

## ЛЕКЦИЯ

УДК 547.61.57

©Мирошниченко, Птицина

### БИОМАРКЕРЫ В СОВРЕМЕННОЙ МЕДИКО-БИОЛОГИЧЕСКОЙ ПРАКТИКЕ

*И.И. Мирошниченко\*, С.Н. Птицина*

Научный Центр Психического Здоровья РАМН, 115522, Москва,  
Каширское шоссе, 34, тел.: (499)-6159319; эл. почта: igormir@psychiatry.ru

Лекция посвящена новому актуальному направлению биомедицинских исследований – использованию биомаркеров. Дано определение биомаркеров, рассмотрены классические диагностикумы, показатели эффективности лекарственной терапии и предикторы исхода заболевания. Приведены примеры предикторов возникновения сердечно-сосудистых заболеваний, острой фазы воспаления и злокачественных новообразований. Особое внимание уделено характеристике распространенных биомаркеров – гомоцистеина, транстиретина и С-реактивного белка. Описаны современные методы идентификации, качественного и количественного определения биомаркеров: хроматомасс-спектрометрия, иммуноферментный анализ. Прослежена связь между последними достижениями геномики, протеомики и биоинформатики с изучением биомаркеров. Сделана попытка определения тенденций развития изучения биомаркеров.

**Ключевые слова:** биомаркер, протеомика, гомоцистеин, масс-спектрометрия, фармакогенетика.

**ВВЕДЕНИЕ.** К настоящему времени доказана связь не только наследственных, но и практически всех заболеваний с генами человека. При наследственных болезнях наблюдается дефект гена, а при других заболеваниях – нарушение регуляции экспрессии гена. Из результатов, полученных геномикой, следует логический выход на генную терапию. Из геномики выросла другая новая наука – протеомика, задачи которой – охарактеризовать белки и их модифицированные формы, присутствующие в конкретной клетке, ткани или органе в норме и при патологии. Геномика, протеомика и биоинформатика стали определяющими науками в современной биологии. Благодаря успехам протеомики теперь прямо в патологически измененных тканях можно видеть диспропорцию между белками. На смену двумерному электрофорезу пришла масс-спектрометрия с источником ионизации MALDI и преобразованиями Фурье при расшифровке сигнала. Ведутся исследования по созданию принципиально новых лекарственных препаратов с использованием антисмысловых олигонуклеотидов, блокирующих экспрессию того или иного гена, с помощью биоинформатики создаются новые пути от гена к лекарству через анализ структуры макромолекулы. В оценке терапевтического процесса с применением как известных, так и новых лекарственных форм и предсказаниях результата терапии большую роль наряду с клиническими показателями могут сыграть биомаркеры.

#### **1. ОПРЕДЕЛЕНИЕ И КЛАССИФИКАЦИЯ ТИПОВ БИОМАРКЕРОВ.**

Возникает логический вопрос, чем биомаркеры отличаются от показателей клинической лабораторной диагностики, определяемых в норме и патологии.

\* - адресат для переписки

Это обстоятельство побудило США к организации специальной рабочей группы: Biomarkers Definitions Working Group.

Приведём определение, данное вышеуказанной группой: “Биологические маркеры - это количественно определяемые биологические параметры, которые как индикаторы определяют норму, патологию и результат лекарственной коррекции заболевания”.

На практике это определение используется несколько более расширено, поскольку зачастую говорят о биомаркерах беременности, старения, спортивной формы, а также воздействия окружающей среды. В общем случае, биомаркер - это измеряемый биохимический, генетический нейрофизиологический, эндокринологический, анатомический, когнитивный, реологический (список может быть продолжен) показатель, указывающий на большую вероятность наличия соответствующей патологии.

Представляется уместным привести классификацию биомаркеров:

0 тип – маркер, указывающий на наличие заболевания и коррелирующий с его клиническими проявлениями;

I тип – маркер, связанный с терапевтическим эффектом и механизмом действия препарата;

2 тип (предиктор клинического исхода, surrogate endpoint, согласно терминологии англоязычных авторов) – маркер, позволяющий предсказать благоприятный или неблагоприятный исход заболевания, эффективность лечения.

Кроме того, биомаркеры позволяют оценить состояние пациента во время лечения, определить так называемые clinical endpoints (рис. 1), показать возможный исход заболевания и предполагаемые результаты терапии, хотя в этом вопросе их применения еще много недоработанного. Они позволяют оценить безопасность терапии и вероятность смертности при наличии известных факторов риска. Набор биомаркеров, являясь искусственным (суррогатным) заменителем клинических показателей (clinical endpoints), позволяет предсказать результат лечения (благоприятный прогноз или сохранение опасности для жизни) на основе эпидемиологических, патофизиологических, терапевтических и других информативных данных.



**Рисунок 1.**

Мониторинг эффективности терапии, опосредованный биомаркером.

## 2. ОБЩИЕ СВОЙСТВА БИОМАРКЕРОВ.

К общим свойствам биомаркеров относится их специфическая связь с патологией, чувствительность, доступность применения к лицам разного пола и возраста, однозначность идентификации, высокая разрешающая способность метода определения, совместимость с имеющимся лабораторным оборудованием, а также возможность определения биомаркера как в острой фазе заболевания, так и при ремиссии.

Если биомаркер используется в условиях, представляющих опасность для жизни пациента (например, острый инфаркт), то он должен быть максимально чувствительным, решающим является правило “rule out” (исключение заболевания). Цена ошибочной диагностики здоровья в данном случае превышает стоимость дополнительного тестирования или ошибочного диагноза заболевания.

В диагностике и клинике часто используются изоферменты, по этому показателю можно судить о повреждении ткани. Клеточная мембрана непроницаема для ферментов, и энзиматическая активность в сыворотке крови гораздо ниже, чем в клетках. При повреждении ткани растворимые компоненты клеток, в том числе ферменты, попадают в кровь. Поэтому, чтобы определить, произошло ли у больного с соответствующими симптомами повреждение ткани, и в какой степени, обычно измеряют активность ферментов в сыворотке. Преимущества такого подхода в том, что содержание ферментов можно определять по катализируемой ими реакции с помощью чувствительных энзимологических методов, достаточно недорогих и быстрых в исполнении. Изоферменты, как биомаркеры, позволяют генетически охарактеризовать популяцию человека, выявить уровень типов, подверженных влиянию того или иного внешнего фактора, показать генетическое разнообразие выборки.

