

НАУКА ЗА РУБЕЖОМ

ИНСТИТУТ ПРОБЛЕМ РАЗВИТИЯ НАУКИ РАН

НОВЫЕ ТЕХНОЛОГИИ В ОБЛАСТИ ДИАГНОСТИКИ РАКА



Наука за рубежом

№ 17, октябрь 2012

Ежемесячное обозрение

Электронное издание:

www.issras.ru/global_science_review

Рубрики «Биотехнологии и генетика. Сельское хозяйство, пищевая и химическая промышленность», «Медицинские технологии и оборудование»

Обзор выполнил **Н. А. Трофимов**

Выпускающее подразделение: **Сектор анализа зарубежной науки**

Руководитель проекта **Л. К. Пипия**

Редактор **О. Е. Осипова**

Верстка: **Н. В. Шашкова**

СОДЕРЖАНИЕ

ВВЕДЕНИЕ	4
1. Фундаментальные проблемы в области исследования рака	7
2. Современные методы диагностики рака	11
3. Перспективные исследования и разработки	16
ПРИЛОЖЕНИЕ	20
Рис. 1. Число случаев заболевания раком и смертность от рака в США: 2004	20
Рис. 2. Смертность от рака в США: 1930–2001	20
Рис. 3. Сравнительная геномная гибридизация для определения изменений в раковых клетках	21
Рис. 4. Фагово-протеиновые биочипы	22
Табл. 1. Основные вирусные агенты, вызывающие рак	23
Табл. 2. Технологии диагностики рака	24
Табл. 3. Технологии нового поколения молекулярной диагностики рака	24
Табл. 4. Типы биомаркеров, используемых в технологиях диагностики	24
Табл. 5. Прогноз темпов роста рынков технологий молекулярной диагностики нового поколения	25
Табл. 6. Технологические платформы дизайна белковых чипов	25
Табл. 7. Технологии ДНК- и РНК-чипов	26

Рак является одним из наиболее быстро прогрессирующих заболеваний и, по-видимому, спутником современного технологического развития. Глобальное изменение климата и экологии, истощение озонового слоя, процессы урбанизации, распространение вредных привычек и нездорового образа жизни, некачественные продукты питания, загрязнение воздуха и окружающей среды, канцерогенные агенты и строительные материалы, ультрафиолетовое и радиочастотное излучение – все это факторы ускоренного мутагенеза и образования популяций раковых клеток. Механизмы развития рака до сих пор недостаточно изучены, а методы его диагностики и лечения несовершенны. Ученым и медикам-практикам еще только предстоит сделать важные совместные шаги для лучшего понимания генетических, эпигенетических и микробиомных механизмов регуляции поведения здоровых и раковых клеток, разработки и практического внедрения более точных методов диагностики и более совершенных методов лечения рака.

Введение

В апреле 2011 г. американская компания BCC Research опубликовала аналитический обзор новых методов диагностики рака [1]. Основное внимание в обзоре уделяется молекулярным методам диагностики и связанным с ними перспективным исследованиям и разработкам.

Раковые клетки выделяются по совокупности двух признаков. Во-первых, их воспроизводство отличается от нормального клеточного роста и деления¹. Во-вторых, они захватывают и колонизируют соседние ткани и клетки, адаптируя их к своим узконаправленным потребностям. Если изменения касаются только темпов роста и деления, то образуются доброка-

¹ При этом различают два крайних случая: в первом – процессы апоптоза не нарушены, а скорость деления возрастает, во втором – скорость деления прежняя, но течение апоптоза ингибируется.

чественные опухоли. Показателем злокачественных изменений является агрессивность и инвазивность опухоли, т. е. ее способность быстро поражать соседние ткани, преодолевать защитные клеточные и гуморальные барьеры, распространяться и образовывать метастазы [2].

Важная особенность раковых клеток – умение синтезировать теломеразу и приобретать в ходе эволюции способность стабилизировать собственные теломеры, тем самым избавляясь от необходимости подчиняться общим для здоровых клеток правилам регуляции циклов деления, старения и апоптоза. Несмотря на то что молекулярные механизмы такого поведения до конца не изучены², именно функции теломер, по всей видимости, определяют интенсивность протекания рака.

Как известно, вид раковой опухоли классифицируется по типу клеток и их тканевой принадлежности: карцинома, саркома, лейкемия и лимфома. На рис. 1 приведены основные виды рака и показатели вызываемой ими смертности в США. По имеющимся оценкам, за время своей жизни как минимум каждый третий американец столкнется с тем или иным видом рака.

С учетом того, что в среднем на протяжении жизни человека каждый его ген может быть подвержен обратимым и необратимым изменениям (мутациям) в 10^{10} случаев, рак возникает относительно не так часто. По современным научным представлениям, рак развивается в результате целой серии мутаций и эпигенетических изменений, которые задействуют в первую очередь стволовые клетки. В то же время уже развившийся рак становится причиной смерти далеко не каждого онкологического больного, что связано с трудностью преодоления защитных барьеров организма мутированными стволовыми клетками в процессе колонизации новых тканей и органов.

Учеными установлено, что процесс канцерогенеза в значительной степени зависит от условий окружающей человека среды. Подтверждена его

² Одним из наиболее значимых исключений в этой области является изучение функций гена *p53*, ответственного за коррекцию поведения клеток при гиперпролиферации, повреждении ДНК, гипоксии (включая нехватку кислорода), а также вследствие преобразований в теломерах.

взаимосвязь с мутагенезом (подверженность организма соматическим мутациям) в отношении двух классов агентов: 1) химические агенты канцерогенеза, включая канцерогенные строительные материалы³, химикаты, аэрозоли и продукты горения; 2) излучение и радиация, прежде всего рентгеновские и ультрафиолетовые лучи.

