

УДК 616-006-073

*T. V. Osipova, T. P. Ryabykh, A. Yu. Baryshnikov***DIAGNOSTIC MICROCHIPS: APPLICATION IN ONCOLOGY***N. N. Blokhin Russian Cancer Research Center RAMS, Moscow***ABSTRACT**

The review is concerned with the possibility of application of protein microchip technology to cancer diagnosis. The paper deals with current state in cancer diagnosis and the role of serologic tumor markers; the next-generation cancer diagnostics founded on multiplexed biomarker measurements; the employment of microchips in experimental and diagnostic research; different kinds of biochips for the analysis of tumor markers as well as the data obtained by the authors for the use of gel biochip-based microchips in tumor marker analysis.

Key words: protein microchips, cancer diagnostics, serologic tumor markers.

*T. B. Осипова, Т. П. Рябых, А. Ю. Барышников***ДИАГНОСТИЧЕСКИЕ МИКРОЧИПЫ:
ПРИМЕНЕНИЕ В ОНКОЛОГИИ***ГУ РОНЦ им. Н. Н. Блохина РАМН, Москва***РЕЗЮМЕ**

В обзоре рассматривается возможность применения технологии белковых микрочипов в диагностике злокачественных новообразований. Обсуждаются современное состояние диагностики рака и роль серологических опухолевых маркеров; диагностика рака нового поколения, основанная на измерении широкого спектра биомаркеров; применение микрочипов в экспериментальных и диагностических исследованиях; виды микрочипов для анализа опухолевых маркеров, а также данные авторов по использованию гелевых микрочипов для анализа опухолевых маркеров.

Ключевые слова: белковые микрочипы, диагностики рака, серологические опухолевые маркеры.

ВВЕДЕНИЕ

Одной из важнейших проблем современной онкологии является разработка новых и совершенствование традиционных методов диагностики рака на основе новых технологий. Появление технологии биологических микрочипов привело к фундаментальным изменениям в диагностике опухолей с помощью опухолевых маркеров. На основе биологических микрочипов в настоящее время разрабатываются новые диагностические системы для количественного иммунологического анализа уровня сывороточных маркеров в крови онкологических больных. Преимуществом микрочипа перед традиционными диагностическими системами является возможность одновременного анализа образца по нескольким параметрам при минимальном расходе анализируемого материала и реагентов. Биологические микрочипы позволяют не только повысить эффективность использования опухолевых маркеров в диагностике онкологических заболеваний, но также изучить природу этих маркеров и их роль в развитии злокачественного процесса.

**СОВРЕМЕННОЕ СОСТОЯНИЕ
ДИАГНОСТИКИ РАКА**

Снижение смертности от злокачественных опухолей и успешное лечение зависят от широкого внедрения в медицинскую практику простых надежных методов ранней диагностики злокачественных новообразований.

Из рис. 1 видно, что 5-летняя выживаемость при запущенных формах рака яичника очень низка, тогда как более 90 % женщин, у которых диагностирована I стадия рака яичника, имеют вероятность прожить более 5 лет [49]. На этом же графике показано, как изменилась бы картина распределения больных по стадиям заболевания в случае ранней диагностики рака.

Аналогичные данные получены для немелкоклеточного рака легкого [32]: 5-летняя выживаемость примерно в 20 раз более вероятна у больных с локализованной опухолью, чем с отдаленными метастазами. И хотя раннее выявление опухоли не всегда приводит к увеличению продолжительности жизни, тем не менее диагностика рака на ранней стадии открывает широкие перспективы для лечения.

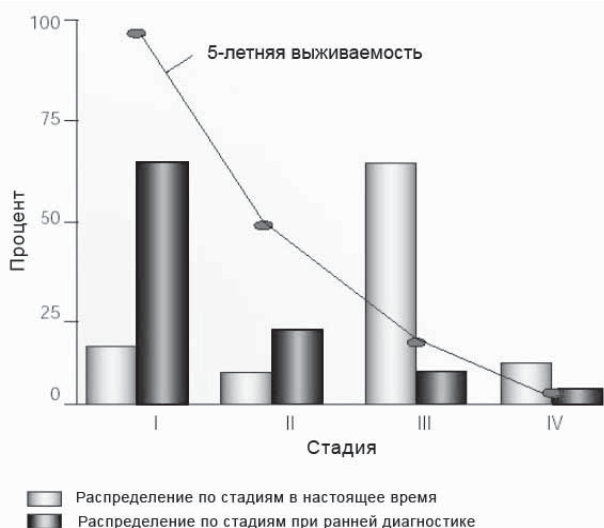


Рис. 1. Прогноз 5-летней выживаемости при раке яичника [49]

В настоящее время раннее выявление рака – это, скорее, исключение, чем правило, поскольку на ранних стадиях опухолевый процесс протекает бессимптомно. Многие виды рака потенциально излечимы, если диагностирована ранняя стадия заболевания. Однако в большинстве случаев больные обращаются за помощью, когда процесс уже распространился за пределы органа или опухоль дала отдаленные метастазы. На момент постановки диагноза опухолевый процесс локализован лишь в 50 % случаев при раке молочной железы (РМЖ) [39], в 56 % случаев при раке предстательной железы [40], в 35 % случаев при колоректальном раке [41] и менее, чем в 20 % случаев, при мелкоклеточном раке легких [32]. Несмотря на имеющиеся методы скрининга, такие, как маммография для РМЖ и тестирование на скрытую кровь для рака кишечника, именно эти формы рака занимают лидирующие места в структуре смертности от злокачественных новообразований [18; 42].

