

## СТАНДАРТНЫЕ ОБРАЗЦЫ

Научная статья

УДК 57.088.1 / 577.113.5 / 681.2.082

<https://doi.org/10.20915/2077-1177-2023-19-2-5-17>



# Молекулярная диагностика онкологических заболеваний: перспективы разработки стандартного образца содержания гена *HER2*

М. С. Вонский<sup>а</sup>  , А. Л. Рунов<sup>а</sup> , Т. С. Горячая<sup>а, б</sup> , А. М. Кольцова<sup>б</sup> , Е. В. Курчакова<sup>а</sup> ,  
В. Д. Назаров<sup>в</sup> , С. В. Лапин<sup>в</sup> , А. В. Мазинг<sup>в</sup> , В. Л. Эмануэль<sup>в</sup> 

<sup>а</sup> ФГУП «Всероссийский научно-исследовательский институт метрологии им. Д. И. Менделеева», г. Санкт-Петербург, Россия,  
 [m.s.vonsky@vniim.ru](mailto:m.s.vonsky@vniim.ru)

<sup>б</sup> ФГБУН «Институт цитологии» Российской академии наук, г. Санкт-Петербург, Россия

<sup>в</sup> ФГБОУ ВО «Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет имени академика И. П. Павлова»  
Министерства здравоохранения Российской Федерации, Научно-методический центр Минздрава России по молекулярной  
медицине, г. Санкт-Петербург, Россия

**Аннотация:** Онкологические заболевания являются основной причиной смертности в мире. Развитие онкопатологий тесно связано с различными изменениями генетического материала, возникающими в злокачественно трансформированных клетках. Принятие медицинских решений требует четкой дифференциации нормальных и патологических показателей, являющихся в том числе результатами применения количественных методов в лабораторной медицине. Исследования ДНК, выделенной из биологического материала пациента, выявление и измерения содержания последовательностей нуклеотидов, выступающих в роли биомаркеров онкопатологий, позволяют решать задачи определения генетических предпосылок развития рака, его диагностики на ранней стадии, определения стратегии лечения, его мониторинга, подтверждения излечения пациента.

Целью данного исследования является выработка основных подходов к созданию стандартных образцов (СО) ДНК для метрологического обеспечения молекулярной диагностики онкопатологий на примере СО содержания последовательности гена *HER2* в составе генома человека, значение величины «число копий последовательности ДНК» которого метрологически прослеживается к естественной единице SI «один».

В ходе исследования разработана методика выполнения измерений копийности (числа копий последовательности гена на геном) гена *HER2*, основанная на применении метода цифровой ПЦР (цПЦР). Показана сходимость результатов измерений для разработанной авторами методики и результатов, полученных с использованием коммерческого набора, использующего метод MLPA на образцах биологического материала человека.

Охарактеризованы пять постоянных клеточных линий из ЦКП «Коллекция культур клеток позвоночных» по отношению числа копий последовательностей гена *HER2* и генов *CEP17* и *RPPH1*. Выявлена клеточная линия с повышенной копийностью гена *HER2*. Полученные результаты будут использованы при создании СО отношения числа копий последовательностей гена *HER2* и генов *RPPH1* и *CEP17*. Создание матричных СО ДНК на основе культур клеток человека, аттестованных с применением цПЦР, позволит передавать единицу величины числа копий последовательности ДНК калибраторам, входящим в состав медицинских изделий, обеспечивая тем самым требуемую достоверность и сопоставимость результатов измерений в лабораторной диагностике онкопатологий, а также возможность калибровки рутинных методик ДНК-диагностики и внутрилабораторного контроля качества.

**Ключевые слова:** стандартные образцы, онкодиагностика, лабораторная медицина, последовательность нуклеотидов, число копий последовательности

**Используемые сокращения:** EGFR – эпидермальный фактор роста; ISH – метод гибридизация in situ; IS WHO – международные стандарты ВОЗ; MALDI-TOF – времяпролетный масс-спектрометрический анализ с применением матричной лазерной десорбции/ионизации; MLPA – мультиплексная лигаза-зависимая амплификация зондов; SI – международная система единиц физических величин; NGS – массовый параллельный секвенс; ВОЗ – Всемирная организация здравоохранения; ДНК – дезоксирибонуклеиновая кислота; МБМВ – Международное бюро мер и весов; НМИ – национальный метрологический институт; ПЦР – полимеразная цепная реакция; кПЦР – количественная полимеразная цепная реакция; цПЦР – цифровая полимеразная цепная реакция; цкПЦР – цифровая капельная полимеразная цепная реакция; РГНА КККВ – Рабочая группа по анализу нуклеиновых кислот Консультативного комитета по количеству вещества: метрология в химии и биологии; РНК – рибонуклеиновая кислота; СО – стандартный образец; ЦКП – центр коллективного пользования.

**Ссылка при цитировании:** Молекулярная диагностика онкологических заболеваний: перспективы разработки стандартного образца содержания гена *HER2* / М. С. Вонский [и др.] // Эталоны. Стандартные образцы. 2023. Т. 19, № 2. С. 5–17. <https://doi.org/10.20915/2077-1177-2023-19-2-5-17>

Статья поступила в редакцию 30.12.2022; одобрена после рецензирования 05.03.2023; принята к публикации 25.03.2023.

## REFERENCE MATERIALS

Research Article

# Molecular Diagnostics of Oncological Disease: Prospects for the Development of a Reference Material for the *HER2* gene Content

Maxim S. Vonsky<sup>a</sup>  , Andrei L. Runov<sup>a</sup> , Tatjana S. Gorjachaya<sup>a, b</sup> , Anna M. Koltsova<sup>b</sup> ,  
Elena V. Kurchakova<sup>a</sup> , Vladimir D. Nazarov<sup>c</sup> , Sergey V. Lapin<sup>c</sup> , Alexandra V. Mazing<sup>c</sup> ,  
Vladimir L. Emanuel<sup>c</sup> 

<sup>a</sup>D. I. Mendeleev Institute for Metrology, St. Petersburg, Russia,  
 m. s.vonsky@vniim.ru

<sup>b</sup>Institute of Cytology of the Russian Academy of Sciences, St. Petersburg, Russia

<sup>c</sup>Pavlov First Saint Petersburg State Medical University of the Ministry of Health of the Russian Federation,  
Scientific and Methodological Center for the Russian Health Ministry on Molecular Medicine, St. Petersburg, Russia

**Abstract:** Cancer is the leading cause of death in the world. The development of oncopathology is closely related to various changes in the genetic material that occur in malignantly transformed cells. Medical decision-making requires a clear differentiation between normal and pathological indicators, which are, among other things, the results of application of quantitative methods in laboratory medicine. Studies of DNA isolated from a patient's biological material, identification and measurement of the content of nucleotide sequences acting as oncopathology biomarkers allow to solve the problems of determining the genetic prerequisites for cancer, its early diagnosis, determining the treatment strategy, monitoring, and confirming the patient's cure.

The purpose of this research is to develop the main approaches to the design of DNA reference materials (RMs) for metrological support of molecular diagnostics of oncopathology through the example of the RM for the *HER2* gene sequence content in the human genome, with the value of «the number of copies of the DNA sequence» which is metrologically traceable to the natural SI unit «one».

In the course of the research, a technique for measuring the *HER2* gene amplification (the number of copies of the gene sequence per genome) was developed based on the use of the digital PCR method (dPCR). Comparability of measurement results for the method developed by the authors, and the results obtained using a commercial kit by the MLPA method on samples of human biological material is shown.

