techniques and Standards. Philadelphia (Pa.): Saunders;1971. 273 p.

7. Quanjer PH, Tammeling GJ, Cotes JE, Pedersen OF, Peslin R, Yernault JC. Lung volumes and forced ventilatory flows. Report Working Party Standardization of Lung Function Tests, European Community for Steel and Coal. Official Statement of the European Respiratory Society. *European Respiratory Society*. 1993; 6(16): 5-40. DOI: 10.1183/09041950.005s1693

8. Костюк СВ, Замулаева ИА, Агапова РК, Ермаков АВ, Саенко АС, Орлова НВ, Смирнова СГ, Вейко НН, Спитковский ДМ. Изменение свойств внеклеточной ДНК периферической крови и частоты TCR-мутантных клеток при действии на организм человека ионизирующей радиации. *Радиационная биология. Радиоэкология*. 2008; (48): 5-13. [Kostyuk SV, Zamulaeva IA, Agapova RK, Ermakov AV, Saenko AS, Orlova NV, Smirnova SG, Vejko NN, Spitzkovskij DM. Changes in the properties of peripheral blood extracellular DNA and the frequency of TCR-mutant cells when ionizing radiation acts on the human body. *Radiation Biology. Radioecology*. 2008; (48): 5-13. (In Russian)]

9. Костюк СВ, Малиновская ЕМ, Ермаков АВ, Смирнова ТД, Каменева ЛВ, Чвартацкая ОВ, Лосева ПА, Ершова ЕС, Любченко ЛН, Вейко НН. Фрагменты внеклеточной ДНК усиливают транскрипционную активность генома мезенхимальных стволовых клеток человека, активируют TLR-зависимый сигнальный путь и ингибируют апоптоз. *Биомедицинская химия*. 2012; 58 (6): 673-683. [Kostyuk SV, Malinovskaya EM, Ermakov AV, Smirnova TD, Kameneva LV, Chvartackaya OV, Loseva PA, Ershova ES, Lyubchenko LN, Vejko NN. Fragments of extracellular DNA enhance the transcriptional activity of the human mesenchymal stem cell genome, activate the TLR-dependent signaling pathway and inhibit apoptosis. *Biomedical Chemistry*. 2012; 58 (6): 673-683. (In Russian)]

10. Pisetsky DS. The Origin and Properties of Extracellular DNA: From PAMP to DAMP. *Clinical immunology (Orlando, Fla)*. 2012;144(1):32-40. DOI:10.1016/j.clim.2012.04.006

11. Peters DL, Pretorius PJ. Origin, translocation and destination of extracellular occurring DNA — A new paradigm in genetic behavior. *Clinica Chimica Acta*. 2011; 412(11-12):806-11. DOI:10.1016/j.cca.2011.01.026

12. Gahan PB, Swaminathan R. Circulating nucleic acids in plasma and serum. Recent developments. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 2008; (1137): 1-6. DOI: 10.1196/annals.1448.050

13. Kostyuk SV, Tabakov VJ, Chestkov VV, Konkova MS, Glebova KV, Baydakova GV, Ershova ES, Izhevskaya VL, Baranova A, Veiko NN. Oxidized DNA induces an adaptive response in human fibroblasts. *Mutation Research - Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*. 2013;7(47): 6-18.

14. Вейко НН, Костюк СВ, Шубаева НО, Иванова СМ, Сперанский АИ. Изменение свойств внеклеточной ДНК периферической крови при ревматоидном артрите. *Иммунология*. 2007; 28 (3): 389-394. [Vejko NN, Kostyuk CV, Shubaeva NO, Ivanova SM, Speranskij AI. Changes in the properties of peripheral blood extracellular DNA in rheumatoid arthritis. *Immunology*. 2007; 28 (3): 389-394. (In Russian)]

15. Беседнова НН, Касьяненко ЮИ, Эпштейн ЛМ, Гажа АК. Иммунотропные свойства дезоксирибонуклеиновой кислоты из молок лососевых рыб. *Антибиотики и химиотерапия*. 1999; (10): 13. [Besednova NN, Kas'yanenko YuI, Ehshtejn LM, Gazha AK. Immunotropic properties of deoxyribonucleic acid from salmon milt. *Antibiotics and Chemotherapy*. 1999; (10): 13. (In Russian)]

