# МЕДИЦИНСКАЯ ТЕХНИКА

## НАУЧНО-ТЕХНИЧЕСКИЙ ЖУРНАЛ

 $N_{2}$  4 (322) 2020

Выходит 6 раз в год

ИЮЛЬ-АВГУСТ

Издается с 1967 г., г. Москва

## ТЕОРИЯ И КОНСТРУИРОВАНИЕ

В.Г. Никитаев, А.Н. Проничев, К.И. Хамади, Е.А. Дружинина, К.А. Мальсагова, Т.О. Плешакова, Т.С. Романова, А.А. Валуева, Н.Д. Иванова, В.К. Сафонова, В.П. Попов, В.С. Зиборов, В.А. Конев, Ю.Д. Иванов

Молекулярная онкологическая диагностика: система обработки данных с биочипов на основе полевых нанотранзисторов

## Аннотация

Рассматривается система молекулярной диагностики заболеваний на ранних стадиях, основанная на биочипах с применением полевых нанотранзисторов. Исследуются практические вопросы обработки данных для устранения искажений сигнала и его визуализации.

## Введение

Для ранней стадии онкологического заболевания характерно появление в крови организма белков, ассоциируемых с этой болезнью, в диапазоне очень низких концентраций ( $C \sim 10^{-15} \, \mathrm{M}$ ). Такие низкие концентрации белков современные методы молекулярной диагностики не позволяют регистрировать. Например, для наиболее распространенного в клинической практике метода иммуноферментного анализа (ИФА) чувствительность составляет около 10-12 М. Актуальна разработка методов с концентрационной чувствительностью, превышающей уровень  $C \sim 10^{-12} \text{ M}$ . Перспективно в этом направлении использование нанодетекторов, обладающих чрезвычайной чувствительностью на уровне единичных биомакромолекул [1]. Такие детекторы можно отнести к классу молекулярных детекторов. Чувствительные элементы нанодетекторов имеют размеры, сходные с размерами детектируемых биомакромолекул, что и обусловливает их высокую чувствительность. Возможность регистрации единичных молекул при помощи молекулярных нанодетекторов позволяет создавать технологии регистрации биомакромолекул в режиме их счета (цифровом

Среди методов лабораторной диагностики можно выделить методы молекулярной диагностики ПЦР и ИФА. Известно, что метод ПЦР, хотя и обладает высокой чувствительностью, зачастую дает ложноположительные результаты в связи с возможной контаминацией образцов. Метод ИФА имеет ограниченную концентрационную чувствительность, определяющую рамки его применения. В настоящее время ведутся активные исследования в области использования нанотехнологий для ранней диагностики онкозаболеваний. Разрабатываемые подходы можно условно разделить на два типа: *in vivo* (выполняемые внутри организма) и *in vitro* (исследования вне организма – «в пробирке»). К первым относят методы нанотераностики,

сочетающие диагностику и терапию в наноразмерном масштабе.

В число перспективных методов in vitro нового поколения входят методы детекции единичных биомакромолекул в биологической жидкости пациента с применением молекулярных детекторов [2]. Эти детекторы позволяют регистрировать белковые маркеры в крови при низких концентрациях (< 10<sup>-13</sup> М), когда патологический процесс находится на ранней стадии развития [3]. Необходимость повышения концентрационной чувствительности на несколько порядков связана с тем, что подавляющее количество типов функциональных белков, которые могут быть в том числе и маркерами заболеваний, присутствуют в плазме крови, согласно оценкам, при концентрациях ниже  $10^{-12}$  М. Наряду с этим требование повышения концентрационной чувствительности связано с ограничением объема анализируемого материала. Расчеты показывают, что для идентификации белка методом масс-спектрометрии при его концентрации  $10^{-8}~{
m M}$  в крови требуется объем пробы порядка 1 мкл. В то же время при концентрации белка в крови  $10^{-15} \, \mathrm{M}$ требуется объем крови порядка 10 л. Это, очевидно, невозможно реализовать на практике. Подход, позволяющий преодолеть концентрационный предел  $10^{-12}$  М при минимальном объеме образца, состоит в использовании для этих целей комбинации двух методов:

