

Диагностические тесты в онкологии: от маркеров к сложным тест-системам

Сороковиков И.В.

Лаборатория фармакоэкономических исследований, Первый МГМУ им. И.М. Сеченова

Резюме: на сегодняшний день в диагностике и лечении онкологических заболеваний применяются множество тестов, основанных на определении биомаркеров разной природы. На практике все тесты разделяют на: диагностические, прогностические, предиктивные и фармакогенетические. С развитием молекулярно-генетических методов возможности тестирования в сфере онкологии значительно расширились. Большие перспективы открываются для применения предиктивных и фармакогенетических тестов, позволяющих назначать онкологическим больным эффективную таргетную терапию и прогнозировать ответ на проводимое лечение. Помимо вошедших в практику KRAS и EGFR-тестирования, в статье рассмотрена практическая ценность тестирования на мутации EML4-ALK при назначении кризотиниба в лечении немелкоклеточного рака легких; BRAF V600E-тестирование в назначении вемурафениба при меланоме; HER2/neu-тестирование в назначении трастузумаба при раке молочной железы. Внедрение таких тестов позволяет сделать шаг к "персонализированной" медицине, улучшению диагностики онкологических заболеваний и повышению эффективности их лечения. Методы обнаружения маркеров также имеют перспективы развития, вплоть до одновременного обнаружения нескольких маркеров различной природы.

Ключевые слова: диагностические, прогностические, предиктивные, фармакогенетические тесты, онкология, биомаркеры, онкомаркеры, «персонализированная» медицина, молекулярно-генетическая диагностика, методы анализа

Diagnostic tests in oncology: from markers to complex test systems

Sorokovikov I.V.

Laboratory of pharmacoecological research: I.M.Sechenov First Moscow State Medical University

Abstract: nowadays in cancer diagnostic and treatment used a number of tests based on identification of different biomarkers. In practice all oncology tests divided to: diagnostic, prognostic, predictive and pharmacogenetic. Testing capabilities in the field of oncology greatly enhanced with the development of molecular-genetic methods. Great prospects opening up for the application of predictive and pharmacogenetic tests to assign cancer patients an effective targeted therapy and predict response to treatment. In addition to routinely practiced KRAS- and EGFR-testing, in this article discussed the practical value of testing EML4-ALK mutation for crizotinib in non-small lung cancer; BRAF V600E-testing for vemurafenib in melanoma; HER2/neu-testing for trastuzumab in breast cancer. The introduction of such tests can take a step toward "personalized" medicine, improve diagnosis of cancer and effectiveness of their treatment. Methods for detection of biomarkers are also prospects for development, up to detection of several markers at the same time.

Key words: diagnostics, prognostic, predictive, pharmacogenetic testing, biomarkers, oncomarkers, oncology, "personalized" medicine, molecular-genetic diagnostics, methods of analysis

Введение

Ежегодно регистрируется более 11 млн. новых случаев онкологических заболеваний в мире, и, по прогнозам специалистов, к 2020 году количество новых случаев ежегодно будет оцениваться в 16 млн. случаев [1]. Прирост по показателям заболеваемости и смертности, прогнозируемый специалистами ВОЗ, будет развиваться в основном в развивающихся странах, в том числе в Рос-

сии. Стоит отметить, что в РФ с 2001 по 2011 годы абсолютное число умерших от злокачественных новообразований в целом не снижается: с 160284 до 154882 случаев ежегодно [13]. Несмотря на значительный путь проделанный медициной в области познания онкологических заболеваний и разработок методов лечения, общепризнанными нерешенными проблемами остаются разработка методов ранней и неинвазивной диагностики заболевания, наличия мер про-

филактики и скрининга, возможность назначения адекватной и таргетной терапии.

В последние годы в связи с развитием биохимии и методов диагностики открываются значительные перспективы в своевременной диагностике и лечении онкологических заболеваний. Понимание механизмов канцерогенеза, открытие биомаркеров и расшифровка генома человека позволили создать диагностические, прогностические и предиктивные тесты в сфере онкологии [1,11,16]. Это означает, что созданные методы тестирования могут применяться как в стратификации здоровых людей на группы риска и обнаружении онкологических опухолей, так и в смене неэффективных неспе-

цифических схем лечения на более эффективную терапию. В связи с этим становится возможным улучшение показателей выживаемости, отказ от заведомо неэффективных для данного пациента и дорогих препаратов и оптимизация затрат на терапию онкологических заболеваний. В данной статье рассмотрены основные онкологические тесты на основе определения маркеров и перспективы их развития.

Биомаркеры – основа диагностических тестов

С развитием биохимии и генетики медицина обрела более четкое понимание меха-

Таблица 1.