Канцерогены подразделяются на два типа: 1) инициаторы⁴ – мутагенные агенты⁵, ответственные за нарушение ДНК (в более широком понимании – ответственные за эпигенетические и микробиомные⁶ [3] изменения), и 2) промоторы⁷ – немутагенные агенты, селективным образом способствующие развитию опухоли на тканях, предварительно подвергшихся действию инициаторов. Например, на участках кожи, подвергшейся действию инициатора, могут образоваться доброкачественные опухоли, именуемые папилломами, количество которых будет пропорционально степени воздействия агентов-инициаторов. Сравнительно безобидная папиллома может стать источником злокачественных изменений в двух случаях: а) при неоднократно повторяющемся воздействии на участок кожи инициаторов, б) при однократном воздействии инициатора с последующим воздействием промоторов, даже если между двумя событиями прошло значительное время. Перечень основных вирусных агентов, вызывающих рак, приведен в табл. 1. Примером канцерогенного агента бактериального происхождения является *Helicobacter pylori*, провоцирующий рак желудка.

Рацион питания и пищевые предпочтения также могут повлиять на процессы канцерогенеза. Факторами риска являются низкое потребление овощей и клетчатки, избыточное потребление соли, нитратов, жиров, кофе, жаренных и запеченных продуктов питания. При этом важны не только индивидуальные предпочтения, но и особенности национального

³ Например, асбест и 2-нафтиламин.

⁴ От англ. Tumor initiator – канцерогенный фактор, оказывающий первичное воздействие на клетку опухолевого образования.

⁵ Агенты – химические и биологические вещества, вирусы, бактерии, грибы.

⁶ Под термином «микробиом» понимается сообщество симбиотических, патогенных микроорганизмов и сравнительно нейтральных микроорганизмов-соотрапезников, для которых человеческий организм является их естественной средой обитания.

⁷ От англ. Tumor promoter – факторы, активизирующие развитие опухоли (вторая стадия развития канцерогенеза).

сельского хозяйства, пищевой промышленности и пищевых цепочек, поскольку в определенных случаях даже сравнительно безвредные продукты питания могут способствовать появлению опухолей. Использование химических добавок в пищевой промышленности (например, аспартама), гормонов роста, комбикормов, пробиотиков и антибиотиков в животноводстве и рыбном хозяйстве, загрязнение окружающей среды, неправильное использование удобрений, пестицидов и фунгицидов в растениеводстве, геновая инженерия бактерий, насекомых, животных и растений могут существенно повлиять на качество продуктов питания, а также на пищевые цепочки в целом и косвенно повысить заболеваемость раком. Доказано, что курение (включая пассивное курение) со временем приводит к раку легких (рис. 2), плевры, а также гортани и глотки. Избыточный вес, ожирение и алкоголь также являются потенциальными факторами развития рака.

1. Фундаментальные проблемы в области исследования рака

Сообщество раковых клеток отличается гигантским потреблением энергии. Степень воздействия раковых опухолей на окружающие их здоровые ткани можно метафорически сравнить с воздействием радиации на окружающую среду при авариях на атомных электростанциях. Кроме того, если учесть, что раковый процесс теоретически может быть инициирован первоначальным изменением в единичной клетке, со временем распространившись на соседние клетки, то данный эффект свидетельствует о том, насколько тонко регулируются процессы в человеческом организме и чем может грозить ему «поломка» даже одной клетки. Остаются вопросы, в какой мере раскрыт потенциал живой клетки, насколько ее жизненный ресурс превосходит фактические потребности организма. Ответы на них связаны с пониманием того, при каких условиях продолжительность жизни человека может быть продлена.

До сих пор недостаточно изучены механизмы развития рака. Среди важнейших малоизученных областей исследования рака по-прежнему остаются генетические, эпигенетические и, в частности, митохондриальные функции активации и дезактивации канцерогенеза, роль иммунных и

аутоиммунных реакций, микробиомного баланса, процессов, связанных с вирусной активацией факторов роста злокачественных новообразований.

С одной стороны, такое положение вещей связано с глобальным дефицитом высококвалифицированных ученых, специализирующихся в смежных дисциплинах, включая биофизику, молекулярную биологию, биохимию, генетику и биоинформатику. С другой стороны – с фундаментальным характером исследований и трудоемкостью стоящей перед учеными задачи.

По всей видимости, открытие генетического кода молекулы ДНК оказало двоякое влияние на всю современную генетику. Обратной стороной стремительного прогресса в исследовании генетического материала (например, завершённые проекты по исследованию геномов живых существ, включая проект «Геном человека») является недостаточное внимание к процессам самоорганизации генетической системы живых организмов. Постепенно приходит осознание того факта, что генетическая система намного более динамичная, нелинейная и сложная, чем это ранее предполагалось.

До сих пор в недостаточной мере изучен вопрос проявления рака как системного нарушения функций организма. Многие ученые объясняют устойчивость рака и его повторное проявление (рецидив) тем, что в основе любой опухоли лежат мутированные стволовые клетки, которые размножаются более осторожно и избирательно. Это зачастую делает их устойчивыми к лучевой и химиотерапии, действие которой направлено в первую очередь на подавление наиболее агрессивно размножающихся клеток. Остается неясным, способны ли раковые стволовые клетки передавать копии родительских ДНК-цепочек каждой хромосомы следующему поколению клеток, как это, по всей видимости, происходит со здоровыми стволовыми клетками. На более фундаментальном уровне требуется подтверждение или опровержение гипотезы о наличии других системных сбоях, ведущих к устойчивости процессов канцерогенеза.

Одной из наименее изученных является способность раковых клеток в определенный момент времени образовывать метастазы (метастазирование). Остаются загадкой молекулярные механизмы, связанные с каждым из четырех этапов развития раковой опухоли: а) инвазия локальных

тканей и кровеносных и лимфатических сосудов; б) перемещение через системы циркуляции крови и лимфы; в) преодоление сосудистых барьеров (выход в периваскулярную ткань); г) строительство новых колоний на удаленных участках организма.

Взаимосвязь воспалительных процессов (включая ангиогенез) с канцерогенезом изучена лишь частично. С одной стороны, воспалительные процессы в организме могут стать толчком к появлению новообразований, с другой – сами раковые опухоли определенным образом регулируют ангиогенез. Одним из таких механизмов представляется секреция опухолями специальных сигнальных веществ, например увеличение уровня фактора *HIF-1*⁸ [4].

Остается неясным, как действуют канцерогенные агенты, включая инициаторов и промоторов опухолей. Известно, что промоторы используют разные механизмы для запуска экспрессии онкогенов. Что касается клеточного окружения, то промоторы, напротив, могут ингибировать реакцию окружающих здоровых клеток на проявления «ракового поведения» мутированных клеток. Вероятнее всего, оба этих процесса происходят синхронно и дополняют друг друга.