Five permanent cell lines obtained from the CUC «Vertebrate Cell Culture Collection» were characterized in relation to the copy number ratios of *HER2* gene sequence and *CEP17* and *RPPH1* genes sequences. A cell line with the *HER2* gene amplification was identified. The results obtained will be used to create the RM for the copy number ratio of the *HER2* gene sequences and the *RPPH1* and *CEP17* gene sequences. Creation of matrix DNA RMs based on human cell cultures certified using dPCR will allow transferring the unit of copy numbers of the DNA sequence to calibrators included in medical devices, thereby ensuring the required reliability and comparability of measurement results in the laboratory diagnostics of onco-pathology, as well as the possibility of calibrating routine methods of DNA diagnostics and intralaboratory quality control.

**Keywords:** reference materials, cancer diagnostics, laboratory medicine, nucleotide sequence, sequence copy number

**Abbreviations used in the article:** EGFR – epidermal growth factor receptor; ISH – in situ hybridization; IS WHO – WHO international standards; MALDI-TOF MS – matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry; MLPA – multiplex ligation-dependent probe amplification; SI – International System of units; NGS – next-generation sequencing; WHO – World Health Organization; DNA – deoxyribonucleic acid; BIPM – International Bureau of Weights and Measures; NMI – national metrological institute; PCR – polymerase chain reaction; qPCR – quantitative polymerase chain reaction; dPCR – digital polymerase chain reaction; ddPCR – droplet digital polymerase chain reaction; NAWG CCQM – Nucleic Acid Analysis Working Group of the Consultative Committee for Amount of Substance: Metrology in Chemistry and Biology; RNA – ribonucleic acid; RM – reference material; CUC – Common Use Center.

**For citation:** Vonsky M. S., Runov A. L., Gorjachaya T. S., Koltsova A. M., Kurchakova E. V., Nazarov V. D. et al. Molecular diagnostics of oncological disease: prospects for the development of a reference material for the *HER2* gene content. *Measurement Standards. Reference Materials*. 2023;19(2):5–17. <https://doi.org/10.20915/2077-1177-2023-19-2-5-17>

The article was submitted 30.12.2022; approved after reviewing 05.03.2023; accepted for publication 25.03.2023.

## Введение

Онкологические заболевания являются ведущей причиной смертности в мире. По данным Всемирной организации здравоохранения (ВОЗ), онкологические заболевания отвечают за 16% от всех смертей [1]. Национальный институт онкологии (National Cancer Institute, США) определяет рак как группу заболеваний, характеризующихся неконтролируемым ростом и распространением аномальных клеток. Возникновение рака всегда связано с генетической трансформацией – комплексным изменением, реализуемым на разных уровнях организации генетического аппарата злокачественно трансформированных клеток [2]. К числу таких изменений относят различные мутации, нарушающие первичную структуру ДНК, в том числе – сопровождаемые изменениями числа копий последовательности гена в составе генома (копийности) и активности генов. Действительно, для опухолевой клеточной трансформации характерны такие проявления, как активация/гиперэкспрессия онкогенов, стимулирующих опухолевый рост, и инактивация/подавление экспрессии антионкогенов – генов-супрессоров опухолевого роста, количественные характеристики которых могут быть полностью охарактеризованы в рамках биоаналитических измерений.

Описанные изменения включают характеристики номинальных свойств – последовательностей нуклеотидов и величин – числа копий определенных последовательностей нуклеотидов, или отношения числа копий последовательностей нуклеотидов.

Выделяют группу генов, мутации в которых определяют наследственную предрасположенность к развитию опухолей. Риск возникновения новообразования у лиц – носителей таких мутаций значительно повышен. Так, рак груди выявляют приблизительно у 13% женщин в течение всей продолжительности жизни. У женщин – носителей мутантного варианта гена *BRCA1* или *BRCA2* (*BRCA1/2*) к возрасту 70–80 лет рак груди выявляют у 55–72% и 45–69% соответственно [3–5]. При этом у носителей мутантных вариантов генов *BRCA1/2* также повышены риски образований опухоли предстательной железы (до 22,9% – для мужчин), желудка (до 3,5% – в популяции), поджелудочной железы (до 3% – в популяции) [6].

Изучение мутаций, их роли в этиологии и патогенезе опухолей обеспечило все возрастающее применение молекулярно-генетических исследований в целях диагностики, профилактики и лечения злокачественных новообразований [7]. Идентификация генетических

нарушений является необходимым элементом применения новых противоопухолевых препаратов, направлено воздействующих на конкретные молекулярные механизмы, лежащие в основе возникновения и развития опухолей. Подобные генетические нарушения, выявляемые при анализе последовательностей нуклеотидов, выступают в качестве биомаркеров, характеризующих «молекулярный портрет» опухоли и обеспечивающих возможность принятия персонализированных клинических решений при выборе терапии. Так, выявление определенных мутаций гена эпидермального фактора роста (*EGFR*) у больных немелкоклеточным раком легких позволяет выделить пациентов, которым показана терапия ингибиторами тирозинкиназы [8]; идентификация мутаций гена *KRAS* необходима для индивидуализации лечения антителами при колоректальном раке [9].

Анализ генетических биомаркеров в молекулярной диагностике выполняют с применением целого ряда методов, включая полимеразную цепную реакцию (ПЦР) с детекцией по конечной точке, ПЦР в реальном времени (ПЦР-РВ), количественную ПЦР (кПЦР), цифровую ПЦР (цПЦР), гибридизацию *in situ* (ISH), мультиплексную зависимую от лигирования амплификацию зондов (MLPA), времяпролетный масс-спектрометрический анализ с применением матричной лазерной десорбции/ионизации (MALDI-TOF), направленное определение последовательности ДНК (секвенирование по Сэнгеру), массовый параллельный сиквенс (NGS). Вследствие этого задача обеспечения достоверности и сопоставимости результатов измерений, выполняемых в разных лабораториях с применением различных методов молекулярной диагностики, особенно актуальна.

Важнейшим инструментом обеспечения сопоставимости и достоверности результатов измерений в лабораторной медицине является метрологическая прослеживаемость. При этом в области молекулярной диагностики основным средством обеспечения прослеживаемости являются стандартные образцы (СО) нуклеиновых кислот, ДНК и РНК, аттестованные по таким характеристикам, как последовательность нуклеотидов, концентрация копий последовательности или отношение числа копий последовательностей.

В настоящее время для передачи единиц величин калибраторам, входящих в наборы реагентов для молекулярной диагностики генетических онкомаркеров, на международном уровне производится ограниченное число стандартных образцов. Так, два СО, в том числе один сертифицированный СО, производит Национальный институт стандартов и технологий (NIST, США) и пять СО в ранге международных стандартов Всемирной

организации здравоохранения (IS WHO) производит Национальный институт биологических стандартов и контролей (NIBSC, Великобритания). Все перечисленные СО NIST SRM 2373 [10] и RM 8366 [11], IS WHO NIBSC09/138, 16/120, 16/250, 18/118 и 18/130 используют для передачи единиц величины отношения числа копий последовательностей ДНК. При том что в диагностике онкопатологий используют около 300 генетических биомаркеров, очевидна необходимость обеспечения метрологической прослеживаемости результатов выполняемых измерений к единице величины SI – числу копий последовательности ДНК.