- а) метод вылавливания низкокопийных белков из объема биологической смеси на поверхность детектора и концентрирования этих белков на поверхности детектора – так называемый фишинг низкосодержащихся белков из смеси (вместо удаления высокосодержащихся фракций белков методами хроматографии и электрофореза, обычно применяемыми для разделения белковой смеси);
- б) высокочувствительный метод регистрации низкокопийных белков за счет использования высокочувствительных молекулярных детекторов, позволяющий регистрировать и

подсчитывать отдельные молекулы и молекулярные комплексы, т. е. переходить к цифровой протеомике и медицине

Одной из технологий, основанной на использовании в качестве регистрирующего устройства молекулярных детекторов, работающих в режиме счета отдельных макромолекул, является применение нанотранзисторных детекторов (НТ-детекторов) [4], [5].

Среди нерешенных задач разработки молекулярных детекторов на основе полевых нанотранзисторов отметим важную задачу обработки данных – уменьшение искажений в регистрируемом сигнале и визуализацию сигнала. Указанная задача представляет собой один из этапов создания системы молекулярной диагностики онкологических заболеваний (далее – СИСТЕМА) и определяет цель рассматриваемой работы.

## Материалы и методы

Исходными данными в рассматриваемой работе выступают сигналы, образованные нанодекторами вследствие ассоцирования биомолекул с иммобилизованными антителами на поверхности полевых нанотранзисторов.

При формировании сенсорных зон на поверхности чипа используются антитела и олигонуклеотидные зонды для белков, ассоциированных с онкологическими заболеваниями (в том числе с острыми лейкозами и минимальной остаточной болезнью).

## Основные требования к СИСТЕМЕ

Система на базе цифровых технологий должна обеспечивать регистрацию данных от нанодетектора, их хранение, выполнять обработку и визуализацию в реальном масштабе времени. Управляющими параметрами системы являются количество каналов регистрации, время регистрации, частота дискретизации аналогово-цифрового преобразователя (АЦП). Виды обработки сигнала: коррекция искажений сигнала, визуализация детекции антиген-содержащих макромолекул. Для преобразования аналогового сигнала молекулярного детектора в цифровой код в данной работе использовался АЦП ЛА-2USB-14 производства компании Руднев-Шиляев.

В молекулярном детекторе выделены рабочие и контрольный каналы. Рабочий канал – канал, на нанотранзисторы которого иммобилизованы антитела.

Функционирование рабочего канала. При взаимодействии антител на поверхности нанотранзистора и специфичных белков в крови значение сигнала рабочего канала изменяется. На нанотранзистор контрольного канала не иммобилизованы антитела. Поэтому специфические белки не оказывают воздействия на контрольный канал. Кроме специфических белков на рабочий канал воздействуют прочие вещества, находящиеся в биорастворе и порождающие искажения в полезном сигнале. Выбранный метод устранения искажений основан на расчете разности сигналов рабочего и контрольного каналов. Вещества, отличные от специфических белков, вызывают изменения сигналов рабочего и контрольного каналов. Для формирования разностного сигнала из тока рабочего канала вычитается ток контрольного канала. Тем самым обеспечивается устранение влияния прочих веществ биораствора на полезный сигнал. Поскольку в начальных условиях ток рабочего и контрольного каналов неодинаков, перед этим выполняется нормировка данных для обеспечения корректного сравнения рабочего и контрольного каналов с приведением их к равным значениям в точке вливания биораствора, при этом базовые линии рабочего и контрольного каналов должны быть совмещены в момент времени перед вливанием биораствора.

Процедура визуализации в режиме on-line осуществляется синхронно с получением данных от АЦП в текущем отсчете. Соответствующие этому отсчету сигналы выводятся на экран компьютера в виде точек на графике функциональной зависимости сигнала молекулярного детектора от времени. По оси абсцисс представлено время, по оси ординат – значение сигналов молекулярной детекции. Разностный сигнал отражает наличие специфических белков в исследуемом биорастворе.

