

УДК 577.15.08

НЕИНВАЗИВНАЯ ДИАГНОСТИКА РАКА ПОЧКИ С ПОМОЩЬЮ УЛЬТРАЧУВСТВИТЕЛЬНОЙ ИММУНОДЕТЕКЦИИ РАКОВО-СЕТЧАТОЧНЫХ АНТИГЕНОВ

© 2022 Ю.М. Шляпников^{1*}, Е.А. Малахова¹, Н.В. Потолдыкова²,
Я.А. Светочева², А.З. Винаров², Д.В. Зинченко³, Е.Ю. Зерний⁴,
А.А. Замятнин мл.^{4,5,6,7}, Е.А. Шляпкинова¹

¹ ФГБУН Институт теоретической и экспериментальной биофизики Российской академии наук,
142290 Пушкино, Московская обл., Россия; электронная почта: yuri.shlyapnikov@gmail.com

² Институт урологии и репродуктивного здоровья человека,
Первый Московский государственный медицинский университет имени И.М. Сеченова
Министерства здравоохранения Российской Федерации (Сеченовский Университет),
119991 Москва, Россия; электронная почта: avinarov@mail.ru

³ ФГБУН Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова
Российской академии наук, 117437 Москва, Россия; электронная почта: zdv@bibch.ru

⁴ НИИ физико-химической биологии имени А.Н. Белозерского,
Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова,
119992 Москва, Россия; электронная почта: zerni@belozersky.msu.ru

⁵ Институт молекулярной медицины,
Первый Московский государственный медицинский университет имени И.М. Сеченова
Министерства здравоохранения Российской Федерации (Сеченовский Университет),
119991 Москва, Россия; электронная почта: zamyat@belozersky.msu.ru

⁶ Научно-технологический университет «Сириус»,
354340 Краснодарский край, федеральная территория «Сириус», Россия

⁷ Университет Суррея, факультет здоровья и медицинских наук, Гилфорд, Великобритания

Поступила в редакцию 28.04.2022

После доработки 06.06.2022

Принята к публикации 15.06.2022

Почечно-клеточный рак является наиболее распространенным урологическим злокачественным новообразованием с высокой летальностью и низким уровнем выявляемости. Одним из подходов для улучшения диагностики может быть поиск новых неинвазивных биомаркеров, представленных в жидкой биопсии, и более чувствительных методов их детекции. Известно, что раково-сетчаточные антигены aberrантно экспрессируются в злокачественных опухолях и присутствуют в жидкой биопсии в крайне низких концентрациях. С помощью разработанного нами мультиплексного иммуноанализа с пределом детектирования 0,1 пг/мл мы исследовали мочу и сыворотку 89 больных почечно-клеточным раком и 50 неонкологических пациентов на присутствие раково-сетчаточных антигенов: аррестина, рековерина, родопсинкиназы и трансдучина. Для оценки различий между почечно-клеточным раком и контролем использовали критерий χ^2 . Результаты показали высокую диагностическую эффективность комбинации аррестина и рековерина: при пороге 0,1 пг/мл чувствительность составила 96%, специфичность – 92%, AUC = 0,96 (95%-ный доверительный интервал 0,93–0,99). Через 7 дней после нефрэктомии концентрации антигенов вернулись к уровням, характерным для контрольной группы. Таким образом, комбинация аррестина с рековерином может служить диагностическим неинвазивным мочевым биомаркером почечно-клеточного рака.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: раково-сетчаточные антигены, почечно-клеточный рак, иммуноанализ, магнитные частицы.

DOI: 10.31857/S0320972522070041, EDN: AVPWKD

Принятые сокращения: ДИ – доверительный интервал; ПКР – почечно-клеточный рак; AUC – площадь под ROC-кривой; CAIX – карбоангидраза IX; RKIP – белок-ингибитор Raf-киназы; PLIN2 – перилиптин-2.

* Адресат для корреспонденции.

ВВЕДЕНИЕ

Почечно-клеточная карцинома (почечно-клеточный рак, ПКР) является наиболее распространенным урологическим злокачественным новообразованием с высокой смертностью. Существующие методы диагностики, компьютерная (КТ) или магнитно-резонансная томография (МРТ) с контрастным усилением и даже ультразвуковое исследование (УЗИ), обладают достаточно высокой диагностической точностью. Тем не менее эти методы не всегда позволяют дифференцировать доброкачественные опухоли почки. Иногда пациенты не готовы получать, пусть и небольшую, лучевую нагрузку при КТ, если при УЗИ возникли подозрения. Кроме того, лучевые методы не всегда позволяют проводить контроль за системной таргетной или иммунотерапией, за радикальностью удаления опухоли или её разрушения при криоабляции и т.д. Поэтому для получения дополнительных диагностических возможностей стали уделять внимание анализу различных биомаркеров.