### **3. БИОМАРКЕРЫ СЕРДЕЧНО-СОСУДИСТЫХ ЗАБОЛЕВАНИЙ.**

Широкое распространение получило применение биомаркеров для идентификации и терапии сердечно-сосудистой патологии. Очевидно, что в каждом конкретном случае биомаркер должен помогать врачу контролировать состояние пациента, например, облегчать идентификацию людей с ишемической патологией. Биомаркеры (например, такой специфичный показатель, как уровни тропонинов I или T) могут помочь дифференцировать пациентов с инфарктом миокарда от пациентов с легочной эмболией или поражением аорты.

Требования к биомаркерам ишемии – высокая миокардиальная специфичность, отсутствие в нормальной (без патологии) сыворотке и ткани, ранняя детекция, длинный период полувыведения, позволяющий увеличить время для диагностики, быстрое тестирование (результаты < 1 час), доступность по цене. Соответствующие рекомендации по диагностике заболевания и оптимизации лекарственной терапии должны быть своевременно предоставлены лечащему врачу. Врачебные мероприятия, оказывающие непосредственное влияние на концентрацию маркера в крови (изменение терапевтической дозы, комедикация, переход на другой препарат), должны быть доведены до сведения аналитика.

Некоторые биомаркеры измеряются в особых клинических ситуациях: при отсутствии симптомов, но наличии семейной истории сосудистых заболеваний; у пациентов с предшествующим сосудистым заболеванием, но не выявляемыми факторами риска; у пациентов с периодически повторяющимся агрессивным сосудистым заболеванием в случае хорошо контролируемых уровней условных факторов риска.

Хроническая дисфункция сердца может развиваться после проведения интенсивной химиотерапии, приводя к появлению хронической сердечной недостаточности. Недавно установлено, что с развитием сердечной дисфункции хорошо коррелирует постепенное увеличение концентрации в крови натрийуретического про-пептида В-типа. Следовательно, возможно применение данного пептида как удобного биомаркера для контроля химиотерапии и предсказания риска развития сердечной недостаточности.

Активность аспартатаминотрансферазы (АсАТ) в сыворотке используется для выявления патологии в сердце и печени. В норме его концентрация в этих двух тканях примерно в 7000 раз выше, чем в сыворотке. Отсюда, учитывая объем плазмы, сердца и печени, можно рассчитать, что активность АсАТ в сыворотке удвоится, если из сердца высвободится всего лишь 0,15% общего количества фермента, а из печени - 0,03%. Таким образом, АсАТ – чувствительный показатель патологических изменений в сердце и печени.

Креатинфосфокиназа (КФК) (изофермент МВ) используется для диагностики инфаркта миокарда, поскольку повышение активности КФК в сыворотке крови в сочетании с болями в груди свидетельствует о повреждении клеток сердца, что характерно для инфаркта миокарда. Следует уточнить, что имеются и более чувствительные биомаркеры для диагностики инфаркта миокарда, как уже упомянутые выше тропонины.

Несмотря на отдельные недостатки, прогресс в использовании биомаркеров сердечно-сосудистых заболеваний несомненен. Известный скептицизм применения биомаркеров в этой области в настоящее время преодолен. Показано, например, что защитный эффект ингибиторов коэнзим-А-редуктазы может являться результатом противовоспалительных эффектов применяемых сердечных препаратов, поэтому С-реактивный белок, биомаркер воспаления, должен измеряться дополнительно к уровню холестерина. Успешно применяются тропонины для диагностики прединфарктного состояния, разработаны специфичные кардиочипы.

#### **4. БИОМАРКЕРЫ РАКА.**

Рак можно рассматривать как нарушение клеточной дифференцировки, когда искажается программа воспроизведения клетки, вследствие чего образуются клетки с патологическим фенотипом. Степень отклонения от нормальной экспрессии генов легче всего выявить, анализируя первичные генетические продукты – белки. В этом плане представляют интерес изоферменты, как удобные для анализа продукты активности генов и специфические маркеры дифференцировки, особенно в сочетании с канцерофетальными антигенами – белками, которые содержатся в опухолях и эмбриональных тканях, но практически отсутствуют в тканях взрослых особей.

Термин “биомаркер”, используемый для скрининга рака, в широком смысле может включать как показатели, тестируемые в сыворотке и моче (не инвазивные и доступные по цене), так и сложные, включающие иммунный ответ, изменения гормонов, а также анализ экспрессии генов на микрочипах, масс-спектрометрическое профилирование белков и количественный анализ уровня антител против специфичных антигенов рака. Появление новых методов анализа экспрессии генов, микрочипов, развитие иммунологии позволило предложить новые подходы для скрининга канцерогенеза на ранних стадиях. Так, одной из основных Программ Национального Института Рака в США стала EDRN – Программа по координации разработки биомаркеров, их валидации и клинического применения.

В связи с увеличением числа случаев рака печени, вызванного, в основном, распространением гепатита С, возрастает необходимость в разработке тестов, помогающих диагностировать это опасное заболевание на ранних стадиях. Каждый год от 2 до 5% пациентов с циррозом печени постигает печальная участь развития гепатокарциномы. Для детекции опухоли, в основном, используется измерение изменения содержания сывороточных белков в крови или других жидкостях организма, чаще всего альфа-фетопротейна (AFP). К сожалению, данный биомаркер не отличается высокой специфичностью, его количество меняется при разных заболеваниях печени, к тому же у пациентов с малыми опухолями чаще всего отмечается отрицательный результат тестирования. Для мониторинга рецидивирующей гепатокарциномы после резекции успешно применяется анализ протромбина, индуцированного отсутствием витамина К, или антагонист II (PIVKA-II). Полученные результаты свидетельствуют, что PIVKA-II, как маркер карциномы печени, успешно дополняет AFP.

Медицинским Центром Израиля (BIDMC) предложен новый масс-спектрометрический метод на основе протеомного профилирования (SELDI-TOF MS), позволяющий более точно, чем традиционные биомаркеры, отделить пациентов с раком печени на ранней стадии от пациентов с циррозом печени, вызванным гепатитом С. Применение SELDI-TOF профилирования

позволило значительно повысить специфичность, как по сравнению с AFP, так с другими биомаркерами рака печени – AFP-L3 и PIVKA-II.