Большая часть современных исследований генетических причин рака нацелена на выявление критических генов⁹ (далее – КГ). Для этого используется, как правило, множество перекрестных методов, но одним из наиболее эффективных является метод сравнения здоровых и пораженных клеток одного и того же пациента для выявления произошедших

⁸ От англ. Hypoxia Inducible Factor-1 α – транскрипционный фактор, индуцируемый гипоксией-Гальфа. Данный фактор влияет на гены, связанные с функциями ангиогенеза, вазомоторного контроля, энергетического метаболизма, апоптоза, врожденного иммунитета.

⁹ К критическим генам относятся: а) протоонкогены и онкогены, б) гены-супрессоры, подавляющие митотическую активность клеток опухоли и в) гены “поддержки”, ответственные за тестирование и репарацию ДНК. Протоонкогенами называются гены, процессы мутации в которых могут привести к проявлению новой функции, связанной с развитием рака. Сверхактивные и в высшей степени экспрессированные формы мутированных протоонкогенов называются онкогенами. Напротив, под супрессорами понимаются гены, в которых те или иные изменения (генетические или эпигенетические), связанные с их полной или частичной дезактивацией, приводят к развитию рака. Эффекты третьего класса генов (генов поддержки) являются в большей степени опосредованными и в связи с этим менее изученными.

единичных изменений¹⁰ в цепи из 3 млрд нуклеотидов. Частично эта задача была решена в ходе проекта «Геном человека», благодаря чему на сегодняшний день известны несколько сотен механизмов развития рака, и в первую очередь связанных с генами-супрессорами.

Более массовые и не такие затратные, как проект «Геном человека», исследования КГ проводятся с использованием постоянно пополняющегося арсенала различного рода технологий биочипов (microarrays), включая разнообразные ДНК- и РНК-чипы, белковые чипы, микроRNA-, RNAi- и siRNA-технологии. Например, для сравнительной геномной гибридизации (CGH) применяются ДНК-чипы, каждая из ячеек которых соответствует заданной позиции нормального генома (рис. 3).

Выявление онкогенов, таким образом, тесно связано с пониманием, что является функцией того или иного гена или их множества и каким образом их изменение может способствовать развитию опухоли. После выявления критического гена дальнейшее исследование этих функций, как правило, проводится с использованием трансгенных мышей с избыточной экспрессией онкогенов либо химерных нокаутных мышей¹¹ с подавленной экспрессией генов-супрессоров. Оба этих метода связаны с множеством проблем, поскольку результаты подобных экспериментов лишь в определенных случаях могут быть использованы в интересах здоровья человека.

При проведении исследований КГ до сих пор недостаточно ясно, как определить, какие изменения являются алгоритмически случайными, а какие несущественными сбоями и помарками, связанными с общей

¹⁰ Такими изменениями могут быть замена или делеция определенного нуклеотида (или последовательности нуклеотидов), его функциональные биохимические дефекты или его выключение (silencing).

¹¹ От англ. knockout mice – подопытные мыши, геном которых был изменен с помощью точечных методов воздействия на ген, включая полную или временную его дезактивацию («нокаут» или «нокдаун» гена), либо замену заданного гена на другой активный ген. Точечный перенос генов осуществляется методом создания химерных эмбрионов с использованием плюрипотентных клеток либо методом трансгенных клонов. Также используются модифицированные плюрипотентные клетки (включая стволовые клетки эмбрионов на стадии морулы или бластоцисты), которые культивируются, подвергаются генной инженерии и заново имплантируются в морулы или бластоцисты организма реципиента. Потомство таких химер наследует генетические модификации в том случае, если оно получено из трансплантированных клеток.

неопределенностью сложной и эволюционирующей системы¹². С точки зрения теорий хаоса и информации под алгоритмически случайными явлениями понимаются любые изменения исходного кода с наибольшим содержанием алгоритмической информации [5]. Именно такие изменения, как правило, носят системный характер и оказываются решающими для тех или иных функций организма. Трудность заключается не только в выявлении такого рода изменений в хаотической массе всех прочих свойственных гетерозиготным организмам¹³ динамических преобразований¹⁴, но и в объяснении причин и механизмов их проявления.

Необратимые и наследуемые эпигенетические изменения, связанные с упаковкой генов в гетерохроматин и метилированием CpG-динуклеотидов, являются еще одним из известных сегодня способов отключения генов-супрессоров. Проведенные исследования подтверждают, что эпигенетическое подавление экспрессии гена является более частым явлением, чем ранее предполагалось. Хотя эпигенетические факторы несут ответственность за дезактивацию генов-супрессоров в большинстве известных видов рака человека, они до сих пор недостаточно изучены.

2. Современные методы диагностики рака

Представленные на рынке диагностические технологии разделяются на две большие группы: *in vivo* и *in vitro* (табл. 2). К новому поколению

¹² То есть квазислучайными или относительно случайными изменениями (relative randomness).

¹³ Гетерозигота – клетка (организм), у которого гомологичные хромосомы несут разные формы (аллели) тех или иных генов. В среднем последовательность ДНК человека является гетерозиготной в одном из каждой тысячи нуклеотидов. Миллионы различных участков гетерозиготности были обнаружены в ходе проекта «Геном человека», что особенно важно для исследования рака. Потеря гетерозиготности (ЛОН) является необратимым изменением и происходит тогда, когда остается всего лишь один из функционирующих аллелей гена-супрессора. В дальнейшем квазислучайные изменения могут привести к полной утрате функционала гена и к развитию опухоли. При сравнении генетического кода здоровой и раковой ткани одного и того же пациента на хромосомный участок, в котором может находиться ген-супрессор, ученых может навести либо потеря в мутированных клетках гетерозиготности на заданном участке генетического кода, либо нарушения на определенном участке контрольной ДНК, связанной с тем или иным генетическим маркером (последовательностью, кодирующей известный наследуемый фенотипический признак).

¹⁴ Например, репликация ДНК, различного рода обратимые эпигенетические альтерации, случайная потеря той или иной модификации аллелей гомологичных хромосом.

