

*Ж.И. Зубцова<sup>1,2</sup>, Е.Н. Савватеева<sup>2</sup>, Д.А. Зубцов<sup>1,2</sup>, С.Б. Поплетеева<sup>2</sup>, Р.А. Юрасов<sup>2</sup>,  
М.В. Цыбульская<sup>2</sup>, А.Ю. Рубина<sup>2</sup>*

<sup>1</sup> Московский физико-технический институт (Национальный исследовательский университет)

<sup>2</sup> Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта РАН

## Разработка многопараметрической тест-системы для диагностики онкологических заболеваний женской репродуктивной системы

На основе технологии гидрогелевых биочипов был разработан прототип диагностической тест-системы для одновременного количественного определения нескольких серологических онкомаркеров на биологическом микрочипе: альфа-фетопротеина, хорионического гонадотропина, ракового эмбрионального антигена, раковых антигенов СА125, СА15-3 и СА19-9. Данная панель онкомаркеров используется для диагностики наиболее распространенных заболеваний женской репродуктивной системы: рака молочной железы и рака яичников. В работе дана оценка аналитических характеристик разработанного прототипа тест-системы и показано, что тест-система на основе биочипов позволяет проводить определение онкомаркеров в диапазоне, необходимом для клинического анализа; при этом воспроизводимость и чувствительность метода удовлетворяют требованиям, предъявляемым к иммуноаналитическим тест-системам. Проведен сравнительный анализ результатов одновременного количественного определения шести онкомаркеров в образцах сывороток крови больных онкологическими заболеваниями и здоровых доноров, полученных на биочипах с данными, полученными в индивидуальном анализе каждого из онкомаркеров с помощью коммерческих ИФА-систем.

**Ключевые слова:** рак молочной железы, рак яичников, онкомаркеры, биологические микрочипы, многопараметрический иммуноанализ.

Последние статистические данные говорят о значительном росте заболеваемости женщин раком шейки матки, молочной железы и яичников как в нашей стране, так и во многих странах мира. Опухоли молочных желез, рак яичников и рак шейки матки входят в десятку самых распространенных видов рака, в том числе по смертности [1].

Снижение смертности от онкологических заболеваний может быть достигнуто за счет своевременной оценки состояния репродуктивной системы у женщин и правильного выбора эффективных средств лечения, что невозможно без ранней дифференциальной диагностики злокачественных изменений. Серологическая лабораторная диагностика опухолей основана на использовании специфических опухоле-ассоциированных маркеров. К таким онкомаркерам относится большая группа факторов различной природы: гормоны, ферменты, гликопротеины, липиды, метаболиты.

Идеальный опухолевый маркер должен обладать высокой специфичностью и чувствительностью в отношении определенного вида опухоли, однако большинство известных в настоящее время опухолевых маркеров не отвечает этим критериям. До сих пор не охарактеризован ни один опухолевый маркер, обладающий 100% специфичностью (не обнаруживающийся при доброкачественных заболеваниях у здоровых людей) и 100% чувствительностью (обязательно выявляемый даже на ранних стадиях развития опухоли) по отношению к какому-либо органу [2].

Как показали различные исследования, одновременное определение нескольких онкомаркеров существенно повышает эффективность скринингового анализа и увеличивает возможности дифференциальной диагностики онкозаболеваний [3].

Большинство иммунохимических методов позволяет выявлять содержание только одного маркера в одном клиническом образце, поэтому в настоящее время большие надежды в области ранней диагностики рака связывают с использованием мультиплексных систем, таких как биологические микрочипы. Биологические микрочипы, представляющие собой матрицы ( $M \times N$ )-элементов, содержащие биологические зонды (ДНК, РНК, олигонуклеотиды, белки, пептиды, олигосахариды, клетки и т.д.), позволяют проводить параллельный многопараметрический анализ исследуемого образца [4, 5].

К настоящему времени известны две группы опухолевых маркеров, наиболее значимых в диагностике злокачественных опухолей яичников: онкофетальные антигены (альфа-фетопротеин — АФП и хорионический гонадотропин человека — ХГЧ) и опухоль-ассоциированный антиген СА125. Онкофетальные антигены не являются специфичными к опухолевым клеткам, но их количественное определение можно использовать для оценки прогноза и ранней диагностики отдаленных метастазов. Маркер СА125 используют для мониторинга течения и эффективности терапии при различных типах рака яичников (серозные, эндометриальные, светлоклеточные) [6, 7]. Тест позволяет

выявить рецидив заболевания за 3-4 месяца до его клинического проявления.