Сведения об авторах

Костюк Светлана Викторовна, д.б.н., Медико-генетический научный центр; адрес: Российская Федерация, 115522, г. Москва, Москворечье, стр. 1; тел.: +7(495) 1110303; e-mail: svet-vk@yandex.ru, <https://orcid.org/0000-0003-2116-1244>

Конькова Марина Сергеевна, к.б.н., Медико-генетический научный центр; адрес: Российская Федерация, 115522, г. Москва, Москворечье, стр. 1; тел.: +7(495) 1110303; e-mail: mkonkova@gmail.com, <https://orcid.org/0000-0003-4734-7178>

Ершова Елизавета Сергеевна, к.б.н., Медико-генетический научный центр; адрес: Российская Федерация, 115522, г. Москва, Москворечье, стр. 1; тел.: +7(495) 1110303; e-mail: es-ershova@rambler.ru, <https://orcid.org/0000-0003-1206-5832>

Кондакова Юлия Александровна, врач педиатр, Городская детская клиническая больница скорой медицинской помощи; адрес: Российская Федерация, 630007, г. Новосибирск, Красный проспект 3; тел.: +7(383)2232358; e-mail: yulakondakova@rambler.ru, <https://orcid.org/0000-0002-1768-845X>

Будзинский Роман Михайлович научный сотрудник, Медико-генетический научный центр; адрес: Российская Федерация, 115522, г. Москва, Москворечье, стр. 1; тел.: +7(495) 1110303; e-mail: SmileBRM@yandex.ru, <https://orcid.org/0000-0002-0131-9131>

Шадрина Вера Владиславовна к.м.н., доцент, Пермский государственный медицинский университет им. Академика Е. А. Вагнера; адрес: Российская Федерация, 614000, г. Пермь, ул. Петропавловская 26; тел.: +7 (342) 2218615; e-mail: verashadrina@mail.ru, <https://orcid.org/0000-0002-2588-2260>

Author information

Svetlana V. Kostyuk, Dr.Biol.Sci., Research Center for Medical Genetic; Address: 1, MoskvoRechie, Moscow, Russian Federation 115522; Phone: +7(495) 1110303; e-mail: svet-vk@yandex.ru, <https://orcid.org/0000-0003-2116-1244>

Marina S. Kon'kova, Cand.Biol.Sci., Research Center for Medical Genetic; Address: 1, MoskvoRechie, Moscow, Russian Federation 115522; Phone: +7(495) 1110303; e-mail: mkonkova@gmail.com, <https://orcid.org/0000-0003-4734-7178>

Elizaveta S. Ershova, Cand.Biol.Sci., Research Center for Medical Genetic; Address: 1, MoskvoRechie, Moscow, Russian Federation 115522; Phone: +7(495) 1110303; e-mail: es-ershova@rambler.ru, <https://orcid.org/0000-0003-1206-5832>

Yulia A. Kondakova, pediatrician, City Children's Clinical Emergency Hospital; Address: 3, Krasnyy prospect str., Novosibirsk, Russian Federation 630007; Phone: +7(383)2232358; e-mail: yulakondakova@rambler.ru, <https://orcid.org/0000-0002-1768-845X>

Roman M. Budzinskiy, Researcher, Research Center for Medical Genetic; Address: 1, MoskvoRechie, Moscow, Russian Federation, 115522; Phone: +7(495) 1110303; e-mail: SmileBRM@yandex.ru, <https://orcid.org/0000-0002-0131-9131>

Vera V. Shadrina, Cand.Med.Sci., Associate Professor, Perm State Medical University named after Academician Ye.A. Wagner; Address: 26, Petropavlovskaya Str., Perm, Russian Federation 614000; Phone: +7 (342) 2218615; e-mail: verashadrina@mail.ru, <https://orcid.org/0000-0002-2588-2260>

Поступила 30.12.2018 г.

Принята к печати 13.02.2019 г.

Received 30 December 2018

Accepted for publication 13 February 2019