

ЛАБОЧИПЫ ДЛЯ ИДЕНТИФИКАЦИИ БИОМАРКЕРОВ

П.И. Белобров

Сибирский федеральный университет, МОЛПИТ, Институт биофизики СО РАН,
Красноярск, Россия. E-mail: peter.belobrov@gmail.com

Представлен обзор современных методов идентификации новых биологических маркеров. Основной акцент сделан на недавно разработанные способы определения сверхнизких концентраций биомаркеров, включая опухолевые маркеры. Среди лабоочипов выделены те, где использованы новые принципы регистрации одиночных молекул. Это позволяет выйти на уровень детектирования зепто-молярных концентраций биомаркеров в пробе.

Labochips for Biomarker ID. P.I. Belobrov. The paper is review of modern methods for identification of new biological markers. We made focus on recently developed methods for sensors of biomarkers with very low concentrations, including tumor markers. There are labochip highlights those that use the new principles of detection of single molecules. This allows going to the level of detection zepto-molar concentrations of biomarkers in the sample.

1. ВВЕДЕНИЕ

В этом разделе рассмотрены ключевые понятия рассматриваемой проблемы – биомаркер, лабоочип и биологический штрихкод.

1.1. БИОЛОГИЧЕСКИЕ МАРКЕРЫ

Проблема биомаркеров вышла по значимости на первое место и в количественной биологии, и даже во всей научной литературе [1-4]. Биологические маркеры – это молекулы ДНК, РНК, белков, модифицированных белков или метаболитов, отражающие биологическое состояние. Количество идентифицированных маркеров мало, тем не менее рождаются перспективные направления развития следующего поколения биомаркеров [5].

Биомаркер является характеристикой, которая может быть **объективно измерена и оценена** как показатель физиологических и патологических процессов или как ответ на терапевтическое вмешательство. Примеры традиционных биологических маркеров: глюкоза при диабете или артериальное давление при гипертензии [1].

1.2. ИДЕНТИФИКАЦИЯ БИОМАРКЕРОВ

Идеальным идентификатором маркера мог бы являться штрихкод, включающий в себя: геном, условия экспрессии, протеом, историю маркера в клетке, в органе и в ткани от эмбриона до апоптоза, ассоциации маркера с болезнями и характеристики в биологических жидкостях, иммунный статус в шкале «свой – чужой», способность вызывать инфекции. Желательно было бы включать в штрихкод пространственную структуру и функ-

ции маркера, статический и динамический потенциал трансформации маркера в другие типы биомолекул под влиянием различных ферментов. Это в целом и есть тот самый биологический ID, который желателен для каждой молекулы, надмолекулярной и субклеточной структуры, клетки, органа, ткани и биологической жидкости каждого живого организма. Однако уровень наших знаний не позволяет пока определить этот ID. Поэтому легко идентифицировать как биомаркеры лишь те биомолекулы, которые можно штриховать генетическим кодом, т.е. ДНК, РНК, пептиды и белки.

В настоящее время упор делается на молекулярные маркеры, которые сыграли главную роль в развитии молекулярной медицины. Технологии молекулярной диагностики позволяют открывать молекулярные биомаркеры и помогают в определении их роли в патологических механизмах болезни. Биомаркеры формируют основу для разработки диагностических тестов, и являются целями при создании лекарственных препаратов. Влияние лекарств, как в ходе клинических испытаний, так и на практике, могут контролироваться с помощью анализов биомаркеров [1, 2].

Идентификация новых биомаркеров, подходящих для лечения пациентов является одним из сложнейших вопросов для онкологов сегодня [6].

Применение мультиплексной диагностики, одновременно использующей несколько биомаркеров, составляет суть мультимаркерной стратегии, основные положения которой суммированы недавно в обзоре [7]. Эта идея была реализована онкологами в России [8].

Компания Invitrogen предлагает коммерческие чипы ProtoArray® с белками человека как «абсолютное» решение для определения биомаркеров [9]. За 10 лет развития в компании Invitrogen было

очищено порядка 8000 белков, но это менее 30% белков протеома человека. Коллекция Национального института здоровья США (NIH) на 5/7/10 содержит 29818 белков человека с открытой рамкой считывания. Несмотря на это, чипы ProtoArray показали эффективность идентификации аутоантител сыворотки крови, т.е. биомаркеров рака. Так, для профилирования сыворотки крови и тканей при раке мочевого пузыря сочетанием белковых и тканевых микрочипов использовались микрочипы, содержащие 8274 белков человека [10]. Это доказательные эксперименты, хотя и очень дорогие, так как каждый чип стоит 3000\$. Для крупномасштабного скрининга, когда надо идентифицировать биомаркеры многих пациентов на разных стадиях болезни, такое «абсолютное» решение невозможно. Это еще одна из причин того, почему до сих пор не найден идеальный биомаркер иммунного ответа, который изменяется от пациента к пациенту [2].



Рис. 1. Микрочипы платформы ProtoArray® для поиска биомаркеров [9].

Принцип анализа белков на микрочипах показан на рис.1. Образцы сыворотки метятся и гибридизуются на микрочипах ProtoArray, состоящих из более, чем 8274 различных, хорошо известных белков. Слайд с массивом белков готовится в фосфатном буферном растворе с 1% БСА, 0,1% Твин-20 с мягким перемешиванием при 4°С. Затем добавляются образцы сыворотки, разбавленные 1/50, и инкубируются в течение 90 мин при 4°С без встряхивания (стадия 1 на рис.1). Несвязанные аутоантитела смываются буфером (3 промывки по 10 мин). Далее добавляются вторичные антитела (антитела против IgG, меченные красителем AlexaFluor 647), инкубировали 90 мин при 4° С, и (стадия 2 на рис.1). Наконец, слайды промывают, сушат и обрабатывают на сканере люминесцентных микрочипов (стадия 3 на рис.1) [10].

Для полной реализации мультимаркерной стратегии разрабатываются лабчипы, в которых на стадии подготовки пробы работают специаль-

ные модули, производящие очистку биомаркеров, представляющих интерес. Например, микрофлюидный чип очистки захватывает биомаркер рака из физиологических растворов, и после промывки выпускает антиген в чистый буфер следующего модуля для идентификации. В результате такого дизайна сенсорный лабчип увеличивает специфичность [6].

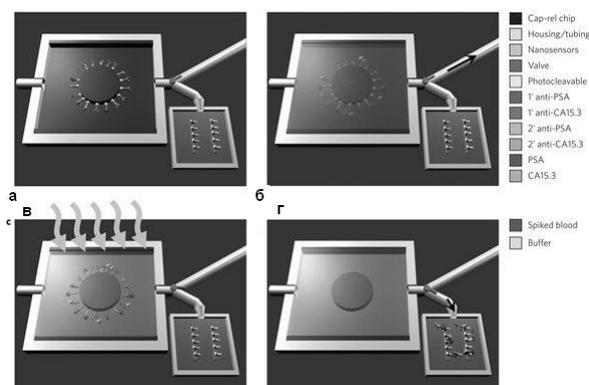


Рис.2. Микрофлюидный чип очистки [11].

На рис. 2а показаны основные антитела к двум биомаркерам, здесь PSA и углеводородный антигена 15.3 (CA15.3), связанным фоторасщепляемой сшивкой с микрофлюидным чипом очистки. Чип помещается в пластиковый корпус, и клапан направляет жидкость, выходящую из чипа, либо в сосуд отходов, либо в следующий модуль. На рис. 2б показано, как цельная кровь впрыскивается в чип с отрегулированным ответвлением (стрелка показывает направление потока жидкости), и, биомаркеры связывают родственные им антитела, если они присутствуют в образце. На рис. 2в показаны промывочные шаги потока крови, объем в чипе (5 мкл) наполнен сенсорным буфером перед УФ-облучением (стрелка). Ультрафиолетовое облучение расщепляет фотолабильные сшивки, выпуская комплексы антиген-антитело в раствор. На рис. 2г, клапан установлен на сенсорном резервуаре (стрелка показывает направление потока жидкости), куда переносится объем 5 мкл. Это позволяет выполнить свободное от радиоактивной метки зондирование, чтобы определить наличие специфических биомаркеров.