Классификация маркеров, соответствующие им онкологические заболевания, материалы и методы обнаружения и применения

Маркер	Нозологии	Применение	Материал/Метод обнаружения
Опухолевые антигены			
Простат-специфический антиген (ПСА, PSA)	Рак предстательной железы	Диагностика, мониторинг (прогностические показатели)	Плазма/ Иммунологический анализ
α-Фетопроtein (АФП)	Гепатоцеллюлярная карцинома, герминомы	Диагностика, мониторинг (прогностические показатели)	Плазма/ Иммунологический анализ
Cancer antigen 125 (CA 125)	Карциномы яичников	Диагностика, прогнозирование и мониторинг лечения	Плазма/ Иммунологический анализ
Cancer antigen 19-9 (CA 19-9)	Рак поджелудочной железы, рак мочевого пузыря	Диагностика, мониторинг (прогностические показатели)	Плазма/ Иммуноферментный анализ (ИФА) Моча/ Иммуноферментный анализ (ИФА)
BRCA-1 и BRCA-2	Рак молочных желез	Диагностика	Образец опухоли/ ПЦР в реальном времени (RT-PCR)
Раково-эмбрионический антиген (РЭА, CEA)	Колоректальная, бронхиальная и желудочная карцинома	Диагностика, прогнозирование и мониторинг лечения	Плазма/ Иммуноферментный анализ (ИФА)
Генетические онкомаркеры			
APC-гене, семейный аденоматозный полипоз	Рак толстой кишки	Диагностика	Кровь, образец опухоли/ ПДРФ (RFLP) хромосомы 5q21-22

Филадельфийская хромосома, Bcl2	Острый миелолейкоз, острый лимфоцитарный лейкоз, лимфома Буркитта	Диагностика	Костный мозг, периферическая кровь/ Флуоресцентная гибридизация in situ (FISH)
KRAS -мутации	Колоректальный рак, рак легкого	Предиктивный	Образец опухоли/ Флуоресцентная гибридизация in situ (FISH), Q-PCR
Метаболические онкомаркеры			
Нейронспецифическая енолаза (NSE)	Мелкоклеточная карцинома легких, нейробластома		
Фрагмент цитокератина 21-1 (Cyfra 21-1)	Немелкоклеточная карцинома легких	Диагностика, прогнозирование и мониторинг лечения	
Клетки-онкомаркеры			
Циркулирующие опухолевые клетки (Circulating tumor cells, CTC)	Метастатический рак легкого и др.	Диагностика и прогнозирование	Кровь/ Иммуноцитометрия

низмов развития канцерогенеза, а с ним и новые возможности в диагностики онкологических заболеваний. Развитие диагностических тестов тесно связано с открытием онкомаркеров. Формально первым шагом в этом направлении можно считать открытие в 1845 году белка Бенс-Джонса, по сути, первого онкомаркера. Научная и практическая ценность этого соединения выяснилась гораздо позже в XX веке, когда были изучены его биохимические свойства и установлена его взаимосвязь с наличием у больных онкологического заболевания — миеломы. К настоящему моменту известно более 200 опухолеспецифических соединений разных химико-биологических классов [1,11]. С развитием методов молекулярно-генетической диагностики понятие опухолевых маркеров (ОМ) значительно расширилось и на данный момент включает в себя: опухолевые антигены, генетические маркеры, метаболические маркеры и клетки-онкомаркеры. В таблице 1 представлены некоторые группы онкологических маркеров, методы их определения и их клиническая ценность. Представленная классификация обобщает несколько параметров принадлежности маркеров к разным группам, однако, не является полной. Так, например, отдельным типом маркеров иногда выделяют вирусные-онкомаркеры (например, онкобелки Е6 и Е7, ассоциирован-

ные с наличием канцерогенных типов ВПЧ и др.), цитокинетические и цитогенетические маркеры.

С практической точки зрения все тесты, основанные на определении биомаркеров, можно разделить на диагностические, прогностические, предиктивные и фармакодинамические. Диагностические ОМ используются для постановки точного диагноза в конкретном случае пациента. Так, например, мутации в APC-гене (Adenomatous Polyposis Coli gene) являются точным диагностическим признаком наличия наследственного заболевания семейный аденоматозный полипоз. Мутации APC-гена обуславливают появление мутантного APC-белка, который в свою очередь с высокой вероятностью определяет развитие рака толстой кишки. Еще одним вариантом диагностического теста, имеющего большое значение в скрининге и выявлении групп риска рака молочной железы — BRCA-1,2 тестирование. Мутации в этих генах являются причиной 30-40% случаев наследственного рака молочных желез и до 90% наследственного рака яичников.

Прогностические тесты связаны с такими клиническими исходами, как выживаемость и безрецидивная выживаемость вне зависимости от проводимого лечения. По сути, этот вид тестов позволяет говорить о злокачественном потенциале опухоли и прогнози-

Таблица 2.

Молекулярные маркеры и их клиническая значимость в назначении таргетной терапии

Молекулярный биомаркер	Выявляемость	Клиническая значимость	Выбор таргетной терапии
BRAF-мутации	40–60% с метастатической меланомой; 90%: V600E мутации (меланома)	Предиктивный (назначение таргетной терапии), прогностический	Вемурафениб, GSK2118436/LGX818, RO5212054, RAF265, XL281
EML4–ALK fu-sion gene	5% среди немелкоклеточного рака легкого; 22% среди некурящих с немелкоклеточным раком легкого	Предиктивный, прогностический	Crizotinib, CH5424802, AP26113
EGFR-мутации	10% среди немелкоклеточного рака легкого (US; 35% East Asians);	Предиктивный, прогностический	Эрлотиниб, Гефитиниб
KRAS-мутации	15–25% аденокарцином легких; 40% колоректальных раков	Негативный предиктор анти-EGFR терапии	Цетуксимаб, Панитумумаб
ERBB2 (HER2/neu) амплификации	20% рак молочных желез; 7–27% рак желудка	Предиктивный, прогностический	Трастузумаб, Лапатиниб, Эртумаксомаб, ММ-111
BCR–ABL fusion gene	98% хронической миелогенной лейкемии; 5–20% острый лимфобластный лейкоз	Диагностический, предиктивный, прогностический	Иматиниб, Дазатиниб, Нилотиниб, Радотиниб INNO-406, DCC-2036