Многочисленные исследования выявили ряд антигенов, ассоциированных с раком молочной железы (РМЖ). Главным маркером считают муциноподобный гликопротеин — СА15-3, который обладает достаточно высокой специфичностью [8–11]. Повышенный уровень этого маркера наблюдается примерно у 80% женщин с метастазирующим РМЖ, а рецидив сопровождается значительным повышением уровня СА15-3 задолго до клинических проявлений. Большинство опухолей молочной железы (62–70%) также сопровождаются экспрессией СА19-9, однако данную фенотипическую особенность сохраняет лишь небольшой процент раковых клеток [10].

Разработка диагностической тест-системы, основанной на проведении одновременного количественного определения концентрации нескольких онкомаркеров, уровень которых повышается при онкопатологиях женской репродуктивной системы с использованием технологии биологических микрочипов, является принципиально новым подходом не только для РФ, но и для мировой практики, поскольку коммерческих диагностикомов подобного класса в мире не существует.

Целью данной работы является создание на основе развиваемой в ИМБ РАН технологии биологических микрочипов (биочипов) прототипа многопараметрической диагностической тест-системы, позволяющей проводить одновременное количественное определение нескольких онкомаркеров в сыворотке крови (АФП, ХГЧ, РЭА, СА125, СА15-3 и СА19-9) для обнаружения и мониторинга терапии рака молочной железы и рака яичников.

Технология изготовления гидрогелевых биочипов основана на полимеризационной иммобилизации молекулярных зондов в ходе формирования гелевых ячеек микрочипа [12, 13, <http://www.biochip.ru/>]. Трехмерные гидрогелевые микрочипы, изготовленные по технологии, разработанной в Институте молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта РАН, позволяют сохранить структуру и биологические функции белковых молекул, которые нуждаются в гидрофильном окружении, максимально приближенном к естественным условиям их функционирования [5].

## I. Изготовление биочипов

Полимеризационную смесь, содержащую гелеобразующие мономеры на основе метакриламида, а также подлежащие иммобилизации белки наносят с помощью робота QArray («Genetix», Великобритания) в виде микрокапель объемом 0,1 нл на поверхность подложки (рис. 1). В качестве подложек использовали стеклянные слайды Corning 2947 Micro Slides (Corning Glass Works, США). Перед использованием стеклянные слайды обра-

батывали растворами NaOH, H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, промывали водой, затем погружали в раствор 1% Bind Silane (Amersham Pharmacia Biosciences, США) в этиловом спирте, отмывали в этиловом спирте, воде и высушивали. Полимеризацию гелевых ячеек проводили под УФ-лампой с максимумом излучения 350 нм (Sylvania GTE lamp, F15T 8/350 B1, Великобритания) в течение 50 мин при 20 °С в токе азота.



Рис. 1. Схема изготовления гидрогелевого микрочипа [14]

Для уменьшения неспецифических взаимодействий биочипы обрабатывали блокирующим буфером 1% раствора поливинилового спирта 50 кДа (Sigma, США) в фосфатно-солевом буфере в течение 1 ч, затем промывали дистиллированной водой.

Качество полученных биочипов проверяли в проходящем свете с помощью биочип-анализатора (ИМБ РАН), снабженного специальным программным обеспечением TestChip и QualityControl (ИМБ РАН). Готовые к использованию биочипы покрывали пластиковыми камерами объемом 130 мкл с двумя отверстиями для введения образца и хранили при +2... +8 °С.