относятся прежде всего технологии молекулярной диагностики (табл. 3), в каждой из которых используются определенные типы биомаркеров¹⁵ (табл. 4). С коммерческой точки зрения наибольшего успеха достигли технологии RT-PCR¹⁶ (табл. 5). Рассмотрим далее основные методы диагностики нового поколения, большая часть из которых находится в стадии активной разработки.

Метод CTC¹⁷

Метод CTC нацелен на выявление свободно перемещающихся по кровеносным сосудам раковых клеток, т. е. циркулирующих раковых клеток (ЦРК). Обнаружить ЦРК непросто, поскольку их концентрация в крови больных составляет, как правило, не более одной такой клетки на 0,1–1 млн других клеток. Наиболее распространенными клеточными маркерами являются цитокератины и молекулы ЕpCAM¹⁸, позволяющие обнаружить в крови подозрительные клетки эпителия.

Методы выделения ЦРК можно разделить на две категории: морфологические и иммуномагнитные. Морфологические методы основываются на разделении клеток по морфологическим признакам, включая разделение по размеру при помощи микрофильтров и по градиенту плотности при центрифугировании. Такие методы недороги, позволяют захватывать клетки с положительными (ЕpCAM+) и отрицательными (ЕpCAM-) адгезионными свойствами. В то же время их невысокая специфичность зачастую приводит к тому, что могут быть упущены ЦРК малых размеров, возможны кросс-контаминации в случае захвата крупных лейкоцитов.

Имуномагнитная технология CTC позволяет выявить ЦРК на основе предварительно меченных магнитными частицами эпителиальных маркеров, включая цитокератины и ЕpCAM, а также на основе других специфич-

¹⁵ Основными молекулярными биомаркерами являются SNP (однонуклеотидный полиморфизм), экспрессия генов и РНК (прежде всего miRNA), генетическая вариация (например, тест EGFR компании Genzyme для выбора стратегии лечения рака легких), метилирование ДНК, наличие протеина (например, PSA, CEA, CA125), паттерны белковой экспрессии и протеины мембраны раковых клеток (например, ЕpCAM).

¹⁶ ПЦР в реальном времени.

¹⁷ От англ. Circulating tumor cells.

¹⁸ Эпителиальная молекула клеточной адгезии, также именуемая эпителий-специфичным антигеном. Различаются молекулы ЕpCAM+ – демонстрирующая молекулярные характеристики стволовых клеток печени и ЕpCAM- – проявляющая сходство со зрелыми гепатоцитами.

ных антигенов, включая CEA¹⁹ и HER-2²⁰. Среди преимуществ данной технологии отмечается возможность захвата живых и неповрежденных клеток и высокая специфичность. В то же время захватываются только те клетки, которые имеют специфические маркеры, при этом возможны и ложноположительные, и ложноотрицательные результаты.

После захвата подозрительных клеток их дальнейшая идентификация производится либо с использованием методов цитометрического анализа, включая FISH²¹ и проточную цитометрию, либо при помощи RT-PCR. Основным преимуществом цитометрических методов является их высокая специфичность и способность оставлять нетронутыми исследуемые клетки. Их недостаток – низкая чувствительность, из-за которой требуется исследование больших объемов образца для выявления небольшого количества ЦРК. У технологий RT-PCR, напротив, высокая чувствительность при сравнительно низкой специфичности и вероятных ложноположительных результатах.

Протеомный анализ

Методы, связанные с исследованием белков, отличаются большей сложностью в сравнении со стандартными генетическими методами из-за значительного разнообразия и гетерогенности белков и их меньшей, чем у ДНК, стабильности. Одной из основных трудностей при исследовании протеома с помощью биочипов остается пространственное изменение трехмерной структуры протеина при его размещении на поверхности чипа. В связи с этим появление полностью функциональных белковых чипов в качестве одного из методов диагностики будущего поколения, по всей видимости, следует ожидать в долгосрочной перспективе. На сегодняшний

¹⁹ Карциноэмбриональный антиген.

²⁰ Ген с условным названием HER-2 кодирует один из факторов роста эпителия молочной железы. Начавшаяся еще в 1970-е годы разработка препарата на базе моноклонального антитела (герцептин), ингибирующего функции гена HER-2, представляет собой один из немногих сравнительно успешных методов терапевтического лечения рака, полученных благодаря опытам над иммунодефицитными мышами. Чрезмерная экспрессия HER-2 наблюдается в 25% случаев рака груди, и тогда использование герцептина является оправданным. Сегодня на рынке представлены три вида диагностического теста для выявления чрезмерной экспрессии данного гена (в том числе “Oncotype DX” на основе RT-PCR и “MammaPrint” на основе ДНК-чипа). Следует отметить, что чаще всего разрабатываемые на подопытных мышах стратегии лечения не приносят результатов по причине их неэффективности для организма человека, тяжелых побочных эффектов или чрезмерной сложности разработок.

²¹ Флуоресцентная гибридизация in situ.

день белковые чипы применяются в диагностике и исследовании рака на лабораторном уровне и подразделяются на несколько типов, включая чипы для антител, используемые для изучения экспрессии протеинов в ходе аутоиммунных реакций, а также протеомные чипы, применяемые для высокопропускной характеристики белковых взаимодействий.

Дизайн каждого белкового чипа определяется выбором из множества технологических платформ (табл. 6). Поскольку промышленные разработки зависят также от степени доступности или дефицитности широкого спектра высокоспецифических, очищенных моноклональных антител, в том числе рекомбинантных, на успех дизайна белковых чипов нового поколения влияет решение вопроса о предоставлении разработчикам доступа к специальным технологиям протеомной экспрессии. Еще одним важным аспектом является техническое решение задачи переноса (легирирования) пробной молекулы на поверхность чипа без нарушения функции белка. Активно разрабатывается вариант с использованием молекул кДНК для синтеза (транскрипции и трансляции) исходного белка вне клетки.

ДНК- и РНК-чипы²²

Основными сферами применения ДНК-чипов по-прежнему являются исследования экспрессии генов, генотипирование (прежде всего анализ SNP²³) и секвенирование ДНК. Не так давно ДНК-чипы также стали активно применяться в молекулярной диагностике и расширенном генотипировании, включая выявление онкогенов (см. рис. 3). Перечень основных технологий ДНК- и РНК-чипов приведен в табл. 7.