Предпринята попытка разработать набор критериев (элементов базы данных) для ранжирования биомаркеров рака с целью стандартизации характеристик биомаркеров и создания соответствующей базы данных. Элементы рассматриваются как набор общих критериев, характеризующих все биомаркеры, используемые в литературе. Характеристики биомаркеров включают общие и уникальные свойства, такие как биологическая природа, стадия/фаза изучения, чувствительность и специфичность, образ действия, оценка риска, статус валидации, метод и рекомендованные интервалы варьирования биомаркера. Специально отобранные свойства одного из специфичных биомаркеров-цитокинов, фактора, стимулирующего колонии макрофагов (M-CSF), используемого для диагностики рака яичников, легких, мозга, поджелудочной железы и прямой кишки, позволили предложить его в качестве модельного биомаркера. Клинические исследования подтвердили преимущества M-CSF перед традиционными биомаркерами детекции рака. Разработанные элементы стандартизации должны помочь созданию базы данных по биомаркерам рака, что облегчит выбор и применение соответствующего биомаркера в онкологии.

Из более ранних разработок следует упомянуть кислую фосфатазу, представляющую собой сложный набор различных молекулярных форм, обусловленных множественностью генных локусов. Этот фермент может использоваться в клинике для выявления метастазирующего рака предстательной железы: при наличии метастазов активность фермента в сыворотке выше, чем при их отсутствии. К сожалению, специфичность этого теста низка, поскольку кислая фосфатаза может высвобождаться из клеток разных типов, кроме того, активность фермента в сыворотке может повышаться сходным образом и при других заболеваниях костей. Однако изоферменты, высвобождающиеся из костной ткани и из клеток крови, отличаются от тех, которые свойственны предстательной железе и ее опухолям. Поэтому специфичность биомаркера можно улучшить, если активность фосфатазы определять в сыворотке в присутствии ингибиторов, избирательно воздействующих на различные изоферменты.

Некоторые биомаркеры, такие как простато-специфичный антиген (PSA) обладают высокой чувствительностью, но низкой специфичностью, поскольку характеризуют рак только как общий процесс. С помощью PSA в 60% случаев можно диагностировать рак до клиники. Из других литературных данных по биомаркерам рака предстательной железы отметим анализ панели потенциальных биомаркеров (SEB-surrogate endpoint biomarkers) малигнизации, включающих p53, цитоморфометрические показатели, erbB-2, erbB-3, EGF-рецептор, TGF- гликопротеин-72, синтазу жирных кислот и антиген Y Левиса. Результаты, полученные с помощью этих наборов, показали значительные различия в экспрессии биомаркеров, характеризующие простатическую неоплазию и рак простаты, и позволили провести мониторинг химиотерапии фенретинидом.

Биомаркеры могут служить инструментом в научных исследованиях по выяснению механизма канцерогенеза. Так, например, картирование области 13q14 13-ой хромосомы человека и выявление с помощью STS-маркеров нового гена-онкосупрессора способствовало пониманию молекулярных механизмов развития В-клеточного лимфолейкоза.

Современные методы геномики позволяют определить экспрессию генов и выявить патогенетические эффекты генных мутаций. Так, для анализа генной экспрессии и выявления предшественника лимфобластоидной лейкемии В применили микрочип Affimetrix U95A, содержащий 12 600 генов человека. Показали, что только 6 генов значительно отличаются по экспрессии и, следовательно, отвечают за сигнальные молекулы и транскрипционные факторы, участвующие в пролиферации клеток.



## БИОМАРКЕРЫ В СОВРЕМЕННОЙ МЕДИКО-БИОЛОГИЧЕСКОЙ ПРАКТИКЕ

В таблице 1 приведен список некоторых биомаркеров, которые позволяют оценить состояние органов и систем человека в норме и при ряде патологических процессов.

Таблица 1. Биомаркеры некоторых патологических состояний.

<b><u>надпочечники</u></b>	<b><u>анемия</u></b>	<b><u>состояние костей</u></b>
АКТГ кортизол 11-дезоксикортизол 17- $\alpha$ -гидроксиprogестерон альдостерон	ферритин фолиевая кислота гаптоглобулин трансферрин витамин B12	25-гидроксивитамин D 1-25-дигидроксивит. D кальцитонин остеокальцин
<b><u>сердечно-сосудистая система</u></b>	<b><u>диабет</u></b>	<b><u>воспалительные процессы</u></b>
ангиотензин I ангиотензин II аполипопротеин A I аполипопротеин A II аполипопротеин B аполипопротеин E эндотелин I CRP (C-реактивный белок) миоглобин ренин натрийуретический пептид тропонин I тропонин T тропонин C	C-пептид глюкагон инсулин микроальбумин глюкоза	цитокины интерлейкины гемопексин D-даймер TNF- $\alpha$ (фактор некроза опухоли, синоним - лимфотоксин B) M-CSF (фактор, стимулирующий колонии макрофагов)
<b><u>репродуктивная система</u></b>	<b><u>щитовидная железа</u></b>	<b><u>почки</u></b>
андростандион андростендион дигидротестостерон DHEA-S04- (дегидроэпиандростерон) тестостерон свободный тестостерон общий progестерон пролактин эстрадиол	T3 свободный T3 общий T4 свободный T4 общий Тироглобулин TSH (тиреотропный гормон) TBG (тироксин-связывающий глобулин).	цистатин C $\alpha$ GST коллаген IV альбумин в моче $\alpha$ -1-микроглобулин в моче $\beta$ -2-микроглобулин в моче IgG в моче

Получен ряд генетических маркеров для контроля сердечно-сосудистых заболеваний (гены лимфотоксина- $\alpha$  (LTA), галектина-2 (LGALS2), неврологических (экспансия тринуклеотидных повторов GAG в одном и том же участке гена IT-15 при хорее Гентингтона, мутации гена SCA1 на хромосоме 6p22-p23, характерные для спинномозговой атаксии 1 типа) и других заболеваний). В настоящее

время мутантные гены выделены или, по крайней мере, картированы на хромосомах для большинства из порядка 5000 известных нозологических форм наследственных болезней.

## 5. ПРИМЕРЫ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ КОНКРЕТНЫХ БИОМАРКЕРОВ.

Гомоцистеин (Hcy) - природная небелковая аминокислота. Hcy - продукт метаболизма метионина (Met) - одной из 8 незаменимых аминокислот.

В плазме крови свободный (восстановленный) Hcy присутствует в небольших количествах 1–2%. Примерно 20% находится в окисленном состоянии, преимущественно в виде смешанного дисульфида цистеинилгомоцистеина и в меньшей мере как гомоцистин. Около 80% Hcy связывается с белками плазмы крови, в основном с альбумином, образуя дисульфидную связь с цистеином-34. Метаболизм гомоцистеина происходит внутриклеточно с участием ряда ферментов, основные из которых: метилентетрагидрофолатредуктаза (МТГФР) и цистатион-β-синтетаза (ЦВС). Помимо ферментов, важную роль в метаболизме гомоцистеина выполняют витамины B<sub>6</sub>, B<sub>12</sub> и фолиевая кислота.