## Экспериментальное исследование

*Цель эксперимента* – исследовать зависимость тока биосенсора от наличия в исследуемом растворе специфических бельов

## Исходные данные

На нанопровод (биосенсор) рабочего канала наносятся антитела для специфичного белка, на биосенсоре контрольного канала антитела отсутствуют.

#### Методика проведения эксперимента

Биосенсор поместить в кювету.

Запустить регистрацию тока рабочего и контрольного каналов биосенсора.

В кювету с биосенсером залить раствор с биологическим материалом, содержащим специфичные белки.

Регистрировать изменение тока в рабочем и контрольном каналах.

Слить раствор с биоматериалом, залить отмывочный раствор.

Завершить регистрацию токов рабочего и контрольного каналов.

Выполнить обработку зарегистрированных данных путем выравнивания графиков зависимости токов рабочих и контрольного каналов от времени, сделать вывод о реакции биосенсора на биораствор.

Результаты эксперимента представлены на рис. 1.

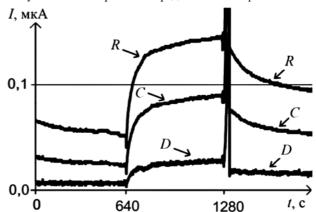


Рис. 1. Функциональные зависимости для токов контрольного (C), рабочего (R) каналов и их разности (D)

## Обработка экспериментальных данных для визуального анализа

Обработка проводится путем нормализации и смещения графиков:

$$d(t) = c(t) / c(638) - r(t) / r(638);$$

$$R(t) = r(t) - 0.59$$
;  $C(t) = c(t) - 0.33$ ;

$$D(t) = K \cdot d(t) + 0,005,$$

где r(t), c(t) — функции зависимости токов рабочего и контрольного каналов от времени. Момент времени t=638 с принимается как точка нормировки данных: значения токов рабочего и контрольного каналов в этой точке принимаются равными своей норме, а вычисление разности сигналов рабочего и контрольного каналов d(t) выполняется в относительных к соответствующим нормам значениях. R(t), C(t), D(t) — функции для визуального анализа, соответствующие смещенным по оси ординат функциям r(t), c(t), d(t). Кроме того, для D(t) осуществляется приведение от относительных единиц к абсолютным значениям тока в микроамперах при помощи масштабного множителя K = [r(638) + c(638)] / 2. Смещение графиков необходимо для удобства сравнительного анализа полученных зависимостей. Моменту времени t=640 с на гра-

фике соответствует добавление биологического материала, содержащего специфичные белки. С этого момента наблюдается рост значения тока в рабочем и контрольном каналах.

Изменение тока на графике D(t) свидетельствует о том, что происходит ассоциация (образование) комплексов «антитело – специфичный белок». Большой всплеск в момент времени  $t=1280\,\mathrm{c}$  характеризует смену буферного раствора для отмывки образовавшихся комплексов. Увеличение тока в этот момент происходит за счет того, что в кювете нет жидкости, что ведет к увеличению проводимости. После добавления буферной жидкости для смывки сигнал медленно начинает уменьшаться — начинается процесс диссоциации. Приведенные графики подтверждают, что биосенсор реагирует на содержащиеся в биорастворе специфичные белки.

Представленная методика исследования наличия специфических белков в биологическом растворе может быть применена при диагностике острых лейкозов на ранней стадии и выявлении минимальной остаточной болезни. Для этого необходимо для белковых молекул, являющихся маркерами заболевания при острых лейкозах и минимальной остаточной болезни, соответствующие им антитела или их синтетические одноцепочечные олигонуклеотидные аналоги – аптамеры иммобилизировать на поверхность рассматриваемого биочипа. Применение такого биочипа позволит выявить маркеры заболевания в исследуемых биологических жидкостях (плазме крови).

Полученные результаты могут быть использованы для развития новых высокочувствительных методов диагностики онкологических заболеваний на ранней стадии, в том числе острого лейкоза и минимальной остаточной болезни.