ровать ее развитие [2,8]. Примером прогностического маркера может служить давно вошедший в практику тест на ПСА (простат-специфический антиген). Этот маркер является опухолеспецифичным маркером и воспроизводится в основном предстательной железой. Уровень ПСА позволяет предсказать развитие рака предстательной железы, его злокачественный потенциал, а динамика данного маркера позволяет прогнозировать рост опухоли и радикальность ее удаления. Тестирование на многие диагностические и прогностические маркеры уже прочно вошло в современную диагностическую практику, и производятся повсеместно.

С развитием молекулярных методов исследований и расшифровкой генома человека, в лечении онкологических заболеваний все большее значение приобретают предиктивные и фармакогенетические маркеры. Тесты, основанные на определении предиктивных маркеров, позволяют предсказывать эффективность лечения или повышенную

токсичность той или иной химиотерапии, что в результате позволяет принимать решение о назначении таргетной терапии для онкологических больных. Фармакогенетические - помогают оценить эффективность конкретных препаратов в отношении конкретного пациента или возможность токсической реакции на проводимую терапию. По сути, фармакогенетическое тестирование позволяет предсказать генетически детерминированный фармакологический ответ на прием определенного препарата.

Открытие и применение предиктивных и фармакогенетических тестов повлияло на тактику лечения онкологических заболеваний в зависимости от экспрессии в опухолевых клетках молекулярных меток, позволяющих прогнозировать ответ на терапию. Данный подход к лечению онкологических и некоторых других заболеваний обсуждается в научной литературе давно. Исследования механизмов канцерогенеза показали, что большинство опухолей не являются генети-

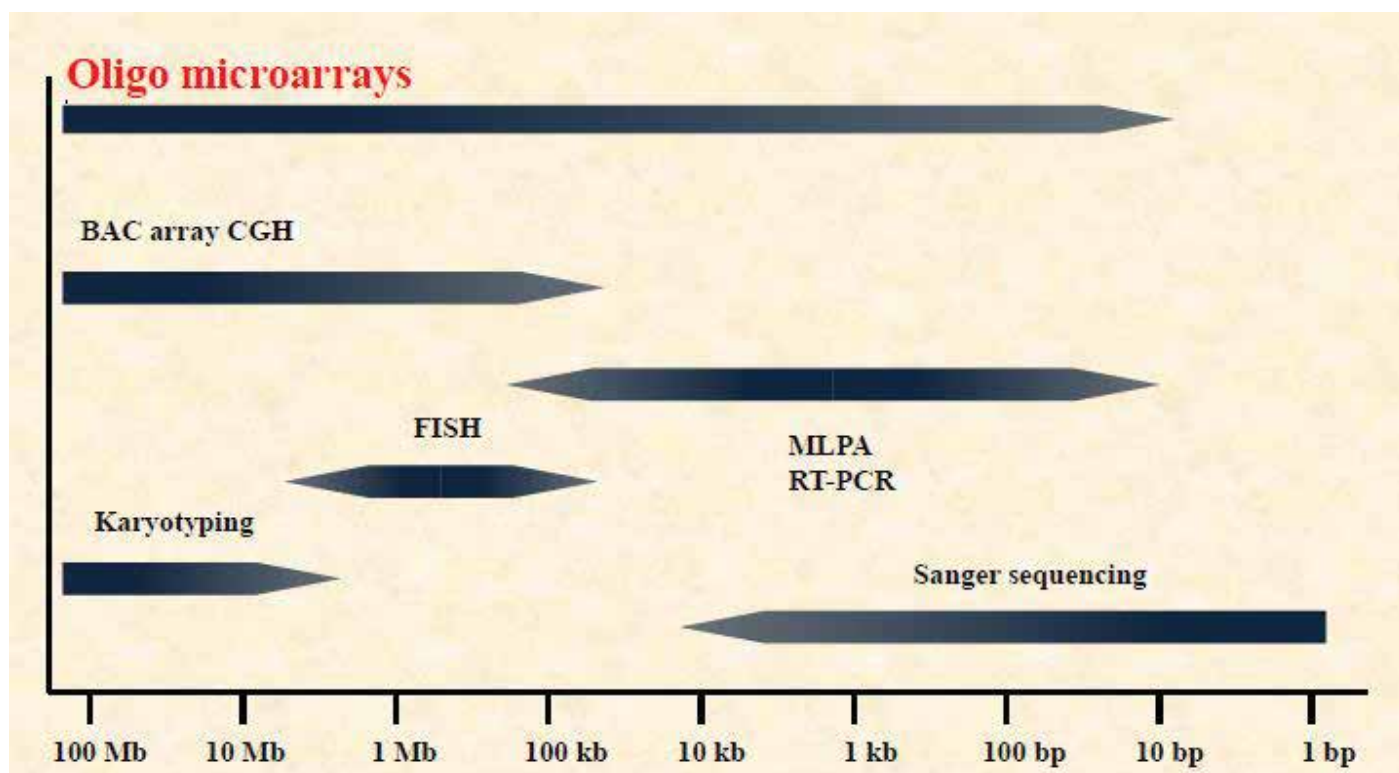


Рисунок 1.