Гипергомоцистеинемия - фактор риска сердечно-сосудистых заболеваний и атеросклероза. На сегодняшний день исследования Hcy являются одним из приоритетных направлений в области клинической диагностики как у нас в России, так и за рубежом. Сейчас за рубежом всерьез поставлен вопрос о включении измерения Hcy у пациентов с коронарной болезнью сердца в список обязательных анализов. Натошак нормальный уровень гомоцистеина составляет от 8 до 12 мкмоль/л, повышенные значения разделяют на легкую (16-30), среднюю (31-100) и тяжелую (>100 мкмоль/л) степень гипергомоцистеинемии.

Установлена важная роль гипергомоцистеинемии в возникновении и поддержании различного рода депрессивных состояний, старческой деменции (слабоумия), болезни Альцгеймера, шизофрении и ряда других заболеваний и патологических процессов. Показано, например, что увеличение концентрации Hcy в крови прямо коррелирует с когнитивными расстройствами у лиц пожилого возраста.

**Транстиретин** - белок, из самого названия которого следует, что он обеспечивает транспорт тироксина и ретинола. Транстиретин производится преимущественно в печени, сосудистом сплетении желудочков мозга и в пигментном эпителии сетчатки глаза. В цереброспинальной жидкости содержание транстиретина непропорционально велико, его масса составляет 25% от массы всех белков этой полости тела. Уровень транстиретина в сыворотке крови в норме находится в широком диапазоне от 0 до 400 мг/мл. Обнаружено более 80 мутаций гена TTR, вызывающих заболевания. Большинство этих мутаций приводит к амилоидозу - нарушению белкового обмена, сопровождающемуся образованием в тканях специфического белково-полисахаридного комплекса - амилоида. Амилоидогенные мутации снижают стабильность белка.

**Белки “острой фазы” воспаления.** В ответ на инфекцию или повреждение тканей резко увеличивается (“позитивные” белки) или, наоборот снижается (“негативные” белки) концентрация некоторых белков плазмы крови, имеющих общее название “белки острой фазы”. К числу таких маркеров воспалительных процессов относятся: D-даимер белок, α<sub>1</sub>-антитрипсин, α<sub>1</sub>-антихимотрипсин, α<sub>2</sub>-макроглобулин.

К позитивным белкам острой фазы воспаления относится и С-реактивный белок (CRP, от англ. C-reactive protein), относящийся к бета-глобулинам. CRP человека состоит из пяти идентичных нековалентно связанных полипептидных цепей, образующих замкнутый пентамер. С-реактивный белок, как и другие белки острой фазы воспаления, появляются в сыворотке вскоре после повреждения тканей и начала воспаления. С-реактивный белок содержится в сыворотке и связывает капсульный полисахарид *Streptococcus pneumoniae*.

Повышение уровня С-реактивного белка наблюдается при острых бактериальных и вирусных инфекциях, инфаркте миокарда, злокачественных

новообразованиях и аутоиммунных заболеваниях. Американская ассоциация кардиологов подразделяет пациентов на 3 группы риска развития сердечно-сосудистой патологии в зависимости от концентрации CRP в крови: низкая вероятность - менее чем 1 мкг/мл; средняя вероятность - от 1 до 3 мкг/мл; высокая вероятность - более чем 3 мкг/мл.

Иногда уровень С-реактивного белка измеряют для оценки активности ревматизма и ревматоидного артрита. В этом случае его концентрация намного превышает 3 мкг/мл. Поскольку уровень С-реактивного белка в течение суток может резко меняться, его следует определять в динамике.

**Цитокины** – разнообразная группа растворимых белков, участвующих в активации, контроле роста и репарации клеток, а также регуляции иммунного ответа. Последовательная экспрессия каскада цитокинов происходит при многих заболеваниях, в том числе ревматоидном артрите, сердечной недостаточности, миеломной болезни и сепсисе. Т-лимфоциты секретируют различные про- и анти-воспалительные цитокины во время заболевания. Существуют две различные субпопуляции Т-хелперных клеток – противовоспалительные Th2 и про-воспалительные Th1. Как правило, Th1 цитокины супрессируют Th2. Лекарственные препараты, такие как противоревматоидные средства, блокаторы ангиотензина II и статины помогают восстановить баланс Th1/Th2.

Оценивая роль данных медиаторов, как показателей развития заболевания и вариабельности отклика на лекарственные препараты, можно привести таблицу 2, показывающую связь измененной экспрессии потенциальных маркеров с неврологическими и психическими заболеваниями. Мониторинг терапевтического вмешательства будет более успешен, если учитывать изменение экспрессии данных медиаторов.

*Таблица 2. Связь неврологических и психических заболеваний с изменением экспрессии воспалительных медиаторов.*

<b>Заболевание</b>	<b>Медиаторы ( маркеры )</b>
<b>Болезнь Альцгеймера</b>	IL1, TNF- $\alpha$ , IL1- $\beta$ , IL-6
<b>Церебральная ишемия</b>	IL1, TNF- $\alpha$ , TNF- $\beta$ ,
<b>Синдром Дауна</b>	IL1
<b>Рассеянный склероз</b>	TNF- $\alpha$ , адгезивные белки LFA-1, ICAM-1, FA-3, хемокины MCP-1,-2,-3, GRO- $\alpha$ , MIP-1 $\alpha$ и -1 $\beta$ .
<b>Слабоумие</b>	INF- $\alpha$ , TGF $\beta$ 1
<b>Депрессия</b>	IL1- $\beta$ , IL-6, IFN- $\gamma$ , IL-1ra, sIL-6r, TNF- $\alpha$ , IL-6, sIL-2r
<b>Шизофрения</b>	TNF- $\alpha$ , IL-6, повышение полиморфизма IL1- $\beta$ , у пациентов, принимающих лекарства – IL2 и IFN- $\alpha$
<b>Бессоница</b>	TNF- $\alpha$ , IL-6

## **6. МЕТОДЫ ИЗМЕРЕНИЯ БИОМАРКЕРОВ.**

Биомаркеры чаще всего измеряются в биообразцах (кровь, моча или образцы ткани); достаточно спорным является подмена понятия “биомаркер” такими клиническими показателями, как давление, показания ЭКГ, или результатами, полученными при снятии эхокардиограммы или другого вида сканирования. Проблема количественного определения содержания биомаркеров носит довольно сложный характер, что вообще характерно для эндогенных соединений.



