

Изотермическая петлевая амплификация: эффективный метод экспресс-диагностики в онкологии

Ю.А. Макарова^{1, 2}, А.А. Зотиков¹, Г.А. Белякова³, Б.Я. Алексеев¹, М.Ю. Шкурников¹

¹ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр радиологии» Минздрава России; Россия, 249031 Обнинск, ул. Королева, 4;

²ФГБУН «Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта Российской академии наук»; Россия, 119991 Москва, ул. Вавилова, 32;

³ФГАОУ ВО Первый Московский государственный медицинский университет им. И.М. Сеченова Минздрава России; Россия, 119991 Москва, ул. Трубецкая, 8, стр. 2

Контакты: Максим Юрьевич Шкурников mshkurnikov@gmail.com

В обзоре обсуждается новый метод молекулярной биологии – изотермическая петлевая амплификация (*loop-mediated isothermal amplification, LAMP*), приобретающий в последнее время все большую популярность, особенно для целей диагностики. В отличие от полимеразной цепной реакции, амплификация ДНК или РНК происходит при постоянной температуре (около 65 °С) с использованием 4 или 6 праймеров. Метод отличается высокой специфичностью, чувствительностью и быстротой. Для него не нужны дорогостоящие приборы, а детекция продуктов реакции может быть проведена невооруженным глазом. LAMP успешно применена для диагностики десятков вирусов, бактерий и других патогенов, в том числе в составе пищевых продуктов, а также для детекции однонуклеотидных полиморфизмов. Недавно была создана модификация LAMP, предназначенная для детекции метастазов. Она получила название OSNA (*one-step nucleic acid amplification*). Оказалось, что OSNA обладает практически такой же чувствительностью и специфичностью, как и стандартные диагностические методы, а иногда даже превосходит их. Особое внимание уделено механизму LAMP, дизайну праймеров и диагностике онкологических заболеваний с помощью OSNA.

Ключевые слова: изотермическая петлевая амплификация, OSNA, Bst-полимераза, диагностика, онкология

Для цитирования: Макарова Ю.А., Зотиков А.А., Белякова Г.А. и др. Изотермическая петлевая амплификация: эффективный метод экспресс-диагностики в онкологии. Онкоурология 2018;14(2):88–99.

DOI: 10.17650/1726-9776-2018-14-2-88-99

Loop-mediated isothermal amplification: an effective method for express-diagnostics of cancer

Yu.A. Makarova^{1, 2}, A.A. Zotikov¹, G.A. Belyakova³, B. Ya. Alekseev¹, M. Yu. Shkurnikov¹

¹National Medical Research Radiology Center of Radiology, Ministry of Health of Russia; 4 Koroleva St., Obninsk 249031, Russia;

²V.A. Engelhardt Institute of Molecular Biology, Russian Academy of Sciences; 32 Vavilova St., Moscow 119991, Russia;

³Sechenov First Moscow State Medical University, Ministry of Health of Russia; Build. 2, 8 Trubetskaya St., Moscow 119991, Russia

The review is devoted to loop-mediated isothermal amplification (LAMP) – a novel molecular diagnostic method that has recently become increasingly popular. Unlike polymerase chain reaction, LAMP does not require thermal cycling; DNA or RNA amplification occurs at a constant temperature (about 65 °C) with 4 or 6 primers. This is a fast, highly-sensitive, and highly specific method, which does not require expensive equipment, where visual detection of the reaction products is performed by the unaided eye. LAMP is successfully used for the diagnosis of multiple viruses, bacteria, and other pathogens (including those in food). Moreover, it can be applied for the detection of single-nucleotide polymorphisms. Recently, a modified LAMP assay – one-step nucleic acid amplification (OSNA) – was validated for metastasis detection. OSNA was demonstrated to have almost the same sensitivity and specificity as standard diagnostic methods (sometimes even higher). Particular attention is paid to the mechanism of LAMP, primer design, and diagnostics of cancer using OSNA.

Key words: loop-mediated isothermal amplification, OSNA, Bst-polymerase, diagnostics, oncology

For citation: Makarova Yu.A., Zotikov A.A., Belyakova G.A. et al. Loop-mediated isothermal amplification: an effective method for express-diagnostics of cancer. *Onkourologiya = Cancer Urology* 2018;14(1):88–99.

Наиболее популярным методом амплификации нуклеиновых кислот является полимеразная цепная реакция (ПЦР). Ее значение как для исследователей, так и для клинических нужд сложно переоценить. Однако в 2000 г. был предложен другой способ амплификации нуклеиновых кислот, названный изотермической петлевой амплификацией (loop-mediated isothermal amplification, LAMP) [1].

Амплификацию осуществляет Bst-полимераза (ДНК-полимераза I из термофильной бактерии *Bacillus stearothermophilus*), способная к синтезу с вытеснением цепи. Поэтому стадия плавления не нужна, и вся реакция протекает при постоянной температуре (около 65 °С). Кроме того, используются 4 или 6 (в более поздней модификации) праймеров, что позволяет значительно повысить специфичность реакции. Праймеры подобраны таким образом, что на 1-й стадии образуется шпилечная структура, содержащая целевую последовательность, а на 2-й — на ее основе происходит образование множественных конкатемеров (рис. 1). Продукты накапливаются весьма быстро, так что уже через 15–60 мин (в зависимости от модификации) после начала реакции их присутствие (по косвенным признакам) можно легко увидеть невооруженным глазом. Реакцию можно совмещать с обратной транскрипцией, прямо в одной пробирке. Наконец, реакция намного менее чувствительна к примесям, так что в качестве исходной матрицы может служить кровь или лизат ткани.

Однако потребовалось время, чтобы этот элегантный, весьма эффективный и дешевый метод завоевал доверие исследователей. Сегодня число цитирований оригинальной статьи с описанием метода [1] приближается к 5000. Для постановки LAMP созданы и продаются оптимизированные версии Bst-полимеразы, а первые наборы для детекции патогенов с помощью LAMP уже поступили в продажу [2]. Очевидно, метод переживает начало бурного роста. В настоящем обзоре детально описан метод LAMP и обсуждаются области его применения. Основной акцент сделан на работах в области диагностики онкологических заболеваний.

Описание реакции изотермической петлевой амплификации

Для проведения реакции используются 2 пары праймеров: внешние (forward outer primer, F3; backward outer primer, B3) и внутренние (forward inner primer, FIP; backward inner primer, BIP) [1]. Внутренние праймеры имеют 2 участка, соответствующих 2 соседним участкам целевой последовательности. Реакция состоит из 2 этапов. Сначала образуется линейная одноцепочечная молекула со шпильками на концах (см. рис. 1, структура 8). Она содержит целевой амплифицируемый участок. На следующей стадии происходит

амплификация этой структуры (см. рис. 1, структуры 8–21). В ней участвуют только длинные внутренние праймеры. Поэтому их концентрация в несколько раз выше, чем концентрация внешних праймеров, которые необходимы только для более эффективного протекания первой стадии. На второй стадии происходит нециклическая амплификация целевого фрагмента. При этом образуется набор конкатемерных структур. Именно благодаря такому остроумному решению выход реакции необычайно высок: за время реакции количество ДНК увеличивается в 10^9 – 10^{10} раз. Благодаря большому количеству праймеров реакция обладает высокой специфичностью.