В настоящее время в качестве диагностических, предиктивных или прогностических биомаркеров ПКР рассматриваются белковые маркеры, специфичные для опухолевой ткани [1–6], сигнатуры экспрессии генов [6–8] и тканевой экспрессии микроРНК [14, 15], мутации генов [9–13] и др. Очевидно, что молекулярные биомаркеры ПКР, представленные в жидкой биопсии, предпочтительнее полученных из опухолевой ткани ввиду неинвазивной процедуры взятия образцов. Удивительно, но анализ сыворотки крови или мочи при диагностике ПКР встречается в литературе гораздо реже, чем при других злокачественных новообразованиях [16]. В частности, крайне мало данных о белках крови, используемых в качестве диагностических и прогностических биомаркеров ПКР [17–19]. Наиболее перспективными кажутся белковые мочевые маркеры, поскольку моча обычно содержит намного меньше общего белка, чем сыворотка, и образцы для анализа легко получить. Кроме того, учитывая, что при ПКР моча находится в непосредственном контакте с опухолью, можно ожидать от таких биомаркеров повышенной эффективности.

На сегодняшний день биомаркеры рака мочевыводящих путей подробно описаны в книге Дакубо [20] и в недавно опубликованных обзорах, например, в работе [21]. Из многочисленных мочевых биомаркеров аквапорин-1 с перилипином-2 (PLIN2), карбоангидраза IX (CAIX), белок, ингибирующий Raf-киназу (RKIP), белок ядерного матрикса-22,

белок 14-3-3 β/α и липокалин, ассоциированный с нейтрофильной желатинозой, считаются наиболее перспективными в диагностике рака почки. Для детекции мочевых биомаркеров используют различные аналитические методы, и их характеристикам в последнее время уделяют повышенное внимание [21]. В большинстве случаев применяют наборы для ИФА. Однако для повышения чувствительности в ряде случаев используют Вестерн-блоттинг, например, для обнаружения PLIN2 [22, 23]. В дальнейшей работе Hu et al. показали, что PLIN2 в моче может быть более надежно обнаружен с помощью биоплазмонного анализа на бумаге [24]. Для идентификации RKIP была использована масс-спектрометрия [25]. В дополнение к упомянутым маркерам, которые проходят валидацию, с помощью других методов, например, жидкостной хроматографии в сочетании с масс-спектрометрией в моче были обнаружены белки, также классифицированные как биомаркеры ПКР [26]. К сожалению, несмотря на некоторые достижения, ни один из этих подходов до сих пор не апробирован для применения в клинической практике. Некоторые биомаркеры не прошли валидацию из-за низкой чувствительности или специфичности, несоответствия в дизайне исследования или вариабельности анализа.

Одним из путей решения этих проблем является поиск новых надежных биомаркеров с использованием высокочувствительных технологий [27]. Как было показано ранее, в злокачественных опухолях aberrантно экспрессируется ряд белков, специфичных для иммунопривилегированных зон, таких как фоторецепторные белки (рековерин, аррестин, трансдуцин, родопсинкиназа и др.) [28–31]. Известно, что аутоантитела против рековерина, аррестина, трансдуцина и родопсина иногда обнаруживаются в сыворотках крови пациентов с меланомо-ассоциированным синдромом ретинопатии [30–32]. Однако работ по выявлению раково-сетчаточных антигенов в жидкой биопсии больных ПКР, насколько нам известно, на настоящий момент не опубликовано. Основываясь на идее о том, что использование высокочувствительных технологий может помочь в поиске новых надежных биомаркеров, мы сосредоточились на раково-сетчаточных антигенах, которые ранее не рассматривались в качестве биомаркеров ПКР в моче или сыворотке крови. Целью нашего исследования являлась проверка гипотезы о том, что низкие концентрации раково-сетчаточных антигенов в жидкой биопсии могут являться перспективными диагностическими и предик-