Для проведения сэндвич-анализа для каждого маркера была выбрана пара моноклональных антител, не имеющих перекрестной реактивности с другими антителами, используемыми в анализе, и не взаимодействующих с другими определяемыми антигенами. При выборе пар антител для всех исследуемых онкомаркеров также учитывали форму калибровочных кривых, то есть графиков зависимости флуоресцентного сигнала, получаемого от гелевых элементов биочипа, содержащих иммобилизованные антитела, от концентрации соответствующего антигена в растворе. В результате выбирали пару антител, использование в анализе которой дает возможность получать калибровочную кривую, обладающую максимально выраженным линейным участком и имеющую максимальное соотношение значимого сигнала к «нулевому» сигналу, получаемому от ячеек с иммобилизованными антителами после их взаимодействия с проявляющимися антителами в отсутствие антигена.

В работе использовали следующие пары антител фирмы «Fujirebio Diagnostics» («SanAg», Швеция): моноклональные антитела против РЭА СЕА12-140-1 и СЕА12-140-10; против СА125 Ovk95, против СА19-9 С241. Моноклональные антитела против АФП — ХФР2 и ХФР4, против СА125 — Х-52, против СА15-3 — Х-19 и моноклональные антитела против  $\alpha$ -субъединицы ХГЧ — ХФ-1 и  $\beta$ -субъединицы ХГЧ — ХН-51 были приобретены у фирмы «Хема-Медика» (Россия). Антитела ХФ-1, ХФР4, СЕА12-140-1, Х-52, Х-19, С241 иммобилизовали в гелевых ячейках микрочипа. Антитела ХФР2, ХН-51, СЕА12-140-10, Ovk-95, Х-19, С241 использовали в качестве проявляющих антител. В работе использовали онкомаркеры АФП, ХГЧ, СА15-3, СА19-9 фирмы «Хема-Медика» (Россия), онкомаркеры РЭА, СА125 — фирмы «SanAg», Швеция.

## II. Калибровочные пробы и образцы сывороток

Для того чтобы правильно определить концентрацию онкомаркера в сыворотке крови, необходимо, чтобы анализируемое вещество в образце взаимодействовало с иммобилизованными на биочипе и проявляющими антителами в тех же условиях, что и в калибровочных пробах, поэтому калибровочные пробы для анализа шести онкомаркеров изготавливали на основе пулированной донорской сыворотки крови человека.

Аликвоты калибровочных проб и образцов сывороток крови были заморожены и хранились при  $-70^\circ\text{C}$ . При необходимости разведения сывороток с высокими концентрациями онкомаркеров использовали нулевую калибровочную пробу. Образцы сывороток крови были предоставлены ФГУ «Центральная клиническая больница с поликлиникой» Управления делами Президента Российской Федерации (Москва, Россия) и ГУ Российским научным центром хирургии имени академика Б.В. Петровского РАМН (Москва, Россия).

## III. Сэндвич-анализ онкомаркеров

Перед анализом биочипы, калибровочные пробы и образцы сыворотки крови выдерживали 30 мин при комнатной температуре. На биочип, находящийся под камерой, наносили 130 мкл образца сыворотки крови или калибровочную пробу. Камеры на биочипах заклеивали герметизирующей лентой. Биочипы инкубировали в течение 20 ч при  $37^\circ\text{C}$ . После инкубации с реакционных камер удаляли герметизирующую ленту и камеры. Биочип промывали дистиллированной водой и высушивали в токе воздуха.

На биочип наносили 50 мкл смеси проявляющих антител против шести онкомаркеров. Биочипы инкубировали в течение 1 ч при  $37^\circ\text{C}$ . После инкубации биочипы ополаскивали дистилли-

рованной водой и отмывали 30 мин в фосфатно-солевом буфере, содержащем 0,1% Tween-20, затем вновь ополаскивали водой и высушивали в токе воздуха, затем регистрировали флуоресцентные сигналы.

## IV. Флуоресцентные измерения

Флуоресцентные измерения проводили с использованием портативного флуоресцентного анализатора биочипов с возбуждением при помощи лазера (ИМБ, Москва) [15], снабженного компьютером и программным обеспечением для обработки флуоресцентных изображений ImaGeAssay (ИМБ, Москва). Измерения с флуоресцентным красителем цианиновым пятым (Cy5) проводили с использованием фильтров 650/670 нм (возбуждение / регистрация), время экспозиции 1 с.