В более поздней модификации было предложено использовать еще 2 праймера (всего 6) [3]. Они получили название «петлевые праймеры» (loop-primers). Петлевые праймеры комплементарны участкам петлевых фрагментов шпилечной структуры, которые остались незадействованы во взаимодействиях с первыми 4 праймерами (рис. 2). Это повысило чувствительность реакции и значительно уменьшило время ее проведения: продукт можно детектировать не через час, а через 10–15 мин после начала реакции.

Дизайн праймеров для изотермической петлевой амплификации

Длина праймеров составляет 15–25 нуклеотидов (н.) (соответственно, праймеры FIP и BIP имеют удвоенную длину — 30–50 н.). Температуру плавления подбирают равной 55–63 °С для праймеров F3, B3 и для участков F2 и B2 праймеров FIP и BIP. Для фрагментов F1c и B1c праймеров FIP и BIP (именно они формируют шпилечные структуры, с которых начинается синтез (см. рис. 1)), а также для петлевых праймеров температуру плавления подбирают равной 60–68 °С. Для этого либо повышают содержание GC, либо удлиняют праймер. Требования к праймерам (отсутствие вторичных структур и стабильных димеров праймеров, содержание GC) такие же, как к праймерам для ПЦР.

Праймеры можно подбирать вручную, однако из-за большого их числа это весьма трудоемкая задача. Для ее решения написано несколько программ. Компании PREMIER Biosoft и OptiGene продают программу LAMP Designer с возможностью бесплатного тестирования. В 2011 г. была создана программа подбора LAVA, однако в настоящее время она недоступна [2]. Программа FastPCR имеет возможность подбора праймеров для LAMP [4]. Наиболее популярна на сегодняшний день созданная японской фирмой Eiken Chemical бесплатная программа Primer Explorer. Программа доступна на сайте фирмы (<https://primerexplorer.jp/e/>). В отличие от LAMP Designer, в ней нет встроенной проверки праймеров с помощью BLAST. Параметры подбора праймеров (диапазон

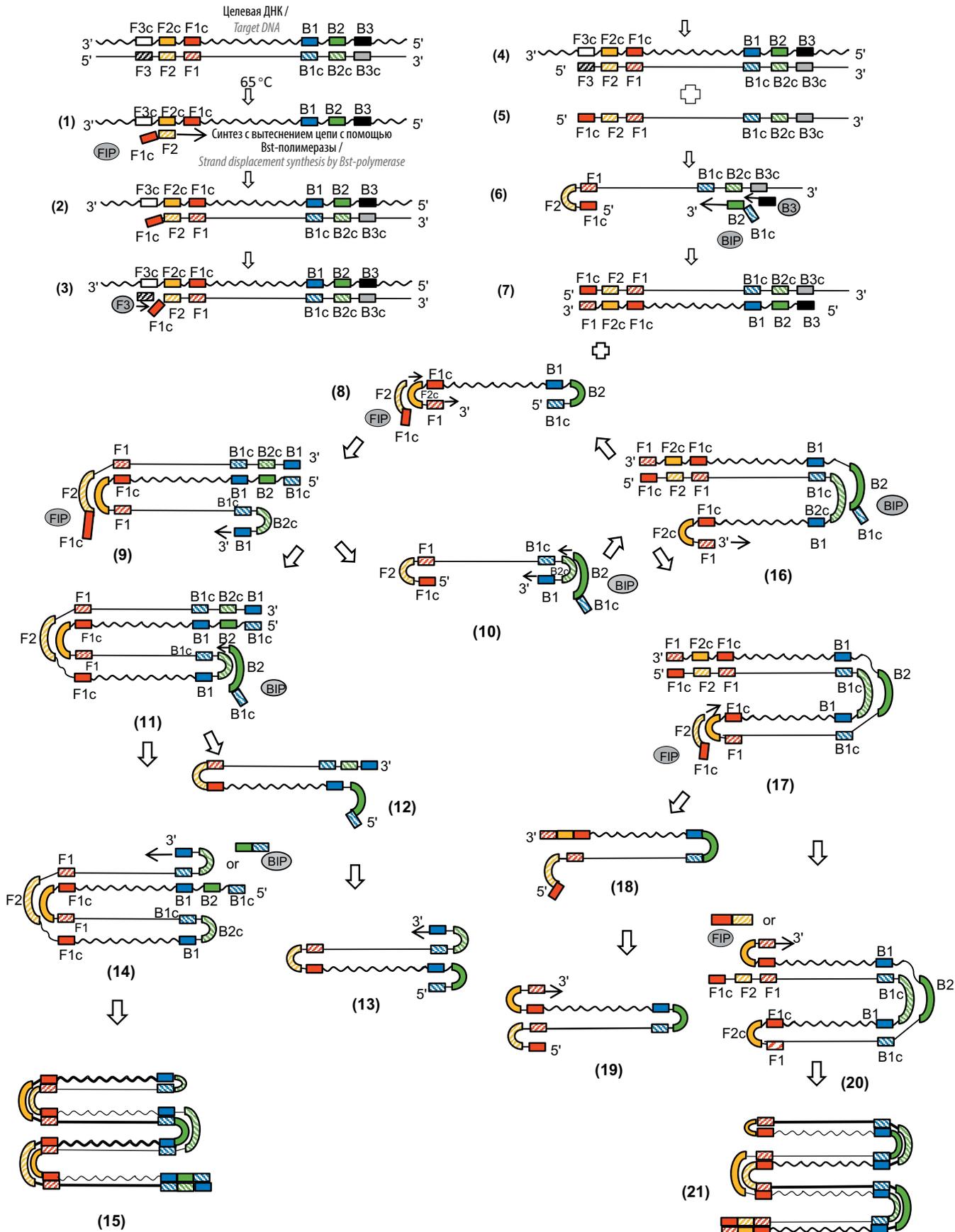


Рис. 1. Схема изотермической петлевой амплификации: (1) – Bst-полимераза начинает удлинение фрагмента F2 праймера FIP (forward inner primer); (2) – удлинение завершено; (3) – посадка праймера F3; (4) – удлинение праймера F3 с вытеснением цепи (5); (6) – образование шпильки на 5'-конце; удлинение цепи с праймеров B3 и VIP (backward inner primer). В результате удлинения праймера B3 образуется структура (7). В результате удлинения праймера VIP образуется шпильчатая структура (8), к которой может присоединиться праймер FIP; (9) – удлинение праймера FIP; на 3'-конце образовалась шпилька, с которой возможна дальнейшая элонгация; (10) – в результате удлинения праймера FIP образовалась шпильчатая структура, комплементарная структуре (8). К ней присоединяется праймер VIP; (11) – продукт элонгации структуры (9). В случае присоединения праймера VIP возможна дальнейшая элонгация; (12) – продукт элонгации праймера VIP, который может сформировать концевые шпильки (13); (14) – дальнейшая элонгация продукта (11) в результате образования шпильки или посадки праймера VIP. В случае элонгации шпильки образуется структура (15); (16) – завершение элонгации праймера VIP и начало элонгации шпильки. В результате вновь образуется структура (8) и появляется структура (17); (18–21) – этапы, аналогичные (12–15). В структурах (15) и (21) новосинтезированная цепь выделена жирной линией