Стоит отметить, что обеспечение единства измерений, выполняемых в молекулярной диагностике онкопатологий, является одной из приоритетных задач РГНА КККВ МБМВ [12]. Например, в пилотных сличениях CCQM-P184<sup>1</sup> исследованы измерительные возможности, обеспечивающие идентификацию мутаций в составе последовательностей генов *BRAF* и *EGFR*, и измерения отношения числа копий последовательностей, содержащих мутацию, к общему числу копий последовательностей этих генов. Результаты сличений подтвердили, что применение метода цПЦР обеспечивает получение достоверных, прослеживаемых к SI результатов измерений содержания генетических биомаркеров онкопатологий.

Рак молочной железы является одной из наиболее распространенных злокачественных патологий у женщин во всем мире [13]. При этом около 20–30% инвазивных раков груди характеризуются увеличением числа копий последовательности гена рецептора эпидермального фактора роста тип 2 *ERBB2* (*HER2*) на геном (или увеличением копийности гена). Данные типы опухолей являются наиболее агрессивными и требуют особых подходов для лечения [14, 15]. Сам ген *HER2* является протоонкогеном, увеличение копийности которого приводит к повышенному уровню экспрессии, что, в свою очередь, ведет к запуску сигнального каскада роста и агрессивному метастазированию злокачественной опухоли [16]. Измерения числа копий последовательности гена *HER2* на геном являются необходимыми для определения правильной терапии, выбора соответствующих препаратов и прогнозирования исхода заболевания.

Критическое значение измерений числа копий последовательности гена *HER2* было отмечено МБМВ: в 2021 г.

<sup>1</sup> CCQM-P184 Copy number concentration and fractional abundance of a mutation (SNV: EGFR or INDEL: BRAF) mixed with wild-type DNA. Координатор сличений: National Measurement Institute и LGC Standards, Великобритания. <http://bit.ly/3WpXrr3>

КККВ было принято решение о проведении РГНА ключевых сличений ССQM-K176, направленных на подтверждение возможностей национальных метрологических институтов (НМИ) в области измерений отношения числа копий последовательностей гена *HER2* и генов *RPPH1*, *CEP17*, считааемых однокопийными.

Актуальность данного исследования обусловлена тем, что для выявления повышенной копийности гена *HER2* в рутинной диагностике часто используют методы ISH, которые позволяют с высокой чувствительностью и специфичностью установить наличие хромосомных перестроек, однако, по сути, являются субъективными экспертными методами, показатели точности которых не охарактеризованы. Применяемые в лабораторной диагностике тест-системы часто используют для сравнения в качестве однокопийного гены, число копий которых на геном может изменяться [17]. Для более точного измерения отношения числа копий последовательностей генов в рутинной лабораторной диагностике используется метод кПЦР – относительный метод, требующий использования калибраторов. Таким образом, необходимо обеспечить сопоставимость результатов измерений, выполненных в разных лабораториях с применением различных методов молекулярной диагностики.

Предназначенные для обеспечения прослеживаемости СО должны быть представлены не только как чистые препараты ДНК, но и как матричные образцы. Важное значение имеет обеспечение коммутативности матрицы СО с матрицей исследуемого биологического материала человека, с учетом особенностей его подготовки – таких, как фиксации, обезвоживания и др.

Создание подобных СО требует развития соответствующих измерительных возможностей, что является одной из приоритетных задач РГНА КККВ МБМВ. В пилотных и ключевых сличениях были исследованы и подтверждены измерительные возможности, обеспечивающие идентификацию мутаций и измерения доли числа копий соответствующих последовательностей, продемонстрировано, что применение метода цПЦР обеспечивает получение достоверных, прослеживаемых к SI результатов измерений содержания генетических биомаркеров онкопатологий.

Целью данного исследования является выработка основных подходов к созданию прослеживаемых к единице величины SI – «числу копий последовательности ДНК» – СО ДНК для метрологического обеспечения молекулярной диагностики онкопатологий, на примере гена *HER2* как биомаркера агрессивности рака груди.

В задачи исследования входит: расчет праймеров и зондов, обеспечивающих амплификацию

специфических последовательностей генов *HER2*, *RPPH1* и *CEP17*, выделение ДНК из биологического материала, отработка режима цифровой капельной ПЦР (цкПЦР) и выполнение измерений концентрации копий последовательностей исследуемых генов, анализ сопоставимости результатов измерений, полученных с применением цкПЦР и рутинного метода MLPA, установление копийности последовательности гена *HER2* в культурах клеток опухолей молочной железы и определение возможности создания СО, аттестованного по отношению числа копий последовательностей гена *HER2* и генов *RPPH1* и *CEP17*.

### Материалы и методы

В работе использованы клеточные культуры, полученные из Центра коллективного пользования (ЦКП) «Коллекция культур клеток позвоночных» ФГБУН «Институт цитологии РАН» – HeLa S3 эпителиоидная карцинома шейки матки, сублиния HeLa [18] и пять культур, полученных из опухолей молочной железы, которые могли содержать повышенное число копий гена *HER2* на геном. Культивирование проводили в соответствии с паспортом на культуру, сроки культивирования не превышали уровней 4–6 пассажей. Перед выделением ДНК клеточный биоматериал был проверен на присутствие микоплазм цитохимическим методом в соответствии с требованиями ОФС.1.7.2.0031.15 Фармакопеи РФ. В работе также были использованы фиксированные в формалине парафинизированные образцы биологического материала 12 пациенток с диагнозом рак молочной железы, проходивших лечение в клинике Первого Санкт-Петербургского государственного медицинского университета им. И. П. Павлова, у которых было получено добровольное информированное согласие.

Во всех образцах биологического материала человека до выделения ДНК была проведена оценка объема материала злокачественного образования: ткань, относящаяся к опухоли, составляла не менее 70 % от общего объема ткани. Выделение ДНК из ткани проводили с использованием набора ExtractDNA FFPE (ЗАО «Евроген», Россия) в соответствии с инструкцией производителя. Исследование копийности гена *HER2* выполняли методом MLPA с использованием наборов SALSA MLPA Probemix P078 Breast tumor (MRC-Holland, Голландия) в соответствии с инструкцией производителя.

Для исследований методом цПЦР ДНК выделяли из культур клеток с помощью коммерческого набора DNeasy Blood & Tissue Kit (QIAGEN, Германия) в строгом соответствии с рекомендациями производителя. Чистоту и концентрацию выделенной ДНК оценивали спектрофотометрически на приборе BioSpec-nano (Shimadzu,

Япония). ДНК после выделения и очистки хранили при  $-70^{\circ}\text{C}$ , избегая многократного размораживания. Отношения числа копий последовательности гена *HER2* к числу копий последовательности считаемого однокопийным гена в составе генома человека рассчитывали, используя результаты измерений, полученных методом цПЦР. Измерения выполняли с использованием разработанного нами экспериментального образца измерительной установки ЭОУ ДНК, реализующего метод цифровой капельной ПЦР (цкПЦР), откалиброванного с использованием С0 концентрации копий ДНК человека (SRM 2372a, NIST, США) [19, 20].

