

# АНАЛИЗАТОР НА КАНТИЛЕВЕРНЫХ БИОЧИПАХ ДЛЯ ЭКСПРЕСС-ДИАГНОСТИКИ РАКА ПРЕДСТАТЕЛЬНОЙ ЖЕЛЕЗЫ

П.Горелкин, А.Ерофеев, Г.Киселев, И.Яминский, М.Рубцова, А.Егоров  
erofeev@polly.phys.msu.ru

Рак предстательной железы – одно из наиболее широко распространенных злокачественных новообразований у мужчин. Простата специфический антиген (ПСА) – наиболее чувствительный, специфичный и единственный значимый онкомаркер для раннего выявления и диагностики рака предстательной железы. Пока не существует устройств, позволяющих проводить экспресс-диагностику ПСА вне лабораторий. Проект Центра перспективных технологий, реализуемый в рамках технологической платформы "Медицина будущего", направлен на разработку портативных кантилеверных биочипов, не требующих меток и способных обеспечить одностадийное определение ПСА.

В России опухоли предстательной железы составляют более 7% от всех злокачественных новообразований у мужчин, занимая четвертое место по заболеваемости после рака легких, желудка и кожи. У мужчин старше 50 лет они занимают второе место среди онкологических заболеваний (после рака легких), во многих развитых странах по частоте являясь второй причиной смертности после сердечно-сосудистых заболеваний. В РФ темпы ежегодного прироста частоты встречаемости этого заболевания за период 1994–2004 годы составили 87% и наиболее высоки среди других видов рака. Столь широкое распространение данного заболевания ставит его в ряд

наиболее важных социальных проблем [1].

Одним из наиболее исследованных молекулярных маркеров при диагностике рака предстательной железы является определение уровня ПСА, особенно для целей ранней диагностики заболевания [2]. ПСА – единственный онкомаркер, определение которого рекомендовано при массовом скрининге. Тестирование ПСА необходимо проводить у всех мужчин старше 40 лет не реже одного раза в год, поскольку выявленный на ранних стадиях рак предстательной железы излечим. Его раннее обнаружение и надлежащее лечение повышают шансы полного излечения от этой тяжелой болезни.

ПСА (рис.1) является сериновой протеазой и представляет собой гликопротеин с молекулярной массой 33 кД, вырабаты-

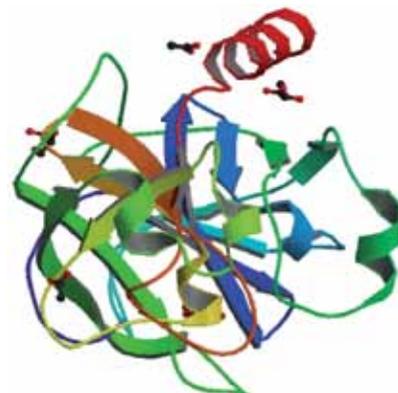


Рис.1. Трехмерная модель белка простат-специфического антигена (ПСА)

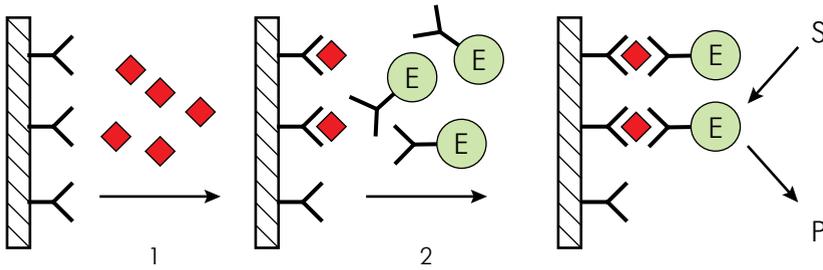


Рис.2. Схема иммуноферментного анализа по принципу «сэндвич»-метода

ваемый только клетками предстательной железы.

В сыворотке белок находится в двух формах: свободной (свПСА) и связанной в комплексы с другими белками, преимущественно с  $\alpha_1$ -антихимотрипсином. Незначительная часть ПСА связана с  $\alpha_2$ -макроглобулином. Содержание свободной формы составляет до 20% от общего количества ПСА, причем повышение концентрации уровня общего ПСА выше 4 нг/мл свидетельствует о возможном наличии рака предстательной железы. Подобное повышение концентрации также может быть обусловлено другими причинами: доброкачественной гиперплазией предстательной железы; наличием воспаления или инфекции; ишемией или инфарктом этой железы. Таким образом, повышение только концентрации маркера не всегда свидетельствует о злокачественном процессе. Для более адекватной диагностики опухолевого заболевания необходимо определение уровня свободного ПСА и оценка концентраций общего и свободного ПСА в крови [3], причем при концентрации общего ПСА выше 30 нг/мл вероятность рака простаты составляет практически 100%.