Fig. 1. Scheme of loop-mediated isothermal amplification: (1) – Bst-polymerase extends the F2 region of the forward inner primer (FIP); (2) – extension is completed; (3) – F3 primer anneals to the target; (4) – F3 primer is extended with strand displacement (5); (6) – the product forms a loop structure at the 5'-end; extension of the strand after annealing of B3 primer and backward inner primer (BIP). The extension of B3 primer results in the emergence of structure (7). The extension of BIP results in the emergence of loop structure (8), which can be used as a binding site for FIP; (9) – FIP is extended with forming a loop structure at the 3'-end, which can be used for further elongation; (10) – the extension of FIP results in the emergence of loop structure complementary to structure (8). BIP binds to it; (11) – product of structure (9) elongation. Further elongation is possible if BIP binds to the target; (12) – product of BIP elongation that can form terminal loops (13); (14) – further elongation of product (11) after binding BIP to the complimentary region on the loop. Loop elongation results in the emergence of structure (15); (16) – completion of BIP elongation and start of the loop elongation. It leads to the formation of structures (8) and (17); (18–21) – stages similar to (12–15). In structures (15) and (21), the newly synthesized chain is indicated by a thick line

длин, температур плавления и расстояния между праймерами) у всех программ близки. Средний размер ампликона (расстояние между внешними границами F2 и B2) составляет ~200 пар нуклеотидов. На рис. 2 приведены расстояния между праймерами, заданные в установках Primer Explorer и которые при необходимости можно изменять. Такая необходимость возникает, когда программа не находит праймеров или находит их слишком много. В этом случае в первую очередь рекомендуют менять размер ампликона и размер петли F1c – F2.

Начальные установки параметров праймеров основаны на эмпирических данных. Однако следует учитывать, что их границы (особенно температура плавления) не являются очень жесткими, как и в случае ПЦР.

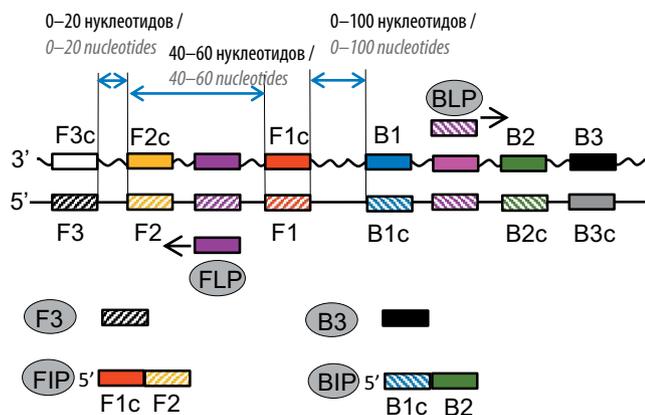


Рис. 2. Схема ампликона изотермической петлевой амплификации с 6 праймерами. Указаны диапазоны расстояний между праймерами, применяемые в программе Primer Explorer. FLP – forward loop primer, BLP – backward loop primer. Остальные обозначения праймеров как на рис. 1

Fig. 2. Scheme of an amplicon in loop-mediated isothermal amplification with 6 primers. The figure shows the ranges of distances between the primers used in the Primer Explorer program. FLP – forward loop primer, BLP – backward loop primer. The remaining primers are abbreviated as on Fig. 1

Например, в популярной в онкологии модификации LAMP – OSNA (one-step nucleic acid amplification; см. ниже) – петлевые праймеры имеют температуру плавления ~56 °C (LPF) и ~54 °C (LPR) [5].

Ферменты для проведения изотермической петлевой амплификации

Все выпускаемые сегодня ферменты для проведения LAMP созданы на основе Bst-полимеразы. Бактерия *B. stearothermophilus*, впервые описанная еще в 1920 г., широко распространена в почве, воде и вызывает порчу продуктов (http://www.wikiwand.com/en/Geobacillus_stearothermophilus). ДНК-полимеразы I, к которым относится Bst-полимераза, – мономерные белки размером ~700–900 аминокислотных остатков. Они осуществляют деградацию РНК-затравок и синтез ДНК на их месте, а также репарацию ДНК. Им свойственна 5'–3'-полимеразная (синтез ДНК) и 5'–3'-экзонуклеазная (деградация затравки) активности [6]. У некоторых полимераз семейства (например, ДНК-полимеразы I из *Escherichia coli*) имеется 3'–5'-экзонуклеазная корректирующая активность (proof-reading). У Bst-полимеразы она отсутствует [7, 8]. У современных коммерческих Bst-полимераз удален домен, обладающий 5'–3'-экзонуклеазной активностью. Они, подобно фрагменту Кленова ДНК-полимеразы I из *E. coli*, представляют собой большой фрагмент исходной Bst-полимеразы. Последняя способна к репликации с вытеснением цепи [7]. Именно это свойство стало определяющим при создании метода LAMP: благодаря ему не нужна повторяющаяся стадия плавления.

LAMP проводится при постоянной температуре (обычно около 65 °C). Это температурный оптимум Bst-полимеразы. Кроме того, при этой температуре двуцепочечная ДНК уже менее стабильна, что облегчает посадку праймеров. Первоначально до реакции проводили денатурацию ДНК при температуре 95 °C в течение 5 мин [1], однако вскоре выяснилось,

Таблица 1. Ферменты, используемые для проведения изотермической петлевой амплификации

Table 1. Enzymes used in loop-mediated isothermal amplification

Фермент Enzyme	Температурный оптимум, °С Optimum temperature, °C	Активность на матрицах Matrices	Производитель Manufacturer
Bst	65	ДНК DNA	New England, Biolabs и др. New England, Biolabs, etc.
Bst 2	60–72, warm start	ДНК DNA	NEB
Bst 3	65 (50–72)	ДНК, РНК DNA, RNA	NEB
GspM3.0	65	ДНК DNA	OptiGene
GspSSD2.0	65	ДНК, РНК DNA, RNA	OptiGene
LAVALamp	68–74	ДНК, РНК DNA, RNA	LuciGen
OmniAmp	72	ДНК, РНК DNA, RNA	BioCat

что реакция также хорошо проходит без денатурации, даже с геномной ДНК человека [9]. Для большей эффективности в реакцию может быть добавлен бетаин (триметилглицин), поскольку он снижает температуру плавления ДНК [9]. Для GC-богатых структурированных матриц его добавление дает хорошие результаты, однако для более легкоплавких матриц бетаин не эффективен и даже может обладать небольшим ингибирующим действием [10].

Разработаны варианты метода LAMP с привлечением обратной транскрипции (RT-LAMP). Обратную транскриптазу добавляют в ту же пробирку, что и реагенты для LAMP [11]. К настоящему времени созданы модифицированные варианты Bst-полимеразы, обладающие одновременно активностью обратной транскриптазы и имеющие повышенную термостабильность (табл. 1). Их использование упрощает проведение реакции и позволяет снизить неспецифическую амплификацию. Создана версия Bst-полимеразы (Bst 2 warm start, см. табл. 1), у которой активный центр при температуре ниже 45 °С блокирован аптамером, что также позволяет повысить специфичность реакции. Следует иметь в виду, что праймеры для ферментов с высокой температурой реакции нужно подбирать тоже с повышенной температурой плавления.

Визуализация продуктов реакции

Как и при ПЦР, визуализация может осуществляться после окончания реакции или в реальном времени. При использовании традиционного электрофореза в агарозном геле с последующим окрашиванием

интеркалирующим флуоресцентным красителем видна характерная «лестница» – конкатемерные продукты различной длины.