В организме содержание эндогенных соединений находится в гомеостатическом равновесии. Иными словами, поступление этих веществ с пищей, в виде лекарств и эндогенного синтеза равняется их потере в результате биотрансформации и экскреции. Эндогенные вещества присутствуют в организме в фоновых концентрациях, которые подвержены биологическим ритмам и флуктуациям. Эти величины необходимо вычитать из соответствующих значений при построении калибровочной кривой. При проведении калибровки с использованием матрицы в виде воды или водных растворов альбумина возникают проблемы оценки степени экстракции определяемого биомаркера.

Низкая аналитическая вариабельность – основное требование ко всем биомаркерам. Она предусматривает хорошую воспроизводимость, выражающуюся в степени соответствия аналитическому стандарту и количественной оценке в пределах допустимого. Метод определения должен быть одним и тем же на протяжении всего исследования. Недопустимо менять условия определения по ходу эксперимента. Должны быть приведены следующие метрологические характеристики: процент экстракции, диапазон линейности отклика; предел чувствительности определения (LOQ), чувствительность, точность (precision), правильность (ассигасу), селективность и, что очень важно, стабильность. Необходимо также позаботиться и о наборе контрольных образцов.

Стандартизация методов предполагает использование рекомендованных измерительных процедур и материалов. Установлены международные стандарты для некоторых биомаркеров, включающих интерлейкин-6, интерлейкин-8, сывороточный амилоид А, фибриноген и CRP.

Если аналитические результаты превышают биологическую вариабельность, необходимо контролируемое улучшение методологии и увеличение количества повторов анализа. В случае новых технологий, таких как генотипирование и использование микрочипов, возможность аналитической ошибки значительно повышается, что требует наличия новых стандартов для минимизации ошибок.

Определение биомаркеров возможно как методами биоаналитической химии, так и методами клинической химии. Биоаналитическая химия использует физико-химические методы анализа, такие как хроматография и масс-спектрометрия. Несмотря на то, что эти методы имеют довольно высокую производительность и пригодны для открытия и определения новых биомаркеров, белковые биомаркеры обычно изучаются методами иммуноферментного анализа, непопулярного в большинстве биоаналитических групп. Иммуноферментный анализ более неоднозначен с точки зрения селективности и линейной зависимости. Он включает в себя чувствительные биологические элементы, которые труднее контролировать. С другой стороны, многие иммунологические исследования обеспечивают селективность и предел определения, недостижимые физическими методами. Они также позволяют проводить большое количество определений одновременно, используя высоко автоматизированные инструменты умеренной стоимости. Эти методы более привычны для клинических врачей и диагностической индустрии.

Следует отметить, что к методам, используемым при поиске новых биомаркеров, и к методам определения биомаркера в клинической практике предъявляются разные требования. При поиске новых маркеров наиболее важен большой диапазон определяемых концентраций и низкий предел определения. А для серийных анализов самыми важными требованиями являются возможность их автоматизации, простота метода и используемого оборудования, наименьшие затраты времени и средств. Поэтому для рутинных клинических анализов более подходит иммуноферментный анализ, так как этот метод проще автоматизировать. Недостатком этого метода является кросс-реактивность антител.

В настоящее время наличие хроматомасс-спектрофотометрического оборудования является необходимым атрибутом успешной жизнедеятельности средней биоаналитической лаборатории. Причем наблюдается тенденция

вытеснения сочленения масс-детекторов с газовыми хроматографами жидкостной хроматографией и капиллярным электрофорезом с тандемной масс-спектрометрией. Прогрессу в исследовании нелетучих и разлагающихся при нагревании веществ, обладающих, в частности, биологической активностью, способствовало в немалой мере разработка таких “мягких” методов ионизации (ионизации без значительной фрагментации), как электрораспыление (Electrospray Ionization, ESI) и химическая ионизация при атмосферном давлении (APCI).

При изучении высокомолекулярных соединений применяются и другие многообещающие источники ионизации: APCI/APPI - фотоионизация при атмосферном давлении / химическая ионизация, MALDI - лазерная десорбционная ионизация, облегчаемая матрицей, Nanospray - электрораспыление для работы с микрообразцами и нанолитровыми потоками жидкости, как в статическом, так и в динамическом режимах.

Метод MALDI основан на воздействии лазерного излучения, которое фокусируется на образец в смеси с соответствующей матрицей. При этом становится возможным изучение высокомолекулярных белков и синтетических полимеров.

В последние десятилетия широкое применение нашли времяпролетные масс-спектрометры и приборы ион-циклотронного резонанса. Во времяпролетном масс-спектрометре (английское сокращение - TOF от Time of Flight) пучок ионов, пройдя ускоряющую разность потенциалов (несколько киловольт), летит в бесполом пространстве вакуумной трубы к детектору. Под действием одинакового ускоряющего напряжения, ионы с разным значением  $m/z$  приобретают разную скорость и регистрируются в разное время. Строго говоря, время пролета ионов обратно пропорционально корню квадратному отношения массы к заряду.

Времяпролетные масс-спектрометры работают в импульсном режиме, длительность импульса для достоверной регистрации двух последовательных масс должна быть менее  $10^{-4}$  с. Время сканирования полных масс-спектров составляет миллисекунды. Точность измерения массы соединения достигает значений порядка 5 ppm. Применение TOF целесообразно при исследовании процессов, быстро протекающих во времени. В лучших приборных образцах диапазон измеряемых масс и разрешающая способность достигают нескольких тысяч, что в сочетании с методом ионизации MALDI делает их незаменимым средством измерения содержания макромолекул.

Масс-спектрометрия ионного циклотронного резонанса с преобразованием Фурье (FT-ICR) является одним из наиболее быстро развивающихся методов анализа биологических и лекарственных веществ благодаря высокой точности измерения масс, высокой разрешающей способности и чувствительности прибора. Анализаторы этого типа представляют собой ловушку ионов, образуемую шестью электродами, которые помещены в высокий вакуум и однородное магнитное поле. Использование сверхпроводящих магнитов, создающих сильные магнитные поля, позволяет получить высокие аналитические характеристики масс-спектрометров ICR, так как большинство фундаментальных параметров, свойственных данному типу анализаторов, возрастают с увеличением магнитной индукции. FT-ICR обладают высокой разрешающей способностью и высокой чувствительностью определения исследуемых продуктов. Широкому их распространению не способствует высокая цена приборов укомплектованных таким типом анализатора.