Совместные усилия фармацевтических компаний, регулирующих органов и научных кругов по идентификации биомаркеров токсичности почки представляют собой модель исследования с целью определения надежных маркеров безопасности для доклинических приложений [12].

Последний глоссарий биомаркеров, который был создан на примере острой почечной недостаточности, приведен в статье [13].

1.3. ЛАБОЧИПЫ И БИО-МЭМС

Понятие лабочипа или лаборатории-на-чипе (LoC) является основным в междисциплинарном подходе, который используется для миниатюризации, интеграции и автоматизации биологических анализов и процедур в области аналитической химии.



Рис.3. От лаборатории к лабочипу [3].

Биология и химия как экспериментальные науки продолжают развиваться и включают новые протоколы. Каждый протокол предлагает шаг за шагом лабораторные инструкции, списки необходимого оборудования и необходимых биологических и/или химических веществ. Биологические или химические лаборатории содержат различные элементы оборудования, используемого для выполнения этих протоколов, как показано на рис. 3. Инженеры при дизайне лабочипов стремятся внедрить все эти компоненты в одном чипе для одноцелевого применения [3].

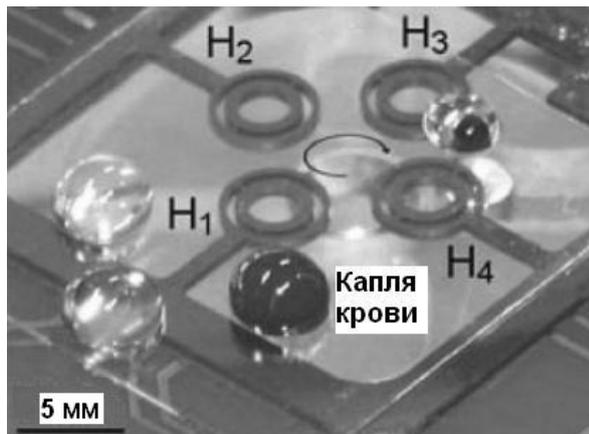


Рис.4. Технология будущего: обнаружение «все-в-одном» на одном чипе [3].

Рассмотрим примеры КМОП (CMOS) датчиков для лабочипов из книги [3]. На рис. 4 показано миниатюрное устройство для полимеразной цепной реакции (ПЦР), в котором четырех разных

лунки (H1-H4) с различными температурами реализованы в одном микрофлюидном лабочипе.

Такой чип рассматривается как технология будущего «all-in-one gene detection on a chip». Это крошечное устройство, может быстро подготовить, очистить и провести генетический анализ крови. Магнитные наночастицы прикрепляются к особенностям клеток в образце, после чего появляется возможность проводить магнитную манипуляцию, перемещая клетки из одной лунки в другую, используя реализованную на базе микросхемы КМОП программу обработки промежуточных продуктов ПЦР клеток из капли крови [3].



Рис.5. Схема КМОП основы лабочипа [3].

Целостный системный подход при разработке КМОП лабочипов состоит в интегрировании микрофлюидики и микроэлектроники с биохимическими реагентами и реакциями на миниатюрных платформах. Как показано на рис. 5, микрофлюидная структура требует направления жидкости в сторону сенсорных или исполнительных сайтов, хотя биохимических реактивы фиксированы в канале микроэлектронного устройства. Эти лабочипы несут ответственность за определение и использования электрического сигнала для детектирования или исполнение заданных целей, соответственно. Действительно, микроэлектронные технологии КМОП позволяет изготовить активные подложки с различными типами сенсорных и исполнительных узлов, которые могут быть рассмотрены в режиме случайного доступа с помощью декодеров.

Главный редактор 3-го издания «Справочника по нанотехнологиям», написал специальную главу по биоМЭМС и биоНЭМС [14]. Микро- и нано-электромеханических системы (МЭМС/НЭМС) предназначены для выполнения своих функций на коротких временах, как правило, в диапазоне от миллисекунд до пикосекунд. Требуемое число рабочих циклов до 10^{12} предъявляет серьезные требования к материалам.

Отношение площади поверхности к объему в МЭМС/НЭМС очень большое, и в этих системах

роль поверхностных и вязких сил становится существенно больше по сравнению с инертными и электромагнитными силами. Поэтому необходимо глубокое понимание адгезии, динамического и статического трения, износа, смазки, роли загрязнения поверхности и влияния окружающей среды на уровне «нано» [14]. Необходимо заметить, что все эти проблемы в живой клетке решаются «сами собой», так как за время эволюции биологические молекулы научились функционировать в почти твердотельном конденсированном состоянии, и умеют использовать многие из законов, к пониманию которых мы только-только приступаем. Важно, что данная проблематика встала в полный рост только после удачных попыток создания лабчипов.

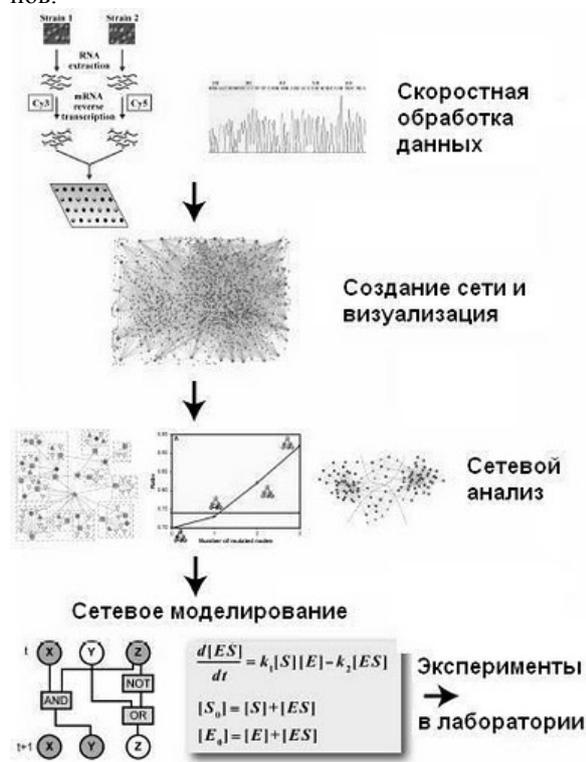


Рис.6. Сетевые процедуры поиска биомаркеров при исследованиях раковых клеток [16].

Большинство механических свойств, как известно, зависят от масштаба, поэтому свойства наноразмерных структур должны быть точно измерены. Для биоМЭМС и биоНЭМС адгезия между биологическими молекулярными слоями и подложкой, а также трение и износ биологических слоев, имеют большое значение. Перспективы новых биоподражательных областей (biomimetics) вдохновили развитие биологических наноматериалов. Например, создание вызванных шероховатостью супергидрофобных поверхностей и самоочищающихся структур с низкой адгезией, ос-

нованной на так называемом эффекте лотоса. Именно поэтому «нано» адгезия, трение, износ и смазка материалов для биологических МЭМС и НЭМС требуют анализа на уровне компонентов статического трения (stiction). Понимание явлений самоочистки поверхности, супергидрофобности иерархических структур и низкой адгезии в этих устройствах было залогом успеха в создании биологических МЭМС и НЭМС, которые описаны в справочном издании [14].

В патенте биоМЭМС сенсора обращено особое внимание на биологическую совместимость компонент датчика, которые работают как резонаторы на одном чипе, где аппаратные средства ведут мониторинг изменения резонансной частоты датчика [15].

Поведение раковых клеток не может быть выведено из интуитивных подходов. Поэтому требуются сложные и элегантные сетевые модели, численный анализ их и моделирование, что будет способствовать генерации экспериментально проверяемых гипотез и открытию основных механизмов канцерогенеза и метастазирования. Анализ и моделирование сети может улучшить наше понимание и выявить скрытые закономерности «в нелогичных» механизмах рака, и найти критические точки, где наше понимание по-прежнему бедное [16]. Кроме того, анализ и моделирование могут способствовать возникновению гипотез, которые, в свою очередь, могут быть протестированы в лаборатории. Наконец, сетевой анализ может помочь определить биомаркеры, полезные в клинической практике персональной медицины (рис. 6).