Для раннего выявления злокачественных опухолей нужны простые, недорогие и минимально инвазивные методы диагностики. К ним относится определение опухолевых маркеров в сыворотке крови – важном источнике информации о состоянии пациента, поскольку она постоянно перфузирует ткани и в нее поступают белковые субстанции от погибающих или мертвых клеток организма.

ДИАГНОСТИКА РАКА НОВОГО ПОКОЛЕНИЯ: МУЛЬТИПЛЕКСНЫЕ ТЕСТ-СИСТЕМЫ

Последние годы характеризуются фундаментальными изменениями в подходах к диагностике рака, основанной на серологических маркерах. В этой области в течение длительного времени доминировал подход, базирующийся на поисках единичных опухолевых маркеров, которые с высокой чувствительностью и специфичностью обнаруживали бы различные виды рака, аналогично тому, как хорионический гонадотропин выявляет беременность или обнаружение вирус-

ной ДНК или РНК указывает на присутствие ряда патогенов [16]. К сожалению, этот подход не оправдал себя, и ни один «идеальный» опухолевый маркер, который мог бы со 100 %-ной вероятностью обнаруживать опухолевый процесс, не был найден [2].

Растущие опухоли высвобождают различные факторы и индуцируют множество изменений в своем окружении, включая воспаление и ангиогенез. Факторы, выделяемые опухолевыми клетками или секретируемые в ответ на рост опухоли клетками организма, идеально подходят для роли биомаркеров [22]. Исходя из этого, задачей диагностики нового поколения является измерение широкого спектра потенциальных биомаркеров и полный анализ этой информации, что позволит с высокой чувствительностью диагностировать опухолевый процесс [16]. Таким образом, современная диагностика направлена на разработку множественных – мультиплексных – систем, позволяющих одновременно оценивать широкий спектр потенциальных онкомаркеров.

Возникшая на рубеже веков технология белковых микрочипов создает возможности для разработки таких диагностических систем.

МИКРОЧИПЫ – НОВАЯ ТЕХНОЛОГИЯ В ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫХ И ДИАГНОСТИЧЕСКИХ ИССЛЕДОВАНИЯХ

Виды микрочипов

В настоящее время основным направлением совершенствования лабораторной диагностики является создание микрочипов – многоэлементных матриц, представляющих собой миниатюрные аналитические устройства для одновременного анализа специфических взаимодействий биологических молекул. Преимущество таких устройств перед традиционными методами диагностических исследований состоит в возможности одновременного анализа большого количества образцов с использованием минимальных количеств исследуемого материала и дорогостоящих реагентов.

Биологические микрочипы представляют собой твердый субстрат, на поверхность которого нанесены вещества биологического происхождения (ДНК, РНК, белки, моноклональные антитела, лиганды, рецепторы и т. д.), способные специфически взаимодействовать с молекулами анализируемого образца, образуя соответствующие комплексы. Кроме отдельных молекул, в микрочипы могут быть внесены различные клетки (бактериальные или клетки млекопитающих). В настоящее время разрабатываются следующие основные виды биологических микрочипов: ДНК-микрочипы, белковые, клеточные и тканевые [21; 23].

ДНК-микрочипы, содержащие иммобилизованные олигонуклеотидные зонды или фрагменты геномной ДНК, – наиболее разработанная область современной технологии микрочипов [31; 35]. Эти микрочипы применяются в молекулярной диагностике различных заболеваний, связанных с мутациями и перестройками в генах, а также при определении лекарственной ус-

тойчивости. В настоящее время ДНК-микрочипы выпускаются промышленно и успешно используются в фундаментальной науке и медицине.

Последнее время большое внимание уделяется развитию технологии белковых микрочипов, так как именно белки реализуют важнейшие функции клетки и играют ключевую роль во всех физиологических и патологических процессах [46].

Белковые микрочипы

Изготовление белковых микрочипов напоминает производство ДНК-микрочипов, но в силу ряда причин технология изготовления белковых чипов находится в стадии разработки. Исторически сложилось так, что ДНК-чипы были востребованы в свое время глобальным проектом «Геном человека», выполнение и успешное завершение которого было бы невозможно без внедрения этой новой технологии. Трудности создания белковых чипов связаны с природой белковых молекул. Белки более разнообразны в химическом и физическом плане (кислые, основные, гидрофильные, гидрофобные и т.д.) и больше подвержены повреждениям, чем ДНК. Большую проблему представляет сохранение нативной структуры и функциональной активности белка при иммобилизации на микрочипе.

Можно выделить 2 основных направления использования белковых чипов: во-первых, применение для изучения и анализа взаимодействий огромного количества белков, кодированных геномом данного организма [20]; во-вторых, использование в медицине в диагностических целях: для определения иммунного статуса организма, выявления специфических антигенов и антител, идентификации аллергенов, определения опухолевых маркеров [29].

Последние 5 лет интенсивно разрабатываются белковые микрочипы для иммунологического анализа. На сегодняшний день моноклональные антитела и их аналоги (Fab, одноцепочечные фрагменты антител, содержащие вариабельные участки, и др.) наиболее часто используются для иммобилизации на микрочипах. Сфера применения микрочипов на основе антител (АТ-микрочипов) может быть разнообразна: анализ в биологических жидкостях уровней различных цитокинов [26], инфекционных агентов [12], гормонов [38], опухолевых маркеров [37; 50; 51], антител к опухолевым маркерам [9].

Предполагается, что такие микрочипы имеют существенные преимущества в изучении процессов, связанных с возникновением и прогрессией опухолей. Микрочипы позволяют, используя небольшой объем образца, одновременно исследовать многие белки, задействованные в этих процессах, а также анализировать соотношения между разными группами белков [20].