LOAC²⁴

Известны пять основных областей применения технологий LOAC: а) протеомика *in vitro*, включая синтез, анализ и инженерию протеинов; б) электрофорез на чипе, заменяющий ряд методов, включая двумерный гельэлектрофорез и многомерную жидкостную хроматографию; в) структурная протеомика, направленная на оптимизацию исследований кристаллизации и роста крупных протеиновых комплексов и белков, плохо поддающихся очистке; г) ПЦР (PCR) для амплификации ДНК- и

²² От англ. DNA (RNA) Microarrays.

²³ Однонуклеотидный полиморфизм. Один из примеров SNP-мутации – однонуклеотидный полиморфизм в гене Brcа, существенно повышающий риск появления рака груди.

²⁴ От англ. Lab-on-a-chip – лаборатория на чипе.

РНК-образцов, с высокими по сравнению со стандартными ДНК-, РНК-чипами пропускными данными и возможностью мультиплексирования²⁵; д) иммунологические исследования взаимодействий типа антиген – антитело. В отличие от стандартных ДНК- и РНК-чипов, включая ПЦР и ПЦР с обратной транскрипцией (RT-PCR-чипы), LOAC содержит на одном чипе весь инструментарий для проведения исследования реакций, нагревания, сенсорного измерения параметров реакции и детекции (сканирования) результатов. В иммунологии, как предполагается, технология LOAC придет на смену стандартному методу ELISA²⁶ благодаря существенному сокращению времени и стоимости иммунологического анализа, мультиплексированию, высокой надежности и пропускной способности. Следует отметить, что пока подавляющее большинство разработок устройств LOAC еще далеко от коммерциализации.

RT-PCR

Ключевым отличием RT-PCR от стандартных методов ПЦР является детекция и обработка реакции в режиме реального времени. ПЦР в реальном времени также именуется количественной ПЦР (qPCR). Наиболее распространенными методами детекции являются флуоресцентный²⁷ и колориметрический²⁸. RT-PCR позволяет преодолеть основные недостатки ПЦР, а именно невысокую точность, низкую чувствительность, ограниченный динамический диапазон, невысокое разрешение и отсутствие автоматизации. В диагностике рака RT-PCR применяется для анализа экспрессии генов, исследования метилированных участков ДНК и генотипирования. Этот метод также позволяет достаточно точно выявлять различного рода мутации ДНК, в том числе SNP, CNV²⁹, стертые участки.

²⁵ Под мультиплексированием понимается проведение тестов на взаимодействие множественных биологических реагентов (например, реакций гибридизации ДНК или реакций множественных антител-антигенов) на одном образце. Методологически подходы могут существенно отличаться: от стандартного, связанного с увеличением количества точек на чипе и их диверсификации, до более революционного и сложного решения, например выращивание и гибридизация колоний ДНК в каждой из точек чипа.

²⁶ От англ. enzyme linked immunoassay – иммуноферментный анализ (ИФА).

²⁷ При этом, как правило, используются неспецифические флуоресцентные метки.

²⁸ Применяются специфические, зависящие от последовательности ДНК метки, т. е. заданная цепь олигонуклеотидов с флуоресцентной меткой.

²⁹ От англ. Copy-Number Variation – вариация числа копий.

ПЭТ

Позитронная эмиссионная томография (ПЭТ) активно применяется как функциональный метод, позволяющий провести диагностику функций органов и тканей пациента либо оказать на них точечное терапевтическое воздействие с использованием радионуклидных фармакологических препаратов³⁰. Диагностика с использованием ПЭТ проводится в трех режимах: статическом, динамическом и в режиме сканирования всего тела пациента, а также в сочетании этих режимов. По имеющимся оценкам, ПЭТ зарекомендовала себя как более эффективный по сравнению с КТ, МРТ, сцинтиграфией и эндоскопией метод при диагностике некоторых опухолей головы и шеи, легких и пищеварительных органов, но при этом ПЭТ менее эффективна при диагностике некоторых видов рака почек, печени. Дальнейшее совершенствование методов ПЭТ зависит от разработки гибридных ПЭТ/КТ-систем. Каждое новое поколение сканеров ПЭТ на 20–30% чувствительнее предыдущего. В настоящее время разрабатываются сканеры четвертого поколения.

3. Перспективные исследования и разработки

Исследования в области генетики вступили в так называемую постгеномную эру. Приходит осознание того факта, что огромный объем информации – своего рода «второй геном» – сокрыт в эпигенетической «оболочке» генетического кода. Эпигенетическая информация не зависит от последовательности нуклеотидных оснований исходного кода. Она может быть наследуемой или ситуационной.

Принимая во внимание наблюдавшиеся до сих пор невысокие темпы исследований в области эпигенетики, прорывные достижения, по-видимому, возможны только в крупных исследовательских центрах и лабораториях с масштабной государственной поддержкой на долгосрочную перспективу. В то же время частные компании, которые смогут первыми получить доступ к ключевым открытиям в эпигенетике и занять в этой сфере свою нишу, очевидно, будут в числе самых влиятельных фирм на глобальном рынке высоких технологий.

³⁰ Основной набор радионуклидов включает ^{18}F , ^{11}C , ^{13}N , ^{15}O , ^{124}I , ^{68}Ga , ^{82}Rb , ^{76}Br .

В более традиционных областях генетики перспективными являются технологии управления генетическими процессами (ДНК/белковая инженерия), включая диагностику (ДНК/белковые чипы), RNAi-терапию, выборочную активацию и дезактивацию генов, управление хромосомными изменениями, мгновенные противовирусные агенты, секвенаторы генома для массового использования и корректоры микробиома человека. Для вышеперечисленных технологий потребуются длительные периоды разработки (десятилетия), и их планирование должно носить долгосрочный характер.

С расчетом на среднесрочную перспективу наиболее активно проводятся эпигенетические исследования метилирования ДНК. Технологии выявления метилирования ДНК подразделяются на три группы: а) бисульфитная конверсия неметилированной ДНК, б) метил-чувствительные рестрикционные ферменты, в) метил-специфичные антитела. После определения метилированных оснований дальнейшее сканирование ДНК производится с использованием стандартных технологий (PCR, ДНК-чипы и секвенаторы).

