



Первый лабораторный тест для объективной ранней диагностики шизофрении

Продолжение. Начало в № 22.

Разработка современных молекулярных тестов для диагностики шизофрении

Последнее десятилетие исследования по диагностике шизофрении были направлены на анализ большинства протеомных биомаркеров, ориентированных одновременно на изучение как нескольких целевых биомаркеров, так и отдельных молекул. При этом стал применяться комплексный подход с использованием высокоэффективных методов жидкостной хроматографии, масс-спектрометрии и мультиплексного иммуноанализа, с использованием которых возможен одновременный анализ десятков и сотен аналитов. Одним из таких методов является технология xMAP (Multi-Analyte Profiling).

Технология применения микросфер в качестве носителей биомолекул всего лишь несколько лет назад вошла в практику лабораторных исследований и сейчас активно используется в разных областях современной медицины. К одному из наиболее успешных достижений относят создание системы на основе суспензионных биочипов. В ней впервые удалось решить ряд технических проблем, связанных с применением микросфер для проведения диагностических исследований в мультиплексном формате. Эта технология основана на принципе использования синтетических микросфер-носителей и проточной цитометрии. Благодаря мультиплексности, открытости платформы и широкому спектру решаемых задач технология xMAP обеспечивает большую гибкость, скорость, воспроизводимость и экономическую эффективность.

В технологии xMAP используются микросферы (гранулы из полистирола диаметром 5,6 мкм) в качестве твердой фазы для иммобилизации моноклональных антител. Каждая микросфера покрыта смесью флуоресцентных красителей в определенных соотношениях и имеет уникальную спектральную характеристику (рис. 1).

Образец (сыворотка крови) вносится в ячейку 96-луночного планшета, в которой происходит иммуноанализ с использованием микросфер. На микросфере, содержащей на своей поверхности карбоксильные группы, способные вступать в реакцию с образованием ковалентных связей с лигандами, иммобилизуют захватывающие антитела, которые специфически связывают определенный компонент аналита. Затем к реакционной смеси добавляют биотинилированные вторичные антитела, которые специфически взаимодействуют с компонентами аналита. После этого добавляют конъюгат стрептавидина с фикоэритрином, что позволяет регистрировать сигнал флуоресценции фикоэритрина на тех микросферах, на которых произошло первичное связывание интересующего компонента аналита (рис. 2).

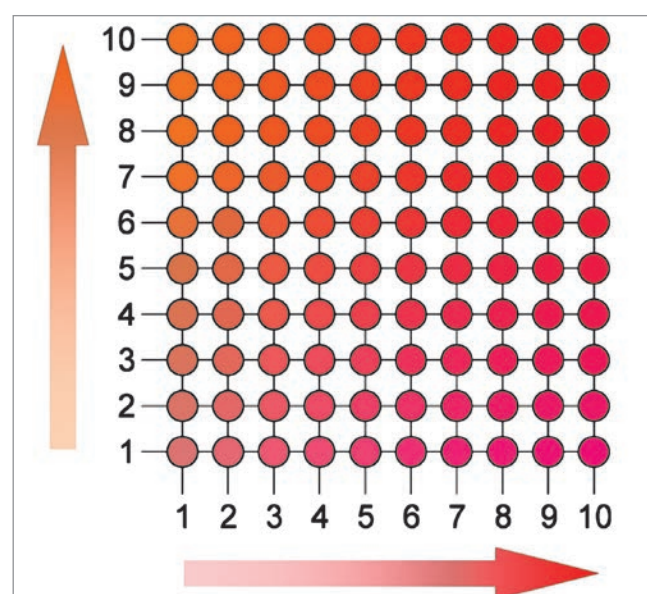


Рис. 1. Уникальные микросферы покрыты двумя флуоресцентными красителями различной интенсивности

Таблица. Аналиты, которые оцениваются в рамках теста VeriPsych™					
№ п/п	А-аналиты	№ п/п	В-Аналиты	№ п/п	С-Аналиты
1.	Кортизол	1.	Аполипопротеин А1	1.	Аполипопротеин В
2.	Гаптоглобин	2.	Нейротрофический фактор мозга (BDNF)	2.	Аполипопротеин А2
3.	Интерлейкин-10	3.	β_2 -Микроглобулин	3.	Аполипопротеин С1
4.	Альфа-1-антитрипсин	4.	Фетуин-А	4.	СА-125
5.	Аполипопротеин Н	5.	IgA	5.	Кальбиндин
6.	Карциноэмбриональный антиген	6.	Лютеинизирующий гормон	6.	CD5L
7.	Компонент системы комплемента С3	7.	Макрофагальный воспалительный белок 1 α (MIP-1 α)	7.	Рецептор эпидермального фактора роста (EGFR)
8.	Ферритин	8.	Простатическая кислая фосфатаза	8.	Фолликулостимулирующий гормон
9.	Интерлейкин-7	9.	Тестостерон	9.	IgM
10.	Trail-R3			10.	Рецептор интерлейкина-6
11.	Бета-целлюлин			11.	Интерлейкин-11
12.	Фактор роста соединительной ткани (CTGF)			12.	Интерлейкин-17
13.	Эндотелин			13.	Молекула повреждения почек-1 (KIM-1)
14.	Молекула клеточной адгезии (ICAM-1)			14.	Моноцитарный хемоаттрактантный белок-2 (MCP-2)
15.	MDC			15.	Матриксная металлопротеиназа-2 (MMP-2)
16.	MIF			16.	Пептид YY (PYY)
17.	Пролактин			17.	Тиреотропный гормон
18.	Амилоид сыворотки			18.	Трансферрин
19.	Сортилин			19.	Витронектин
20.	Тканевой ингибитор металлопротеиназы-1 (TIMP-1)			20.	Тромбопоэтин
21.	Рецептор к фактору некроза опухолей-2 (TNFR2)				
22.	Фактор роста эндотелия сосудов (VEGF)				