#### **7. РАЗРАБОТКА НОВЫХ БИОМАРКЕРОВ.**

Современный анализ генома человека и развитие системного подхода в биологии обеспечили более тщательную диагностику и возможность терапии. Завершение проекта “Геном человека” и оценка других геномов в совокупности с достижениями протеомики далеко продвинуло анализ механизмов заболеваний и разработку новых лекарств с использованием потенциальных биомаркеров.

Фармакогенетика открыла обширную область, включающую разработку новых лекарств, генетическое обоснование отклика на лекарственное и прочее экзогенное воздействие. Целью фармакогенетики является предсказание отклика пациента на специфический лекарственный препарат как способ достижения

наилучшего “персонализированного” лечения. В настоящее время у человека установлены генетические различия практически по всем ферментам, метаболизирующим лекарства. В перспективе генотипирование пациентов приведет к снижению количества наследственных заболеваний и оптимизации терапии путем выявления генетического полиморфизма.

Стратегия сцепления позволяет идентифицировать сегмент генома (обычно включающий миллионы пар оснований ДНК), связанный с болезнью. Картирование этого сегмента может привести к идентификации гена, отвечающего за чувствительность к заболеванию.

Ассоциативная стратегия оценивает связь генетических вариантов, с присутствием или отсутствием заболевания. Общий анализ экспрессии генов, обычно использующий полимеразную цепную реакцию (ПЦР) и микрочипы ДНК, позволяет перейти к оценке регуляторных цепей генов.

Проанализированные гены группируются в кластеры экспрессии, нарушение регуляции которых свидетельствует о заболевании. Идентификация генов-кандидатов ведет к определению мишени для лекарственных препаратов. Белковые продукты регулируемых генов могут быть кандидатами на биомаркеры при условии внеклеточной секреции.

На основе библиотеки кДНК сердца и артериальной ткани человека был разработан кардиочип и проведён анализ экспрессии генов миокардиальной ткани для идентификации специфических образцов гипертрофии сердца, инфаркта миокарда, различных форм сердечной недостаточности и трансплантатов сердца. Такой анализ позволил вести молекулярное профилирование пациентов с расширенной кардиомиопатией, включая корреляцию терапевтического отклика с транскрипционными изменениями.

Методы геномики и фармакогенетики позволяют идентифицировать чувствительность или нарушение экспрессии модифицированного гена в клетках и тканях, а протеомики (двумерный электрофорез и масс-спектрометрия) - идентифицировать малые количества белков, их клеточную локализацию, посттрансляционную модификацию, а также межбелковое взаимодействие в разных образцах. Преимущество протеомного анализа в возможности учитывать пост-трансляционные модификации белков, влияющие на их функции и активность.

Появилась новая дисциплина - метаболомика, облегчающая быстрый скрининг *in vivo* различных факторов, включая эффективность лекарства или токсичность, лежащих в основе физиологических процессов.

Методы протеомики, основанные на принципах сравнения экспрессии белков в норме и при патологии, включают вестерн-блот анализ, иммуносорбентные методы, антитела, идентификацию белков с помощью двумерного геля электрофореза, жидкостной хроматографии, поверхностной хроматографии и особенно широко применяемую в последние годы высокоэффективную масс-спектрометрию.

Построение неинвазивного молекулярного изображения с помощью новых контрастных агентов помогает идентифицировать компоненты заболевания во времени и пространстве (например, идентифицировать тромбогенные молекулы на эндотелии сосудов).

Новый подход – анализ белков в бесклеточной системе позволяет избежать трудностей выделения белков из клеток и облегчает получение данных по белкам непосредственно с генных микрочипов.

Биоинформатика связывает и объединяет различные типы биологических данных, например, идентификацию мишени для лекарства и валидацию биомаркера. Интегратомика использует все вышеперечисленные методы для получения целостной картины на уровне ДНК, РНК, белков, тканей и фармакологическом уровне.

Комбинация нескольких подходов и методов даёт, как правило, более успешные результаты. Например, потенциальные диагностические маркеры рака

толстого кишечника и рака яичников идентифицированы путем объединения результатов геномного и протеомного анализов, когда методы протеомики подтвердили статус кандидатов на биомаркеры, выявленных профилированием генома.

Интегративный подход позволил повысить низкую чувствительность PSA (простато-специфичного антигена) для детекции рака простаты путем объединения метода SELDI-MS и биоинформативного алгоритма.

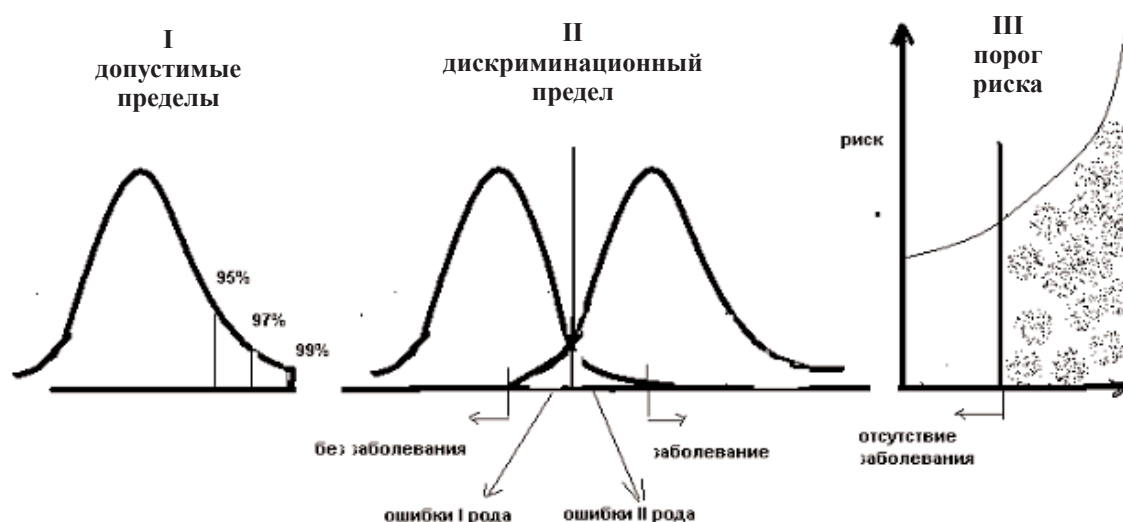
Интегративная функциональная информатика важна в области точности количественной оценки и воспроизводимости анализа биомаркеров, она облегчает оценку различных ключевых факторов патофизиологических каскадов и обеспечивает сокращение времени, поскольку биомаркеры могут быть применены значительно раньше, чем осуществится разработка лекарства.