Поскольку основывающиеся на антителах методы терапии рака далеки от совершенства, в том числе по причине высокой стоимости их производства и доставки в больших количествах, усилия ученых переориентируются на разработку технологий специфических молекулярных агентов, точечным способом обезвреживающих раковые клетки. Например, ингибиторы ПАРП (PARP)³¹ представляют собой первый шаг на этом пути. Однако данные препараты, подавляя наиболее «слабые» раковые клетки, утратившие из-за генетической нестабильности гены *Brcs1* и *Brcs2*, косвенно благоприятствуют развитию более «сильных» раковых клеток. Долгосрочная перспектива таких терапевтических методов подвергается сомнению.

Учитывая трудоемкость исследований и многомиллионный по количеству вероятных пациентов рынок, информация о начатых разработках, а также об эмбриональных технологиях диагностики и лечения рака строго охраняется. Приведем примеры некоторых разработок, находящихся в стадии клинических испытаний и коммерциализации.

³¹ От англ. Poly ADP-Ribose Polymerase – семейство ферментов, катализирующих поли-АДФ-рибозилирование белков (одна из посттрансляционных трансформаций белка).

Технологии RT-PCR развиваются большинством как частных, так и государственных лабораторий. Например, компания Asuragen в сотрудничестве с Университетом Бохума (Германия) ведет разработку диагностического теста для исследования вариации профилей экспрессии miRNA в нормальной поджелудочной железе, при панкреатите и при PDAC-раке³². В 2011 г. разработки переведены в стадию коммерциализации. Компания Exiqon имеет собственные разработки биочипов. В стадии коммерциализации находится диагностическая платформа для исследования рака на базе чипов с 384 точками, осуществляющих детекцию более 700 различных miRNA без предварительной амплификации, а также скринингового теста для ранней диагностики рака кишечника на основе квантификации miRNA с помощью ПЦР с праймерами, содержащими LNA³³. Компания проводит клинические испытания своих тестовых методов при обследовании пациентов, проходящих колоноскопию. На уровне лабораторных испытаний находятся диагностические тесты «TYPE ID» компании bioTheragnostics и тест для уточнения диагноза рака неизвестной первичной локализации «CUP assay» компании Veridex. Ведущая разработки в сотрудничестве с Университетом Юты (США) компания ARUP планирует выйти на рынок с тестом для классификации подвидов рака груди (в том числе ER- и ER+) на базе 55 генов.

Среди технологий ДНК-чипов можно выделить разработки компании Pathwork Diagnostics с использованием одобренной FDA технологии “Tissue of Origin”, позволяющей сканировать порядка 1500 генов, и технологию компании Agendia “CupPrint” (сканирует порядка 2000 генов).

Технологии LOAC пока еще далеки от коммерциализации. В этой области заметна разработка компании Iris Biotechnologies, направленная на определение генетического профиля пациента (на базе биопсии) с целью раннего обнаружения и прогнозирования развития всех видов рака груди.

Одним из примеров ведущихся разработок белковых чипов является тестовая платформа компании 20/20 Gene Systems, направленная на

³² Проточный рак поджелудочной железы, диагностика которого осложнена, отличается высокой агрессивностью и летальностью.

³³ Замкнутые нуклеиновые кислоты.

раннее обнаружение заболевания и скрининг больных раком легких. Компания продвигает концепцию белковых чипов с моноклональными антителами, полученными методом фагового дисплея (рис. 4) [6].

Компания Calando Pharma пытается осуществить давнюю мечту ученых о переносе siRNA с помощью полимерно-белковых наночастиц для лечения рака методом RNAi-терапии. В случае успеха данная разработка станет пионерской на рынке генной терапии. Аналогичные попытки предпринимает Liquidia Technologies, отдающая приоритет RNAi-терапии опухолей простаты.

Несмотря на предпринимаемые усилия, по-прежнему остро ощущается потребность в разработке более совершенных биочипов в области неинвазивной диагностики, располагающих функционалом для синхронного определения множества разнородных биомаркеров в режиме реального времени, а также мультиплексирования. Предполагается, что темпы таких разработок будут ускоряться по мере появления более доступных специфических биомаркеров.

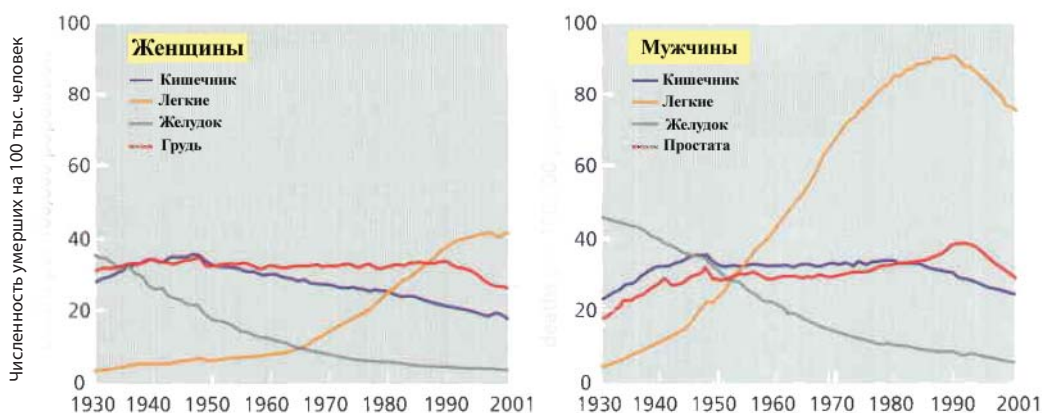
Приложение

Рисунок 1. Число случаев заболевания раком и смертность от рака в США: 2004



Примечание. Всего в 2004 г. в США диагностировали 1 368 030 новых случаев рака, а численность умерших от рака составила 563 700 человек.