тивными биомаркерами ПКР. В данной работе мы модифицировали метод иммуноанализа на микрочипах с детекцией магнитными частицами, который ранее показал ультравысокую чувствительность при определении широкого спектра аналитов [33–36], и использовали его для обнаружения четырех антигенов, аррестина, рековерина, родопсинкиназы и трансдуцина, в моче и сыворотке пациентов с ПКР и людей без онкологических заболеваний.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Материалы. Реагенты и мембрана из регенерированной целлюлозы (толщина 40 мкм) приобретены в «Sigma-Aldrich» (США). Карбоксилированные магнитные частицы (1 мкм, Dynabeads MyOne) приобретены в «Invitrogen» (США). Получение рекомбинантных антигенов и антител описано в Приложении.

Пациенты и образцы. Исследования проводились в соответствии с Хельсинкской декларацией 1975 г., пересмотренной в 2008 г., и одобрены Этическим комитетом Сеченовского университета (№10-18; 17/11/2018). Предварительно от всех пациентов было получено письменное согласие на участие в исследовании. Сбор образцов мочи проводился в Институте

урологии и репродуктивного здоровья Сеченовского университета в 2019–2021 гг. Диагноз ПКР был подтвержден гистологическим исследованием образцов ткани, полученных в ходе оперативного лечения. Характеристики пациентов представлены в табл. 1. У пациентов с pT3–pT4 выполняли регионарную лимфаденэктомию и оценивали наличие поражения лимфатических узлов. Образцы мочи, сыворотки и опухолевой ткани хранили при –80 °С.

Проведение иммуноанализа. Процедура изготовления белковых микрочипов описана в Приложении. Микрочипы помещали в пробирки с образцом (1–1,5 мл) и инкубировали в течение ночи при 4 °С при вращении со скоростью 20 об./мин. Микрочип промывали водой и фиксировали в проточной ячейке, описанной ранее [27], под которую устанавливали магнит. Суспензию магнитных частиц, конъюгированных с антителами к аррестину, рековерину, трансдуцину и родопсинкиназе, с общей концентрацией $5 \times 10^{-4}\%$ прокачивали через ячейку в течение 2–3 мин со скоростью 10 мкл/мин. Изображения микрочипа получали с помощью оптического микроскопа с темнопольным осветителем.

Статистическая обработка результатов. Изображения микрочипов обрабатывали, как описано в [19, 20] и в Приложении.

Таблица 1. Характеристики пациентов, участвовавших в исследовании

Характеристики		ПКР	Контроль
Общее число пациентов		89	50
Средний возраст (диапазон), годы		59 (31–88)	66 (42–82)
Пол	мужской	52	31
	женский	37	19
Тип опухоли	светлоклеточный рак	68	н/п
	хромофобный рак	6	
	папиллярный рак (тип 1 + тип 2)	14	
	дефицит сукцинат-дегидрогеназы	1	
Стадия опухоли	T1a	53	н/п
	T1b	22	
	T2	3	
	T3	10	
	T4	1	

Примечание. В контрольной группе 25 пациентов имели диагноз мочекаменная болезнь, 18 – доброкачественная гиперплазия предстательной железы, 3 – стриктура уретры, 3 – гидронефроз и 1 – кисты почки. н/п – не применимо.

Пустое пространство вокруг пятен использо- вали для расчета фона. Типичные фоновые значения варьировались в диапазоне 0–500 и 0–1000 частиц/мм² для мочи и сыворотки со- ответственно. Поскольку площадь пятна со- ставляла $(2,0 \pm 0,5) \times 10^4$ мкм², эти значения соответствуют 0–10 и 0–20 частиц на пятно. Для построения калибровки (рис. 1) использо- вали пределы погрешности $2 \times$ (стандартное отклонение сигнала). Анализ считали положи- тельным, если значение сигнала превышало (среднее значение фона) + $2,5 \times$ (стандартное отклонение фона). Для оценки различий между ПКР и контрольной группой использовали тест χ^2 . Для расчета доверительных интервалов (ДИ) значений площади под кривой (AUC) использовали бинормальную модель [37]. Для концентраций раково-сетчаточных антигенов в моче рассчитывали коэффициенты корреляции Спирмена. Статистическая обработка данных проводилась в программном пакете Origin Pro 2018.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Характеристика пациентов, включенных в исследование. Количество участвующих паци- ентов было выбрано как минимум таким же,

как обычно принято в подобных исследовани- ях [23, 25]. В общей сложности были обследо- ваны и включены в исследование 89 пациентов с ПКР (табл. 1): 68 пациентов со светлоклеточ- ным раком, 6 – с хромофобным, 14 – с папил- лярным (типы 1/2) и 1 – с дефицитом СДГ, а также 50 контрольных пациентов с мочекамен- ной болезнью, доброкачественной гиперплази- ей предстательной железы, простыми кистами почек, стриктурой уретры и гидронефрозом.