Микрочипы на основе гидрогелей – трехмерные микрочипы

Существуют разные способы изготовления белковых микроматриц, отличающиеся способом нанесения и иммобилизации белков.

В Институте молекулярной биологии им. В. А. Энгельгардта РАН разработаны микрочипы на основе трехмерных гидрогелей [8; 34]. В гелевых микрочипах белки или антитела иммобилизуют в слое полиакриламидного геля, нанесенного на специально обработанную поверхность стекла. Иммобилизация антител происходит в результате фотоиндуцированной сополимеризации [44]. Раствор смеси геля и антител наносится с помощью робота на поверхность стекла в виде капель диаметром от 50-300 мкм и объемом ~1 нл. Полимеризацию проводят облучением ультрафиолетовым светом ($\lambda=350$ нм) в течение 30 мин при комнатной температуре. Приготовленные таким образом белковые чипы используют для проведения различных реакций, в том числе иммунологических. В «сэндвич»-варианте иммуноанализа 2-е антитела метят флюоресцентным красителем (цианиновыми красителями Cy3 или Cy5). После соответствующих этапов анализа измеряют флюоресцентные сигналы от гелевых ячеек с помощью анализатора микрочипов (Биочип ИМБ), снабженного специальными компьютерными программами.

Основные преимущества использования чипов на основе гидрогелей состоят в следующем. Благодаря трехмерной конфигурации ячейки число иммобилизованных молекул значительно выше, чем в поверхностных микрочипах, что приводит к увеличению сигнала флюоресценции. Белки, иммобилизованные в геле, благодаря водному окружению сохраняют нативную структуру и не подвергаются денатурации. Гелевые полусферы отделены гидрофобной поверхностью, что исключает перетекание раствора от ячейки к ячейке.

В гелевых ячейках возможно осуществление различных вариантов иммуноанализа – прямого, непрямого, «сэндвич»-анализа. Показана возможность количественного анализа белков в таких чипах [1].

ОПУХОЛЕВЫЕ МАРКЕРЫ И ИХ РОЛЬ В ДИАГНОСТИКЕ РАКА

Опухолеассоциированные антигены. Диагностическая чувствительность и диагностическая специфичность

В онкологических клиниках в целях диагностики и контроля за лечением (мониторинг) на протяжении многих лет используют опухолевые маркеры – вещества, секретируемые опухолевыми клетками или организмом в ответ на рост опухоли.

Международно признанных маркеров немного, но их число постоянно увеличивается. В табл. 1 перечислены наиболее распространенные серологические опухолевые маркеры – опухолеассоциированные антигены. Они представляют собой сложные белки, секретируемые опухолевыми клетками, как правило, в значительно больших количествах, чем нормальными. Эти маркеры широко используются в клинической практике при наблюдении за больными, для раннего выявления рецидивов и контроля за лечением.

Опухолевые маркеры позволяют дифференцировать злокачественные и доброкачественные опухоли, определять стадию заболевания, своевременно выявлять и диагностировать рецидив. Значение этих маркеров в диагностике ранних стадий рака ограничено, поскольку каждый из этих маркеров обладает невысокой диагностической чувствительностью и специфичностью [2; 15], то есть не позволяет диагностировать заболевание в группе больных злокачественными опухолями в 100 % случаев и не дает 100 %-ного отрицательного ответа в группе здоровых доноров. Исключение составляет ПСА, применяемый не только для дифференциальной диагностики и мониторинга, но и для скринингового выявления клинически не проявляющихся опухолей (табл. 1).

Несмотря на недостаточную чувствительность и специфичность, опухолеассоциированные антигены нашли широкое применение в клинической практике, и вся история их использования – постоянный поиск новых подходов, позволяющих преодолеть указанные недостатки. Один из таких подходов – использование комбинаций опухолевых маркеров.

Комбинирование опухолевых маркеров

Давно замечено, что применение в клинической практике комбинаций опухолевых маркеров позволяет увеличить чувствительность и специфичность и тем самым повысить эффективность диагностики злокачественных новообразований.

Для солидных опухолей большинства локализаций использование нескольких опухолевых маркеров оказывается гораздо более эффективным, чем применение одного, даже самого чувствительного. В табл. 2 представлены наиболее распространенные формы злокачественных опухолей и возможные комбинации раз-

личных маркеров, информативных для опухолей данной локализации. Многими авторами предложены различные комбинации опухолевых маркеров с целью увеличения диагностической эффективности [7; 24; 28; 36; 47; 52].

Однако на сегодняшний день одновременное определение нескольких онкомаркеров с помощью различных коммерческих диагностикомов для установления точного диагноза чрезвычайно дорого.

Современная онкология столкнулась с необходимостью развития новых подходов к диагностике рака и создания принципиально новых тест-систем, позволяющих одновременно количественно определять сразу многие опухолевые маркеры.

БИОЧИПЫ ДЛЯ АНАЛИЗА ОПУХОЛЕВЫХ МАРКЕРОВ

АТ-микрочипы позволяют одновременно параллельно определять сразу многие опухолевые маркеры в небольшом объеме образца (например, в сыворотке крови). Применение АТ-микрочипов для анализа опухолевых маркеров включает 2 основных направления диагностических исследований: поиск новых маркеров и количественное определение известных опухолевых маркеров в средах организма [19].

Другими примерами применения АТ-микрочипов в онкологии может служить оценка координированных изменений элементов сигнальных путей или изменение в уровнях экспрессии определенного класса белков, таких, например, как факторы ангиогенеза [19].