Праймеры и зонды для амплификации в цПЦР были рассчитаны с использованием сетевого ресурса PrimerQuest© Tool (Integrated DNA Technology, США). Последовательности праймеров и зондов с указанием размера амплифицируемых последовательностей (ампликонов) представлены в табл. 1. Синтез праймеров и зондов был выполнен НПФ «Синтол» (Москва, Россия). Для проведения цкПЦР использовали смеси ddPCR mastermix for probes (Bio-Rad Laboratories, США). Реакции цкПЦР проводили в следующих условиях:

предварительная денатурация/активация фермента  $95^{\circ}\text{C} - 10$  минут, далее 60 циклов ( $94^{\circ}\text{C} - 30$  сек.,  $57^{\circ}\text{C} - 60$  сек.), финальная стабилизация  $98^{\circ}\text{C} - 10$  минут. Анализ результатов цкПЦР проводили с использованием программного обеспечения QuantaSoft 1.7.4 (Bio-Rad Laboratories, США) в автоматическом и ручном режимах.

Оптимизацию условий амплификации проводили с использованием очищенной ДНК, выделенной из культуры клеток опухоли шейки матки линии HeLa S3. Данная культура является одним из самых распространенных и хорошо изученных модельных объектов в клеточной биологии, выбор ее был обусловлен присутствием в составе генома интересующего нас набора генов. Распределение продуктов цкПЦР по интенсивности флуоресцентного сигнала для последовательностей в составе экзона 4 гена *HER2* и гена *RPPH1* проиллюстрировано на рис. 1 (*HER2* экзон 4 – рис. 1а, *RPPH1* – рис. 1б).

### Результаты и обсуждение

Разработанная нами методика выполнения измерений копийности (числа копий последовательности гена на геном) гена *HER2*, основанная на применении

Таблица 1. Праймеры и зонды для амплификации последовательностей в составе генов *HER2*, *RPPH1* и *CEP17*

Table 1. Primers and probes for amplification of *HER2*, *RPPH1* and *CEP17* gene sequences

Ген / последовательность	Последовательность нуклеотидов праймеров / зонда	Размер ампликона, (пар нуклеотидов)
HER2-EXON4 NC_000017.11: 39694639–39695571	5' –GGTGGCAAAGCAAAGCTATATTC–3' 5' –CGTTTGTCTCCTGGCCATTCTA–3' 5' –HEX–ACATGCAAAGCTACTCCCTGAGCA–BHQ1–3'	102
HER2-EXON16 NC_000017.11: 39715445–39716387	5' –CCTCTTGGCATGGCTTCTC–3' 5' –TGTAGGGAGAGGAAGAGTTCTG–3' 5' –HEX–AAGGATGCCAAGGCAGGTAGGAC–BHQ1–3'	96
HER2-EXON24 NC_000017.11: 39724733–39725827	5' –ATGAGCTACCTGGAGGATGT–3' 5' –CCAGCCCCGAAGTCTGTAATTT–3' 5' –HEX– TTGGGACTCTTGACCAGCACGTTT–BHQ1–3'	103
RPPH1 NC_000014.9: 20343050–20343764	5' –CGGAGCTTGAACAGACTCA–3' 5' –GGAGAGTAGTCTGAATTGGGTTATG–3' 5' –FAM–CCTCACCTCAGCCATTGAACTCAC–BHQ1–3'	97
CEP17 NC_000017.11: 26981721–26983000	5' –AAAGCCACAGGTAAGAAGTAGG–3' 5' –CTAGATCACGGCAGCAAGAG–3' 5' –FAM–CTATTGCAGCACGTGGCACATGG–BHQ1–3'	97

метода цифровой ПЦР (цПЦР), была апробирована при проведении измерений в рамках ключевых сличений ССQM-K176, отчет по которым находится на этапе подготовки. Подтверждением правильности выбора системы праймеров/зондов служило совпадение результатов измерений числа копий последовательностей, относящихся к разным экзонам в составе гена *HER2*. Анализ результатов сличений подтвердил применимость разработанной методики для выполнения измерений вариации числа копий последовательностей гена *HER2* с использованием отношения числа копий последовательностей гена *HER2* и генов *CEP17* и *RPPH1*. Относительная стандартная неопределенность для выполняемых по разработанной методике измерений не превышала 6%, а максимальная расширенная неопределенность составляет 12% ( $k = 2$ ).

В настоящей работе сопоставлены результаты измерений копийности гена *HER2* в биологическом материале пациентов, полученные с использованием апробированной нами в рамках международных ключевых сличений методики и применяющейся в клинической практике методики, основанной на MLPA [21]. Результаты измерений, полученные с использованием цПЦР и MLPA, представлены в табл. 2. С учетом того что число копий последовательности является исчисляемой величиной, значение которой, в соответствии с брошюрой «Международная система единиц (SI)» МБМВ, выражается с использованием единицы «один», являющейся нейтральным элементом любой системы единиц, отношение

таких величин выражается как безразмерная величина или просто число. Видно, что во всех случаях отношения числа копий последовательностей гена *HER2* и гена *CEP17* для двух методик находятся в хорошем соответствии (значения, полученные с использованием MLPA, лежат в интервале 12% расширенной неопределенности значений, полученных с использованием цПЦР). При этом нами показано, что отношение числа копий последовательностей гена *HER2* и гена *RPPH1*, лежащего на другой хромосоме, в четырех из двенадцати случаев отличается от такового к числу копий последовательности гена *CEP17*, лежащего на той же хромосоме 17 (пациенты № 1, 4, 6 и 11). Этот результат подтверждает литературные данные о геномных перестройках, в том числе увеличении числа копий протяженных участков хромосом в процессе злокачественной трансформации при раке груди [22]. Показанная сходимость результатов, полученных методами цПЦР и MLPA, а также более широкий диапазон отношений числа копий последовательностей гена *HER2* и однокопийных генов *RPPH1* и *CEP17* демонстрирует возможности применения метода цПЦР для аттестации СО отношения числа копий последовательностей генов. Такие СО будут предназначены, в первую очередь, для передачи единицы величины калибраторам, входящим в состав медицинских изделий для молекулярно-генетической диагностики *in vitro*, но также могут применяться в клинической практике для калибровки рутинных методик и для внутрилабораторного контроля качества.

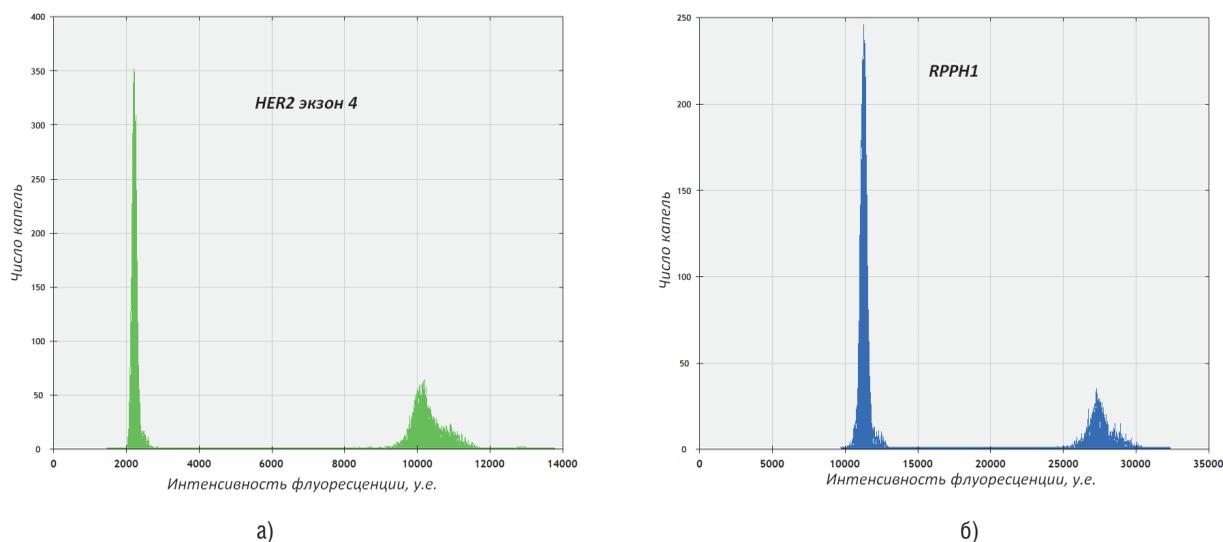


Рис. 1. Распределение продуктов цПЦР по интенсивности флуоресцентного сигнала для: а) последовательностей в составе экзона 4 гена *HER2*; б) последовательностей в составе гена *RPPH1*