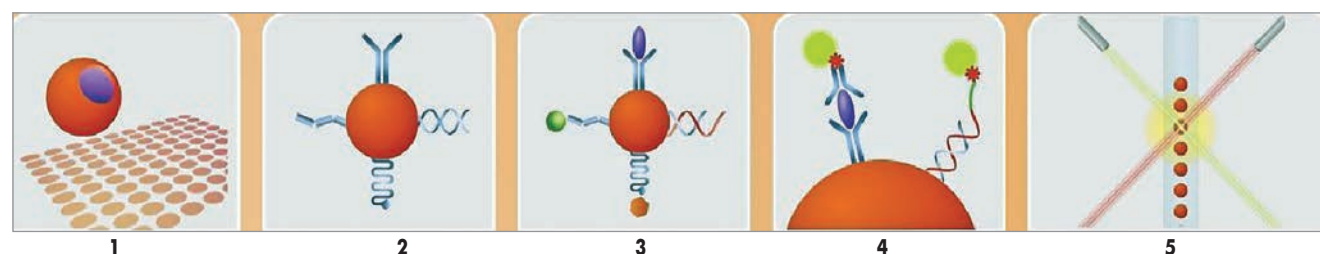


Рис. 2. Принцип технологии xMAP: 1 – окрашивание полистироловых микросфер (5,6 мкм) смесью двух флуорофоров; 2 – присоединение связывающих агентов к поверхности микросфер (субстраты, пептиды, олигонуклеотиды, рецепторы, антитела); 3 – добавление образца (кровь, сыворотка, плазма); 4 – внесение детектирующего агента и флуоресцентной метки (смесь стрептавидина и фикоэритрина); 5 – считывание результатов (проточный цитофлуориметр идентифицирует каждую индивидуальную микросферу и детектирует интенсивность сигнала)

Анализ осуществляется на специальном лазерном проточном цитофлуориметре, который регистрирует флуоресцентные сигналы. Красный лазер возбуждает молекулы красителей внутри микросферы и классифицирует микросферы, а зеленый лазер используется для количественной оценки исследуемого аналита. Выпускаемые в настоящее время системы позволяют проводить мультиплексный анализ – количественное определение до 100 различных аналитов за один анализ.

Биологический маркер VeriPsych™ для диагностики шизофрении

В качестве коммерческого теста для диагностики шизофрении в 2010 г. был представлен первый мультиплексный биологический маркер VeriPsych™, утвержденный CLIA (Clinical Laboratory Improvement Amendments). Это совместная разработка компаний Rules-Based Medicine (США) и Psynova Neurotech (Великобритания). В основе теста лежит определение с использованием мультиплексной технологии в сыворотке крови 51 аналита, специфично и достоверно коррелирующих с шизофренией. В процессе создания теста (работа длилась около 10 лет) ученые из Кембриджского университета под руководством профессора Sabine Bahn использовали образцы крови 572 больных шизофренией и 235 здоровых участников. Таким образом, исследователи проанализировали около 200 потенциальных биомаркеров шизофрении по отдельности и в комбинации, в результате

чего удалось определить связанные с шизофренией ($n=51$; табл.). Чувствительность и специфичность теста составляют 83%, его использование предполагает особый алгоритм расчета. «Если определение лишь одного показателя, а именно уровня глюкозы в крови, может подтвердить или опровергнуть наличие сахарного диабета, то для диагностики некоторых заболеваний, к которым относится шизофрения, требуется анализ нескольких десятков биомаркеров», – отметил один из создателей теста VeriPsych™ доктор Craig Benson.

«Психиатры и специалисты здравоохранения отреагировали на появление теста неоднозначно. Большинство согласилось с тем, что чувствительный и специфический тест, анализирующий показатели крови при психических заболеваниях, является важным шагом вперед, другие же скептически отнеслись к использованию нового метода в клинической практике. Критические замечания в основном касались того, что тест помогает различить больных шизофренией и здоровых людей, но не предназначен для дифференциальной диагностики шизофрении и других психических расстройств», – прокомментировал руководитель проекта профессор Sabine Bahn. Как сообщают разработчики теста VeriPsych™, следующая версия предоставит клиницистам возможность разграничить шизофрению и биполярные расстройства.

Список литературы находится в редакции.