Идентификация потенциальных биомаркеров злокачественных опухолей

В основе поиска новых опухолевых маркеров лежит следующий подход: одновременно измеряя многие

Таблица 1

Серологические опухолевые маркеры, наиболее часто используемые в клинических исследованиях [6]

Маркер	Вид рака	Основное клиническое применение
α-фетопроtein	Гепатоцеллюлярный, несеминозный, тестикулярный	Определение стадии опухолевого процесса
Хорионический гонадотропин-β человека	Хорионкарциномы яичка и плаценты	Определение стадии опухолевого процесса
СА 15-3	Молочной железы	Мониторинг заболевания
СА 19-9	Поджелудочной железы, желудка	Мониторинг заболевания
СА 125	Яичника, шейки матки	Мониторинг заболевания
РЭА	Колоректальный, поджелудочной железы, легких, молочной железы	Мониторинг заболевания
ПСА	Предстательной железы	Скрининг, мониторинг заболевания

Таблица 2

Различные комбинации опухолевых маркеров, используемые в клинической практике

Опухоли (по локализации)	РЭА	АФП	СА 19-9	СА 125	СА 15-3	β -ХГЧ	ПСА
Рак прямой и толстой кишки	•		•	•		•	
Рак желудка	•		••	•		•	
Рак поджелудочной железы	•		••	•		•	
Рак молочной железы	•		•	•	••		
Рак легких	•			•		•	
Опухоли яичников		•		••	•	••	
Рак эндометрия	•		•				
Рак щитовидной железы	•						
Рак простаты							••
Рак печени		••					
Рак шейки матки	•			•	•		

белки, сопоставляют 2 любые интересующие исследователей популяции (например, здоровых и больных данным видом рака) по большому числу параметров (белков) и идентифицируют наилучшие прогностические маркеры опухоли данной локализации.

С помощью АТ-микрочипов был проведен поиск новых прогностических маркеров рака легкого [17]. На микрочипах с 84 нанесенными антителами к сывороточным белкам были протестированы 80 образцов сыворотки крови (24 – больных с первично диагностированным раком легких; 24 – здоровых доноров и 32 – больных хроническими обструктивными заболеваниями легких). Было показано повышение уровней экспрессии С-реактивного белка, сывороточного амилоида А, муцина 1 и α -1-антитрипсина. Большинство этих белков не являются опухолеспецифическими и связаны с такими процессами, как травма, инфекция, воспаление и т.д. По-видимому, они могут быть использованы как дополнительные маркеры к известным опухолевым маркерам.

В табл. 3 представлены новые биомаркеры, обнаруженные с помощью АТ-микрочипов для рака легких [17], предстательной железы [25], рака поджелудочной железы [30] и рака яичника [27]. Из таблицы видно, что эти маркеры не являются специфическими для изученных видов рака. Они могут давать положительный эффект при других видах рака (например, маркеры рака яичника дают положительный эффект при раке молочной железы [27]), но позволяют достаточно точно дифференцировать (с вероятностью 95 %) группу больных данным видом рака (включая больных I и II стадией заболевания [27]) от здоровой популяции.

АТ-микрочипы позволяют также проводить иммунофенотипирование и диагностику лейкозов [10; 11; 14].

Это лишь первые результаты поиска новых потенциальных маркеров, которые могли бы быть использованы для ранней диагностики и скрининга злокачественных новообразований с использованием АТ-микрочипов. Они позволяют сделать следующие выводы:

1. Обнаруженные маркеры, как правило, не являются опухолеспецифическими (см. маркеры рака легких и рака поджелудочной железы в табл. 3);

2. Комбинации из 4-7 маркеров позволяют с высокой степенью вероятности дифференцировать сыворотку крови больных раком от сывороток крови здоровых доноров.

Таким образом, по-видимому, эти маркеры не позволяют диагностировать ту или иную форму рака, однако вполне могут быть использованы наряду с другими опухолевыми маркерами в скрининговых исследованиях для выявления опухолевого процесса как такового.

Количественное определение опухолеассоциированных антигенов

Вторым подходом к увеличению эффективности диагностики злокачественных новообразований на основе применения мультиплексных систем является создание АТ-микрочипов для одновременного количественного определения сразу нескольких (в перспективе – многих) опухолевых маркеров. Этот подход строится на создании тест-системы, аналогичной применяемой в настоящее время в клинической практике, но позволяющей одновременно определять уже изве-

Таблица 3

Новые биомаркеры, обнаруженные с помощью АТ-микрочипов

Опухоль	Маркеры	Число иммобилизо- ванных антител	В списке литературы
Рак легких	С-реактивный белок, сывороточный амилоид А, муцин 1, α -1-антитрипсин, трансферрин, гелзолин	84	17
Рак простаты	Фактор фон Виллебранда, иммуноглобулин М, α -1-антихимотрипсин, виллин, иммуноглобулин G	184	25
Рак поджелудочной железы	С-реактивный белок, α -1-антитрипсин, сывороточный амилоид А, иммуноглобулин А, гелзолин, индуцируемый белком антагонист витамина К-II	92	30
Рак яичника	лептин, пролактин, остеоопонтин, инсулино-подобный ростовой фактор II	169	27

стные опухолевые маркеры в одном образце сыворотки крови.

В отличие от АТ-микрочипов, описанных в предыдущем разделе и предназначенных для полуколичественного анализа, такой микрочип предназначен для количественного определения опухолевых маркеров. Это связано с тем, что все известные опухолевые маркеры экспрессируются и у здоровых людей, а у большинства больных злокачественными новообразованиями существенно повышается их уровень.

В настоящее время технология микрочипов позволяет одновременно исследовать десятки тысяч характеристик анализируемого образца. Однако для диагностических целей, как было показано выше, вполне достаточно нескольких опухолевых маркеров, значимость которых для данного заболевания установлена. Поэтому при диагностических исследованиях обычно ограничиваются рассмотрением систем, оценивающих в образце от 2 до 100 аналитов, представляющих наибольший интерес [33].