В реальном времени продукты реакции можно детектировать, добавляя флуоресцентные красители (SYBR Green I, бромистый этидий и др.) и измеряя изменение флуоресценции [11]. Протекание реакции можно оценить и по другим признакам. В ходе синтеза ДНК в результате гидролиза нуклеозидтрифосфатов высвобождается пирофосфат. Он образует белый осадок с присутствующими в буфере ионами магния. Поскольку в ходе LAMP образуется большое количество ДНК, побочного продукта (пирофосфата) тоже много. Благодаря этому помутнение реакционной смеси видно невооруженным глазом [12]. Количество образующегося пирофосфата магния пропорционально количеству синтезированной ДНК, поэтому, измеряя концентрацию пирофосфата, можно судить о концентрации ДНК [12]. Был даже разработан специальный прибор (турбидиметр), позволяющий по мутности проводить количественную оценку в реальном времени [13]. Более подробно способы детекции продуктов LAMP описаны в обзоре [2].

Сравнение методов изотермической петлевой амплификации и полимеразной цепной реакции

Сравнение характеристик ПЦР и LAMP приведено в табл. 2.

Безусловными достоинствами LAMP по сравнению с ПЦР являются высокая специфичность, ко-

Таблица 2. Сравнительная характеристика изотермической петлевой амплификации и полимеразной цепной реакции

Table 2. Comparison of loop-mediated isothermal amplification and polymerase chain reaction

Параметр Parameter	Полимеразная цепная реакция Polymerase chain reaction	Изотермическая петлевая амплификация Loop-mediated isothermal amplification
Фермент Enzyme	Taq-полимераза*; синтез без вытеснения цепи Taq-polymerase*; non-strand-displacing synthesis	Bst-полимераза; синтез с вытеснением цепи Bst-polymerase; strand-displacing synthesis
Температурный режим Temperature regimen	Циклическое изменение температуры Thermocycling	Изотермический (обычно 65 °C) Isothermal (usually 65 °C)
Амплификация Amplification	Циклическая Cyclic	Нециклическая Non-cyclic
Число праймеров Number of primers	2	4–6
Степень амплификации Amplification efficacy	10 ⁹ раз**	10 ⁹ –10 ¹⁰ раз
Время реакции Reaction time	Порядка от 45 мин до 2,5 ч*** Between 45 min and 2.5 h***	10–60 мин 10–60 min
Прибор Equipment	Дорогостоящий амплификатор Expensive thermocycler	Амплификатор не требуется**** No need for thermocycler****

*Или другие термофильные полимеразы, осуществляющие синтез без вытеснения цепи.

*Or other thermophilic, non-strand-displacing polymerases.

**Значение приведено для 30 циклов полимеразной цепной реакции.

**For 30 cycles of polymerase chain reaction.

***Время может различаться в зависимости от продолжительности каждой стадии и модели прибора.

***The time may vary depending on the duration of each stage and type of thermocycler.

****Можно использовать термостат или водяную баню.

****A thermostat or a water bath can be used.

торая достигается за счет 6 (или 8, в случае использования петлевых праймеров) участков связывания праймеров с целевой последовательностью, и высокая чувствительность (в среднем у LAMP она на порядок выше, чем у ПЦР (см. табл. 2)). Еще одним достоинством служит высокая скорость: продукты LAMP можно детектировать уже через 10 мин после начала реакции. Кроме того, реакция намного менее чувствительна к ингибиторам, присутствующим в биологических образцах. Поскольку дорогостоящие амплификаторы не нужны, а детекцию можно осуществлять просто глядя на пробирку, то LAMP дешевле ПЦР и не требует высокой квалификации.

Существенными недостатками метода являются невозможность клонирования продуктов реакции и сложность подбора праймеров, из чего следует другой недостаток: метод неудобен для исследовательских задач, при которых необходима амплификация относительно большого числа последовательностей. Такое соотношение сильных и слабых сторон обусловило область применения метода: он оказался ценной находкой для диагностики.

Области применения изотермической петлевой амплификации

LAMP, как и любой новый метод, первоначально был встречен с некоторым недоверием, однако накапливающийся положительный опыт его применения приводил ко все более широкому признанию. Первоначальная сложность подбора праймеров и оптимизации условий с лихвой окупается последующей простотой применения. Поэтому наиболее широко LAMP используется за стенами исследовательских лабораторий, где, вероятно, скоро будет успешно конкурировать с ПЦР. В продажу поступили первые коммерческие наборы на основе LAMP, например произведенные японской компанией Eiken Chemical, пионером в данной области. К настоящему времени метод успешно опробован для детекции однонуклеотидных полиморфизмов (single nucleotide polymorphisms, SNPs) [14], а также десятков патогенов: вирусов, бактерий, простейших, например возбудителей гепатита В, туберкулеза, сальмонеллеза, малярии и многих других [2]. Он оказался применим для контроля качества медицинских препаратов из лекарственных растений [15], отличия коровьего и козьего

молока и продуктов из них [16] и многих других целей. Оказалось, что LAMP может использоваться для детекции микроРНК (коротких РНК длиной ~22 н., осуществляющих сайленсинг генов [17]). Праймером F3 служит целевая микроРНК. Для детекции используют любой работающий набор праймеров (B3, F1P, V1P) и синтетическую матрицу. Важно только, чтобы исследуемый образец не содержал мишеней для них. Специфичность реакции определяется праймером F3, т.е. самой микроРНК. Специфичность была продемонстрирована при детекции микроРНК семейства let-7, различающихся только одним нуклеотидом. Диапазон чувствительности метода для микроРНК в реакционной смеси составил от 1 аттомоль до 1 пикомоль [18]. Важной областью применения LAMP, на которой мы остановимся подробнее, оказалась детекция метастазов в лимфатические узлы (ЛУ).

OSNA: детекция метастазов в лимфатические узлы

В 2007 г. LAMP был адаптирован для детекции метастазов в сторожевые ЛУ [5]. Так называют узлы, расположенные в непосредственной близости от злокачественной опухоли. Именно они поражаются метастазами в первую очередь. Наличие метастазов в сторожевых ЛУ имеет важное прогностическое значение и во многом определяет тактику лечения. Кроме того, проведение диагностики прямо во время операции позволяет принять оптимальное решение о необходимости удаления сторожевых и более отдаленных ЛУ. Стандартная диагностика (окрашивание парафиновых срезов ткани гематоксилином и эозином и визуальная оценка) требует высокой квалификации и довольно продолжительного времени (~36 ч), тогда как LAMP прост в применении и позволяет быстро получить результат.

Модификация LAMP, разработанная для анализа метастазов в сторожевые ЛУ, — OSNA — включает лизис фрагмента ЛУ, обратную транскрипцию и LAMP. Выделения РНК не требуется: в качестве матрицы используется просто лизат ткани. Стандартным стало применение праймеров к цитокератину 19 (KRT19) [5, 19]. Цитокератин 19 принадлежит к семейству кератинов — белков промежуточных филаментов. Экспрессируется главным образом в клетках эпителия, в частности в эпителии протоков и слизистых оболочках, а также в клетках опухолей эпителиального происхождения и их метастазах [20]. Поэтому обнаружение цитокератина 19 в ЛУ является признаком присутствия в нем опухолевых клеток эпителиального происхождения. Метод был разработан для детекции метастазов рака молочной железы и с тех пор успешно применен для детекции метастазов других опухолей эпителиального происхождения, в частности колоректального рака, немелкоклеточного рака легких, рака матки и щитовидной железы [21–24].