Вычисление интенсивности флуоресценции каждого гелевого элемента биочипа производили следующим образом: изображение каждой ячейки окружалось концентрической окружностью. Флуоресцентный сигнал  $F$  определялся согласно формуле

$$F = \frac{I_m - B_{d.c.}}{B_{r.g.} - B_{d.c.}}, \quad (1)$$

где  $I_m$  — медианный флуоресцентный сигнал, рассчитанный для ячейки микрочипа. Для того чтобы учесть пространственную неоднородность интенсивности источника излучения, биочип заменяли красным стеклом с такими же геометрическими размерами. Получали фоновый сигнал от участков, соответствующих участкам изображения внутри концентрических окружностей ( $B_{r.g.}$ ). Для учета шумов микроскопа флуоресцентный и фоновый сигналы корректировали шумовым сигналом  $B_{d.c.}$ , измеренным при нулевой интенсивности источника.

Интенсивность флуоресценции от иммобилизованных антител и антигенов рассчитывали как медианный сигнал от четырех одинаковых гелевых элементов.

## V. Результаты и обсуждение

Нами был создан биочип для количественного иммуноанализа шести онкомаркеров, содержащий гелевые элементы, диаметром 120 мкм и объемом 0,1 нл (по четыре одинаковых элемента в ряду) с иммобилизованными моноклональными антителами ко всем анализируемым онкомаркерам (АФП, РЭА, ХГЧ, СА125, СА15-3 и СА19-9) и ячейки, не содержащие биоматериала (пустые гели) для контроля неспецифической сорбции. По краям биочипа расположены маркерные гелевые ячейки (М), содержащие иммобилизованный флуоресцентный краситель Cy5, для ориентации биочипа при проведении измерений. Структура биочипа приведена на рис. 2.

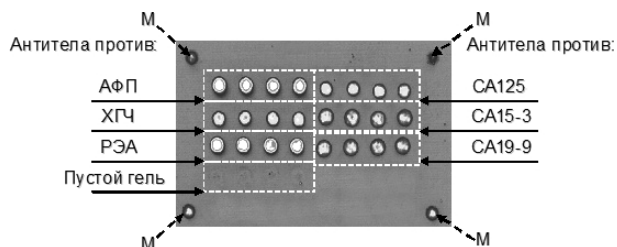


Рис. 2. Биочип для проведения одновременного количественного иммуноанализа шести онкомаркеров (АФП, ХГЧ, РЭА, СА125, СА15-3, СА19-9). Флуоресцентное изображение после иммуноанализа. По краям биочипа расположены маркерные гелевые ячейки (М), содержащие иммобилизованный флуоресцентный краситель Су5, для ориентации биочипа при проведении измерений

Для количественного определения концентрации каждого антигена в исследуемом образце необходимо получить соответствующую калибровочную кривую. Для упрощения процедуры ана-

лиза калибровочные пробы содержали одновременно все шесть анализируемых онкомаркеров в диапазонах концентраций, необходимых для проведения клинического анализа в сыворотке крови, при этом нулевая калибровочная проба не содержала онкомаркеров. В качестве проявляющих антител использовали смесь антител против всех шести онкомаркеров, меченных флуоресцентным красителем Су5. После завершения анализа при помощи специального программного обеспечения «ImaGelAssay», разработанного в ИМБ РАН, на основе флуоресцентных изображений биочипов, полученных после инкубации с калибровочными пробами, получали одновременно шесть калибровочных кривых, по одной для каждого из анализируемых онкомаркеров. Как видно из рис. 3, в выбранном диапазоне концентраций величина флуоресцентного сигнала от ячеек с иммобилизованными антителами прямо пропорциональна концентрации соответствующего антигена в образце.