Создание биочипов для количественного определения сразу нескольких опухолевых маркеров – сложная задача. По аналогии с традиционными тест-системами в формате микрочипа должны иметь хорошую чувствительность, специфичность и воспроизводимость полученных результатов анализа. Основная трудность решения этой задачи состоит в подборе таких условий проведения иммуноанализа, которые были бы одинаково оптимальны для всех маркеров, объединяемых на чипе.

Одной из первых задач, вставших перед исследователями, был иммуноанализ в миниатюрном варианте – в ячейке микрочипа – и количественное определение хотя бы одного опухолевого маркера. В серии работ была показана возможность определения на биочипе уровня в сыворотке крови таких единичных опухолевых маркеров, как ПСАобщ, ПСАсв, интерлейкин- β , хорионический гонадотропин- β человека (β -ХГЧ),

РЭА, ферритин, АФП, СА 19-9 [4; 45; 48]. Было показано, что определение этих маркеров может проводиться с высокой чувствительностью [45].

Одна из первых мультиплексных тест-систем в формате биочипа была разработана для одновременного количественного определения сразу 12 опухолевых маркеров: СА 125, СА 15-3, СА 19-9, СА 242, РЭА, АФП, ПСАобщ, ПСАсв, β -ХГЧ, гормон роста человека (ГРЧ), нейрон-специфическая енолаза (NSE) и ферритин [43]. Тест-система была апробирована на образцах сыворотки крови онкологических больных с клинически подтвержденным диагнозом и имела диагностическую чувствительность 68,2 % и диагностическую специфичность 97,1 %. Наибольшей была частота выявления для рака печени (92,05 %), рака поджелудочной железы (81,5 %) и яичника (81,3 %). Для желудочно-кишечного тракта частота выявляемости была низкой (38,75 % для рака кишечника и 57,95 % для рака желудка). Большой интерес представляют данные о том, что у каждого больного была обнаружена своя индивидуальная картина уровней опухолевых маркеров.

Применение такого чипа – мультичипа – для диагностики различных форм рака позволило сделать ряд интересных наблюдений. Во-первых, при раке каждой локализации увеличивается экспрессия многих маркеров. Второе наблюдение следует непосредственно из первого: не существует так называемых опухолеспецифических маркеров. И, в-третьих, нет так называемых «женских» и «мужских» опухолевых маркеров. Например, ПСА, всегда рассматривавшийся как мужской маркер, в небольшом проценте случаев повышается у женщин при раке яичника, шейки матки и молочной железы [43].

Таким образом, результаты исследований, проведенных на чипах, лишний раз подтвердили ранее существовавшее положение об отсутствии опухолеспецифических маркеров.

Новая тест-система была использована в скрининговых исследованиях на контингенте численностью 15 867 человек. Из 436 человек, имевших повышенный уровень опухолевых маркеров, были прослежены 138. Из них в 16 случаях рак был клинически подтвержден, в 41 случае пациенты имели доброкачественные заболевания, с которыми связано повышение уровней опухолевых маркеров в сыворотке крови, тогда как в 81 случае на момент обследования пациенты не имели никаких симптомов заболевания и в настоящее время находятся под наблюдением.

В будущем внимание исследователей, по-видимому, будет сфокусировано на отборе и оптимизации различных комбинаций известных опухолевых маркеров, а также возможном расширении их за счет новых маркеров для раннего выявления различных опухолей или предопухолевых состояний.

РАЗРАБОТКА ТЕСТ-СИСТЕМЫ ДЛЯ АНАЛИЗА ОПУХОЛЕВЫХ МАРКЕРОВ НА ОСНОВЕ ГИДРОГЕЛЕВЫХ МИКРОЧИПОВ

В РОНЦ РАМН на протяжении ряда лет велись разработки традиционных диагностических тест-систем на основе ELISA для количественного определения опухолевых маркеров, были наработаны антигены и моноклональные антитела к ним. В частности, в лаборатории экспериментальной диагностики и биотерапии опухолей НИИ ЭДнТО была разработана и запатентована тест-система на простата-специфический антиген (в формате 96-луночного планшета) для диагностики рака предстательной железы [3]. В то же время в ИМБ РАН была разработана и защищена международным патентом оригинальная технология создания микрочипов на основе гидрогелей [8; 34; 35]. Это можно считать предпосылками для создания онкодиагностического биочипа для количественного определения опухолевых маркеров в сыворотке крови.

На рис. 2 представлен общий вид гелевого биочипа. На поверхности специально обработанного предметного стекла располагаются трехмерные гелевые элементы. На 1 мм² стекла может размещаться до 100 индивидуальных гелевых ячеек. Каждый элемент содержит иммобилизованные моноклональные антитела, специфические к опухолевым маркерам (например, ПСА). Количественное определение опухолевого антигена на чипе, как и в традиционных методах, осуществляется иммунологическим методом, в наших

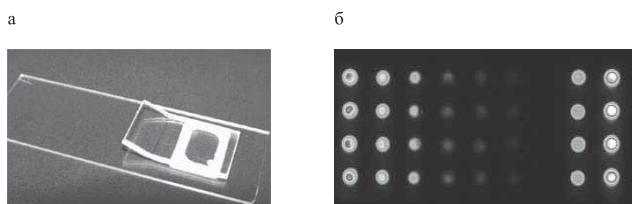


Рис. 2. Общий вид (а) и флуоресцентное изображение (б) гелевого микрочипа

исследованиях применялся так называемый «сэндвич»-вариант иммуноанализа. На биочип наносили исследуемый образец крови больного (сыворотку), а после этого – 2-е антитела к этому же маркеру, меченные флуоресцентным красителем (Cy5 или Cy3). Интенсивность флуоресценции гелевого элемента была пропорциональна концентрации АГ. Флуоресцентные сигналы от гелевых ячеек измеряли с помощью анализатора микрочипов. Таким образом, на чипе иммуноанализ проходил в каждом гелевом элементе объемом меньше 1 нл.