1.4. БИОМАРКЕРЫ ТОКСИЧНОСТИ

Недавно эта проблема была подвергнута тщательно анализу на примере острой почечной недостаточности, и редакция Nature сделала свободный доступ к основным статьям [11-13,17-19].

Проблема токсичности среды изучается достаточно давно и имеет несколько интересных решений, которые подробно рассмотрены в обзоре [18]. Табл.1. интересна тем, что в ней систематизированы биоломинесцентные бактерии и их ферменты, полезные для биотестирования токсичности [18].

Вышел учебник, где обстоятельно изложены основные аналитические системы определения токсичности среды [20]. В заключение этой книги сказано, что в современной токсикологии в самое ближайшее время «диагностические микрочипы обеспечат быстрый и одновременный анализ многих тысяч параметров, что крайне важно для определения токсикантов, экотоксикантов или токсинов в организме человека, животных и окружающей среде в режиме on-line» [20].

Рассмотрим конкретные подходы к созданию систем идентификации биомаркеров, на основе которых можно вскоре ждать приборные реализации КМОП лабочипов.

2. ЛАБОЧИПЫ НОВОГО ПОКОЛЕНИЯ

Важно, что практически во всех новейших публикациях, рассматриваемых подробнее ниже, поиск и тестирование новых биомаркеров всегда включается в область рассмотрения.

2.1. ПРОГРАММИРУЕМЫЕ ЛАБОЧИПЫ

Эти лабочипы (нано-био-чипы) являются достойным примером идентификации молекулярных маркеров [21-23].

Клинический анализ остается одним из важнейших рубежей в науке, так как более глубокое понимание живых систем увеличивает потребности в лабораторном биологическом анализе. Одна из важных тенденций – миниатюрный дизайн для клинических исследований, что может привести к медицинскому результату «в точке санитарной помощи» (ТСП), т. е. в постели, в машине скорой помощи, или других удаленных местах. Несмотря на значительный прогресс в направлении клинических систем анализа ТСП, очень немного появились полностью работающих прототипов лабораторий-на-чипе (LOC) и микросистем тотального анализа (μ TAS) [21].

Анализ основ дизайна лабочипов существенно слабее, чем настольных альтернатив. Настольные альтернативы представляют из себя сеть макроскопических лабораторий – базовые инфраструктуры, необходимые для обработки образцов, обнаружения анализируемых веществ, обработки данных и обработки аналитов реагентами. Эти платформы лучше всего охарактеризовать как «чипы-в-лаборатории», а не истинные «лаборатории-на-чипе». Отсутствие стандартной и модульной технологии анализа, которая охватывала бы несколько классов аналита, мотивирует работать в направлении универсальных детектирующих мини-ансамблей, или лабочипов, для которых можно было бы быстро создать прототип с легким включением проверок новых биомаркеров [21].

Время исследования биомаркеров рака толстой кишки (CEA), молочной железы (HER-2/neu C-erbB-2) и яичников (CA125) в лабочипе менее 30 минут, что в 4 раза быстрее, чем типичный анализ ELISA. Обширное исследование этих аналитов показало, что лабочип обладает чувствительностью вдвое большей, чем иммуноферментный анализ и значениями уровней детализации на порядок меньше. Рис.7а является типичной кри-

вой "доза-эффект", полученной в лабочипе с увеличением количества вещества. Для демонстрации специфики сигнала бусинки, связанные с CEA, HER-2/neu и CA125 сначала экспонировались для каждого антитела в отдельности, а затем для смеси обнаруживаемых антител. Сигнал с неспецифическими бусинками был менее 5% от сигнала аналит-специфичных бусинок (рис.7б) [21].

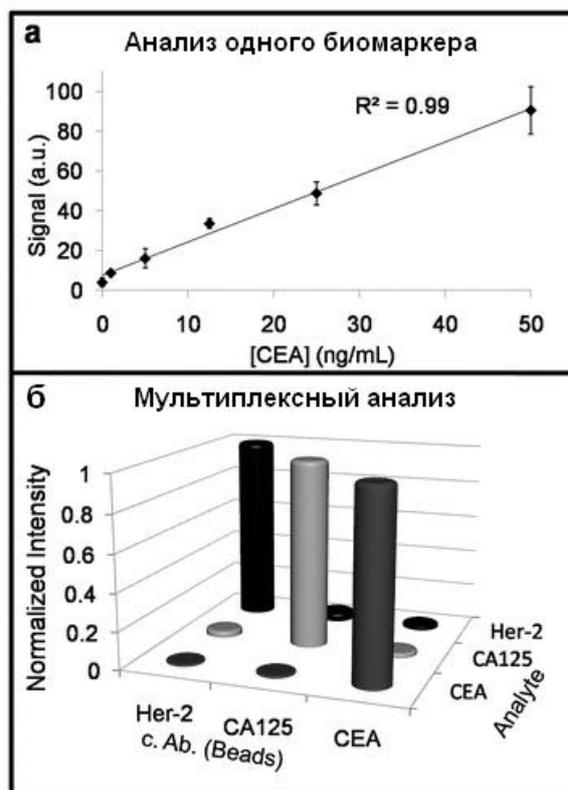


Рис. 7. а) характерная кривая «доза-эффект» в лабочипе, б) мультиплексирование: низкое неспецифическое связывания между массивами, специфичными для трех различных биомаркеров [21].

Решение изложенного выше анализа ТСП в программируемых лабочипах, где создается синергетический эффект компонентов и достижений нанотехнологии, клинической химии, биоинформатики, микрофлюидики, оптики, анализа изображений и распознавания образов для создания нового мощного комплексного подхода в измерении устройствами малых размеров [21]. Ансамбль лабочипов использует размерно-перестраиваемые сети нанометровых волокон ("нано-сеть") в агрозных микросферах или полимерной мембраны и флуоресцентного сигнала из наночастиц (нано), чтобы выделить и количественно биологически важных аналитов (био) с комплексных матриц, в закрытой миниатюрной системе (чип). Лабочип имеет гибкую конструкцию анализа и разнообраз-

ный набор проверенных подтипов анализа. Модульные конструкции элементов лабочипа позволяют быстро включать в испытания новые типы биомаркеров; тесты для нуклеиновых кислот, белков и клеток расположены в лабочипе для создания аналитических условий испытаний, связанных с разными типами заболеваний. В совокупности, модульность, гибкость и способность обрабатывать и изучать новые типы биомаркеров здесь называются «программируемостью». В статье [21] описывается функция создания «программируемой системы лабочипа», как универсальной и модульной системы клинических анализов, типичные результаты и возможности которой дает этот комплексный подход.

Это направление лабочипов активно развивается и используется для идентификации сложных биомаркеров [22, 23]. Объем статьи не позволяет рассмотреть подробно эту важную проблему.

2.2. ДАТЧИКИ ОДИНОЧНЫХ МОЛЕКУЛ

Методы детектирования одиночных молекул развиваются давно, имеют собственную историю взлетов и падений, которая тесно связана с появлением наночастиц, что хорошо систематизировано в недавней монографии [24].

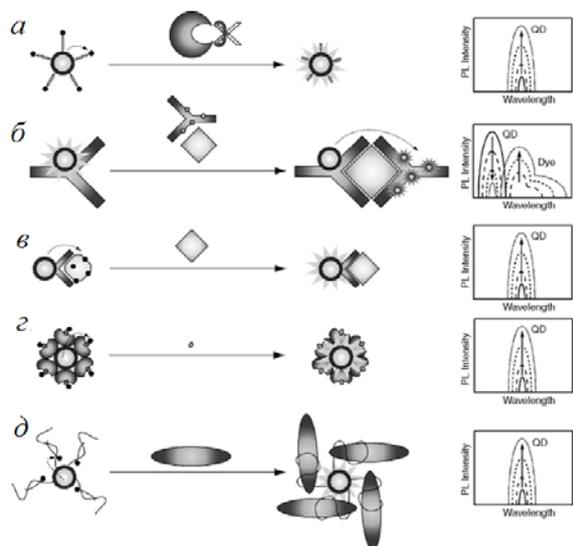


Рис.8. Стратегии биотестирования на основе квантовых точек и FRET [24].