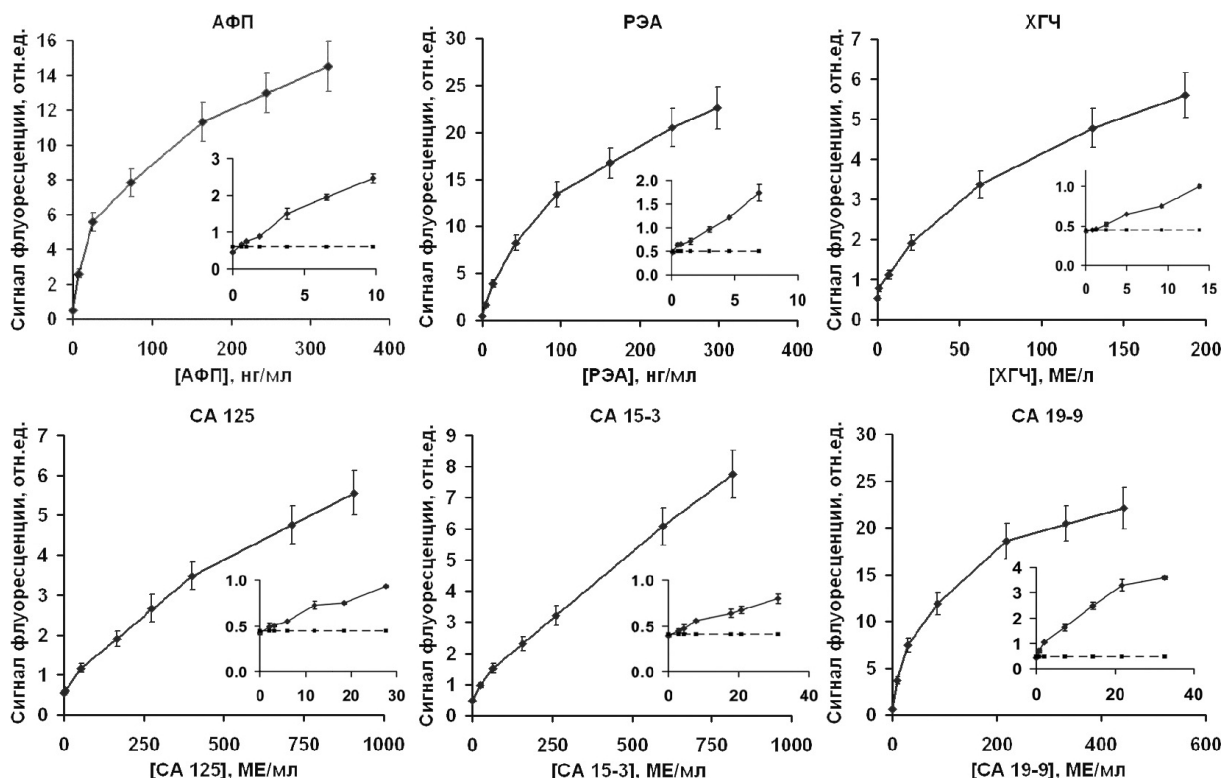


Рис. 3. «Сэндвич»-иммуноанализ АФП, РЭА, ХГЧ, СА 125, СА 15-3, СА 19-9. Каждая точка на калибровочных графиках представляет собой среднее арифметическое значение из десяти измерений, проведенных в одинаковых условиях. На вставках приведены начальные участки соответствующих кривых, используемые для определения аналитической чувствительности анализа для каждого онкомаркера. Вертикальными отрезками показаны величины стандартных отклонений. Горизонтальными прямыми обозначены значения флуоресценции, превышающие на два стандартных отклонения флуоресцентный сигнал от нулевой калибровочной пробы

Неизвестную концентрацию онкомаркеров в сыворотке крови определяли по соответствующей калибровочной кривой, используя сигналы от ячеек с иммобилизованными антителами. Программа «ImaGelAssay» автоматически определяла концентрации АФП, ХГЧ, РЭА, СА125, СА15-3, СА19-9 в анализируемых образцах сывороток крови пациента.

Для оценки воспроизводимости и аналитической чувствительности была проведена серия экспериментов на семидесяти биочипах (по десять калибровочных кривых для каждого из шести онкомаркеров).

Величину «коэффициент вариации» (КВ) для каждой точки калибровочной кривой каждого ан-



тигена определяли по формуле

$$KB = \frac{100\sigma(F)}{\bar{F}}, \quad (2)$$

где KB — коэффициент вариации, %;  $\sigma(F)$  — среднее квадратичное отклонение для флуоресцентного сигнала

$$\sigma(F) = \sqrt{\frac{1}{N-1} \sum_{i=1}^{N-1} (F_i - \bar{F})^2}, \quad (3)$$

где  $F_i$  — значение каждого флуоресцентного сигнала для данной точки калибровочной кривой данного антигена;  $\bar{F}$  — среднее арифметическое

значение флуоресцентного сигнала для данной точки калибровочной кривой данного антигена;  $N$  — число измерений. Коэффициент вариации для различных концентраций определяемых антигенов не превышал 15%.