Fig. 1. Distribution of ddPCR products by fluorescent signal intensity for: sequence within exon 4 of the *HER2* gene; б) sequence within the *RPPH1* gene

Разработка стандартных образцов, аттестованных по содержанию последовательностей ДНК – биомаркеров онкопатологий, часто требует решения проблемы получения возобновляемого биологического материала. Возможным решением этой проблемы является использование культивируемых *in vitro* линий клеток, генетический материал которых содержит необходимые мутации. В рамках исследования возможности создания СО отношения числа копий последовательностей гена *HER2* к однокопийным генам *RPPH1* и *CEP17* был проведен анализ пяти линий клеточных культур опухолей молочной железы. После наращивания культур клеток *in vitro* геномная ДНК была выделена и очищена, как было указано выше. С использованием цПЦР было измерено отношение числа копий последовательностей гена *HER2* и генов *RPPH1* и *CEP17*. Результаты измерений показали, что исследованные культуры клеток различаются по содержанию числа копий последовательностей гена *HER2*: для трех культур число копий последовательности гена *HER2* осталось в норме, для одной культуры обнаружено снижение числа копий последовательности гена *HER2* в два раза и для одной культуры – значительное увеличение этого показателя. В последнем случае отношения числа копий последовательностей гена *HER2* и генов *RPPH1* и *CEP17* достоверно различаются ( $12,5 \pm 1,5$  и  $8,5 \pm 1,0$  соответственно), что свидетельствует о том, что в данной клеточной культуре произошла не только мультипликация фрагмента хромосомы 17, на котором локализован ген *HER2*, но и хромосомы 14, содержащей ген *RPPH1*.

Полученные нами на примере измерений числа копий последовательности гена *HER2* результаты отчетливо демонстрируют возможности использования постоянных культур клеток как источника воспроизводимого биоматериала для производства СО, предназначенных для применения в области молекулярной ДНК-диагностики онкологических заболеваний.

## Заключение

В ходе исследования предложен и апробирован подход к созданию СО для метрологического обеспечения молекулярной диагностики онкопатологий на основе применения постоянных клеточных культур. Разработана методика выполнения измерений вариации числа копий гена *HER2* на основе метода цПЦР. Показана сходимость результатов измерений для разработанной авторами методики и коммерческой тест-системы SALSA MLPA Probeset P078 Breast tumor (MRC-Holland, Голландия) на 12 образцах биологического материала пациенток с диагнозом рак молочной железы. Применение цПЦР позволило получать результаты в более широком, по сравнению с MLPA, диапазоне значений копийности гена *HER2*, что может быть полезно для принятия клинических решений. Показано, что выполнение дополнительных измерений отношения числа копий последовательностей генов *HER2* и *RPPH1* позволяет выявить случаи геномных перестроек, связанных с увеличением копийности протяженного фрагмента хромосомы 17, содержащего гены *HER2* и *CEP17*, при котором отношение числа копий последовательности генов *HER2* и *CEP17* сохраняется.

Охарактеризованы пять постоянных клеточных линий из ЦКП «Коллекция культур клеток позвоночных» по отношению числа копий последовательностей гена *HER2* и генов *CEP17* и *RPPH1*. Выявлена клеточная линия с повышенной копийностью гена *HER2*. Полученные результаты будут использованы при создании СО содержания гена *HER2*. Аттестованные значения отношения числа копий последовательностей гена *HER2* и генов *RPPH1* и *CEP17* будут метрологически прослеживаемы к государственному первичному эталону единицы числа копий последовательности ДНК (на стадии разработки). Хранение и передача единицы величины числа копий последовательности ДНК в новом государственном

Таблица 2. Отношения числа копий последовательностей гена *HER2* и генов *RPPH1*, *CEP17* для образцов биологического материала человека, полученные методами MLPA и цПЦР

Table 2. Copy number ratios of the *HER2* gene sequence and the *RPPH1* and *CEP17* genes sequences for samples of human biological material obtained by MLPA and ddPCR methods

		Пациент, №											
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Отношение числа копий последовательностей	<i>HER2/CEP17</i> (MLPA)	>14	3	>14	12	5,7	2,8	4	1,5	1	1	1	1
	<i>HER2/CEP17*</i> (цПЦР)	18,4	2,99	44,4	13,2	5,3	2,5	4,2	1,7	1,1	1,0	1,1	1,0
	<i>HER2/RPPH1*</i> (цПЦР)	24,7	2,44	43,6	22,5	5,6	4,3	3,4	1,6	1,1	1,0	2,2	1,0

\* расширенная неопределенность для результатов, полученных с использованием метода цПЦР, составляет 12% ( $k=2$ )

эталоны будут реализованы с использованием эталонов сравнения – стандартных образцов ДНК, первичная структура которых (последовательность нуклеотидов) будет подтверждена с использованием генетического анализатора «НАНОФОР 05» (ООО «Синтол», Россия).

Теоретическая значимость полученных результатов заключается в обосновании применения культур клеток человека, полученных из раковых опухолей, как возобновляемого источника биологического материала для создания матричных СО ДНК биомаркеров онкопатологий.

Практическую значимость исследования представляют результаты измерений содержания гена *HER2* в культурах клеток человека, позволяющие в перспективе обеспечить передачу единицы величины отношения числа копий последовательностей ДНК калибраторам, входящим в состав медицинских изделий для молекулярно-генетической диагностики онкопатологий *in vitro* и внутрилабораторного контроля качества.

**Благодарности:** Клеточные культуры предоставлены ЦКП «Коллекция культур клеток позвоночных». Работа выполнена при финансовой поддержке гранта Минобрнауки Российской Федерации, Соглашение № 075-15-2021-683.

**Acknowledgments:** Cell cultures were provided by the CUC «Vertebrate Cell Culture Collection». The research was supported by the Ministry of Education and Science of the Russian Federation, Agreement № 075-15-2021-683.

**Вклад соавторов:** Вонский М. С. – разработка замысла и концепции исследования, курирование данных, проверка и редакция текста статьи; Рунов А. Л. – проведение исследовательских работ, валидация, проверка, написание чернового варианта статьи; Горячая Т. С. – предоставление материалов для исследования;

Кольцова А. М. – предоставление материалов для исследования; Курчакова Е. В. – проведение исследовательских работ; Назаров В. Д. – проведение исследовательских работ; Лапин С. В. – проведение исследовательских работ; Мазинг А. В. – предоставление материалов для исследования; Эмануэль В. Л. – руководство, курирование, контроль.