Возможности молекулярно-генетических методов в анализе нуклеиновых кислот разных размеров

чески гетерогенными и имеют разную устойчивость к лечению. Очевидно, что назначение общепринятой терапии цитостатиками, как и терапии таргетными препаратами, неодинаково эффективно для всех пациентов. В связи с этим, использование предиктивных тестов является одним из первых шагов к «персонализированной» медицине, позволяющей принимать решения о назначении тех или иных таргетных препаратов в зависимости от генетического статуса конкретного пациента.

В настоящее время в РФ к обязательному применению утверждены 2 предиктивных теста: KRAS и EGFR-тестирование. Рассмотрим подробнее некоторые широко используемые в мировой практике и перспективные предиктивные молекулярные тесты (табл. 2).

KRAS-тестирование в назначении таргетной терапии при колоректальном раке

Одним из наиболее значимых предиктивных тестов стало открытие и применение KRAS-тестирования. Ген KRAS (Kirsten rat sarcoma) впервые был найден при исследовании саркомы у лабораторных крыс. Однако, позже было выяснено, что гомологичный человеческий KRAS ген, обнаруживаемый

в разных злокачественных опухолях, может находиться в двух состояниях — «дикий» или мутированном. При тестировании больных колоректальным раком «дикий» тип гена обнаруживают примерно в 65% случаев, тогда как в 35% случаев - ген KRAS мутированного типа. В исследованиях немелкоклеточного рака легких «дикий» ген обнаруживается в 80-90% случаев, а при раке органов головы и шеи — в 95%. В случае выявления мутантного типа KRAS-гена у больных обнаруживается непрерывное поступление сигналов в клетки опухоли по EGFR-пути, что блокирует апоптоз, стимулирует пролиферацию и неоангиогенез опухоли. Известно, что таргетная терапия моноклональными антителами Цетуксимабом и Панитумумабом влияет на блокирование клеточного сигнального EGFR-пути, что в случае возникновения мутантного типа KRAS-гена у онкологического больного абсолютно неэффективно. Таким образом, в отличие от других маркеров позволяющих стратифицировать пациентов, которые имеют наибольшую эффективность по отношению к таргетной терапии, KRAS-тестирование позволяет выбрать пациентов, для которых таргетная терапия Цетуксимабом и Панитумумабом будет неэффективна. KRAS-тестирование — это молекулярный тест, который технически может быть проведен в нескольких вариан-

тах: варианты ПЦР-диагностики (RealTime-PCR) или методом секвенирования. На данный момент является обязательным при планировании таргетной терапии у больных колоректальным раком [2,3,8,16].

EGFR-тестирование в назначении Эрлотиниба и Gefитиниба при немелкоклеточном раке легких

На данный момент изучены и другие предиктивные маркеры эффективности анти-EGFR терапий. EGF-рецептор – является одним из основных факторов передачи сигналов роста и пролиферации из внеклеточной среды в клетку. Среди пациентов с немелкоклеточным раком легкого было выявлено, что назначение анти-EGFR значительно более эффективно, чем рутинная цитостатическая терапия. На основе тестов на мутацию EGFR-гена пациентам с положительными результатами назначают таргетную монотерапию Эрлотинибом или Gefитинибом второй линией, что дает некоторые улучшения показателей общей и безрецидивной выживаемости. Необходимо отметить, что проведение теста на EGFR мутацию крайне важно при принятии ре-

шений о назначении терапии, так как более 80% пациентов с положительным результатом тестирования имеют улучшения при таргетной терапии анти-EGFR препаратами, а среди пациентов с EGFR нормальным геном - менее 10%. На данный момент существует множество тестов для определения EGFR-мутаций, которые в большинстве случаев являются разновидностями ПЦР-методики [2,8].

Тест на слияние EML4-ALK в назначении Кризотиниба при немелкоклеточном раке легкого (НМРЛ)

Другим важным открытием в молекулярной диагностике и клинической онкологии является открытие онкогена EML4 –ALK. Инверсия в хромосоме 2 приводит к слиянию EML4 и ALK экзонов, что приводит к появлению EML4 –ALK химерных белков, угнетению апоптоза и пролиферации опухолевых клеток. Эти генетические нарушения характерны для отдельной группы больных НМРЛ, составляющую около 5% от общей заболеваемости. Однако, среди некурящих частота положительных EML4-ALK тестов около 22%, а среди онкологических боль-