Так, в большинстве работ по сравнению методики OSNA и гистологического исследования при детекции метастатического поражения сторожевых ЛУ при раке молочной железы показано, что OSNA обладает высокой специфичностью, высоким уровнем соответствия результатов и диагностической ценностью отрицательного результата. Такие данные демонстрировали, что диссекция подмышечных ЛУ у пациентов без метастазов в сторожевые ЛУ может не проводиться. Высокая диагностическая ценность отрицательного результата дает убедительные доказательства того, что диссекция подмышечных ЛУ могла быть безопасно исключена у пациентов с непораженными сторожевыми ЛУ. Высокий (93,8 %) уровень сопоставимости результатов указывает на то, что OSNA сопоставима с гистологическим исследованием по способности детекции метастазов в ЛУ (табл. 3).

Аналогичные результаты были получены при сравнении методики OSNA и гистологического исследования при детекции метастатического поражения ЛУ при раке желудка, легких, щитовидной железы, колоректальном раке, плоскоклеточном раке головы и шеи (табл. 4).

Нами OSNA впервые был применен для детекции метастазов в сторожевые ЛУ при раке предстательной железы [25]. Чувствительность и специфичность относительно морфологического исследования составили 94 и 93 %. Такие же высокие значения были получены ранее для других видов опухолей [24]. Таким образом, метод применим и для рака предстательной железы. Поскольку с момента удаления ЛУ до получения результата проходит не более 40 мин, метод может быть использован прямо во время операции. Благодаря простоте, дешевизне и точности OSNA имеет хорошие перспективы для внедрения в клиническую практику. Применение OSNA также позволит избежать субъективности, неизбежной при визуальной оценке срезов тканей, и внедрить его в больницы со слабым техническим оснащением.

Очевидно, потенциал OSNA на этом отнюдь не исчерпан. Так, метод опробован еще не на всех опухолях эпителиального происхождения. Актуальным представляется также поиск других генов-маркеров, помимо СК19, в частности для опухолей неэпителиального происхождения.

Дальнейшие направления развития изотермической петлевой амплификации в онкологии

Статус ЛУ остается важным прогностическим фактором и одним из ключевых компонентов выбора тактики лечения больных раком различной локализации. «Золотым стандартом» оценки статуса ЛУ является гистологическое исследование, не лишенное ряда недостатков (субъективность оценки, влияние пробоподготовки и числа анализируемых срезов).

Таблица 3. Сравнение методики OSNA и гистологического исследования при детекции метастатического поражения сторожевых лимфатических узлов при раке молочной железы

Table 3. Comparison of OSNA assay and histological examination for the detection of sentinel lymph node metastases in breast cancer

Автор Author	Год Year	Количество образцов Number of specimens	Чувствительность, % Sensitivity, %	Специфичность, % Specificity, %	Сопоставимость результатов, % Concordance rate, %	Диагностическая ценность положительного результата, % Positive predictive value, %	Диагностическая ценность отрицательного результата, % Negative predictive value, %
М. Tsujimoto и соавт. [5] M. Tsujimoto et al. [5]	2007	325	95,8	98,6	98,2	91,5	99,3
М. Visser и соавт. [26] M. Visser et al. [26]	2008	346	95,3	94,7	94,8	80,3	98,9
С. Schem и соавт. [27] C. Schem et al. [27]	2009	343	98,1	91,7	91,8	80,0	99,0
У. Tamaki и соавт. [28] Y. Tamaki et al. [28]	2009	450	87,5	94,1	92,9	76,1	97,2
С. Feldman и соавт. [29] S. Feldman et al. [29]	2011	1044	77,5	95,8	93,4	73,8	96,6
А. Khaddage и соавт. [30] A. Khaddage et al. [30]	2011	80	88,2	98,4	96,3	93,8	96,9
Л. Bernet и соавт. [31] L. Bernet et al. [31]	2011	181	89,2	95,8	94,5	84,6	97,2
К.Л. Snook и соавт. [32] K.L. Snook et al. [32]	2011	395	91,7	96,9	95,9	86,8	98,1
М.А. Frère-Belda и соавт. [33] M.A. Frère-Belda et al. [33]	2012	503	80,9	93,9	92,2	65,4	97,2
У.С. Wang и соавт. [34] Y.S. Wang et al. [34]	2012	1188	83,7	92,9	91,4	96,8	69,1
У. Sagara и соавт. [35] Y. Sagara et al. [35]	2013	61	75,0	98,0	93,4	90,0	94,1
С. Buglioni и соавт. [36] S. Buglioni et al. [36]	2013	903	92,6	96,1	95,3	86,1	98,0
В. Smolarz и соавт. [37] B. Smolarz et al. [37]	2013	74	100	96,2	97,3	90,9	100
С.М. Banerjee и соавт. [38] S.M. Banerjee et al. [38]	2014	268	95,1	95,6	95,5	80,0	99,1
Н. Pathmanathan и соавт. [39] N. Pathmanathan et al. [39]	2014	170	89,3	96,5	95,3	83,3	97,9
А. Chaudhry и соавт. [40] A. Chaudhry et al. [40]	2014	166	92,8	93,7	89,2	43,4	99,2
Д. Li и соавт. [41] D. Li et al. [41]	2015	311	83,3	96,7	95,2	76,9	97,8
Всего <i>Total</i>		6808	89,3	94,8	93,8	77,8	97,6

Таблица 4. Сравнение методики OSNA и гистологического исследования при детекции метастатического поражения лимфатических узлов при различных видах рака

Table 4. Comparison of OSNA assay and histological examination for the detection of lymph node metastases in various cancers

Автор Author	Год Year	Количество образцов Number of specimens	Чувствительность, % Sensitivity, %	Специфичность, % Specificity, %	Сопоставимость результатов, % Concordance rate, %	Диагностическая ценность положительного результата, % Positive predictive value, %	Диагностическая ценность отрицательного результата, % Negative predictive value, %
Рак желудка <i>Gastric cancer</i>							
Y. Yaguchi и соавт. [42] Y. Yaguchi et al. [42]	2011	162	88,9	96,6	94,4	90,9	95,8
K. Kumagai и соавт. [43] K. Kumagai et al. [43]	2014	394	83,3	95,9	94,2	76,3	97,3
Колоректальный рак <i>Colorectal cancer</i>							
R.S. Croner и соавт. [44] R.S. Croner et al. [44]	2010	184	92,5	96,5	95,7	88,1	97,9
H. Yamamoto и соавт. [45] H. Yamamoto et al. [45]	2011	385	95,2	97,7	97,1		
U. Güller и соавт. [46] U. Güller et al. [46]	2012	307	94,5	97,6	97,1	89,7	98,8
H. Yamamoto и соавт. [47] H. Yamamoto et al. [47]	2016	1925	86,2	96,5	95,7	66,5	98,8
Рак легкого <i>Lung cancer</i>							
M. Inoue и соавт. [48] M. Inoue et al. [48]	2012	165	95,0	99,3	98,8	95,0	99,3
M. Hayama и соавт. [49] M. Hayama et al. [49]	2014	40	100	91,7	92,5	57,1	100
K. Nakagawa и соавт. [50] K. Nakagawa et al. [50]	2016	410	79,7		92,7		
Рак щитовидной железы <i>Thyroid cancer</i>							
K. Kaczka и соавт. [51] K. Kaczka et al. [51]	2014	92	65,0	87,5	82,6	59,1	90,0
K. Kaczka и соавт. [52] K. Kaczka et al. [52]	2015	21	81,8	100	90,5	83,3	100
S. del Carmen и соавт. [53] S. del Carmen et al. [53]	2016	273	81,5	92,1	87,9	87,1	88,3
Рак шейки матки <i>Cervical cancer</i>							
S. Okamoto и соавт. [54] S. Okamoto et al. [54]	2013	130	50,0	98,4	96,2	60,0	97,6
T. Nagai и соавт. [55] T. Nagai et al. [55]	2015	137	82,4	99,2	97,1	93,3	97,5
Плоскоклеточный рак головы и шеи <i>Head and neck squamous cell carcinoma</i>							
T. Matsuzuka и соавт. [56] T. Matsuzuka et al. [56]	2012	175	82,4	99,3			
H. Goda и соавт. [57] H. Goda et al. [57]	2012	312	86,9	96,0	94,2	84,1	96,8