**Contribution of the authors:** Vonsky M. S. – development of the research concept, data curation, revision and editing of the text; Runov A. L. – research work, validation, verification, writing a draft version of the article; Gorjachaya T. S. – providing materials for research; Koltsova A. M. – providing materials for research; Kurchakova E. V. – research work; Nazarov V. D. – research work; Lapin S. V. – research work; Mazing A. V. – providing materials for research; Emanuel V. L. – leadership, supervision, control.

**Конфликт интересов:** Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов. Материал статьи подготовлен на основе доклада, представленного на V Международной научной конференции «Стандартные образцы в измерениях и технологиях» (Екатеринбург, 13–16 сентября 2022 г.). Переводная версия статьи на английском языке планируется к публикации в книге Sobina E. et al. (eds.). Reference Materials in Measurement and Technology. RMMT 2022. Switzerland: Springer, Cham.

**Conflict of interest:** The authors declare no conflict of interest. The material of the article was prepared on the basis of the report presented at the V International Scientific Conference «Reference Materials in Measurement and Technology» (Yekaterinburg, September 13–16, 2022). A translated version of the article in English is planned for publication in the book Sobina E. et al. (eds.). Reference Materials in Measurement and Technology. RMMT 2022. Switzerland: Springer, Cham.

## СПИСОК ИСТОЧНИКОВ

1. Global cancer statistics 2020: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries / H. Sung [et al.] // *CA: A Cancer Journal for Clinicians*. 2021. Vol. 71, № 3. P. 209–249. <https://doi.org/10.3322/caac.21660>
2. *Loeb K. R., Loeb L. A.* Significance of multiple mutations in cancer // *Carcinogenesis*. 2000. Vol. 21, № 3. P. 379–385. <https://doi.org/10.1093/carcin/21.3.379>
3. Risks of breast, ovarian, and contralateral breast cancer for BRCA1 and BRCA2 mutation carriers / K. B. Kuchenbaecker [et al.] // *JAMA*. 2017. Vol. 317, № 23. P. 2402–2416. <https://doi:10.1001/jama.2017.7112>
4. Average risks of breast and ovarian cancer associated with BRCA1 or BRCA2 mutations detected in case series unselected for family history: A combined analysis of 22 studies / A. Antoniou [et al.] // *American Journal of Human Genetics*. 2003. Vol. 72, № 5. P. 1117–1130. <https://doi:10.1086/375033>
5. *Chen S., Parmigiani G.* Meta-analysis of BRCA1 and BRCA2 penetrance // *Journal of Clinical Oncology*. 2007. Vol. 25, № 11. P. 1329–1333. <https://doi:10.1200/JCO.2006.09.1066>
6. Cancer risks associated with BRCA1 and BRCA2 pathogenic variants / S. Li [et al.] // *Journal of Clinical Oncology*. 2022. Vol. 40, № 14. P. 1529–1541. <https://doi.org/10.1200/JCO.21.02112>

7. Berger M. F., Mardis E. R. The emerging clinical relevance of genomics in cancer medicine // *Nature Reviews Clinical Oncology*. 2018. Vol. 15, № 6. P. 353–365. <https://doi.org/10.1038/s41571-018-0002-6>
8. Tumor immune microenvironment and nivolumab efficacy in EGFR mutation-positive non-small-cell lung cancer based on T790M status after disease progression during EGFR-TKI treatment / K. Haratani [et al.] // *Annals of Oncology*. 2017. Vol. 28, № 7. P. 1532–1539. <https://doi.org/10.1093/annonc/mdx183>
9. Fluorouracil, leucovorin, and irinotecan plus cetuximab treatment and RAS mutations in colorectal cancer / E. V. Cutsem [et al.] // *Journal of Clinical Oncology*. 2015. Vol. 33, № 7. P. 692–700. <https://doi.org/10.1200/JCO.2014.59.4812>
10. Development of NIST standard reference material 2373: Genomic DNA standards for HER2 measurements / Hua-Jun He [et al.] // *Biomolecular Detection and Quantification*. 2016. Vol. 8. P. 1–8. <https://doi.org/10.1016/j.bdq.2016.02.001>
11. Development and interlaboratory evaluation of a NIST reference material RM 8366 for EGFR and MET gene copy number measurements / H. J. He [et al.] // *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine*. 2019. Vol. 57, № 8. P. 1142–1152. <https://doi.org/10.1515/cclm-2018-1306>
12. Metrological framework to support accurate, reliable, and reproducible nucleic acid measurements / M. Milavec [et al.] // *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. 2022. Vol. 414, № 2. P. 791–806. <https://doi.org/10.1007/s00216-021-03712-x>
13. *Alkabban F. M., Ferguson T.* Breast cancer. Treasure Island: StatPearls Publishing, 2022. URL: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK482286> (дата обращения: 08.11.2022).
14. Activating HER2 mutations in HER2 gene amplification negative breast cancer / R. Bose [et al.] // *Cancer Discov*. 2013. Vol. 3, № 2. P. 224–237. <https://doi.org/10.1158/2159-8290.CD-12-0349>
15. *Iqbal N., Iqbal N.* Human epidermal growth factor receptor 2 (HER2) in cancers: overexpression and therapeutic implications // *Molecular Biology International*. 2014. № 852748. <https://doi.org/10.1155/2014/852748>
16. *Moasser M. M.* The oncogene HER2: its signaling and transforming functions and its role in human cancer pathogenesis // *Oncogene*. 2007. Vol. 26, № 45. P. 6469–6487. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1210477>
17. Centromere 17 copy number gain reflects chromosomal instability in breast cancer / K. Lee [et al.] // *Scientific Reports*. 2019. Vol. 9, № 1. P. 17968. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-54471-w>
18. *Scherer W. F., Syverton J. T., Gey, G. O.* Studies on the propagation in vitro of poliomyelitis viruses. IV. Viral multiplication in a stable strain of human malignant epithelial cells (strain HeLa) derived from an epidermoid carcinoma of the cervix // *Journal of Experimental Medicine*. 1953. Vol. 97, № 5. P. 695–710. <https://doi.org/10.1084/jem.97.5.695>
19. Droplet digital polymerase chain reaction detection of HER2 amplification in formalin fixed paraffin embedded breast and gastric carcinoma samples / Y. Zhu [et al.] // *Experimental and Molecular Pathology*. 2015. Vol. 100, № 2. P. 287–293. <https://doi.org/10.1016/j.yexmp.2015.11.027>
20. Certification of standard reference material 2372a; Human DNA quantitation standard / E. L. Romsos [et al.] // *NIST Special Publication*. 2018. P. 260–189. <https://doi.org/10.6028/NIST.SP.260-189>
21. Use of the MLPA assay in the molecular diagnosis of gene copy number alterations in human genetic diseases / L. Stuppia [et al.] // *International Journal of Molecular Sciences*. 2012. Vol. 13, № 3. P. 3245–3276. <https://doi.org/10.3390/ijms13033245>
22. *Cousineau I., Belmaaza A.* EMSY overexpression disrupts the BRCA2/ RAD51 pathway in the DNA-damage response: Implications for chromosomal instability/recombination syndromes as checkpoint diseases // *Molecular Genetics and Genomics*. 2011. Vol. 285, № 4. P. 325–340. <https://doi.org/10.1007/s00438-011-0612-5>