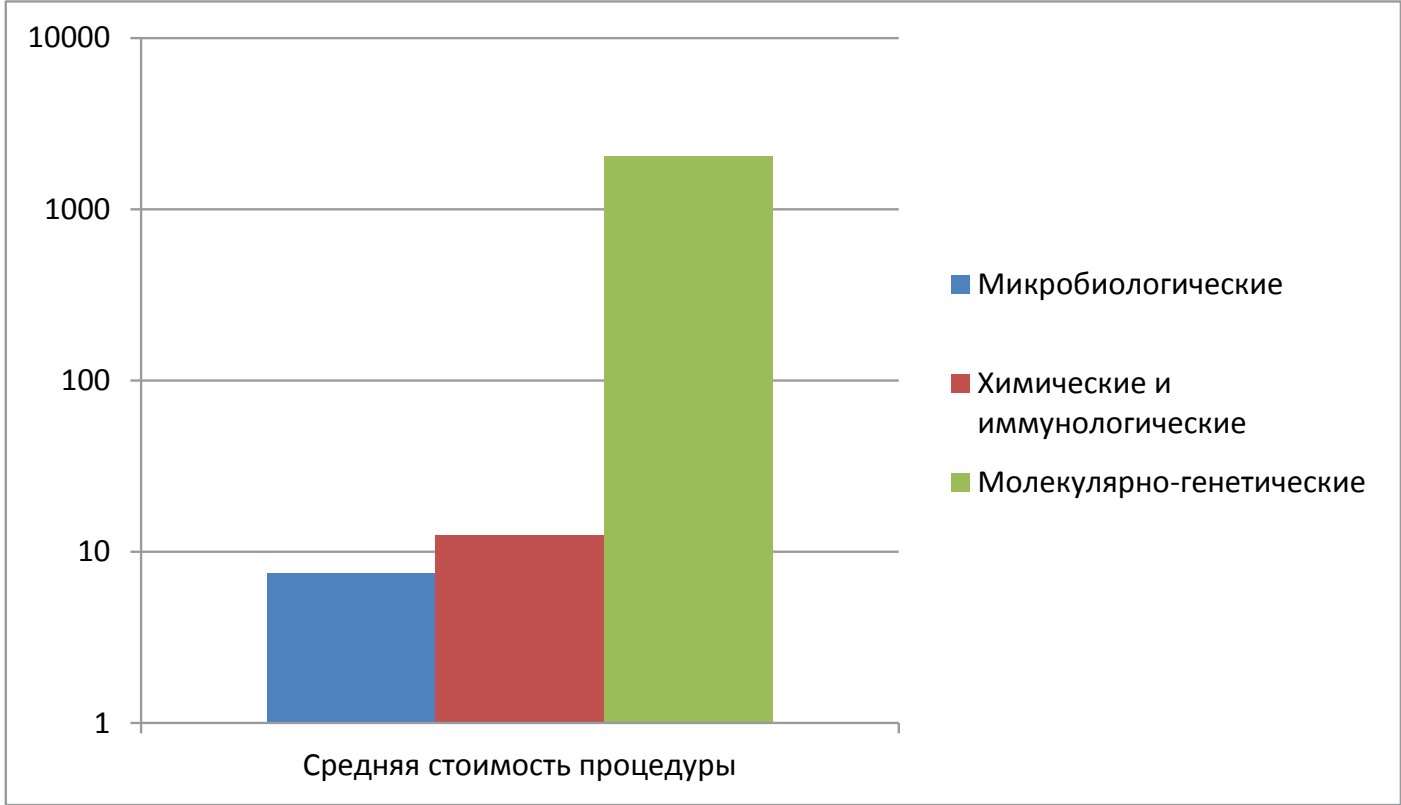


Диаграмма 1.
Средняя стоимость одной процедуры разных методов тестирования

ных с отрицательными результатами теста на EGFR — 33%. Необходимо отметить, что НМРЛ считается более агрессивным онкологическим заболеванием, чем мелкоклеточный рак легкого. В лечение НМРЛ используют хирургическое лечение и ненаправленная адъювантная химиотерапия. Однако, в течение 4 лет с момента обнаружения данного генетического нарушения были разработаны онкологические тесты Vysis ALK Break Apart FISH Probe Kit (Abbott Molecular ; одобрена в сентябре 2010 года) и препарат Кризотиниб (вторая линия терапии, одобрен FDA 2011 г.), который является специфическим ингибитором EML4-ALK. Применение Кризотиниба позволило достичь адекватного ответа на химиотерапию у 57% больных и стабилизации процесса у 33%, в то время как исторически терапия второй линии вызывает ответ приблизительно лишь у 10% пациентов. Данная технология тестирования на EML4-ALK онкоген и применение Кризотиниба позволили также достичь 72% безрецидивной выживаемости за 6,5 месяцев наблюдения. Методы тестирования на данный онкоген представлены FISH технологией и ПЦР с обратной транскрипцией (RT-PCR) [2,6,8].