## Заключение

Рассматриваемая работа посвящена теме разработки систем молекулярной диагностики заболеваний на ранней стадии. Представлена система обработки данных с биочипа на основе полевых нанотранзисторов. Разработанная система позволяет считывать данные с АЦП – значения токов нанопроводов, уменьшать искажения сигнала и визуализировать их в виде графиков. По визуализированным данным можно наблюдать, с какими антителами или аптамерами, иммобилизованными на нанопроводах, провзаимодействовал биологический материал, нанесенный на чип.

Разработанная система может быть использована при проведении фундаментальных биомедицинских исследований на молекулярном уровне и применена в диагностике онкологических заболеваний на ранних стадиях, в том числе острых лейкозов и минимальной остаточной болезни.

Работа выполнена при поддержке РФФИ по проекту 18-29-09115.

Список литературы:

- Pleshakova T.O., Malsagova K.A., Kaysheva A.L., Kopylov A.T., Tatur V.Yu., Ziborov V.S., Kanashenko S.L., Galiullin R.A., Ivanov Yu.D. Highly sensitive protein detection by biospecific AFM-based fishing with pulsed electrical stimulation // FEBS Open Bio. 2017. № 7. PP. 1186-1195.
- 2. Archakov A.I., Ivanov Yu.D., Lisitsa A.V., Zgoda V.G. AFM fishing nanotechnology is the way to reverse the Avogadro number in proteomics // Proteomics. 2007. № 7. PP. 4-9.
- 3. Archakov A.I., Ivanov Yu.D. Analytical nanobiotechnology for medicine diagnostics // Molecular BioSystems. 2007. № 3. PP. 336-342.
- 4. Patolsky F., Zheng G.F., Lieber C.M. Fabrication of silicon nanowire devices for ultrasensitive, label-free, real-time detection of biological and chemical species // Nature Protocols. 2006. № 1. PP. 1711-1724.

5. Немчинов В.М., Никитаев В.Г., Ожогин М.А., Ляхович В.В. Усилители с полевыми транзисторами. – М.: Советское радио, 1980. 192 с.

> Валентин Григорьевич Никитаев, д-р техн. наук, профессор, зав. кафедрой, кафедра компьютерных медицинских систем, Александр Николаевич Проничев, канд. техн. наук, доцент, отделение биотехнологий офиса образовательных программ(M), Кирилл Искандерович Хамади, студент, Екатерина Александровна Дружинина, аспирантка, ФГАОУ ВО «Национальный исследовательский ядерный университет «МИФИ», Кристина Ахмедовна Мальсагова, канд. биолог. наук, мл. научный сотрудник, Татьяна Олеговна Плешакова, д-р биолог. наук, ст. научный сотрудник, Татьяна Сергеевна Романова, канд. биолог. наук, научный сотрудник, ФГБНУ «Научно-исследовательский институт биомедицинской химии им. В.Н. Ореховича», Анастасия Андреевна Валуева, студентка, ФГБОУ ВПО «Российский химико-технологический университет им. Д.И. Менделеева», мл. научный сотрудник, ФГБНУ «Научно-исследовательский институт биомедицинской химии им. В.Н. Ореховича», Нина Дмитриевна Иванова, преподаватель, ФГБОУ ВО «Московская государственная академия ветеринарной медицины и биотехнологии - MBA им. К.И. Скрябина», Виктория Константиновна Сафонова, студентка, ФГБОУ ВО «Московский государственный технический университет им. Н.Э. Баумана», г. Москва, Владимир Павлович Попов, д-р физ.-мат. наук, зав. лабораторией, ФГБУН «Институт физики полупроводников им. А.В. Ржанова Сибирского отделения РАН», г. Новосибирск, Вадим Серафимович Зиборов, канд. физ.-мат. наук, ст. научный сотрудник, ФГБУН «Объединенный институт высоких температур РАН», Владимир Александрович Конев, канд. мед. наук, доцент, ФГАОУ ВО «Российский национальный исследовательский медицинский университет им. Н.И. Пирогова», Юрий Дмитриевич Иванов, д-р биолог. наук, зав. лабораторией, ФГБНУ «Научно-исследовательский институт биомедицинской химии им. В.Н. Ореховича», г. Москва. e-mail: vgnikitayev@mephi.ru