Исследования ПСА могут применяться для мониторинга пациентов с гипертрофией железы с целью раннего выявления начала злокачественных процессов, поскольку увеличение уровня ПСА у больных при раке предстательной железы происходит значительно быстрее, чем у пациентов с доброкачественной гиперпла-

зией. Существует корреляция между содержанием ПСА в крови, степенью злокачественности опухоли и распространенностью процесса: уровни ПСА 10–20 нг/мл чаще всего свидетельствуют о прорастании капсулы, выше 40 нг/мл – о наличии метастазов [4].

У пациентов с высоким уровнем ПСА необходимо регулярно проводить мониторинг изменения этого параметра с целью распознавания злокачественного процесса. Многократное определение уровней ПСА можно также использовать для оценки эффективности лечения, причем мониторинг уровня ПСА в крови обеспечивает самое раннее, по сравнению с другими методами, обнаружение рецидива и метастазирования.

Вследствие вышесказанного, для диагностики и мониторинга необходимо иметь портативные и недорогие устройства, позволяющие проводить в клинической лаборатории или даже в кабинете врача экспресс-диагностику количественного содержания ПСА в крови пациента.

Наиболее эффективно ПСА определяется при иммуноферментном анализе, причем наиболее быстрым является "сэндвич"-метод, основанный на использовании иммобилизованных и меченых ферментом специфических антител.

В такой схеме предполагается одновременное использование двух антител разной специфичности, т.е. направленных к разным антигенам определяемого белка. Один тип антител иммобилизуется на подложке

и используется для улавливания антигена из определяемого раствора, например, сыворотки крови. Во второй тип антител вводится метка, и их используют на второй стадии анализа для выявления иммунных комплексов антиген-антитело на подложке, образовавшихся на первой стадии анализа.

Принцип определения ПСА (рис.2) заключается в следующем: к носителю с иммобилизованными антителами добавляют раствор, содержащий анализируемый антиген.

На первой стадии инкубации на твердой фазе образуется специфический комплекс антиген-антитело. Затем носитель отмывается от несвязавшихся компонентов и добавляются меченные ферментом антитела. После вторичной инкубации и удаления с ферментом избытка конъюгата антител определяется ферментативная активность носителя, пропорциональная начальной концентрации исследуемого антигена.

Реакция проводится в две стадии с применением флуоресцентных меток, что значительно увеличивает длительность и стоимость анализа. Для количественного анализа необходимо использовать спектрофотометры, т.е. исследования должны проводиться исключительно в лабораторных условиях.

Задача проекта – создание микрочипов, позволяющих производить одностадийное определение ПСА без применения меток вне лабораторий.

Одно из важнейших направлений высокоспецифического распознавания на основе антител – создание микроантител-верных чипов – механических передатчиков для одновременного выявления антигенов или нескольких видов одного антигена. Принцип работы таких микрочипов основан на измерении возникающего при межмолекулярном взаимодействии изгиба кантилеверного датчика (рис.3).

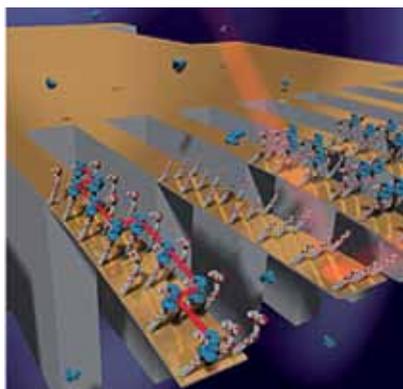


Рис.3. Сенсорный чип из тестовых и контрольных кантилеверов (определение положения кантилевера осуществляется с помощью лазерно-оптической системы)

Отличительная особенность наномеханических кантилеверных систем – устойчивость к неспецифическому связыванию, достигаемая за счет использования одного контрольного кантилевера, модифицированного неспецифическими антителами. Полезный – это разностный сигнал между тестовым (сенсорным) и контрольным кантилеверами, причем их изгиб можно определять с помощью лазерно-оптической системы.