Разработка онкодиагностического биочипа была начата с создания биочипа на ПСА (общую и свободную формы) для диагностики рака простаты. Мужчины старше 50 лет составляют группу риска в отношении этого заболевания. В последние 10 лет в ряде стран применяются программы скрининга, в которых ПСА-тест является одной из важных составляющих. Результатом этого стала тенденция к выявлению более ранних стадий рака простаты и снижение частоты возникновения. Использование для диагностики 2 форм ПСА (общей и свободной) позволяет значительно увеличить чувствительность и специфичность метода в интервале концентраций ПСА от 4 до 10 нг/мл [13].

Целью исследования была разработка тест-системы на основе биочипов (изготовлены в ИМБ РАН) для одновременного количественного определения 2 форм ПСА.

Показано [5], что тест-система на основе биочипа на 2 формы ПСА имеет удовлетворительные аналитические характеристики. Калибровочные кривые на ПСАобщ и ПСАсв (рис. 3) были хорошо воспроизводимы в различных экспериментах, коэффициенты вариации $\leq 11\%$. Аналитическая чувствительность тест-системы как для ПСАобщ, так и для ПСАсв составляла 0,1 нг/мл. Надежность определения уровня маркеров в тест-системе оценивали с помощью специальных тестов. Было показано (тест на «открытие»), что отличие измеряемой концентрации от расчетной составило от 5 до 9 % для ПСАобщ и от 2 до 9 % для ПСАсв. Проверка тест-системы на специфичность показала отсутствие перекрестной реактивности с другими опухолеассоциированными антигенами: АФП, РЭА и раковыми антигенами СА 19-9, СА 15-3 и СА 125.

Тест-система на биочипе была апробирована на клиническом материале, включающем сыворотки онкологических больных и здоровых доноров. Уровни ПСАобщ и ПСАсв в сыворотках здоровых доноров не

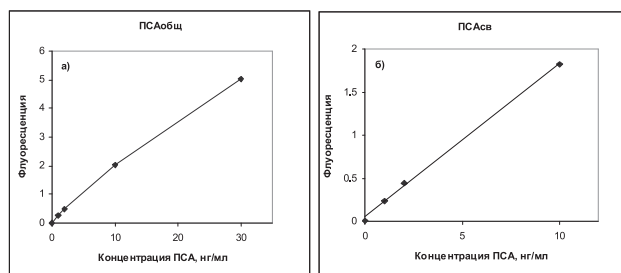


Рис. 3. Калибровочные кривые для ПСАобщ и ПСАсв [5]

превышали общепринятых пороговых уровней: 4 и 1,1 нг/мл соответственно. Коэффициенты корреляции уровней ПСАобщ и ПСАсв в сыворотках больных РПЖ, измеренных на биочипе и в тест-системе Roche Diagnostics, составили $\geq 0,99$, ($p < 0,001$), (рис. 4); измеренных на биочипе и в тест-системе CanAg – также $\geq 0,99$, ($p < 0,01$) [5].

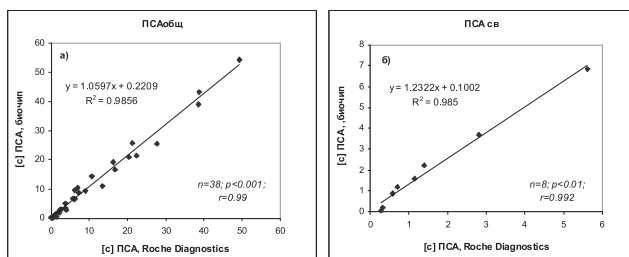


Рис. 4. Линия регрессии уровней ПСАобщ (а) и ПСАсв (б), определяемых в образцах сывороток больных раком простаты в тест-системе Roche Diagnostics и тест-системе в формате биочипа [5]

Таким образом, тест-система на основе биочипа позволяет одновременно количественно определять 2 формы опухолевого маркера (ПСА) в минимальных объемах образца (20 мкл). В перспективе эта тест-система может быть использована для ранней диагностики и скрининга на рак простаты в группе высокого риска (мужчины старше 50 лет) и может быть расширена за счет включения новых маркеров.

В настоящее время ведутся исследования по созданию диагностического микрочипа для одновременного количественного определения нескольких опухолевых маркеров. Показана [1] принципиальная возможность определения с помощью гелевых микрочипов опухолеассоциированных антигенов: АФП (маркера гепатоцеллюлярного рака), РЭА (маркера колоректального рака), раковых антигенов СА 19-9 (маркера рака поджелудочной железы), СА 15-3 (маркера рака молочной железы), СА 125 (маркера рака яичника). Таким образом, технология микрочипов открывает широкие возможности для одновременного анализа образцов сыворотки крови онкологических больных сразу на несколько (в перспективе – на множество) биомаркеров, что может значительно увеличить эффективность диагностики рака.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Возникновение технологии белковых микрочипов привело к изменению подхода к диагностике злокачественных новообразований. Новая технология позволяет проводить одновременный параллельный анализ сразу многих опухолевых маркеров, что увеличивает эффективность диагностики. 2 основные области применения этой технологии в онкологических исследованиях – это поиск новых биомаркеров и одновременное количественное определение уже известных опухолевых маркеров.