BRAF V600E-тестирование в назначении Вемурафениба при меланоме

Другим предиктивным тестом, который в ближайшее время будет активно применяться, является BRAF V600E тестирование для пациентов с метастатической меланомой. Появление этого теста крайне актуально в свете того, что меланома является ведущей причиной смерти среди онкологических заболеваний. Было обнаружено, что около 40-60% пациентов с подтвержденной меланомой имеют мутации гена BRAF, 80-90% из которых имеют определенную мутацию гена — V600E. Течение заболевания таких пациентов и подход к лечению значительно отличается от лечения пациентов с «диким» типом BRAF. Меланома у пациентов с мутацией BRAF V600E, как правило, более агрессивна, а смертность их значительно выше. Разработка теста на мутацию этого гена Roche Cobas® 4800 позволило выявлять у больных меланомой в образце исследуемого материала мутированный тип гена даже в том случае, если отношение мутированных генов к «диким» в образце составляет 1:9. Положительный результат тестирования позволяет назначать пациентам

таргетную терапию, например препаратом Вемурафениб (Zelboraf). В связи с назначением таргетной терапии удалось значительно повысить выживаемость пациентов по сравнению с приемом стандартной терапии с дакарбазином: 84% против 64% за 6 месяцев исследования. Появление теста на BRAF V600E-мутацию дало толчок к разработке новых таргетных препаратов для лечения метастатической миеломы, например другого BRAF-ингибитора GSK2118436, который на этапе клинических исследований также показывает высокие результаты по преодолению устойчивости к стандартной терапии. Кроме того, в будущем возможно применение этого предиктивного теста при выборе терапии для других онкологических заболеваний обусловленных мутацией BRAF-гена, таких как папиллярный рак щитовидной железы [2,8].

ERBB2 (HER2/neu)-тестирование в назначении Трастузумаба при раке молочной железы

HER2/neu является мишенью для специфической терапии и одновременно важным прогностическим и предиктивным маркером в лечении этого заболевания. В целом, данный генетический маркер встречается и в нормальных клетках организма, однако гиперэкспрессия этого онкогена проявляется в 25–30% случаев РМЖ и ассоциируется с плохим прогнозом развития РМЖ (рака молочной железы) и агрессивностью его течения. Настоящим прорывом в лечении этого заболевания было внедрение в практику препарата Трастузумаб (Герцептин), способного избирательно связываться с рецепторами Her2/neu и блокировать рост опухолевых клеток с усиленной амплификацией этого онкогена, не влияя на клетки с нормальным содержанием HER2/neu. Тестирование пациентов на HER2/neu проводится иммуногистохимическим методом или FISH (флуоресцентная гибридизация in situ) и позволяет выявить пациентов, которым необходимо назначение таргетной терапии Герцептином. На данный момент установлена корреляция HER2+ результатов с устойчивостью к Цисплатину, что повышает ценность маркера.

Тесты на предиктивные биомаркеры могут носить и прогностический характер. Так, например, высокая экспрессия маркера ERCC1, определяемая у пациентов с резектабельным НМРЛ после оперативно-

го лечения, является прогностически благоприятным маркером выживаемости, по сравнению с низкой экспрессией ERCC1. Предиктивная значимость этого маркера заключается в том, что у пациентов с IV стадией НМРЛ, имеющих низкую экспрессию ERCC1, частота объективных ответов и прогноз химиотерапии комбинацией Гемцитабина с Цисплатином лучше, чем у пациентов той же группы, но с высокой экспрессией ERCC1.

В целом современные возможности тестирования онкологических больных на многие предиктивные маркеры позволяют назначить для конкретного больного таргетную терапию, которая прогностически будет значительно более эффективна рутинной цитостатической, или отказаться от применения некоторых таргетных препаратов, как это происходит при положительных результатах KRAS-тестирования. В связи с этим, применение диагностических тестов на предиктивные маркеры позволяет значительно улучшить показатели выживаемости для некоторых онкологических заболеваний и, возможно, снизить затраты на лечение.

Диагностические тесты в клинической практике и перспективы их развития

Развитие современных методов анализа и диагностического оборудования повлекло за собой рост клинической значимости маркеров. Ежегодно количество рекомендованных для практического применения тестов на основе определения маркеров становится больше. Для определения опухолеассоциированных соединений в крови и биологических жидкостях (серологических биомаркеров) на данный момент используются иммуноферментные (ИФА), иммунофлуоресцентные (ИЛА) и радиоиммунный анализы (РИА). Принцип этих методов основан на использовании специфичных моноклональных антител, способных связываться с определенными частями молекулы онкомаркера. В ходе количественного определения молекула онкомаркера связывается с антигенами и, в дальнейшем, с помощью ферментативных или флуоресцентных реакций комплекс антиген-биомаркер приобретает окрашивание и спектрометрически определяется количественно. Такие методы определения маркеров уже прочно вошли в клинко-диагностическую практику и широко представлены среди проводимых исследований в лечебно-диагностических учреж-

дениях РФ.

Отдельным направлением анализов является молекулярно-генетическая диагностика. В 2005 году уже приблизительно 5% всех лабораторных анализов было проведено с помощью методов, позволяющих анализировать нарушения в ДНК или РНК. В этой сфере активно используются различные варианты ПЦР (полимеразная цепная реакция, RealTime-PCR, Reverse-Transcriptase PCR), методы кариотипирования (спектральное кариотипирование, Fish — метод, анализ полиморфизма длины рестрикционных фрагментов, ДНК-микрочипы и секвенирование). Реакция ПЦР, известная более 30 лет, позволяет определять и увеличивать (амплифицировать) количество определяемого генетического материала. Другим молекулярно-генетическим методом, активно используемым в онкологической диагностике, является FISH-метод. Флуоресцентная гибридизация in situ, или метод FISH (англ. Fluorescence in situ hybridization - FISH) — цитогенетический метод, который применяют для детекции и определения положения специфической последовательности ДНК, например определенные генетические маркеры. Секвенирование биополимеров (белков и нуклеиновых кислот — ДНК и РНК) — еще один метод молекулярно-генетической диагностики, который позволяет определять нуклеотидную последовательность (от лат. sequentum — последовательность). В результате секвенирования получают формальное описание первичной структуры линейной макромолекулы в виде последовательности мономеров в текстовом виде. Размеры секвенируемых участков ДНК обычно не превышают 100 пар нуклеотидов (next-generation sequencing, NGS) и 1000 пар нуклеотидов при секвенировании по Сенгеру. В результате секвенирования перекрывающихся участков ДНК, получают последовательности участков генов, целых генов, тотальной мРНК и даже полных геномов организмов.