## REFERENCES

1. Sung H., Ferlay J., Siegel R. L., Laversanne M., Soerjomataram I., Jemal A. et al. Global cancer statistics 2020: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*. 2021;71(3):209–249. <https://doi.org/10.3322/caac.21660>
2. Loeb K. R., Loeb L. A. Significance of multiple mutations in cancer. *Carcinogenesis*. 2000;21(3):379–385. <https://doi.org/10.1093/carcin/21.3.379>
3. Kuchenbaecker K. B., Hopper J. L., Barnes D. R., Phillips K.-A., Mooij T. M., Roos-Blom M.-J. Risks et al. of breast, ovarian, and contralateral breast cancer for BRCA1 and BRCA2 mutation carriers. *JAMA*. 2017;317(23):2402–2416. <https://doi.org/10.1001/jama.2017.7112>
4. Antoniou A., Pharoah P. D. P., Narod S., Risch H. A., Eyfjord J. E., Hopper J. L. et al. Average risks of breast and ovarian cancer associated with BRCA1 or BRCA2 mutations detected in case series unselected for family history: A combined analysis of 22 studies. *American Journal of Human Genetics*. 2003;72(5):1117–1130. <https://doi.org/10.1086/375033>
5. Chen S., Parmigiani G. Meta-analysis of BRCA1 and BRCA2 penetrance. *Journal of Clinical Oncology*. 2007;25(11):1329–1333. <https://doi.org/10.1200/JCO.2006.09.1066>
6. Li Sh., Silvestri V., Leslie G., Rebbeck T. R., Neuhausen S. L., Hopper J. L. et al. Cancer risks associated with BRCA1 and BRCA2 pathogenic variants. *Journal of Clinical Oncology*. 2022;40(14):1529–1541. <https://doi.org/10.1200/JCO.21.02112>
7. Berger M. F., Mardis E. R. The emerging clinical relevance of genomics in cancer medicine. *Nature Reviews Clinical Oncology*. 2018;15(6):353–365. <https://doi.org/10.1038/s41571-018-0002-6>
8. Haratani K., Hayashi H., Tanaka T., Kaneda H., Togashi Y., Sakai K. et al. Tumor immune microenvironment and nivolumab efficacy in EGFR mutation-positive non-small-cell lung cancer based on T790M status after disease progression during EGFR-TKI treatment. *Annals of Oncology*. 2017;28(7):1532–1539. <https://doi.org/10.1093/annonc/mdx183>

9. Cutsem E. V., Lenz H.-J., Köhne C.-H., Heinemann V., Tejpar S., Melezínek I. et al. Fluorouracil, leucovorin, and irinotecan plus cetuximab treatment and RAS mutations in colorectal cancer. *Journal of Clinical Oncology*. 2015;33(7):692–700. <https://doi.org/10.1200/JCO.2014.59.4812>
10. He H.-J., Almeida J. L., Lund S., Steffen C. R. Development of NIST standard reference material 2373: Genomic DNA standards for HER2 measurements. *Biomolecular Detection and Quantification*. 2016;8:1–8. <https://doi.org/10.1016/j.bdq.2016.02.001>
11. He H.-J., Das B., Cleveland M. H., Chen L., Camalier C. E., Liu L.-Ch. et al. Development and interlaboratory evaluation of a NIST reference material RM 8366 for EGFR and MET gene copy number measurements. *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine*. 2019;57(8):1142–1152. <https://doi.org/10.1515/ccml-2018-1306>
12. Milavec M., Cleveland M. H., Bae Y.-K., Wielgosz R. I., Vonsky M., Huggett J. F. et al. Metrological framework to support accurate, reliable, and reproducible nucleic acid measurements. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. 2022;414(2):791–806. <https://doi.org/10.1007/s00216-021-03712-x>
13. Alkabban F. M., Ferguson T. Breast cancer. Treasure Island: StatPearls Publishing; 2022. Available at: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK482286> [Accessed 08 November 2022].
14. Bose R., Kavuri Sh. M., Searleman A. C., Shen W., Shen D., Koboldt D. C. et al. Activating HER2 mutations in HER2 gene amplification negative breast cancer. *Cancer Discov*. 2013;3(2):224–237. <https://doi.org/10.1158/2159-8290.CD-12-0349>
15. Iqbal N., Iqbal N. Human epidermal growth factor receptor 2 (HER2) in cancers: overexpression and therapeutic implications. *Molecular Biology International*. 2014;852748. <https://doi.org/10.1155/2014/852748>
16. Moasser M. M. The oncogene HER2: its signaling and transforming functions and its role in human cancer pathogenesis. *Oncogene*. 2007;26(45):6469–6487. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1210477>
17. Lee K., Kim H. J., Jang M. H., Lee S., Ahn S., Park Y. S. Centromere 17 copy number gain reflects chromosomal instability in breast cancer. *Scientific Reports*. 2019;9(1):17968. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-54471-w>
18. Scherer W. F., Syverton J. T., Gey, G. O. Studies on the propagation in vitro of poliomyelitis viruses. IV. Viral multiplication in a stable strain of human malignant epithelial cells (strain HeLa) derived from an epidermoid carcinoma of the cervix. *Journal of Experimental Medicine*. 1953;97(5):695–710. <https://doi.org/10.1084/jem.97.5.695>
19. Zhu Y., Lu D., Lira M. E., Xu Q., Du Y., Xiong J. et al. Droplet digital polymerase chain reaction detection of HER2 amplification in formalin fixed paraffin embedded breast and gastric carcinoma samples. *Experimental and Molecular Pathology*. 2015;100(2):287–293. <https://doi.org/10.1016/j.yexmp.2015.11.027>
20. Romsos E. L., Kline M. C., Duewer D. L., Toman B., Farkas N. Certification of standard reference material 2372a; Human DNA quantitation standard. *NIST Special Publication*. 2018:260–189. <https://doi.org/10.6028/NIST.SP.260-189>
21. Stuppia L., Antonucci I., Palka G., Gatta V. Use of the MLPA assay in the molecular diagnosis of gene copy number alterations in human genetic diseases. *International Journal of Molecular Sciences*. 2012;13(3):3245–3276. <https://doi.org/10.3390/ijms13033245>
22. Cousineau I., Belmaaza A. EMSY overexpression disrupts the BRCA2/ RAD51 pathway in the DNA-damage response: Implications for chromosomal instability/recombination syndromes as checkpoint diseases. *Molecular Genetics and Genomics*. 2011;285(4):325–340. <https://doi.org/10.1007/s00438-011-0612-5>

## БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЙ СПИСОК

Международная система единиц (SI) // ФГУП «ВНИИМ им. Д. И. Менделеева». Изд. 9-е. 2019. ВІРМ. URL: <https://www.vniim.ru/files/SI-2019.pdf> (дата обращения 10.10.2022)

ОФС.1.7.2.0031.15 Испытание на присутствие микоплазм / Фармакопей.РФ. URL: <https://pharmacopoeia.ru/ofs-1-7-2-0031-15-ispytanie-na-prisutstvie-mikoplazm/> (дата обращения 10.09.2022).

ЦКП «Коллекция культур Клеток Позвоночных» Федеральное государственное бюджетное учреждение науки «Институт цитологии Российской академии наук»: сайт. URL: <https://incras-ckp.ru/> (дата обращения 12.10.2022).

World Health Organisation: сайт / Всемирная организация здравоохранения. <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/cancer> (дата обращения 11.10.2022).