Последние достижения в этом направлении связаны с обнаружением фемтомолярных концентраций специфического антигена простаты (PSA), с детектированием одиночных молекул ферментов в нанопорах [25-27].

Рассмотрим недавний пример биосенсора на квантовых точках [24]. На рис.8 показаны фотолюминесцирующие биодатчики на квантовых точках (QD PL), использующие резонансный перенос энергии флуоресценции (FRET). Основными стратегиями биотестирования являются: обнаружение протеаз на основе тушения люминесценции связанными пептидами и её восстановления в QD PL (рис.8а); сэндвич-иммуноанализ на основе FRET сенсибилизированной эмиссии акцептора (рис.8б); обнаружение тринитротолуола как аналита восстановлением люминесценции QD PL после перемещения меченого аналога тушителя в связывающий антитела сайт (рис.8в); обнаружения мальтозы как аналита восстановлением люминесценции QD PL после перемещения меченого тушителя циклодекстрина из сайта белка, связывающего мальтозу (рис.8г); выявление тромбина как аналита восстановлением люминесценции QD PL после перемещения меченых тушителем олигонуклеотидов при связывании тромбина с вторичной структурой аптамера (рис.8д).

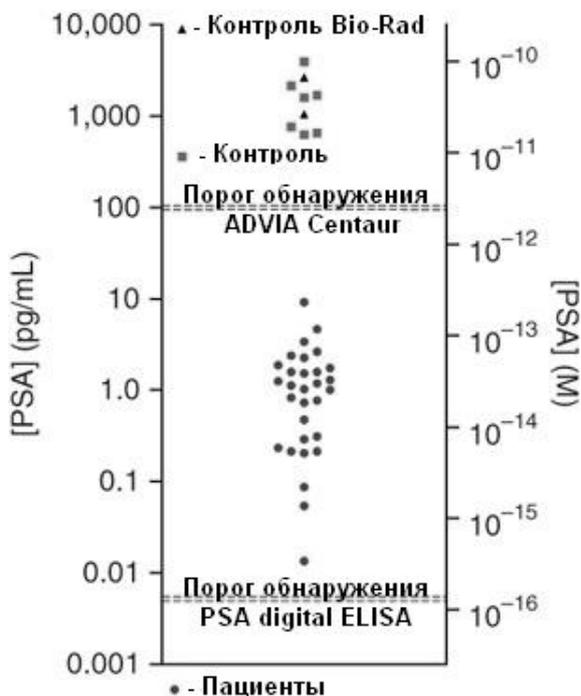


Рис.9. Биомаркер PSA в сыворотке крови пациентов после радикальной простатэктомии [25].

Цифровой иммуферментный анализ (ИФА, digital ELISA) обнаруживает лишь ~ 10-20 меченых ферментом комплексов в 100 мкл (~ 10⁻¹⁹М). Это позволяет регулярно выявлять клинически значимые белки в сыворотке крови в концентрации (< 10⁻¹⁵М), что значительно ниже, чем для обычного метода ИФА. Так цифровой ИФА обна-

руживает PSA в сыворотке крови при таких низких концентрациях, как 14 фг/мл (0,4 фМ). Пациенты после радикальной простатэктомии имеют неопределяемый уровень PSA по измерениям клиники ведущих диагностических тестов (ADVIA Centaur). Верхняя пунктирная линия на рис.9 представляет предел обнаружения теста ADVIA Centaur при анализе PSA (100 пг/мл или 3пМ). Используя цифровой ИФА было показано, что у всех 30 пациентов концентрация PSA была выше предела обнаружения PSA цифровым ИФА, который показан нижним пунктиром (0,006 пг/мл или ~ 200 аМ) на рис.9. Самая низкая концентрации PSA у одного пациента была 0,014 пг/мл (~ 400 аМ), но с большой неопределенность в концентрации [25].

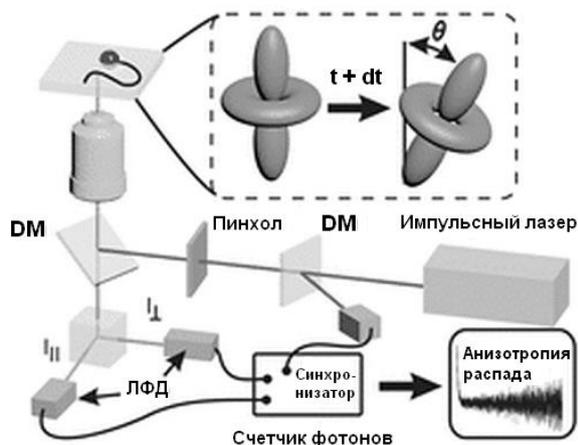


Рис.10. Анизотропия флуоресценции – от одиночных молекул к живым клеткам [28].

В [28] рассмотрены новые многопараметрические схемы тестирования одиночных молекул для обнаружению малых молекул лекарств. Поляризации света, излучаемого флуоресцентным зондом, связана с молекулярными параметрами биомаркеров и локальные условия среды (динамическая вязкость и температура). В аналитической биохимии анизотропии флуоресценции широко используется для измерения состояние укладки белков и нуклеиновых кислот, а также констант сродства лигандов. Схема метода показана на рис.10. Высокая чувствительность анизотропии флуоресценции позволяет изучать состояние одиночных молекул в живых клетках.

Аптамеры являются перспективным биомолекулами из-за своих небольших размеров, химической устойчивости и рентабельными по сравнению с обычными биорецепторами, такими как антитела. В [29] сделан анализ последних достижений в сенсорах на основе аптамеров (аптасенсоров) с точки зрения разработчика, и рассмотре-

ны методы поверхностной иммобилизации и механизмы биомолекулярных взаимодействий в контексте биотехнологии и наномедицины.

Например, FRET изображения одиночных молекул миозина, где гидролиз АТФ производится с помощью QD на миозине, фермент, меченный флуорофором Cu3 как донор, и QD как акцепторный лиганд, показаны в [30] на микромолярном уровне. FRET одиночных молекул, когда используются донорно-акцепторные пары из QD и красителя, позволяют сделать визуализацию молекулярной динамики на физиологических уровнях флуоресцентно меченных аналитов.

2.3. БИОЭЛЕКТРОННЫЙ ТРАНЗИСТОР

Недавно был изготовлен первый в мире биоэлектронный транзистор, в котором нанопровода кремния (SiNW) были интегрированы с липидным бислоем [31].

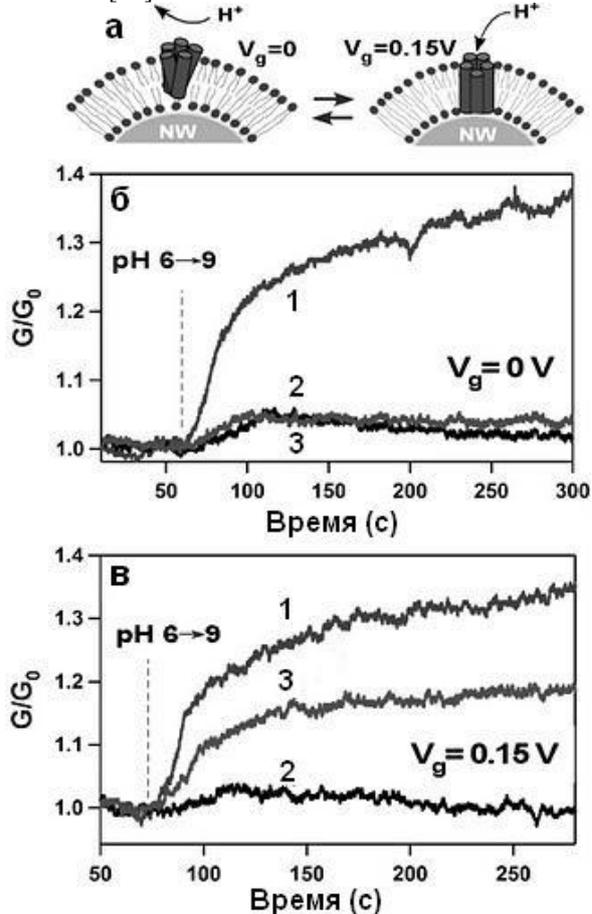


Рис.11. Биоэлектронный транзистор контролирует поток ионов через липидную мембрану [31]

Был использован антибиотик грамицидин, который, внедряясь в липидную мембрану, формирует канал, через который могут двигаться прото-

ны. Когда этот процесс запускался, в SiNW появлялся электрический сигнал. Удалось полностью заблокировать канал с помощью ионов кальция, как это происходит и в природе.