Аналитическую чувствительность, то есть наименьшую определяемую концентрацию, для каждого онкомаркера рассчитывали как концентрацию, соответствующую значению флуоресценции, превышающему не менее чем на два стандартных отклонения флуоресцентный сигнал измеренной 10 раз нулевой калибровочной пробы ( $\bar{F}_0 + 2 SD$ ). Полученные значения приведены в табл. 1.

Т а б л и ц а 1

Чувствительность анализа онкомаркеров на гидрогелевых биочипах и в коммерческих тест-системах

Онкомаркер	Концентрация в крови в норме	На биочипах	Коммерческих тестов
АФП	$\leq 10$ нг/мл (у мужчин и небеременных женщин)	0,7	0,5 (Canag)
ХГЧ	$\leq 10$ МЕ/л (у мужчин и небеременных женщин)	2,0	0,8 (DSL)
РЭА	$\leq 5$ нг/мл ( $< 10$ нг/мл для курящих)	0,7	0,5 (Canag)
СА125	$\leq 28$ МЕ/мл (у небеременных женщин)	1,7	1,5 (Canag)
СА15-3	$\leq 35$ МЕ/мл	7,0	1 (Canag)
СА19-9	$\leq 37$ МЕ/мл	0,4	1 (Canag)

Как видно из приведенных данных, значения чувствительности анализа на биочипах лежат в диапазоне, не превышающем значений верхней границы нормы [16], что позволяет рассматривать разработанный прототип тест-системы как перспективный инструмент, пригодный для клинического применения.

Разработанный метод количественного анализа шести онкомаркеров в сыворотке крови был апробирован на образцах 585 сыворотках крови больных онкологическими заболеваниями и здоровых доноров.

Была проведена сравнительная оценка результатов, получаемых с помощью разработанного прототипа тест-системы на биочипе с традиционными диагностическими системами. Для этого проводили корреляционный анализ данных, получаемых при одновременном количественном иммуноанализе шести онкомаркеров (АФП, РЭА, ХГЧ, СА125, СА15-3 и СА19-9) с помощью прототипа тест-системы, и данных, полученных при определении содержания каждого из маркеров в индивидуальном анализе тех же сывороток с помощью стандартных и хорошо зарекомендовавших себя диагностических тест-систем: «Fujirebio Diagnostics (CanAg)», Швеция и фирмы DSL, США (для ХГЧ).

Как видно из рис. 4, результаты одновременно определения шести онкомаркеров в сыворотке крови человека с помощью прототипа тест-системы хорошо коррелируют с результатами, полученными при индивидуальном определении концентрации каждого из онкомаркеров с использованием стандартных тест-систем, основанных на

иммуноферментном анализе (ИФА-системы). Результаты корреляционного анализа представлены в табл. 2.

Величину коэффициента корреляции вычисляли по формуле для линейной корреляции Пирсона:

$$k_{xy} = \frac{\sum_{i=1}^n [(x_i - \bar{x})(y_i - \bar{y})]}{(n-1)\sigma_x\sigma_y}, \quad (4)$$

где  $\bar{x}, \bar{y}$  — средние значения измеряемых концентраций онкомаркеров,  $x_i, y_i$  — сравниваемые концентрации,  $n$  — число сравниваемых наблюдений,  $\sigma_x, \sigma_y$  — стандартные отклонения в сопоставляемых рядах рассчитываются по формуле (3).

Полученный коэффициент корреляции проверяется на значимость с помощью таблицы критических значений. Для этого вычисляем количество степеней свободы

$$f = n - 2 \quad (5)$$

и на пересечении с необходимым уровнем значимости находим критическое значение коэффициента. Если коэффициент корреляции больше критического значения, то уровень значимости правильный [17]. Получили, что для всех измерений уровень значимости  $p < 0,01$ .

В результате проведенных испытаний было показано, что разработанный прототип тест-системы позволяет адекватно определять концентрацию шести онкомаркеров одновременно в одном образце сыворотки крови человека на биочипе и может быть предложен для использования в клинической практике.