Накопленные к настоящему времени экспериментальные данные свидетельствуют в пользу того, что микрочипы – это новая, перспективная технология, которая может кардинально изменить подход к диагностике рака и увеличить диагностическую эффективность.

ЛИТЕРАТУРА

1. Дементьева Е. И., Рубина А. Ю., Дарий Е. Л. и др. Применение белковых микрочипов для количественного определения опухолеассоциированных маркеров // ДАН. – 2004. – Т. 395. – С. 542–547.
2. Кушлинский Н. Е. Возможности, неудачи и перспективы исследования опухолевых маркеров в онкологической клинике. Часть 1 (лекция) // Клин. Лаб. Диагн. – 1999. – № 3. – С. 25–32.
3. Осипова Т. В., Ленева Н. В., Виха Г. В. и др. Набор для количественного определения общего простатического антигена в сыворотке крови человека методом одностадийного твердофазного иммуноферментного анализа. Патент RU 224006 С2, БИ, 2004, 34.
4. Осипова Т. В., Рябых Т. П., Дементьева Е. И. и др. Белковые микрочипы для диагностики злокачественных новообразований. Разработка биочипа на простат-специфический антиген // Росс. Биотер. Журн. – 2003. – № 3. – С. 24–30.
5. Рябых Т. П., Осипова Т. В., Дементьева Е. И. и др. Тест-система в формате биочипа для одновременного количественного определения общей и свободной форм простата-специфического антигена в сыворотке крови // Росс. Биотер. Журн. – 2006. – № 2. – С. 49–57.
6. Alaoui-Jamali M. A., Xu Y. Protein technology for biomarker profiling in cancer: an update // J Zhejiang University Science B. – 2006. – Vol. 7(6). – P. 411–420.
7. Ando S., Kimura H., Iwai N. et al. Optimal combination of seven tumour markers in prediction of advanced stage at first examination of patients with non-small cell lung cancer // Anticancer Res. – 2001. – Vol. 21. – P. 3085–3092.
8. Arenkov P., Kukhtin A., Gemmel A. et al. Protein microchips: use for immunoassay and enzymatic reactions // Anal. Biochem. – 2000. – Vol. 278. – P. 123–131.
9. Ascari M., Alarie J. P., Moreno-Bondi M., Vo-Dinh T. Application of an antibody for p53 detection and cancer diagnosis // Biotechnol. Prog. – 2001. – Vol. 17(3). – P. 543–552.
10. Belov L., de la Vega O., dos Remedios C. G. et al. Immunophenotyping of leukemias using a cluster of differentiation antibody microarray // Cancer Res. – 2001. – Vol. 61(11). – № 1. – P. 4483–4489.
11. Belov L., Huang P., Barber N. et al. Identification of repertoires of surface antigens on leukemias using an antibody microarray // Proteomics. – 2003. – Vol. 3(11). – P. 2147–2154.
12. Borrenbaeck C. A. Antibodies in diagnostics – from immunoassays to protein chips // Immunology today. – 2000. – Vol. 21. – P. 379–382.
13. Catalona W. J., Smith D. S., Ratliff T. L. et al. Measurement of prostate-specific antigen in serum as a