Функциональная информатика способна использовать инструменты геномики для моделирования потенциальных мишеней и биомаркеров. Например, установлено, что применение геноспецифичных малых РНК может привести к специфическому ингибированию генной экспрессии и накоплению модифицированных клеток. Эти клетки исследуются батареей функциональных тестов, и гены-кандидаты отбираются как потенциальные мишени и биомаркеры на основе их роли в интересующих метаболических путях.

Новые биомаркеры применяются в клинике, если они целенаправленно характеризуют заболевание, воспроизводимо определяются и легко идентифицируются клиницистами. Биомаркеры не должны влиять на течение заболевания и результаты лечения, не должны быть дорогостоящими. Клиническая валидация должна доказать связь биомаркера с заболеванием или последствиями терапии, часто для установления искусственного (суррогатного) статуса биомаркера.

Для прогностических маркеров, используемых в терапии, менее важна высокая специфичность и цена, но имеет значение узкий диапазон интраиндивидуальной изменчивости. Использование такие биомаркеров более спорно, так как требует больших образцов в течение длительного времени, тогда как диагностические тесты требуют меньшего количества образцов.

Важным этапом доклинического тестирования биомаркеров является определение их значений, отклоняющихся от нормы (рис. 2). Для этого необходимо охарактеризовать распределение маркеров в популяции или образцах, полученных от пациентов, на которых биомаркеры будут тестироваться, и оценить варьирование уровней биомаркера в зависимости от возраста, пола, этноса, преобладания определенных заболеваний и связи с определенными факторами риска.



**Рисунок 2.**  
Значения биомаркеров в норме и при патологии.



Допустимые пределы изменения показателя устанавливаются после перекрестного анализа образцов сравнения (обычно это здоровые люди), выбираются границы интервала для нормального распределения (чаще всего это 95% или 97,5%), за которыми следует отклонение от нормы. Допустимый интервал определяет границы между максимальным и минимальным значением показателя.

При этом должны учитываться возможности наложения результатов измерения показателей, например, когда определенная доля показателей у здоровых людей выходит за пределы нормального статистического распределения. Значения внутри интервала могут не соответствовать здоровью человека, если человек наследственно отличается от членов группы, используемой для установления пределов допустимых значений. Возможен и еще один случай наложения результатов, когда изменения в значениях внутри допустимого интервала свидетельствуют о патологии.

Дискриминационные пределы также используются для определения отклонений значений биомаркера. Они устанавливаются путем оценки степени перекрытия распределения биомаркера у пациентов с заболеванием и распределением биомаркера у здоровых людей при перекрестных исследованиях.

Следующий подход к определению отклонений уровня биомаркера – **определение порога риска**, за которым следует развитие заболевания. В популяции всегда существует градиент факторов риска, и большинство людей часто характеризуются как имеющие уровни, отклоняющиеся от нормы. Часто такие уровни могут определяться не только по значениям специфического фактора риска, но и по совокупности с другими факторами риска, потенциально приводящими к развитию заболевания.

Качественное исследование новых биомаркеров основано на независимом сравнении характеристик данного биомаркера со стандартом на соответствующей выборке пациентов, представляющей адекватный спектр заболевания. Результаты должны показывать преимущества биомаркеров для диагностики и прогностики.

При оценке результатов, полученных с помощью биомаркеров, должен применяться байесовский подход, объединяющий предварительно полученные данные с результатами тестирования биомаркеров (выраженных как соотношение чувствительность/специфичность) для оценки вероятности заболевания. Разработаны алгоритмы предсказания риска, включающие отобранные биомаркеры, и специалисты могут предсказать даже скорость развития заболевания (например, скорость развития коронарной недостаточности).

Все увеличивающиеся количества биомаркеров часто оценивают на поливариантных моделях (измеряемых параллельно панелях маркеров).

Когда оценивается новый биомаркер X, важно помнить, что вопрос не в том, что X лучше предсказывает болезнь, чем ранее изученный биомаркер Y, а улучшает ли X точность предсказания, чем все более ранние предикторы того же заболевания, включающие Y. То есть, относительная значимость новых биомаркеров лучше оценивается при сравнении со статистической моделью, включающей совокупность известных предикторов.

Использование множественных маркеров на основе оценки многих факторов риска имеет большое значение, поскольку возможный синергизм и наличие нескольких мишеней для оценки нежелательных уровней факторов риска позволяют получить максимально точный прогноз для пациента.

#### **ЗАКЛЮЧЕНИЕ.**

Три параллельных открытия произвели революцию в области биомедицинских исследований:

во-первых, это завершение работ по Проекту “Геном человека”, разработка микрочипов, достижения протеомики и нанотехнологий, обеспечившие создание исключительно информативных биомаркеров, включая высоко-эффективные и чувствительные функциональные методы;



во-вторых, достижения биоинформатики, позволившие значительно повысить эффективность аналитического подхода к результатам лабораторных экспериментов. BLAST, иерархическая кластеризация, осуществляющие создание обширной базы данных по референс-белкам и связывающие данные, полученные на микрочипах, с биологическими путями;

в-третьих, осознание того, что болезнь – результат нарушения регуляции генных регуляторных сетей, белков и метаболических изменений, отражающих сложные взаимодействия генетических и внешних компонентов системы.

Эти достижения в немалой степени способствовали и прогрессу в изучении биомаркеров. Интерес к этой теме побудил к появлению специализированных журналов: “Biomarkers”, “The International Journal of Biological Markers”.

Биомаркеры служат широкому ряду целей в разработке лекарств и оценке терапевтической стратегии. Они могут обеспечить основу для отбора кандидатов на клинические испытания и выявления типов заболеваний и пациентов, наиболее подходящих для применения новых препаратов.

Можно сказать, что в результате успехов сочетания молекулярно-генетического, протеомного и биоинформативного подходов сильно преобразован поиск и разработка новых лекарств, вакцин и диагностики и значительно выросло число соединений - кандидатов, требующих рационализации как клинических испытаний потенциальных лекарственных препаратов, так самого процесса эффективной терапии пациентов. Один из возможных подходов к улучшению терапии – использование клинических показателей для определения заболевания и влияния на него применения лекарственных препаратов, методов хирургии и вакцин. Другой подход – использование широко ряда аналитических инструментов для оценки биологических параметров, относящихся к биомаркерам. Измерение биомаркеров помогает объяснить эмпирические результаты клинических испытаний, связывая эффект вмешательства на молекулярном и клеточном уровне с клиническим ответом.