Возможность применения методики LAMP при различных формах онкологических заболеваний является предметом пристального изучения в наши дни. На настоящий момент известно о многочисленных многоцентровых исследованиях и успешном клиническом применении LAMP при нескольких видах рака, таких как рак желудка и колоректальный рак. Пристальное внимание уделяется прогностической значимости анализа целого ЛУ методом OSNA, позволяющего избежать ложноотрицательных результатов при наличии микрометастазов. Кроме того, изучается вопрос использования дополнительных маркеров, отличных от цитokerатина 19. Так, сообщалось о нескольких случаях рака молочной железы с низкой экспрессией матричной РНК цитокератина 19, что делало невозможным применение OSNA для обнаруже-

ния метастатического поражения ЛУ. В многоцентровом исследовании Y. Tamaki и соавт. 2 узла от разных пациентов дали ложноотрицательные результаты с очень слабой экспрессией матричной РНК цитокератина 19, при иммуногистохимической окраске первичных опухолей пациентов также не обнаружено цитокератина 19 [27]. Такая же проблема может возникать и при других злокачественных опухолях и тем самым влиять на процесс принятия решений о дальнейшей тактике ведения пациента.

Отдельным направлением является разработка различных модификаций микрочипов, что позволит сделать диагностику с помощью LAMP еще более доступной [58–60]. Таким образом, LAMP оказалась весьма перспективным методом, уже входящим в широкое применение.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

- Notomi T., Okayama H., Masubuchi H. et al. Loop-mediated isothermal amplification of DNA. *Nucleic Acids Res* 2000;28(12):E63. PMID: 10871386.
- Wong Y.P., Othman S., Lau Y.L. et al. Loop-mediated isothermal amplification (LAMP): a versatile technique for detection of micro-organisms. *J Appl Microbiol* 2018;124(3):626–43. DOI: 10.1111/jam.13647. PMID: 29165905.
- Nagamine K., Hase T., Notomi T. Accelerated reaction by loop-mediated isothermal amplification using loop primers. *Mol Cell Probes* 2002;16(3):223–9. PMID: 12144774.
- Kalendar R., Tselykh T.V., Khassenov B., Ramanculov E.M. Introduction on using the fastPCR software and the related java web tools for PCR and oligonucleotide assembly and analysis. *Methods Mol Biol* 2017;1620:33–64. DOI: 10.1007/978-1-4939-7060-5_2. PMID: 28540698.
- Tsujimoto M., Nakabayashi K., Yoshidome K. et al. One-step nucleic acid amplification for intraoperative detection of lymph node metastasis in breast cancer patients. *Clin Cancer Res* 2007;13(16):4807–16. DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-06-2512. PMID: 17699859.
- Patel P.H., Suzuki M., Adman E. et al. Prokaryotic DNA polymerase I: evolution, structure, and "base flipping" mechanism for nucleotide selection. *J Mol Biol* 2001;308(5):823–37. DOI: 10.1006/jmbi.2001.4619. PMID: 11352575.
- Kiefer J.R., Mao C., Hansen C.J. et al. Crystal structure of a thermostable *Bacillus* DNA polymerase I large fragment at 2.1 Å resolution. *Structure* 1997;5(1):95–108. PMID: 9016716.
- Aliotta J.M., Pelletier J.J., Ware J.L. et al. Thermostable *Bst* DNA polymerase I lacks a 3'–5' proof-reading exonuclease activity. *Genet Anal* 1996;12(5–6):185–95. PMID: 8740835.
- Nagamine K., Watanabe K., Ohtsuka K. et al. Loop-mediated isothermal amplification reaction using a non-denatured template. *Clin Chem* 2001;47(9):1742–3. PMID: 11514425.
- Ma C., Wang Y., Zhang P., Shi C. Accelerated isothermal nucleic acid amplification in betaine-free reaction. *Anal Biochem* 2017;530:1–4. DOI: 10.1016/j.ab.2017.04.017. PMID: 28457896.
- Notomi T., Mori Y., Tomita N., Kanda H. Loop-mediated isothermal amplification (LAMP): principle, features, and future prospects. *J Microbiol* 2015;53(1):1–5. DOI: 10.1007/s12275-015-4656-9. PMID: 25557475.
- Mori Y., Nagamine K., Tomita N., Notomi T. Detection of loop-mediated isothermal amplification reaction by turbidity derived from magnesium pyrophosphate formation. *Biochem Biophys Res Commun* 2001;289(1):150–4. DOI: 10.1006/bbrc.2001.5921. PMID: 11708792.
- Mori Y., Kitao M., Tomita N., Notomi T. Real-time turbidimetry of LAMP reaction for quantifying template DNA. *J Biochem Biophys Methods* 2004;59(2):145–57. DOI: 10.1016/j.jbbm.2003.12.005. PMID: 15163526.
- Nakamura N., Ito K., Takahashi M. et al. Detection of six single-nucleotide polymorphisms associated with rheumatoid arthritis by a loop-mediated isothermal amplification method and an electrochemical DNA chip. *Anal Chem* 2007;79(24):9484–93. DOI: 10.1021/ac0715468. PMID: 17985847.
- Li J.J., Xiong C., Liu Y. et al. Loop-Mediated Isothermal Amplification (LAMP): emergence as an alternative technology for herbal medicine identification. *Front Plant Sci* 2016;7:1956. DOI: 10.3389/fpls.2016.01956. PMID: 28082999.
- Kim M.J., Kim H.Y. Direct duplex real-time loop mediated isothermal amplification assay for the simultaneous detection of cow and goat species origin of milk and yogurt products for field use. *Food Chem* 2018;246:26–31. DOI: 10.1016/j.foodchem.2017.11.014. PMID: 29291848.
- Makarova J.A., Shkurnikov M.U., Wicklein D. et al. Intracellular and extracellular microRNA: an update on localization and biological role. *Prog Histochem Cytochem* 2016;51(3–4):33–49. DOI: 10.1016/j.proghi.2016.06.001. PMID: 27396686.
- Li C., Li Z., Jia H., Yan J. One-step ultrasensitive detection of microRNAs with loop-mediated isothermal amplification (LAMP). *Chem Commun (Camb)* 2011;47(9):2595–7. DOI: 10.1039/c0cc03957h. PMID: 21173961.
- Taniyama K., Motoshita J., Sakane J. et al. Combination analysis of a whole lymph node by one-step nucleic acid amplification and histology for intraoperative detection of micrometastasis. *Pathobiology* 2006;73(4):183–91. DOI: 10.1159/000096019. PMID: 17119347.
- Jain R., Fischer S., Serra S., Chetty R. The use of Cytokeratin 19 (CK19) immunohistochemistry in lesions of the pancreas, gastrointestinal tract, and liver. *Appl Immunohistochem Mol Morphol* 2010;18(1):9–15. DOI: 10.1097/PAI.0b013e3181ad36ea. PMID: 19956064.
- Sidaway P. Lung cancer: OSNA enables more accurate detection of micrometastases. *Nat Rev Clin Oncol* 2018;15(2):68. DOI: 10.1038/nrclinonc.2017.206. PMID: 29255236.