Был использован другой антибиотик – белок, выделенный из грибов аламетицин, который также встраивается в мембрану и образует в ней канал для движения ионов. На этом этапе ученые прилагали напряжение к нанонитям SiNW, и это приводило к тому, что встроенные белки принимали нужную пространственную конфигурацию, и канал открывался.

На рис.11. показано управление работой прибора, содержащего алометицин. Схема действия приложенного напряжения на протонный транспорт в самоорганизующихся порах аломецитина в липидной мембране показана на рис.11а. На рис.11б видны зависимости нормированной проводимости от времени при смещении 0В после изменен pH с 6 до 9 на непокрытых SiNW (1), с покрытыми SiNW (2), а также покрытые SiNW с включением пор аломецитина (3). На зависимости нормированной проводимости от времени при смещении 0,15 В (рис.11в) видно, что кривая 3 изменила своё положение, что свидетельствует об управляемости потоком ионов. Вертикальные пунктирные линии указывают на время, когда pH клеточной жидкости был переключен от 6 до 9. Итак, устройство «открывает» и «закрывает» ионный канал, воспроизводя одну из важнейших функций живой клетки. Поражает то, что удалось приложить напряжение к «проводу» и заставить белки выстроиться так, как нужно – то есть, воспроизвести естественный процесс формирования ионных каналов.

Ионный биполярный транзистор, в котором использован биоэлектронный элемент схемы для доставки нейромедиатора ацетилхолина, оказался эффективным в модуляции нейронов [32]. Стерический захват белков управляется кривизной липидного бислоя [33], что перспективно для сопряжения биологических молекул, включая и биомаркеры, с микроэлектронными устройствами с целью поиска механизмов их действия. Использование фемтолитровых объемов и белков растений открывает новые направления в применениях биосенсоров для поиска биомаркеров [34-37].

2.4. ПЛАЗМОННЫЕ ЛАБОЧИПЫ

Плазмонные резонансы находят важные приложения в биодатчиках. Комбинация датчика локализованного поверхностного плазмонного резонанса с методом молекулярной идентификации, таким как поверхностно-усиленная спектроскопия комбинационного рассеяния, позволяют достичь

предела обнаружения с разрешением и чувствительностью на уровне одной молекулы [38].

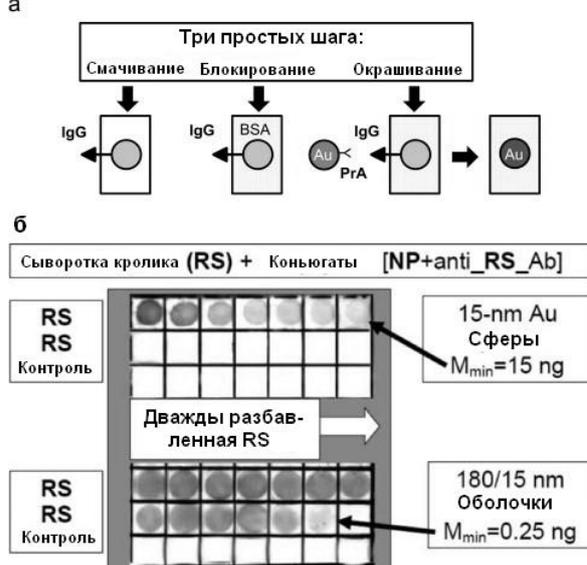


Рис. 12. Основные принципы точечного ИФА [38]

Как показано на рис.12а, основные принципы точечного ИФА включают три простых шага: размещение капель анализа на полоске мемbrane, блокирование свободного пространства с раствором BSA, и окрашивания адсорбированных молекул-мишеней биоспецифическим СГ конъюгатом. Здесь цели зондирования – молекулы IgG и белка, соответственно. На рис.12б показана схема точечного ИФА нормальной кроличьей сыворотки (RS) с использованием конъюгатов 15 нм коллоидных частиц золота и наноболочек кремний/золото (180/15 нм) с овечьими антикроличьими антителами. Количество IgG равно 1 мкг на первой (слева вверху) площадке и уменьшается двойным разбавлением (слева направо). Нижняя строчка каждой анализа соответствует отрицательному контролю (10 мкг BSA в каждой ячейке).

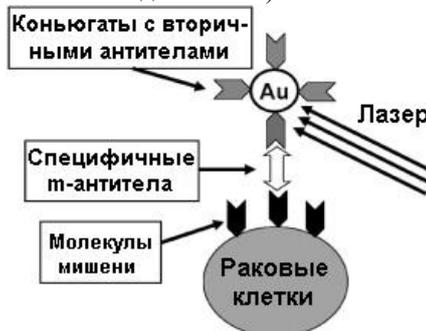


Рис.13. Схема лечения ПФТТ [38].

Возникла новая область плазмонной фототермальной терапии (ПФТТ), которая показана на рис.13. По схеме ПФТТ на первом шаге молеку-

лярные мишени рака (MCT, например, EGFR) метятся первичными моноклональными антителами. На втором шаге эти m-антитела образуют конъюгаты с вторичными антителами. На шаге 3 облучение лазерным импульсом приводит к нагреву наночастиц и к гибели раковой клетки [38].

2.5. МЕТОДЫ МАСС-СПЕКТРОМЕТРИИ

В последние годы, большая часть усилий с масс-спектрометрией были направлены на определение методологии разработки и проверки биомаркеров. В этой области произошли некоторые перспективные продвижения, связанные с появлением мониторинга единичных реакций (SRM), мультиплексного контроля одновременно многих реакции (MRM), и, совсем недавно, стандартных стабильных изотопов и захват их антипептидными антителами MRM (SISCAPA-MRM). Методики MRM и SRM не требуются выработка антител и при наличии надлежащего контроля предлагают некоторый надежный количественный уровень. Однако методы, часто требуют существенной подготовки образца, многократного тестирования и различных приборов. Метод SISCAPA представляется более надежным, но он предполагает тщательную разработку пептидных антител. Время обработки и анализа время типичного числа образцов может составлять до нескольких месяцев [39]. Тем не менее, только инструментарий масс-спектрометрии позволяет идентифицировать химические штрихкоды одиночных молекул ДНК на основе липосом, классифицировать бактерии и даже устанавливать потенциальные биомаркеры при раке легкого [40-42].

3. БИОЛОГИЧЕСКИЕ ШТРИХКОДЫ

Биоштрихкод в узком смысле - это связанная генетическим кодом со специфическим биомаркером последовательность нуклеотидов, т.е. уникальная метка для идентификации маркера в биологической системе. Поэтому в настоящее время любому идентифицированному маркеру можно поставить в соответствие штрихкод.

Для белков и РНК штрихкод всегда связан с ДНК, хотя для штрихования липидов, например, трудно представить себе «соответствующий» набор оснований. Для любых биологических молекул проблема штрихкода открыта.

3.1. «ШТРИХОВАНИЕ» НАНОЧАСТИЦАМИ

Использование наночастиц золота произвело переворот в биологии и медицине [43], позволив

создать биоштрихкод для PSA без использования ПЦР, но с такой же чувствительностью [44-46].

На рис. 14 приведено схематическое изображение PSA Au-NP зондов (вверху) и PSA анализ биоштрихкода (внизу). Штрихкод ДНК-функционализированных наночастиц (Au NP 30 нм), сопряженных с PSA-специфическими антителами через модифицированный тозиллом (Ts) конец штрих-кода для создания нагруженных PSA Au-NP зондов.