Дальнейшее внедрение разработанного нами прототипа диагностической тест-системы позво-

лит не только проводить раннюю (до проявления клинических проявлений) диагностику злокачественных новообразований органов репродуктивной системы у женщин, но и определять стра-

тегию противораковой терапии, и осуществлять контроль над ее эффективностью, а также регистрировать возможные метастатические изменения.

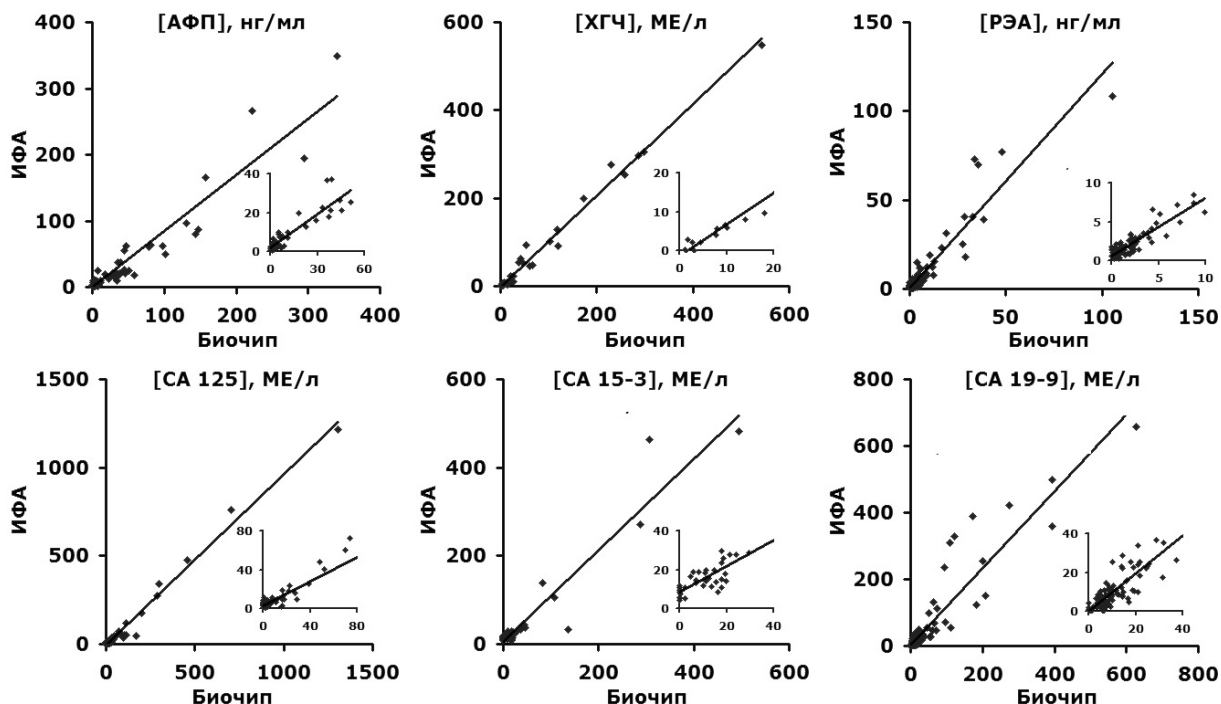


Рис. 4. Результат корреляционного анализа концентраций шести онкомаркеров, полученных после проведения одновременного количественного сэндвич-иммуноанализа на биочипах, и их концентраций, полученных в индивидуальном анализе с использованием коммерческих ИФА-систем. Приведенные прямые соответствуют наилучшей линейной аппроксимации.

Т а б л и ц а 2

#### Корреляционный анализ онкомаркеров на биочипе

Онкомаркер	Коэффициент корреляции. Биочип / ИФА	Количество измерений
АФП	0.91	122
ХГЧ	0.99	41
РЭА	0.95	327
СА 125	0.97	118
СА 15-3	0.84	90
СА 19-9	0.87	223

#### Литература

1. Jemal A., Murray T., Ward E., Samuels A., Tiwari R.C., Ghafoor A., Feuer E.J., Thun M.J. Cancer statistics, 2005 // *CA Cancer J. Clin.* — 2005. — V. 55, № 1. — P. 10–30.