22. Wild J.B., Iqbal N., Francombe J. et al. Is it time for one-step nucleic acid amplification (OSNA) in colorectal cancer? A systematic review and meta-analysis. *Tech Coloproctol* 2017;21(9):693–9. DOI: 10.1007/s10151-017-1690-0. PMID: 28887714.
23. Shi F., Zhang Q., Liang Z. et al. One-step nucleic acid amplification assay is an accurate technique for sentinel lymph node biopsy of breast cancer patients: a meta-analysis. *Br J Cancer* 2017;117(8):1185–91. DOI: 10.1038/bjc.2017.262. PMID: 28797030.
24. Tamaki Y. One-step nucleic acid amplification (OSNA): where do we go with it? *Int J Clin Oncol* 2017;22(1):3–10. DOI: 10.1007/s10147-016-1030-9. PMID: 27549784.
25. Шкурников М.Ю., Зотиков А.А., Беляков М.М. Применение петлевой изотермической амплификации ДНК для диагностики микрометастазов рака предстательной железы в лимфатические узлы. *Онкоурология* 2017;13(2):63–6. DOI: 10.17650/1726-9776-2017-13-2-63-66 [Shkurnikov M.Y., Zotikov A.A., Belyakov M.M. et al. Application of loop-mediated isothermal amplification of DNA for diagnosis of prostate cancer micrometastases in the lymph nodes. *Onkourologiya = Cancer Urology* 2017;13(2):63–6. (In Russ.)].
26. Visser M., Jiwa M., Horstman A. et al. Intra-operative rapid diagnostic method based on CK19 mRNA expression for the detection of lymph node metastases in breast cancer. *Int J Cancer* 2008;122(11):2562–7. DOI: 10.1002/ijc.23451. PMID: 18324628.
27. Schem C., Maass N., Bauerschlag D.O. et al. One-step nucleic acid amplification – a molecular method for the detection of lymph node metastases in breast cancer patients; results of the German study group. *Virchows Arch* 2009;454(2):203–10. DOI: 10.1007/s00428-008-0703-9. PMID: 19101726.
28. Tamaki Y., Akiyama F., Iwase T. et al. Molecular detection of lymph node metastases in breast cancer patients: results of a multicenter trial using the one-step nucleic acid amplification assay. *Clin Cancer Res* 2009;15(8):2879–84. DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-08-1881. PMID: 19351770.
29. Feldman S., Krishnamurthy S., Gillanders W. et al. A novel automated assay for the rapid identification of metastatic breast carcinoma in sentinel lymph nodes. *Cancer* 2011;117(12):2599–607. DOI: 10.1002/cncr.25822. PMID: 21226034.
30. Khaddage A., Berremila S.A., Forest F. et al. Implementation of molecular intra-operative assessment of sentinel lymph node in breast cancer. *Anticancer Res* 2011;31(2):585–90. PMID: 21378342.
31. Bernet L., Cano R., Martinez M. et al. Diagnosis of the sentinel lymph node in breast cancer: a reproducible molecular method: a multicentric Spanish study. *Histopathology* 2011;58(6):863–9. DOI: 10.1111/j.1365-2559.2011.03836.x. PMID: 21585425.
32. Snook K.L., Layer G.T., Jackson P.A. et al. Multicentre evaluation of intraoperative molecular analysis of sentinel lymph nodes in breast carcinoma. *Br J Surg* 2011;98(4):527–35. DOI: 10.1002/bjs.7347. PMID: 21656717.
33. Le Frère-Belda M.A., Bats A.S., Gil-laizeau F. et al. Diagnostic performance of one-step nucleic acid amplification for intraoperative sentinel node metastasis detection in breast cancer patients. *Int J Cancer* 2012;130(10):2377–86. DOI: 10.1002/ijc.26291. PMID: 21780107.
34. Wang Y.S., Ou-yang T., Wu J. et al. Comparative study of one-step nucleic acid amplification assay, frozen section, and touch imprint cytology for intraoperative assessment of breast sentinel lymph node in Chinese patients. *Cancer Sci* 2012;103(11):1989–93. DOI: 10.1111/cas.12001. PMID: 22924886.
35. Sagara Y., Ohi Y., Matsukata A. et al. Clinical application of the one-step nucleic acid amplification method to detect sentinel lymph node metastasis in breast cancer. *Breast Cancer* 2013;20(2):181–6. DOI: 10.1007/s12282-011-0324-z. PMID: 22203582.
36. Buglioni S., Di Filippo F., Terrenato I. et al. Quantitative molecular analysis of sentinel lymph node may be predictive of axillary node status in breast cancer classified by molecular subtypes. *PLoS One* 2013;8(3):30–40. DOI: 10.1371/journal.pone.0058823. PMID: 23533593.
37. Smolarz B., Krawczyk T., Westfal B. et al. Comparison of one-step nucleic acid amplification (OSNA) method and routine histological investigation for intraoperative detection of lymph node metastasis in Polish women with breast cancer. *Polish J Pathol* 2013;64(2):104–8. PMID: 23900867.
38. Banerjee S.M., Michalopoulos N.V., Williams N.R. et al. Detailed evaluation of one step nucleic acid (OSNA) molecular assay for intra-operative diagnosis of sentinel lymph node metastasis and prediction of non-sentinel nodal involvement: experience from a London Teaching Hospital. *Breast* 2014;23(4):378–84. DOI: 10.1016/j.breast.2014.02.001. PMID: 24630617.
39. Pathmanathan N., Renthawa J., French J.R. et al. Intraoperative sentinel lymph node assessment in breast cancer: a comparison of rapid diagnostic method based on CK19 mRNA expression and imprint cytology. *ANZ J Surg* 2014;84(10):730–4. DOI: 10.1111/ans.12668. PMID: 24899463.
40. Chaudhry A., Williams S., Cook J. et al. The real-time intra-operative evaluation of sentinel lymph nodes in breast cancer patients using One Step Nucleic Acid Amplification (OSNA) and implications for clinical decision-making. *Eur J Surg Oncol* 2014;40(2):150–7. DOI: 10.1016/j.ejso.2013.12.007. PMID: 24378008.
41. Li D., Xu X., Chen J. et al. Utility of one-step nucleic acid amplification (OSNA) assay in detecting breast cancer metastases of sentinel lymph nodes in a Chinese population. *Breast Cancer* 2015;22(2):135–40. DOI: 10.1007/s12282-013-0461-7. PMID: 23515947.
42. Yaguchi Y., Sugasawa H., Tsujimoto H. et al. One-step nucleic acid amplification (OSNA) for the application of sentinel node concept in gastric cancer. *Ann Surg Oncol* 2011;18(8):2289–96. DOI: 10.1245/s10434-011-1591-9. PMID: 21301968.
43. Kumagai K., Yamamoto N., Miyashiro I. et al. Multicenter study evaluating the clinical performance of the OSNA assay for the molecular detection of lymph node metastases in gastric cancer patients. *Gastric Cancer* 2014;17(2):273–80. DOI: 10.1007/s10120-013-0271-9. PMID: 23743877.
44. Croner R.S., Geppert C.I., Bader F.G. et al. Molecular staging of lymph node-negative colon carcinomas by one-step nucleic acid amplification (OSNA) results in upstaging of a quarter of patients in a prospective, European, multicentre study. *Br J Cancer* 2014;110(10):2544–50. DOI: 10.1038/bjc.2014.170. PMID: 24722182.
45. Yamamoto H., Sekimoto M., Oya M. et al. OSNA-based novel molecular testing for lymph node metastases in colorectal cancer patients: results from a multicenter clinical performance study in Japan. *Ann Surg Oncol* 2011;18(7):1891–8. DOI: 10.1245/s10434-010-1539-5. PMID: 21290195.
46. Güller U., Zettl A., Worn M. et al. Molecular investigation of lymph nodes in colon cancer patients using one-step nucleic acid amplification (OSNA): a new road to better staging? *Cancer* 2012;118(24):6039–45. DOI: 10.1002/cncr.27667. PMID: 22684906.
47. Yamamoto H., Tomita N., Inomata M. et al. OSNA-assisted molecular staging in colorectal cancer: a prospective multicenter trial in Japan. *Ann Surg Oncol* 2016;23(2):391–6. DOI: 10.1245/s10434-015-4880-x. PMID: 26438440.
48. Inoue M., Hiyama K., Nakabayashi K. et al. An accurate and rapid detection of lymph node metastasis in non-small cell