Рис. 14. Пример технологии биоштрихкодов на основе наночастиц [45].

На втором этапе, PSA Au-NP зонды пассивируются с BSA. Биологический анализ штрихкодов представляет собой сэндвич-ИФА. Во-первых, зонды магнитных микрочастиц (MMP) поверхностно функционализированы с помощью моноклональных антител к PSA смешиваются с белка-мишени PSA. MMP-PSA гибридной структуры отмывали от избыточных компонентов сыворотки и ресуспендировали в буфере. Затем PSA Au-NP зонды добавляются в сэндвич MMP и MMP-связанного PSA. После магнитной сепарации и отмывки PSA-специфичный штрих-код ДНК выходил в раствор и, обнаруживался с применением скан-теста, который использует Au-NP, катализируемым серебром. Около 1/2 штрих-кода ДНК является дополнением к "универсальному" сканометрическому ДНК зонду Au-NP, а также другая 1/2 дополняет поверхность чипа иммобилизованной последовательностью ДНК, которая отвечает за сортировку и связывание штрих-кодов последовательности, комплементарной последовательности PSA штрих-кода [45].

ДНК-штрихкоды получили широкое распространение, особенно когда удается выделить некий характерный белок, который есть всегда в клетке, но имеет видовую специфичность. ДНК штрихование широко используется в систематике.

3.2. ЛЮЦИФЕРАЗНЫЙ РЕЦЕПТОР

Используя «click»-химию [47], получен биолюминесцентный лабчип для обнаружения протеаз на основе сайт-специфичных конъюгатов белков люциферазы *Renilla* и наночастиц золота (Au NP). Зонды Au NP - Luc8 эффективно тушат биолюминесценцию люциферазы (рис.15), но излучение значительно восстановилось после протеолитического расщепления люциферазы на зонде. Этим определялась активность протеаз [48].

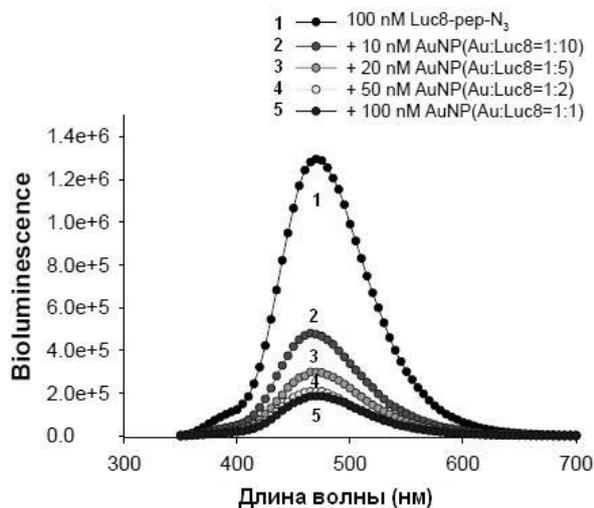


Рис. 15. Эффективность тушения биолюминесценции люциферазы *Luc8* частицами Au NP [48].

Люцифераза идеально подходит для лабчипов. Конъюгаты люциферазы с нанотрубками были использованы для определения внутриклеточной АТФ [49].



Рис. 16. Оптические методы КМОП сенсоров а) флуоресцентной метки, б) биолюминесцентный и в) затвор, управляемый частицами [3].

Достаточно просто представить себе схему люциферазного рецептора. Изменения люминесценции оптического диапазона падают на фото-

диоды, встроенные в сенсор КМОП, и обнаруживаются интегральной микросхемой. Эти оптические сигналы могут быть из различных источников, в том числе от флуоресцентно меченых частиц, биолюминесценции или оптических затворов, определяющих наличие или отсутствие частиц, как показано на рис.16а-в.

3.3. ШТРИХКОД БИОМАРКЕРОВ

Спинномозговая жидкость (CSF) является важным источником потенциальных биомаркеров неврологических нарушений. Аβ пептид является одним из ключевых молекул в патогенезе болезни Альцгеймера (БА). Аβ-производные диффузионных лигандов (ADDLs) составляют нейротоксическое подмножество растворимых Аβ1-42 олигомеров, и в настоящее время рассматриваются как молекулярные причины нейродегенеративного сбоя памяти при БА [1].

Сверхчувствительный тест на основе нанотехнологий включается при обнаружении всего лишь 50 молекул Аβ пептида в спинномозговой жидкости (CSF). Предел чувствительности этого биоштрихкода - определение 500 зептомолей целевой ДНК [44]. Метод магнитной сепарации и последующего освобождения штрих-кодов ДНК из наночастиц золота привел к получению ряда штрих-кодов нитей ДНК для каждой целевой ДНК. Лабчип для выявления на основе штрих-кода ДНК можно сделать на уровне ПЦР чувствительности, но без использования полимеразной цепной реакции [1, 46].

Коммерческим ИФА можно обнаружить только ADDLs в ткани головного мозга, где биомаркер является наиболее высокой концентрацией. Исследования ADDLs в CSF не удалось из-за их малой концентрации. Сверхчувствительный анализ биоштрихкода на основе наночастиц был использован для измерения концентрации ADDLs в CSF [1, 45]. Технологией усиления биоштрихкода, который в миллион раз более чувствителен, чем ИФА, можно обнаружить ADDLs в CSF, где биомаркер присутствует в очень низких концентрациях. Эти концентрации для больных с диагнозом БА, неизменно выше, чем уровни в CSF, взятой у здоровых родственников для контроля. Это исследование является шагом в направлении диагностического инструмента, на основе растворимых патогенных маркеров БА. Цель состоит в том, чтобы, в конечном счете, обнаружить и подтвердить биомаркеры в крови [1, 43-49].

Среди различных типов искусственных рецепторов выделяют молекулярно-напечатанные полимеров, комбинаторные библиотеки, аптамеры, дизайн распознающих молекул и природные

структуры. Примерами природных структур являются датчики из ионных каналов, гибридные двойные слои, смешанные гибридные бислои мембран липидов и металлопорфирины [4].

Важный пример технологии биосетрихкодов на основе наночастиц для PSA приведен на рис.14, который был заимствован из статьи [45].

4. МОЛЕКУЛЯРНЫЕ МАРКЕРЫ

В этом разделе мы кратко рассмотрим несколько биомаркеров, которые интересны как новые тенденции развития в этой области.

4.1. НОВЫЙ МАРКЕР МикроРНК

Хотя микроРНК (миРНК) как биомаркер открыт совсем недавно [50], но уже написана монография по методам детектирования миРНК [51].

МиРНК, эндогенные некодирующие регуляторные молекулы миРНК ~ 22-нуклеотидов, за короткое время стали играть центральную роль в регуляции экспрессии генов. Из-за возрастающих последствий для контроля различных биологических и патологических процессов, миРНК в настоящее время считается новым биомаркером различных заболеваний человека, включая рак, вирусные заболевания, сердечно-сосудистые заболевания, нарушения обмена веществ и т.д. Особые профили экспрессии были связаны с конкретными патологическими состояниями. Профили экспрессии миРНК в связи с этим стали крайне важными не только для фундаментальной науки, но и для врачей. Тем не менее, методики, используемые для обнаружения белок-кодирующих мРНК, не могут быть непосредственно применены к миРНК из-за их малого размера. В течение последних лет исследователи предприняли значительные усилия для разработки методов, пригодных для обнаружения и количественной оценки миРНК. Широкий спектр инновационных технологий (более 30 различных методов) были изобретены и выверены. Итоги разработки этих методов подведены в [51], где они представлены в упорядоченном виде для лучшего понимания и использования этих методов для исследований миРНК и прикладных разработок. В частности, развитие методов количественного определения циркулирующих микроРНК открывает новые возможности для использования миРНК в качестве диагностических и прогностических биомаркеров болезней человека [51].