Подобные устройства изготавливаются следующим образом: на золотой поверхности кантилевера формируется сенсорный слой молекул специфических либо контрольных антител. При взаимодействии сенсорного слоя с раствором определяемого антигена образуются иммунные комплексы. В результате межмолекулярных перестроений в адсорбированном слое возникают латеральные напряжения, приводящие к изгибу кантилевера.

Использование в качестве сенсоров на биохимические объекты кантилеверных систем находит применение в различных областях: при разработке способов идентификации, в медицине и оборонной промышленности [5–13]. Сенсоры, в которых поверхность кантилевера покрыта биологически активным

соединением, способны быстро фиксировать анализируемое вещество, они обладают высокой чувствительностью и могут одновременно обеспечивать множество параллельных испытаний [14].

В результате реализации данного проекта планируется на основе кантилеверных биочипов создать прибор для экспресс-диагностики рака предстательной железы, причем технология таких биочипов позволит значительно сократить время анализа и сделать диагностический прибор портативным.

Авторы статьи выражают искреннюю благодарность О.В.Синицыной, Д.В.Колесову за активное участие в экспериментальном и конструктивном обсуждении полученных результатов.

*Работа выполнена при поддержке Министерства образования и науки РФ в рамках ФЦП "Исследования и разработки по приоритетным направлениям развития научно-технологического комплекса России на 2007-2013 годы", Госконтракт № 16.512.11.2265.*

### Литература

1. Чиссов В.И., Старинский В.В., Петрова Г.В. Злокачественные новообразования в России в 2004 году. – М.: 2006.
2. Матвеев Б.П. Клиническая онкоурология. – М.: 2003.
3. Miller K., Abrahamsson P.A., Akakura K., Debruyne Frans M.J., Evans C.P., Klotz L. The Continuing Role of PSA in the Detection and Management of Prostate Cancer. Eur Urol 2007, Suppl 6, 327–333.
4. Пушкарь Д.Ю. Простатспецифический антиген и биопсия предстательной железы. – М.: 2003.
5. Wu, G. H.; Ji, H. F., Hansen K., Thundat T., Datar R., Cote R., Hagan M. F., Chakraborty A. K., Majumdar A. Origin of nanomechanical cantilever motion generated from biomolecular interactions. – Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 2001, v.98, p.1560–1564.
6. McKendry R., Zhang J. Y., Arntz Y., Strunz T., Hegner M., Lang H.P., Baller M. K., Certa U., Meyer E., Guntherodt H. J., Gerber C. Multiple label-free biodetection and quantitative DNA-binding assays on a nanomechanical cantilever array. – Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A., 2002, v.99, p. 9783–9788.
7. Fritz J., Baller M. K., Lang H. P., Rothuizen H., Vettiger P., Meyer E., Guntherodt H. J., Gimzewski J. K. Translating Biomolecular Recognition into Nanomechanics Science, 2000, v.288, p.316–318.
8. Hansen K., Ji H., Wu G. H., Datar R., Cote R., Majumdar A. Effect of single nucleotide polymorphisms (SNPs) on Nanomechanical Motion. – Anal. Chem., 2001, v.73, p.1567–1571.
9. Liu F.; Zhang Y., Ouyang Z. Flexoelectric origin of nanomechanical deflection in DNA- microcantilever system. – Biosens. Bioelectron, 2003, v.18, p.655–660.
10. Hagan M.F., Majumdar A., Chakraborty A.K., Nanomechanical forces generated by surface grafted DNA. – J. Phys. Chem. B, 2002, v.106, p.10163–10173.
11. Alvarez M., Carrascosa L.G., Moreno, M., Calle A., Zaballos A., Lechuga L.M., Martinez A.C., Tamayo J., Nanomechanics of the formation of DNA self-assembled monolayers and hybridization on microcantilevers. – Langmuir, 2004, v.20, p.9663–9668.
12. Hansen K.M., Thundat T., Microcantilever biosensors. – Methods, 2005, v. 37, p.57–64.
13. Stachowiak J.C., Yue M., Castelino K., Chakraborty A., Majumdar A., Chemomechanics of surface stresses induced by DNA hybridization. – Langmuir, 2006, v.22, p.263–268.
14. Yue M., Lin H., Dedrick D.E., Satyanarayana S., Majumdar A., Bedekar A.S., Jenkins J.W., Sundaram A. A 2-D microcantilever array for multiplexed biomolecular analysis. – J. Microelectromech. Syst., 2004, v.13, p.290–299.