- lung cancer patients based on one-step nucleic acid amplification assay. *Lung Cancer* 2012;78(3):212–8. DOI: 10.1016/j.lungcan.2012.08.018. PMID: 23026640.
49. Hayama M., Chida M., Karube Y. et al. One-step nucleic acid amplification for detection of lymph node metastasis in lung cancer. *Ann Thorac Cardiovasc Surg* 2014;20(3):181–4. PMID: 23603642.
50. Nakagawa K., Asamura H., Tsuta K. et al. The novel one-step nucleic acid amplification (OSNA) assay for the diagnosis of lymph node metastasis in patients with non-small cell lung cancer (NSCLC): results of a multicenter prospective study. *Lung Cancer* 2016;97:1–7. DOI: 10.1016/j.lungcan.2016.03.015. PMID: 27237020.
51. Kaczka K. Badanie metodą jedностopniowej amplifikacji kwasu nukleinowego węzłów chłonnych w raku brodawkowatym tarczycy – porównanie z badaniem histopatologicznym i badaniem PCR w czasie rzeczywistym. *Endokrynol Pol* 2015;65(6):422–30.
52. Kaczka K., Fendler W., Borowiec M. et al. One-step nucleic acid amplification testing in medullary thyroid cancer lymph nodes: a case series. *Arch Med Sci* 2015;11(1):137–41. DOI: 10.5114/aoms.2015.49206. PMID: 25861300.
53. del Carmen S., Gatiús S., Franch-Arcas G. et al. Concordance study between one-step nucleic acid amplification and morphologic techniques to detect lymph node metastasis in papillary carcinoma of the thyroid. *Hum Pathol* 2016;48:132–41. DOI: 10.1016/j.humpath.2015.09.020. PMID: 26614398.
54. Okamoto S., Niikura H., Nakabayashi K. et al. Detection of sentinel lymph node metastases in cervical cancer: assessment of KRT19 mRNA in the one-step nucleic acid amplification (OSNA) method. *Gynecol Oncol* 2013;130(3):530–6. DOI: 10.1016/j.ygyno.2013.06.027. PMID: 23811115.
55. Nagai T., Niikura H., Okamoto S. et al. A new diagnostic method for rapid detection of lymph node metastases using a one-step nucleic acid amplification (OSNA) assay in endometrial cancer. *Ann Surg Oncol* 2015;22(3):980–6. DOI: 10.1245/s10434-014-4038-2. PMID: 25190122.
56. Matsuzuka T., Takahashi K., Kawakita D. et al. Intraoperative molecular assessment for lymph node metastasis in head and neck squamous cell carcinoma using one-step nucleic acid amplification (OSNA) assay. *Ann Surg Oncol* 2012;19(12):3865–70. DOI: 10.1245/s10434-012-2409-0. PMID: 22618721.
57. Goda H., Nakashiro K.I., Oka R. et al. One-step nucleic acid amplification for detecting lymph node metastasis of head and neck squamous cell carcinoma. *Oral Oncol* 2012;48(10):958–63. DOI: 10.1016/j.oraloncology.2012.03.026. PMID: 22516375.
58. Mauk M.G., Liu C., Song J., Bau H.H. Integrated microfluidic nucleic acid isolation, isothermal amplification, and amplification quantification. *Microarrays (Basel)* 2015;4(4):474–89. DOI: 10.3390/microarrays4040474. PMID: 27600235.
59. Giuffrida M.C., Spoto G. Integration of isothermal amplification methods in microfluidic devices: recent advances. *Biosens Bioelectron* 2017;90:174–86. DOI: 10.1016/j.bios.2016.11.045. PMID: 27888686.
60. Asiello P.J., Baeumner A.J. Miniaturized isothermal nucleic acid amplification, a review. *Lab Chip* 2011;11(8):1420–30. DOI: 10.1039/c0lc00666a. PMID: 21387067.

Вклад авторов

Ю.А. Макарова, А.А. Зотиков, М.Ю. Шкурников: обзор публикаций по теме статьи, анализ полученных данных, написание текста рукописи;

Г.А. Белякова, Б.Я. Алексеев: обзор публикаций по теме статьи, анализ полученных данных.

Authors' contributions

Yu.A. Makarova, A.A. Zotikov, M.Yu. Shkurnikov: reviewing of publications of the article's theme, analysis of the obtained data, article writing;

G.A. Belyakova, B.Ya. Alekseev: reviewing of publications of the article's theme, analysis of the obtained data.

ORCID авторов

Ю.А. Макарова: <https://orcid.org/0000-0003-4497-3421>

А.А. Зотиков: <https://orcid.org/0000-0001-7720-9919>

Б.Я. Алексеев: <https://orcid.org/0000-0002-3398-4128>

М.Ю. Шкурников: <https://orcid.org/0000-0002-6668-5028>

ORCID of authors

Yu.A. Makarova: <https://orcid.org/0000-0003-4497-3421>

A.A. Zotikov: <https://orcid.org/0000-0001-7720-9919>

B.Ya. Alekseev: <https://orcid.org/0000-0002-3398-4128>

M.Yu. Shkurnikov: <https://orcid.org/0000-0002-6668-5028>

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Conflict of interest. The authors declare no conflict of interest.

Финансирование. Исследование выполнено при поддержке Российского научного фонда (проект № 16-15-00290).

Financing. The study was financed by the Russian Science Foundation (project No. 16-15-00290).

Статья поступила: 11.04.2018. **Принята к публикации:** 10.05.2018

Article received: 11.04.2018. **Accepted for publication:** 10.05.2018