4.2. FMN КАК БИОМАРКЕР

Биомаркер $ZrO(PO_4)_{1-x}(FMN)_x$ синтезирован совсем недавно как недорогой гибридный биосо-

вместимый материал с интенсивным свечением, и был испытан на мышах [52]. Широкие возможности бактериальной люциферазы, у которой FMN является субстратом, существенно расширяет возможности люциферазных лабчипов для тестирования этого маркера.

4.3. БЕЛКИ СЕМЕЙСТВА S100

Белки S100 - группа связывающих кальций белков с низким молекулярным весом. Название «S100» связано со способностью белка растворяться в 100% растворе сульфата аммония при pH 7,2. S100 - это группа уникальных для нервной ткани кислых белков, отличающихся по заряду и массе, но тождественных иммунологически. Концентрация их в мозге в 10^6 раз превышает содержание в других тканях и составляет до 90% растворимой фракции белков нервных клеток. Все фракции S100 специфически взаимодействуют с кальцием, но отличаются друг от друга количеством связывающих кальций центров (от 2 до 8). Белки этого семейства являются важнейшими биомаркерами, которые доставили много проблем из-за неточного представления об их структуре [53-59].

Кальций-связывающий белок S100A4 (метастазин) экспрессируется на поздних стадиях развития различных новообразований человека и обладает способностью придавать клеткам метастатический потенциал. Белок S100A4 способствует метастазам в нескольких экспериментальных моделях на животных, и экспрессия белка S100A4 связано с опухолевым ростом. S100A4 локализуется в ядре, цитоплазме и внеклеточном пространстве и обладает широким спектром биологических функций, таких как регулирование ангиогенеза (процесса образования новых кровеносных сосудов в органе или ткани), выживаемости и подвижности клеток, и инвазии (способности клеток злокачественной опухоли отделяться от нее и проникать в окружающие ткани). Подробнее доказательства, связи S100A4 и метастазов рака, и механизмы, посредством которых S100A4 способствует опухолевому росту, рассмотрены в обзоре [53].

Связь других белков этого семейства с регулирующей архитектурой актина и миозина в клетках, что тесно связано с метастазами, рассмотрена в работах [54, 55]. Современные методы позволяют идентифицировать ассоциированный с опухолями белок S100A4 в пикомолярной концентрации и разрабатывать новые методологии молекулярных основ действия белков семейства S100 как биомаркеров [56-58].

Отметим интересную особенность связи белков этого семейства с обменом кальция. Поэтому

очевидна перспектива использования люциферазных лабочипов, особенно тех, которые используют кальций-связывающие фотопротеины, излучающие один квант света на один атом кальция. Синтез новых типов таких белков ведется достаточно интенсивно [59]. Это позволяет надеяться на новые количественные методы идентификации биомаркеров, особенно маркеров семейства S100.

ВЫВОДЫ И ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Рассмотрены новейшие разработки лабочипов, на которые возлагаются основные надежды при идентификации биомаркеров в клинике.

Информация, поступающая от геномики, протеомики, гликомики и метаболомики делает важным разработку новых процедур, которые используют эти научные открытия. Действительно, огромное количество «открытий» биомаркеров делается на бумаге – 20000 от рака и 6000 от сердечных болезней, но только ~ 1 биомаркер в год одобрялся Управлением по контролю за качеством пищевых продуктов и лекарственных препаратов США (FDA) в период между 1995 и 2005 гг. Медленные темпы утверждения новых биомаркеров для использования в клинической практике в основном ограничены аналит-специфичным дизайном текущих биоаналитических и клинических технологий [21].

Основное вывод этого обзора следующий.

Есть полезные лабочипы, которые могут помочь в поиске молекулярных маркеров для практической медицины, но путь этот сложный, требующий совместной творческой работы с глубоким взаимным уважением и точным пониманием того, что других путей диагностики и терапии нет.

Закончим эпиграфом к проблеме опухолевых маркеров, который принадлежит Н.С. Сергеевой: «Повышение опухолеассоциированного маркера – это не всегда опухолевый, но всегда патологический процесс, требующий дополнительного обследования» [60].

БЛАГОДАРНОСТИ

Благодарю М.И. Самойловича и Н.С. Сергееву за обсуждение проблем маркеров, что и послужило стимулом к написанию этого обзора. Надеюсь, моих коллег И.А. Денисова, А.Г. Туманяна и А.С. Якимова, с которыми мы разрабатываем новые лабочипы, сформулированные выше мысли вдохновят на новые подвиги. Благодарю за содействие в подготовке обзора В.А. Кратасюк, Е.Н. Есимбекову, Л.В. Мешайкину и Л.А. Франк.

Работа поддержана грантами: РФФИ (№ 07-04-01340-а), Министерством образования и науки

РФ (№ 2.2.2.2/5309 и № 2010-1.1-201-058-013) и CRDF США (№ RUX0-002-KR-06/BP4M02 и № RUX0-002-KR-06/BG9202).

ЛИТЕРАТУРА

1. Jain, Kewal K. *The Handbook of Biomarkers*. 1st Ed., 2010, 488 p.
2. *Biomarkers in Drug Development: A Handbook of Practice, Application, and Strategy*. Eds. M. R. Bleavins, C. Carini, et al. Wiley, 2010. 760 pp.
3. E Ghafar-Zadeh, M Sawan. *CMOS Capacitive Sensors for Lab-on-Chip Applications: A Multidisciplinary Approach*. Analog Circuits and Signal Processing. Springer Science, 2010, 146 pp.
4. G. Wu. *Assay Development: Fundamentals and Practices*. Wiley. 2010, 429 pp.
5. The Editor. Biomarkers: the next generation // *Nature Reviews Drug Discovery* **9**, 415 (2010).
6. L. Hutchinson, V.T. DeVita. Focus issue on biomarkers // *Nature Reviews Clinical Oncology* **7**, 295 (2010).
7. D. Gruson, S. Bodovitz. Rapid emergence of multimer strategies in laboratory medicine // *Biomarkers*, **15** (4), 289-296 (2010).
8. Сергеева Н. С., Чиссов В. И., и др. Исследование диагностической чувствительности новых опухолеассоциированных копологических маркеров при колоректальном раке // *Российский онкологический журнал* № 2, с.21-24 (2010).
9. ProtoArray® Human Protein Microarrays – the absolute solution to identify biomarkers URL: <http://www.invitrogen.com/>.
10. E. Orenes-Pinero, R. Barderas, et al. Serum and Tissue Profiling in Bladder Cancer Combining Protein and Tissue Arrays // *J. Proteome Res.*, **9** (1), 164–173 (2010).
11. E. Stern, A. Vacic, et al. Label-free biomarker detection from whole blood // *Nature Nanotechnology* **5**, 138 - 142 (2010).
12. David G Warnock & Carl C Peck. A roadmap for biomarker qualification // *Nature Biotechnology* **28**, 444-445 (2010).
13. Glossary of Biomarkers // *Nature Biotechnology* **28**, 434-435 (2010). {7}
14. B. Bhushan. *MEMS/NEMS and BioMEMS/BioNEMS: Materials, Devices, and Biomimetics*. pp. 1663-1740. 3rd Ed. Springer Handbook of Nanotechnology, Springer, 2010, 1961 pp.
15. H. V. Demir, C. M. Puttlitz, Melik R. *BioMEMS sensor and apparatuses and methods thereof* // No: WO/2010/028077, Pub. Date: 11.03.2010.