2. Marwada P., Wang W., Wagner P.D., Srivastava S. Biomarkers in molecular medicine: cancer detection and diagnosis // *Biotechniques.* — 2005. — V. 38. — P. 9–15.

3. Cordero O.J., De Chiara L., Lemos-Gonzalez Y., Paez de la Cadena M., Rodriguez-Berrocal F.J. How the measurements of a few serum markers can be combined to enhance their clinical values in the management of cancer // *Anticancer Res.* — 2008. — V. 28, N. 4C. — P. 2333–2341.

4. Mikhailovich V., Gryadunov D., Kolchinsky A., Makarov A.A., Zasedatelev A. DNA microarrays in the clinic: infectious diseases // *Bioessays.* — 2008. — V. 30. — P. 673–82.

5. Rubina A. Yu., Kolchinsky A., Makarov A.A., Zasedatelev A.S. Why 3D? Gel-Based Microarrays in Proteomics // *Proteomics.* — 2008. — V. 8. — P. 817–831.

6. Кишкун А.А. Иммунологические и серологические исследования в клинической практике. — М.: ООО «Медицинское информационное агентство», 2006. — Вып. 536. — С. 239–271.

7. Сергеева Н.С., Ермошина Н.В., Мишурникова М.П. Использование опухолеассоциированных маркеров для диагностики и контроля за эффективностью терапии у больных с распространенным раком яичников. — М.: МНИОИ им. П.А. Герцена, 2002.

8. Лукьянов П.А., Журавлева Н.В. Современная гликобиология и медицина // Вестник ДВО РАН. — 2004. — № 3. — С. 24–34.

9. Алексеева М.Л., Гусарова Е.В., Муллабаева С.М., Понкратова Т.С. Онкомаркеры, их характеристика и некоторые аспекты клинико-диагностического использования // Проблемы репродукции. — 2005. — Вып. 3. — С. 65–79.

10. Джубалиева С.К., Пугачев К.К., Хаманн Т.Л., Мустафин Ч.К., Катков А.Б. Клинико-диагностическое значение изучения уровня высокомолекулярного муцина СА19-9 в сыворотке крови больных с заболеваниями молочной железы // Хирургия. — 2009. — Вып. 8. — С. 34–37.

11. Кушинский Н.Е. Возможности, неудачи и перспективы исследования опухолевых маркеров в современной онкологической клинике. Ч. 2 // Клиническая лабораторная диагностика. — 1999. — № 4. — С. 25–32.

12. Мирзабеков А.Д., Рубина А.Ю., Паньков С.В. Способ полимеризационной иммобилизации биологических макромолекул и композиция для его осуществления // Патент РФ № 2216547, дата приоритета 16.10.2001. — С. 14.

13. Rubina A.Y., Dementieva E.I., Stomakhin A.A., Darii E.L., Pan'kov S.V.,

Barsky V.E., Ivanov S.M., Konovalova E.V., Mirzabekov A.D. Hydrogel-based protein microchips: manufacturing, properties, and applications // BioTechniques. — 2003. — V. 34. — P. 1008–1022.

14. Грядунов Д.А., Зименков Д.В., Михайлович В.М., Наседкина Т.В., Дементьева Е.И., Рубина А.Ю., Паньков С.В., Барский В.Е., Заседателев А.С. Технология гидрогелевых биочипов и ее применение в медицинской лабораторной диагностике // Лаборатория. — 2009. — Т. 3, вып. 11. — С. 10–14.

15. Barsky V., Perov A., Tokalov S., Chudinov A., Kreindlin E., Sharonov A., Kotova E., Mirzabekov A. Fluorescence data analysis on gel-based biochips // J. Biomol. Screening. — 2002. — V. 7. — P. 247–257.

16. Карпищенко А.И., Антонов В.Г., Бутенко А.Б., Белозвостов А.С., Шелепина Е.П. Онкомаркеры и их диагностическое значение. — СПб.: ВМедА, 1999. — С. 47.

17. Джонсон Н., Лион Ф. Статистика и планирование эксперимента в технике и науке. Методы обработки данных. — М.: Мир, 1980.

Поступила в редакцию 13.07.2010.