Перспективным направлением развития технологий тестирования являются микрочипы (microarray) — панель микрочеек, содержащих нанозонды, специфичные к определенному биомаркеру или его фрагменту. Существуют ДНК-чипы, способные определять «линейные» молекулы ДНК и РНК, и белковые — способные детектировать антитела, антигены, гормоны. В целом данная технология позволяет определять в одном образце почти неограниченное количество

маркеров, что имеет некоторые перспективы в диагностике и скрининге онкологических заболеваний. Этапы детекции и оценки результатов автоматизированы и проводятся на стандартных наборах, что позволяет получать воспроизводимые результаты за короткое время — 4-6 часов. Вместе с тем, метод требует дорогостоящего оборудования.

Приведенные методы на сегодняшний день автоматизированы, что позволило значительно ускорить тестирование.

Необходимо отметить, что методика тестирования зависит от свойств определяемого маркера, а для многих из них возможны несколько методов определения. Так, например, тестирование на онкоген HER2/neu при карциноме молочной железы зачастую проводится иммуногистохимически или FISH технологией. Вместе с этим, развивающиеся технологии диагностических микрочипов позволяют анализировать кДНК сразу нескольких рекомендованных при карциноме молочной железы маркеров — HER2/neu + рецепторы эстрогена (ER) + рецепторы прогестерона (PR) одновременно.

Методы тестирования онкологических больных на современном этапе имеют некоторые недостатки. Диагностика большинства серологических маркеров характеризуется не самыми высокими показателями чувствительности и специфичности. Несколько снижает диагностическую значимость таких тестов и то, что не существует абсолютных опухолеспецифичных и органоспецифических маркеров, так как повышенное содержание некоторых из них ассоциировано с доброкачественными опухолями или воспалительными процессами, а один и тот же маркер обнаруживается у больных разными онкологическими заболеваниями.

Молекулярно-генетические техники тестирования онкологических больных также не лишены проблем. Для каждого биомаркера необходимо подобрать способ его обнаружения, так как на сегодняшний момент не существует универсальной методики генетического теста. На данный момент серьезным недостатком является стоимость одной процедуры тестирования на генетические маркеры.

Цена проводимого теста кроме прочих параметров зависит от технологии. Процедура большинства рутинных иммунологических и химических тестов стоит от 10 до 15 USD (диаграмма №1). Так, анализ преysкура-

та Клинического Центра Первого МГМУ им.И.М. Сеченова на платные медицинские услуги (дата обращения 12.09.2013 г.) показал, что средняя стоимость исследований на опухолеассоциированные маркеры методом ИХЛ (иммунохемилюминисценции) составляет около 440 RUR, а методами ИФА (иммуноферментный анализ) и РИА (радиоиммунологический анализ) — 310 RUR. В тоже время, для более новых технологий, например молекулярно-генетических тестов, стоимость отличается в разы и в среднем колеблется от 40 до 4000 USD за одну процедуру.

Несмотря на высокую стоимость некоторых тестов, в динамике за последние несколько лет их цена неуклонно снижается, а применение значительно растет. Широкие перспективы открываются для развития молекулярной диагностики онкологических заболеваний и с точки зрения развития рынка диагностики в мире. В периоде с 2007 по 2012 год по оценкам специалистов мировой рынок *in vitro* диагностики (IVD) растет, за счет развития молекулярных диагностических тестов, увеличения ряда иммунологических тестов и экспресс тест-систем. Кроме того, в аналитическом обзоре рынка технологий диагностики *in vitro* специалисты отмечают, что ключевым фактором роста сегмента молекулярной диагностики в последние годы стало именно появление новых онкологических тестов, позволяющих назначать таргетную терапию. На данный момент IVD сегмент диагностики в РФ оценивается в 300 млн. USD, значительной частью которого являются онкологические диагностические тесты, а ежегодные темпы роста к 2014 года прогнозируются на уровне 10-20% [7,9,10].

Расходы на лабораторную диагностику в среднем составляют 2-3% от расходов на здравоохранение в развитых странах [9]. Ежегодно появляются новые диагностические тесты в онкологии, рекомендованные к применению, разрабатываются и реализуются новые технологии определения биомаркеров. Так, например, в 2000 г. Американским Обществом Клинической Онкологии (ASCO) для диагностики и лечения рака молочной железы были рекомендованы к определению некоторые серологические (CA15-3, CA 27, 29, РЭА) биомаркеры, а к 2007 году рекомендации ASCO включали определение гистохимических (Her2/neu, Ki67 и т.д.) маркеров и молекулярно-генетические тесты (Oncotype DX, MammaPrint). На ми-

ровом рынке лабораторной диагностики существует несколько крупных производителей диагностических тестов и оборудования:

Abbot (+Celera), Bayer, Becton Dickinson and Company, bioMerieux, Cefeid, F/Hoffman-La Roche, Genomic Health, GenProbe, Myriad Genetics, Novartis (Chiron), Qiagen [8,9].