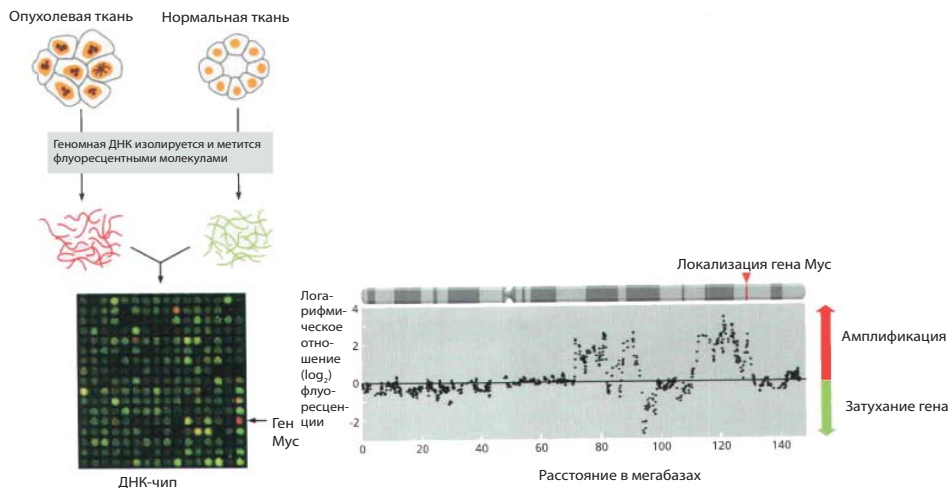
Рисунок 2. Смертность от рака в США*: 1930–2001



* Показатель смертности рассчитан с учетом возрастного распределения населения США.

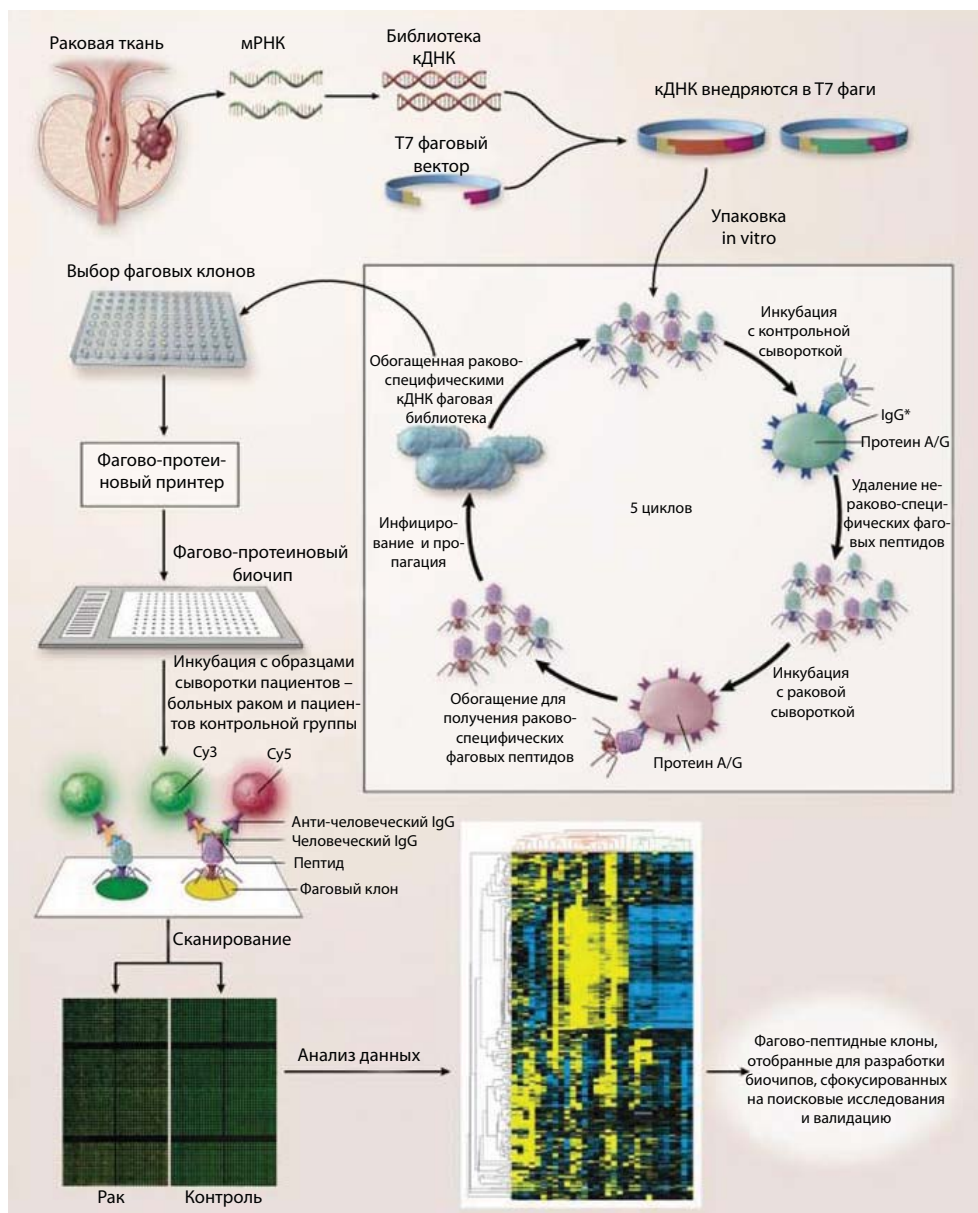
Примечание. Особое внимание обращает на себя тот факт, что значительное возрастание смертности от рака легких среди обоих полов полностью повторяет тренды распространения привычки курения.

Рисунок 3. Сравнительная геномная гибридизация для определения изменений в раковых клетках



Примечание. Сначала ДНК-фрагменты, взятые из нормальных и больных клеток, метятся различными флуоресцентными молекулами (красным – раковые, зеленым – нормальные) и подвергаются гибридизации на ДНК-чипе, каждая из ячеек которого соответствует заданному участку генома. Соотношение показателей красной и зеленой флуоресценции на разных участках свидетельствует либо об амплификации, либо о затухании того или иного гена. Стрелками отмечена амплификация гена Мус, который влияет на процессы клеточного роста и деления.

Рисунок 4. **Фагово-протеиновые биочипы**



* IgG – иммуноглобулин G.