## ИНФОРМАЦИЯ ОБ АВТОРАХ

**Вонский Максим Сергеевич** – канд. биол. наук, руководитель отдела государственных эталонов и стандартных образцов в области биоаналитических и медицинских измерений ФГУП «ВНИИМ им. Д. И. Менделеева»

Россия, 190005, г. Санкт-Петербург, Московский пр., д. 19

e-mail: m. s.vonsky@vniim.ru

<https://orcid.org/0000-0003-4061-7411>

## INFORMATION ABOUT THE AUTHORS

**Maxim S. Vonsky** – Cand. Sci. (Biol.), Head of the department of state standards and reference materials in the field of bioanalytical and medical measurements, D. I. Mendeleev Institute for Metrology

19 Moskovskiy ave., St. Petersburg, 190005, Russia

e-mail: m. s.vonsky@vniim.ru

<https://orcid.org/0000-0003-4061-7411>

**Рунов Андрей Леонидович** – и. о. руководителя сектора государственных эталонов в области биоаналитических измерений ФГУП «ВНИИМ им. Д. И. Менделеева»  
Россия, 190005, г. Санкт-Петербург, Московский пр., д. 19  
e-mail: a. l.runov@vniim.ru  
<https://orcid.org/0000-0001-9496-4414>

**Горячая Татьяна Станиславовна** – ведущий инженер с возложением обязанностей руководителя группы по контролю и обеспечению качества Центра клеточных технологий ФГБУН «Институт цитологии РАН»  
Россия, 194064, г. Санкт-Петербург, Тихорецкий пр., д. 4  
e-mail: goryachaya.tanya@yandex.ru  
<https://orcid.org/0000-0003-2854-3528>

**Кольцова Анна Михайловна** – канд. биол. наук, старший научный сотрудник с возложением обязанностей заведующего Центра коллективного пользования «Коллекция культур клеток позвоночных» ФГБУН «Институт цитологии РАН»  
Россия, 194064, г. Санкт-Петербург, Тихорецкий пр., д. 4  
e-mail: koltsova.am@mail.ru  
<https://orcid.org/0000-0002-3863-4987>

**Курчакова Елена Владимировна** – инженер сектора государственных эталонов в области биоаналитических измерений ФГУП «ВНИИМ им. Д. И. Менделеева»  
Россия, 190005, г. Санкт-Петербург, Московский пр., д. 19  
e-mail: e. v.kurchakova@vniim.ru  
<https://orcid.org/0000-0002-3084-463X>

**Назаров Владимир Дмитриевич** – канд. мед. наук, младший научный сотрудник лаборатории диагностики аутоиммунных заболеваний Научно-методического центра Минздрава России по молекулярной медицине ФГБОУ ВО ПСПбГМУ им. И. П. Павлова  
Россия, 197022, г. Санкт-Петербург, ул. Льва Толстого, д. 6–8  
e-mail: nazarov19932@mail.ru  
<https://orcid.org/0000-0002-9354-8790>

**Лاپин Сергей Владимирович** – канд. мед. наук, заведующий лабораторией диагностики аутоиммунных заболеваний Научно-методического центра Минздрава России по молекулярной медицине ФГБОУ ВО ПСПбГМУ им. И. П. Павлова  
Россия, 197022, г. Санкт-Петербург, ул. Льва Толстого, д. 6–8  
e-mail: svlapin@mail.ru  
<https://orcid.org/0000-0002-4998-3699>

**Мазинг Александра Васильевна** – канд. мед. наук, ведущий научный сотрудник лаборатории молекулярной диагностики Научно-методического центра Минздрава России по молекулярной медицине ФГБОУ ВО ПСПбГМУ им. И. П. Павлова  
Россия, 197022, г. Санкт-Петербург, ул. Льва Толстого, д. 6–8  
e-mail: alex\_mazing@mail.ru  
<https://orcid.org/0000-0002-3055-6507>

**Andrei L. Runov** – Acting Head of the sector of state standards in the field of bioanalytical measurements, D. I. Mendeleev Institute for Metrology  
19 Moskovskiy ave., St. Petersburg, 190005, Russia  
e-mail: a. l.runov@vniim.ru  
<https://orcid.org/0000-0001-9496-4414>

**Tatjana S. Gorjachaya** – Leading Engineer with the duties of the Head of the group for quality control and quality assurance of the Center for Cell Technologies, Institute of Cytology of the Russian Academy of Sciences  
4 Tikhoretsky ave., St. Petersburg, 194064, Russia  
e-mail: goryachaya.tanya@yandex.ru  
<https://orcid.org/0000-0003-2854-3528>

**Anna M. Koltsova** – Cand. Sci. (Biol.), Senior Researcher with the duties of the Head of the Common Use Center «Vertebrate Cell Culture Collection», Institute of Cytology of the Russian Academy of Sciences  
4 Tikhoretsky ave., St. Petersburg, 194064, Russia  
e-mail: koltsova.am@mail.ru  
<https://orcid.org/0000-0002-3863-4987>

**Elena V. Kurchakova** – Engineer of the sector of state standards in the field of bioanalytical measurements, D. I. Mendeleev Institute for Metrology  
19 Moskovskiy ave., St. Petersburg, 190005, Russia  
e-mail: e. v.kurchakova@vniim.ru  
<https://orcid.org/0000-0002-3084-463X>

**Vladimir D. Nazarov** – Cand. Sci. (Med.), Junior Researcher of the laboratory for diagnostics of autoimmune diseases of the Scientific and Methodological Center for Molecular Medicine, Pavlov First Saint Petersburg State Medical University of the Ministry of Health of the Russian Federation  
6–8 Lev Tolstoy str., St. Petersburg, 197022, Russia  
e-mail: nazarov19932@mail.ru  
<https://orcid.org/0000-0002-9354-8790>

**Sergey V. Lapin** – Cand. Sci. (Med.), Head of the laboratory for diagnostics of autoimmune diseases of the Scientific and Methodological Center for Molecular Medicine, Pavlov First Saint Petersburg State Medical University of the Ministry of Health of the Russian Federation  
6–8 Lev Tolstoy str., St. Petersburg, 197022, Russia  
e-mail: svlapin@mail.ru  
<https://orcid.org/0000-0002-4998-3699>

**Alexandra V. Mazing** – Cand. Sci. (Med.), Leading Researcher of the laboratory of molecular diagnostics of the Scientific and Methodological Center for Molecular Medicine, Pavlov First Saint Petersburg State Medical University of the Ministry of Health of the Russian Federation  
6–8 Lev Tolstoy str., St. Petersburg, 197022, Russia  
e-mail: alex\_mazing@mail.ru  
<https://orcid.org/0000-0002-3055-6507>

**Эмануэль Владимир Леонидович** – д-р мед. наук, профессор, заведующий кафедрой клинической лабораторной диагностики с курсом молекулярной медицины ФГБОУ ВО ПСПбГМУ им. И. П. Павлова  
Россия, 197022, г. Санкт-Петербург, ул. Льва Толстого, д. 6–8  
e-mail: vladimirem1@gmail.com  
<https://orcid.org/0000-0002-2079-0439>

**Vladimir L. Emanuel** – Dr. Sci. (Med.), Professor, Head of the department of clinical laboratory diagnostics with the course of molecular medicine, Pavlov First Saint Petersburg State Medical University of the Ministry of Health of the Russian Federation  
6–8 Lev Tolstoy str., St. Petersburg, 197022, Russia  
e-mail: vladimirem1@gmail.com  
<https://orcid.org/0000-0002-2079-0439>