Анализируя направления работы данных компаний и тенденции совершенствования диагностических тестов в целом необходимо выделить несколько основных направлений развития тестов в онкологии. С точки зрения исполнения самих тест-систем они могут быть, как предназначены для исполнения вручную, так и для полуавтоматического и автоматического исполнения. Очевидно, что автоматизация позволит не только упростить и ускорить процессы однотипного тестирования, но и значительно повысить точность и надежность тестов, а также снизить влияние человеческого фактора.

Отдельным направлением развития технологий тестирования является развитие технологии микрочипов. В периоде с 2004 года до 2014 специалисты прогнозируют прирост рынка микрочипов в 20% ежегодно. Данная технология позволяет определять в одном образце почти неограниченное количество маркеров, что имеет некоторые перспективы в диагностике и скрининге онкологических заболеваний. Существует автоматическое оборудование, позволяющее амплифицировать до 30 тысяч маркеров на одном чипе за достаточно короткое время (2-6 часов) [15]. Кроме того, данная технология позволяет определять большой спектр молекул по размерам (рис. 1), что так же открывает дополнительные возможности в комбинированном определении сразу нескольких разных по величине генетических маркеров. На сегодняшний день известно, что технологии микрочипов позволяют так же объединять на панели разные группы маркеров, например, одновременное определение соединений белковой структуры и нуклеиновых кислот.

В целом, ко всем диагностическим тестам, применяемым в онкологии, предъявляются общие требования:

- Высокая надежность и воспроизводимость метода
- Высокая специфичность и чувствительность
- Разумная стоимость и использование ресурсов здравоохранения
- Наличие данных РКИ или мета-ана-

лиза данных об эффективности применения технологии тестирования

Литература

1. Anant Narayan Bhatt, Rohit Mathur, Abdullah Farooque/ Cancer biomarkers - Current perspectives// Indian J Med Res 132, August 2010, pp 129-149
2. D Gonzalez de Castro¹, P A Clarke, B Al-Lazikani and P Workman/ Personalized Cancer Medicine: Molecular Diagnostics, Predictive biomarkers, and Drug Resistance// Clinical Pharmacology and Therapeutics 2013 Mar;93 (3): 252-9.
3. George J. Netto, MD, I Rana D. Saad, PhD, I and Peter A. Dysert, II, MD/ Diagnostic molecular pathology: current techniques and clinical applications, part I/
4. Georges J. Netto, MD I and Rana Saad, PhD/ Diagnostic molecular pathology, part 2: Proteomics and clinical applications of molecular diagnostics in hematopathology/
5. Meldrum C., Maria A Doyle, Tothill R.W. Next-generation sequencing for cancer diagnostics: a practical perspective/ Запрос: «ncbi Next-generation sequencing in oncology»
6. Min T./ FISH techniques// Methods Mol Biol. 2003; 220:193–212.
7. Molecular diagnostic and their evolving influence on the healthcare system/ H.Glorikian. Scientia Advisors. Jun 2012. (Электронный ресурс: www.scientiaadv.com, дата обращения 14.09.2013 г.)
8. Ong FS, Das K, Wang J, Vakil H, Kuo JZ, Blackwell WL, Lim SW, Goodarzi MO, Bernstein KE, Rotter JI, Grody WW. Personalized medicine and pharmacogenetic biomarkers: progress in molecular oncology testing. Expert Rev Mol Diagn. 2012;12:593-602.
9. Roshe Diagnostics Business Overview 2013. Published by F. Hoffman-La Roche LTD (Электронный ресурс: www.roche.com, дата обращения 17.09.2013 г.)
10. Strategic Review of Molecular Diagnostics by Scientia Advisors. 2010. (Сайт: www.scientiaadv.com дата обращения 14.09.2013)
11. Алексеева М.Л., Гусарова Е.В., Муллабаева С.М. Онкомаркеры, их характеристика и некоторые аспекты клинико-диагностического использования (обзор литературы). Проблемы репродукции. 2005; 3: 65-79
12. Зубцова Ж.И., Савватеева Е.Н., Д.А. Зубцов. Разработка многопараметрической тест-системы для диагностики онкологиче-

ских заболеваний женской репродуктивной системы. Труды МФТИ. -2010. Т.2 №2. С.: 16-22

13. Злокачественные новообразования в России в 2011 году (заболеваемость и смертность) под. ред. В.И. Чиссова, В.В. Старинского, Г.В. Петровой – М.: ФГБУ «МНИ-ОМ им. П.А. Герцена» Минздрава России. – 2013. – 289 с.

14. Николаенко Т.А. Методы молекулярно-генетической диагностики сегодня.//Лабораторная медицина. 2008; № 8: 27-30

15. www.rmj.ru

16. Имянитов Е.Н. Стандартные и потенциальные предиктивные маркеры при опухолях желудочно-кишечного тракта.// Практическая онкология. Т.13, № 4 – 2012. С. 219-228