Таблица 1. **Основные вирусные агенты, вызывающие рак**

Вирус	Ассоциированное с вирусом онкологическое заболевание	Зоны высокой вероятности проявления связанного с вирусом рака
ДНК-вирусы		
Папилломавирусы	Бородавки (доброкачественные образования) Карцинома цервикального канала	Повсеместно
Вирусы гепатита: гепатита В	Рак печени	Юго-Восточная Азия, тропическая Африка
гепатита С	Рак печени	Повсеместно
Герпесвирусы: вирус Эпштейна – Барра	Лимфома Беркитта Назофарингеальная карцинома	Западная Африка, Папуа Новая Гвинея, Южный Китай, Гренландия
РНК-вирусы		
Ретровирусы: Т-лимфотропный вирус человека первого типа (HTLV-1)	Т-клеточная пролимфоцитарная лейкемия	Япония, Западная Индия
вирус иммунодефицита человека (HIV)	Саркома Капоши	Центральная и Южная Африка

Примечание. Численность инфицированных одним или несколькими из перечисленных видов вируса значительно превышает численность больных, у которых впоследствии разовьется рак. Это объясняется тем, что для развития канцерогенеза воздействие каждого из этих вирусов должно совпасть с другими факторами. Зачастую вирусы лишь опосредованно способствуют развитию рака. Например, ВИЧ, разрушая Т-лимфоциты, способствует трансформации клеток эндотелия со стороны герпесвирусов. Вирус гепатита С сначала вызывает хронический гепатит, который впоследствии может способствовать появлению рака печени.

Таблица 2. Технологии диагностики рака

Группа технологий	Примеры методов диагностики
In vivo	Ультразвуковое исследование, радиографические методы, включая МРТ, КТ, маммографию и ПЭТ
In vitro	Клинические исследования, гематология, микробиология, патологоанатомические методы, иммунологические исследования, методы молекулярной диагностики

Таблица 3. Технологии нового поколения молекулярной диагностики рака

Технология	Исследуемые молекулы
ДНК- и РНК-чипы	ДНК, РНК, mRNA, miRNA, siRNA, snRNA, метилированная ДНК
Белковые чипы	Протеины, пептиды
LOAC	ДНК, РНК, miRNA, протеины, пептиды
RT-PCR	ДНК, РНК
Секвенирование ДНК	ДНК, РНК, miRNA, метилированная ДНК
Конвенциональные мультиплексные методы (FISH и аналогичные методы)	Протеины, ДНК
Методы СТС	Протеины

Таблица 4. Типы биомаркеров, используемых в технологиях диагностики

Биомаркер	ДНК- и РНК-чипы	Белковые чипы	LOAC	RT-PCR	Секвенирование	FISH и аналоги	СТС
Геномный	X	-	-	X	X	X	-
Эпигеномный	X	-	-	X	X	-	-
Клеточный	-	X	X	-	-	X	X
Протеомный	-	X	X	-	-	X	

Таблица 5. Прогноз темпов роста рынков технологий молекулярной диагностики нового поколения

Технология	Рынки технологий, млн долл. США			Совокупный среднегодовой темп роста 2010–2015, %
	2009	2010	2015	
RT-PCR	241,5	302,2	2501,2	52,6
Конвенциональные мультиплексные методы (FisH и аналогичные методы)	240,9	259,4	783,4	24,7
ДНК- и РНК-чипы	92,5	110,7	831,3	49,7
LOAC	83,9	91,4	537,0	45,8
СТС	7,9	10,4	283,9	93,7
Белковые чипы	141,0	...

Таблица 6. Технологические платформы дизайна белковых чипов

Особенность дизайна белкового чипа	Технологические платформы
Синтез пробной молекулы	In situ, внешний синтез, электрохимический синтез
Биохимические свойства	Моноклональное антитело, пептид, антиген, рекомбинантный протеин, протеиновые домены
Поверхностное разрешение	2D, 3D
Химические свойства поверхности чипа	Силиконовые поверхности, гидрогели (например, полиакриламид), нитроцеллюлоза, альдегиды, ковалентная/нековалентная сшивка

Таблица 7. **Технологии ДНК- и РНК-чипов**

Технология	Примеры применения
1. Исследование профилей экспрессии	Классификация раковых опухолей, открытие биомаркеров, разработка лекарств, токсикогеномика
2. Генотипирование	
Анализ SNP	Предсказание риска заболевания, реакции на лекарства (фармакогенетика)
Эпигенетические исследования	Анализ метилированных участков ДНК, анализ взаимодействия ДНК – белок, ацетилирование гистонов
Цитогенетические исследования	Анализ вариации копий ДНК, включая стертые области, транслокации и дупликации
Анализ вариантов сплайсинга	Изучение разнообразия сплайсинга РНК
Анализ РНК	Детекция и составление профилей экспрессии РНК, включая механизмы интерференции (RNAi)
3. Секвенирование ДНК	
Повторное секвенирование геномов	Секвенирование высокоизменчивых или абберантных геномов (как случается в онкологии), секвенирование геномов патогенных организмов
Секвенирование de novo	Секвенирование неизученных геномов

Обзор выполнен на основе следующих публикаций:

1. BCC Research (2011), Next-Generation Cancer Diagnostics: Technologies and Global Markets. By John Bergin.
2. Molecular Biology of the Cell. Fifth edition / Alberts B., Johnson A., Lewis J., Rafi M., Roberts K., Walter P. With problems by Wilson J. and Hunt T. N.Y., 2008.
3. <http://www.genome.org>
4. Серебровская Т.В. Новая стратегия в лечении болезней: гипоксия – индуцируемый фактор // Вестник Международной академии наук (Русская секция). 2006. № 1. С. 30–31.
5. RAND, 1997. Complexity, Global Politics, and National Security. Washington, D.C., 1997.
6. <http://beta.2020gene.com/wp-content/uploads/2010/02/FigurePhageMicroArray3.jpg>

Тематические рубрики ежемесячного обзора

Аэронавтика и космос

Биотехнологии и генетика. Сельское хозяйство, пищевая и химическая промышленность

Информационные и телекоммуникационные технологии и вычислительная техника

Исследования в области ядерной и квантовой физики

Медицинские технологии и оборудование

Нанотехнологии и новые материалы, микроэлектроника

Социальные и экономические науки и статистика

Энергетика и транспорт