- screening test for prostate cancer // *N. Engl. J. Med.* – 1991. – Vol. 324. – P. 1156–1161.
14. *Christopherson R. I., Stoner K., Barber N et al.* Classification of AML using a monoclonal antibody microarray // *Methods Mol. Med.* – 2006. – Vol. 125. – P. 241–245.
 15. *Etzioni R., Urban N., Ramsey S et al.* The case for early detection // *Nat. Rev. Cancer.* – 2003. – Vol. 3(4). – P. 243–252.
 16. *Gander T. R., Brody E. N., Mehler R. E. et al.* Driving forces in cancer diagnostics // *MLO.* – 2003. – P. 10–20.
 17. *Gao W. M., Kuick R., Orzechowski R. P. et al.* Distinctive serum protein profiles involving abundant proteins in lung cancer patients based upon antibody microarray analysis // *BMC Cancer.* – 2005. – Vol. 5. – P. 110–119.
 18. *Greenlee R., Murray T., Bolden S., Wingo P.* Cancer statistics 2000 // *CA Cancer J Clin.* – 2003. – Vol. 50(1). – P. 7–33.
 19. *Haab B. B.* Antibody arrays in cancer research // *Molec. Cell. Proteomics.* – 2005. – Vol. 4. – P. 377–383.
 20. *Haab B. B., Dunham M. J., Brown P. O.* Protein microarrays for highly parallel detection and quantitation of specific proteins and antibodies in complex solutions // *Genome Biol.* – 2001. – Vol. 2. – P. 4.1–4.13.
 21. *Hall J.* The microarray revolution: how one chip is changing the face of science // *Harvard Science Rev.* – 2002. – P. 82–85.
 22. *Hanahan D., Wainberg R. A.* The hallmarks of cancer // *Cell.* – 2000. – Vol. 100. – P. 57–70.
 23. *Jain K. K.* The role of protein-chip technology in molecular diagnostics // *IVD Technology.* – 2002. – P. 1–10.
 24. *Lahousen M., Stettner H., Pickel H.* The predictive value of combination of tumor markers in monitoring patients with ovarian cancer // *Cancer.* – 1987. – Vol. 60. – P. 2228–2232.
 25. *Miller J. C., Zhou H., Kwekel J. et al.* Antibody microarray profiling of human prostate cancer sera: antibody screening and identification of potential biomarkers // *Proteomics.* – 2003. – Vol. 3. – P. 56–63.
 26. *Moody M. D., Van Arsdel S. V., Murphy K. P. et al.* Array-based ELISAs for high-throughput analysis of human cytokines // *BioTechniques.* – 2001. – Vol. 31. – P. 186–194.
 27. *Mor G., Visintin I., Lai Y. et al.* Serum protein markers for early detection of ovarian cancer // *PNAS.* – 2005. – Vol. 102. – P. 7677–7682.
 28. *Muzushima Y., Hirata H., Isumi S. et al.* Clinical significance of the number of positive tumor markers in assisting the diagnosis of lung cancer with multiple tumor marker assay // *Oncology.* – 1990. – Vol. 47. – P. 43–48.
 29. *Ng J. H., Ilag L. L.* Biomedical application of protein chips // *J. Cell Mol. Med.* – 2002. – Vol. 6. – № 3. – P. 329–340.
 30. *Orzechowski R., Hamelinck D., Li L. et al.* Antibody microarray profiling reveals individual and combined serum proteins associated with pancreatic cancer // *Cancer Res.* – 2005. – Vol. 65(23). – P. 11193–11202.
 31. *Proudnikov D., Timofeev E., Mirzabekov A.* Immobilization of DNA in polyacrilamide gel for the manufacture of DNA and DNA-oligonucleotide microchips // *Anal. Biochem.* – 1998. – Vol. 259. – P. 34–41.
 32. *Ries L. A. G., Eisner M. P., Kosary C. J et al.* SEER Cancer Statistics Review 1973–1999, National Cancer Institute, 2002.
 33. *Rubenstein K.* Multiplex assays: technologies, applications, and markets // *CMA.* – 2006. – www.advancesreports.com
 34. *Rubina A., Dementieva E., Stomakhin A. et al.* Hydrogel-based protein microchips: manufacturing, properties, and applications // *BioTechniques.* – 2003. – Vol. 34. – P. 1008–1022.
 35. *Rubina A. Yu., Pan'kov S. V., Dementieva E. I. et al.* Hydrogel drop microchips with immobilized DNA: properties and methods for large-scale production // *Anal. Biochem.* – 2004. – Vol. 325. – P. 92–106.
 36. *Russel H., Crocer J.* Expression of CEA, CA 125, CA 19-9 and human milk fat Globule membrane antigen in ovarian cancer // *J Clin Pathol.* – 1988. – Vol. 41(3). – P. 260–269.
 37. *Sato K., Tokeshi M., Kimura H., Kitamori T.* Determination of carcinoembryonic antigen in human sera by integrated bead-bed immunoassays in a microchip for cancer diagnosis // *Anal. Chem.* – 2001. – Vol. 73(6). – P. 1213–1218.
 38. *Schneider B. H., Diekenson E. L., Vach M. D. et al.* Highly sensitive optical chip immunoassays in human serum // *Biosens. Bioelectron.* – 2000. – Vol. 15. – P. 597–604.
 39. Screening for breast cancer // – 2001.
 40. Screening for prostate cancer // – 2000.
 41. Screening for colorectal cancer // – 2001.
 42. *Smith R., Mettlin C., Davis K., Eyre H.* American cancer society guidelines for the early detection of cancer // *CA Cancer J Clin.* – 2000. – Vol. 50(1). – P. 34–49.
 43. *Sun Z., Fu X., Zhang L.* A protein chip system for parallel analysis of multitumor markers and its application in cancer detection // *Anticancer res.* – 2004. – Vol. 24. – P. 1159–1166.
 44. *Vasiliskov A. V., Timofeev E. N., Surzhikov S. A. et al.* Fabrication of microarray of gel-immobilized compounds on a chip by copolymerization // *Biotechniques.* – 1999. – Vol. 27. – P. 592–606.
 45. *Wiese R., Belosludtsev Y., Powdrill T. et al.* Simultaneous multianalyte ELISA performed on a microarray platform // *Clin Chem.* – 2001. – Vol. 47. – P. 1451–1457.
 46. *Wiesner A.* Detection of tumor markers with ProteinChip® Technology // *Current Pharmacol Biotech.* – 2004. – Vol. 5. – P. 45–67.
 47. *Woolas R. P., Xu F.J., Jacobs I.J. et al.* Elevation of multiple serum markers in patients with stage I ovarian cancer // *J. Natl Cancer Inst.* – 1993. – 3, 85(21). – P. 1748–1751.

48. *Wu G., Datar R.H., Hansen K.M. et al.* Bioassay of prostate-specific antigen using microcantilevers // *Nature Biotechnology*. – 2001. – Vol. 19. – P. 856–860.

49. *Wulfschlegel J. D., Liotta L. A., Petricoin E. F.* Proteomic applications for the early detection of cancer // *Nature Reviews. Cancer*. – 2003. – Vol. 3. – P. 267–275.

50. *Xiao Z., Jiang X., Beckett M. L., Wright G. L.* Generation of baculovirus recombinant prostate-specific membrane antigen and its use in the development of a novel protein biochip quantitative immunoassay // *Protein Expr Purif*. – 2000. – Vol. 19(1). – P. 12–21.

51. *Xiao Z., Adam B. L., Cazares L. H. et al.* Quantization of serum prostate-specific membrane antigen by a novel protein biochip immunoassay discriminates benign from malignant prostate disease // *Cancer Res*. – 2001. – Vol. 61(16). – P. 6029–6033.

52. *Zhang Z., Bast R.C., Yu Y. et al.* Three biomarkers identified from serum proteomic analysis for the detection of early stage ovarian cancer // *Cancer Res*. – 2004. – Vol. 64. – P. 5882–5890.

Поступила 20.07.2006.