16. D. Sharon, R. Chen, M. Snyder. Systems biology approaches to disease marker discovery // *Disease Markers*, **28** (4), 209-224 (2010).
17. J V Bonventre, V S Vaidya, et al. Next-generation biomarkers for detecting kidney toxicity // *Nature Biotechnology* **28**, 436-440 (2010).
18. J. R. van der Meer & S. Belkin. Where microbiology meets microengineering: design and applications of reporter bacteria // *Nature Reviews Microbiology* **8**, 511-522 (2010).
19. J. F. Evans & J. H. Hutchinson. Seeing the future of bioactive lipid drug targets // *Nature Chemical Biology* **6**, 476-479 (2010).
20. Токсикологическая химия. Аналитическая токсикология: учебник / Под ред. Р.У. Хабриева, Н.И. Калетиной. - М. : ГЭОТАР-Медиа, 2010. - 752 с. : ил.
21. J. V. Jokerst, J. W. Jacobson, et al. Programmable Nano-Bio-Chip Sensors: Analytical Meets Clinical // *Anal. Chem.* **82** (5), 1571-1579 (2010).
22. J V Jokerst, & J T McDevitt. Programmable nano-bio-chips: multifunctional clinical tools for use at the point-of-care // *Nanomedicine*, **5** (1), 143-155 (2010).
23. S. E. Weigum, P. N. Floriano, et al. Nano-Bio-Chip Sensor Platform for Examination of Oral Exfoliative Cytology // *Cancer Prev Res* **3** (4), 518-528 (2010).
24. A. Merkoci. *Biosensing using nanomaterials*. Wiley. 2009. 505 pp.
25. D M Rissin, C W Kan, et al. Single-molecule enzyme-linked immunosorbent assay detects serum proteins at subfemtomolar concentrations // *Nature Biotechnology* **28**, 595-599 (2010).
26. K. Lympelopoulou, R. Crawford, et al. Single-Molecule DNA Biosensors for Protein and Ligand Detection // *Angew. Chemie Int. Ed.*, **49** (7), 1316-1320 (2010).
27. S. H. Kang, S. Lee, E. S. Yeung. Detection of Single Enzyme Molecules inside Nanopores on the Basis of Chemiluminescence // *Angew. Chemie Int. Ed.*, **49** (14), 2603-2606 (2010).
28. C. C. Gradinaru, D. O. Marushchak, et al. Fluorescence anisotropy: from single molecules to live cells // *Analyst*, **135**, 452 – 459 (2010).
29. Y.C. Lim, A.Z. Kouzani, W. Duan. Aptasensors: A Review // *Journal of Biomedical Nanotechnology*, **6**, (2), 93-105 (2010).
30. M Sugawa, S Nishikawa, et al. Single-Molecule FRET Imaging for Enzymatic Reactions at High Ligand Concentrations // *Small*, **6** (3), 346 - 350 (2010).
31. N. Misra, J.A. Martinez, et al. Bioelectronic silicon nanowire devices using functional membrane proteins // *PNAS* **106** (33), 13780-13784 (2009).
32. K. Tybrandt, K. C. Larsson, et al. Ion bipolar junction transistors // *PNAS* **107** (22) 9929-9932 (2010).
33. J. C. Stachowiak, C. C. Hayden, and D. Y. Sasaki. Steric confinement of proteins on lipid membranes can drive curvature and tubulation // *PNAS* **107** (17), 7781-7786 (2010).
34. N.-J. Cho, C. W. Frank, et al. Quartz crystal microbalance with dissipation monitoring of supported lipid bilayers on various substrates // *Nature Protocols* **5**, 1096-1106 (2010).
35. H. H. Gorris, D. R. Walt. Analytical Chemistry on the Femtoliter Scale // *Angew. Chemie Int. Ed.*, **49** (23), 3880-3895 (2010).
36. S. Yalovsky, F. Baluska. *Integrated G Proteins Signaling in Plants*. Springer, 2010. 340 pp.
37. P. Hassanzadeh. New perspectives in biosensor technology // *Gastroenterology and Hepatology. From Bed to Bench*, **3** (3), 105-107 (2010).
38. N.G. Khlebtsov, L.A. Dykman. Optical properties and biomedical applications of plasmonic nanoparticles // *J Quantit. Spectr. Radiat. Transfer*. **111** (1), 1-35 (2010).
39. J.-F. Houle. Rapid development of novel protein biomarkers using real-time immunoassays // *Bioanalysis*, **2** (6), 991-993 (2010).
40. A. Gunnarsson, P. Sjoval and F. Hook. Liposome-Based Chemical Barcodes for Single Molecule DNA Detection Using Imaging Mass Spectrometry // *Nano Lett.*, **10** (2), 732-737 (2010).
41. S. Sauer & M. Kliem. Mass spectrometry tools for the classification and identification of bacteria // *Nature Reviews Microbiology* **8**, 74-82 (2010).
42. Z. Abliz, Z. An, et al. Integrated Ionization Approach for RRLC-MS/MS-based Metabonomics: Finding Potential Biomarkers for Lung Cancer // *J. Proteome Res.*, Just Accepted, June 18 (2010).
43. D A Giljohann, D S Seferos, et al. Gold nanoparticles for biology and medicine // *Angew. Chem Int. Ed.*, **49** (19), 3280-94 (2010).
44. S. Hearty, P. Leonard, R. O'Kennedy. Nanomedicine: Barcodes check out prostate cancer // *Nature Nanotechnology* **5**, 9 - 10 (2010).
45. C. S. Thaxton, R. Elghanian, et al. Nanoparticle-based bio-barcode assay redefines "undetectable" PSA and biochemical recurrence after radical prostatectomy // *PNAS* **106** (44), 18437-18442 (2009).
46. D. A. Giljohann & C. A. Mirkin. Drivers of biodiagnostic development // *Nature* **462**, 461-464 (2009).

47. Click Chemistry for Biotechnology and Materials Science. Ed. J. Lahann. Wiley, 2009, 432 pp.
48. Y.-P. Kim, W. L. Daniel, et al. Bioluminescent nanosensors for protease detection based upon gold nanoparticle-luciferase conjugates // *Chem. Commun.* **46**, 76-78 (2010).
49. J.-H. Kim, J.-H. Ahn, et al. A Luciferase/Single-Walled Carbon Nanotube Conjugate for Near-Infrared Fluorescent Detection of Cellular ATP // *Angew. Chemie Int. Ed.*, **49** (8), 1456-1459 (2010).
50. Hwang J-H, Voortman J, et al. Identification of MicroRNA-21 as a Biomarker for Chemoresistance and Clinical Outcome Following Adjuvant Therapy in Resectable Pancreatic Cancer // *PLoS ONE* **5** (5): e10630 (2010).
51. Z. Wang, B. Yang. *MicroRNA Expression Detection Methods*. Springer, 2010, 387 pp.
52. M. Roming, H. Lunsdorf, et al., $ZrO(HPO_4)_{1-x}(FMN)_x$: Quick and Easy Synthesis of a Nanoscale Luminescent Biomarker // *Angew. Chemie Int. Ed.*, **49** (3), 632-637 (2010).
53. K. Boye and G. M. Melandsmo. S100A4 and Metastasis. A Small Actor Playing Many Roles // *Am J Pathology*, **176**, 528-535 (2010).
54. M. J. Jung, U. Murzik, et al. Regulation of cellular actin architecture by S100A10 // *Experimental Cell Research*, **316** (7), 1234-1240 (2010).
55. P. D. Chantler, S. R. Wylie, et al. Conventional myosins - unconventional functions // *Biophysical Reviews*, **2** (2), 67-82 (2010).
56. S. Abdali, B. De Laere, et al. Toward Methodology for Detection of Cancer-Promoting S100A4 Protein Conformations in Subnanomolar Concentrations Using Raman and SERS // *J. Phys. Chem. C*, **114** (16), 7274-7279 (2010).
57. J van Dieck, T Brandt, et al. Molecular basis of S100 proteins interacting with the p53 homologs p63 and p73 // *Oncogene* **29**, 2024-2035 (2010).
58. T. M. Ismail, S. Zhang, et al. Self-association of Calcium-binding Protein S100A4 and Metastasis // *J Biol Chem*, **285**, 914-922 (2010).
59. S.V. Markova, L.P. Burakova, et al. Green-fluorescent protein from the bioluminescent jellyfish *Clytia gregaria*: cDNA cloning, expression, and characterization of novel recombinant protein // *Photochem. Photobiol. Sci.* **9**, 757-765 (2010).
60. Н.С.Сегреева, Н.В.Маршутина. Новые серологические опухолеассоциированные маркеры (S100, Bone TRAP 5b, UBC, TuM2-ПК) в мониторинге онкологических больных // *Протоколы заседаний Московского Онкологического Общества*, No 534, с.9-10 (2007).

14/07/2010