Биомаркеры помогают определить безопасность и эффективность клинических испытаний, дают информацию для выработки режима дозирования и минимизации интериндивидуальных различий в ответе.

Оценка выгоды или риска является основной задачей разрабатываемого плана всех терапевтических вмешательств. Наиболее реальный путь оценки заболевания – по клиническим конечным показателям (clinical endpoint), таким, например, как выживаемость, инфаркт миокарда, перелом кости или возникновение рака и др. Однако эти стандарты не применимы для оценки долговременной терапии, поскольку требуется длительное время для проявления этих клинических показателей и испытаний с большим количеством пациентов. Биомаркеры, представляющие собой чувствительные и специфические индикаторы заболеваний, могут стать замещающими предикторами конечного результата (surrogate endpoint) для получения клинического ответа на терапию в случае такой долговременной терапии. Следует отметить, что понятие “биомаркеры” шире понятия surrogate endpoint, поскольку только некоторые биомаркеры получают статус замещающих показателей.

Биомаркеры могут заменять клинические конечные показатели в решающих ситуациях, когда разрушительный клинический исход, такой как смерть, представляет собой этическую проблему. Эта точка зрения подтверждается фармакокинетическими исследованиями, в которых биомаркеры, такие как, например, присутствие РНК вируса иммунодефицита человека в плазме крови, используются как заместители клинического исхода (гибель или появление опасных инфекций) в оценке антивирусных агентов у пациентов с ВИЧ инфекцией.

Итак, на наш взгляд, понятием “биомаркеры” не следует заменять клинические показатели, отражающие реальное состояние пациента, его самочувствие и функционирование его организма. Точно также следует разделять понятия “фактор риска”, непосредственно связанного с заболеванием и

указывающим причину развития заболевания, и “маркер риска”, статистически связанного с заболеванием, который может измеряться в процессе заболевания, но не требует обязательного наличия причинной связи.

Биомаркеры широко применяются на первоначальных этапах оценки кандидата на лекарственное средство: исследованиях *in vitro*, на культурах ткани, на моделях животных и ранней фазе клинических испытаний для доказательства концепции. Но они нашли и другое применение в детекции заболеваний и мониторинге состояния пациента, включающее следующие пункты:

1. как диагностический инструмент для идентификации пациентов с заболеванием или отклонения от нормального состояния (например, контроль уровня глюкозы в крови);

2. как инструмент установления заболевания (например, измерение антигена СА-125 для диагностики рака) или классификации степени заболевания (концентрация простато-специфичного антигена отражает степень роста опухоли или метастаз);

3. как индикатор прогноза заболевания (например анатомическое измерение опухоли для предсказания некоторых видов рака);

4. использование для предсказания и мониторинга клинического ответа на терапевтическое вмешательство (например, определение уровня холестерина и С-реактивного белка в мониторинге терапии сердечно-сосудистых заболеваний).

Таким образом, отдавая должное тому, что клинические конечные показатели (измерение и анализ характерных признаков заболевания) – наиболее надежные показатели в оценке терапевтического вмешательства, - замещающие клинические показатели (surrogate clinical endpoints или набор биомаркеров) вполне способны предсказать клинический результат, повышая этим эффективность и безопасность терапии.

## РЕКОМЕНДУЕМАЯ ЛИТЕРАТУРА

1. Арчаков А.И. (2000) *Вопр. мед. химии*, **46**, 4-7.
2. Biomarkers Definitions Working Group (2001) *Clinical Pharmacology & Therapeutics*, **69**, 89-95.
3. Vasan R.V. (2006) *Circulation*, **113**, 2335-2362.
4. Karacalioglu O., Arslan Z., Kilic S., Oztürk E., Ozguven M. (2007) *Biomarkers*, **12**, 533-540.
5. Petricoin E.F., Liotta L.A. (2002) *Trends Biotechnol.*, **20**(12), 30-34.
6. Kim D.Y., Paik Y.H., Ahn S.H., Choj J.W., Kim J.K., Lee K.S., Chon C.Y., Han K.H. (2007) *Oncology*, **72**, 52-57.
7. Hardy J., Hardy-Gwin K. (1998) *Science*, **282**, 1075-1079.
8. Clarke R., Daly L., Robinson K. (1991) *N. Engl. J. Med.*, **324**, 1149-1155.
9. Tucker K.L., Qiao N., Scott T., Rosenberg I., Spiro A. III (2005) *J. Clin Nutr.*, **82**, 627-635.
10. Whicher J.T. (1998) *Clin Biochem.*, **31**, 459-465.
11. Prabakaran P., Gan J., Wu Y.Q., Zhang M.Y., Dimitrov D.S., Ji X. (2006) *J. Mol. Biol.*, **357**, 82-99.
12. Мирошниченко И.И., Птицина С.Н. (2005) *Клин. фармакокинетика*, **2**, 35-39.
13. He M., Taussing M.J. (2003) *J. Immunol. Methods*, **274**, 265-270.
14. Xin H., Bernal A., Amato F.A., Pinhasov A., Kauffman J., Brenneman D.E., Derian C.K., Andrade-Gordon P., Plata-Salamán C.R., Ilyin S.E. (2004) *Biomol. Screen.*, **9**, 286-293.
15. Pozniak A. (1997) *Lancet*, **351**, 536-537.

Поступила: 07. 04. 2008.

BIOMARKERS IN THE MODERN MEDICAL AND BIOLOGIC PRACTICE

*I.I. Miroshnichenko, S.N. Ptitsina*

Mental Health Research Center Russian Academy of Medical Science, Kashirskoe Sh., 34, Moscow,  
115522 Russia; tel.: 7-499-615-93-19; e-mail igormir@psychiatry.ru

The lecture deals with biomarkers, a newly introduced direction in biomedical research. The following terms, definitions, and characteristics were proposed to describe biomarkers: diagnostic tools, clinical endpoints and surrogate endpoints. Examples of predictors for cardiovascular diseases, acute-phase of inflammation and malignant tumors are represented. The special attention is given to the characteristic of the widespread biomarkers: homocysteine, transthyretin and C-reactive protein. Modern methods of identification, qualitative and quantitative determination of biomarkers are considered: mass spectrometric methods, immunoassay. The relationships between the latest achievements in the field of genomics, proteomics, bioinformatics and biomarker's investigations are established. The perspectives of biomarkers are discussed.

**Key words:** biomarker, proteomics, homocysteine, mass spectrometry, pharmacogenetics.