Мультиплексный ультрачувствительный им- муноанализ на раково-сетчаточные антигены. Из списка известных раково-сетчаточных антиге- нов [6] были выбраны четыре: аррестин, реко- верин, трансдуцин и родопсинкиназа. Для раз- работки «сэндвич»-иммуноанализа отбирали пары антител. Подробности приведены в При- ложении. Микрочипы изготавливали путём электрораспыления связывающих антител на мембрану из регенерированной целлюлозы по схеме, представленной на рис. 1, а. Ультравы- сокую чувствительность анализа обеспечивает детекция связанных на поверхности микрочи- па аналитов магнитными частицами, которые хорошо видны в микроскопе с темнопольным осветителем (рис. 1, б). Микрочипы обеспечи- вают безопасное применение в потенциально опасных биологических образцах, при этом используемое оборудование не контактирует

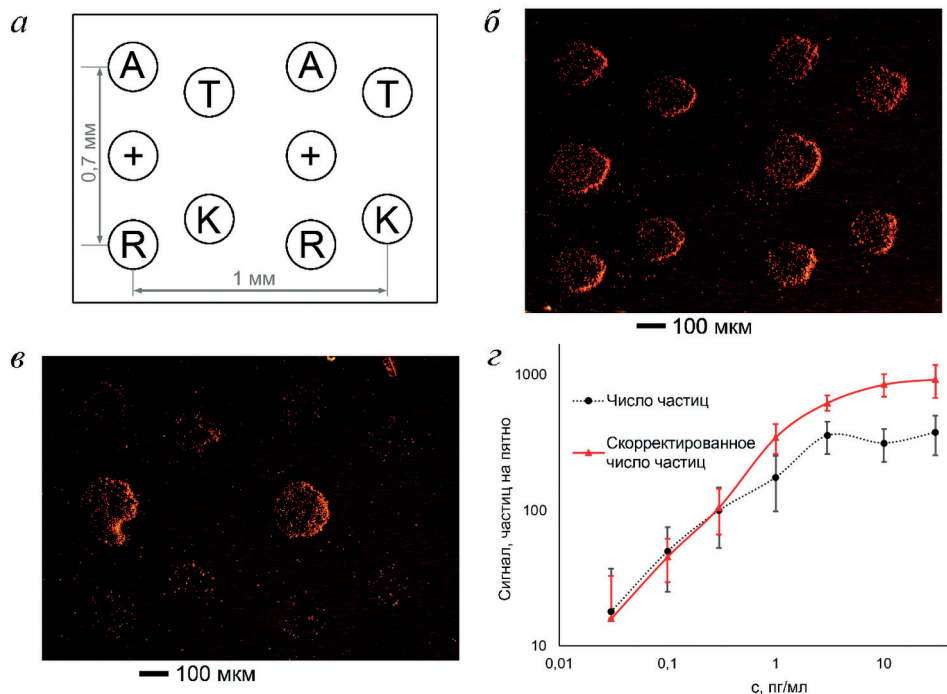


Рис. 1. а – Дизайн микрочипа, используемого в иммуноанализе. А, R, К и Т обозначают пятна антител, специфичных к аррестину, рековерину, родопсинкиназе и трансдуцину соответственно; знак + означает положительный контроль – пятно рекомбинантного рековерина; б, в – изображения микрочипов, полученные при одновременном иммуноанализе 0,1 нг/мл (б) и 0,1 пг/мл (в) каждого из четырех аналитов; г – калибровочные кривые, общие для всех аналитов, основанные на методе расчета сигнала по количеству частиц в пятне (пунктирная черная кривая) и по усовершенствованной методике (сплошная красная кривая)

с образцом. Значение предела детектирования 0,1 пг/мл было достигнуто для всех четырёх аналитов (рис. 1, *в*). Чтобы уменьшить большие вариации сигнала (рис. 1, *з*), была введена коррекция, описанная в Приложении, которая позволила также увеличить динамический диапазон на два порядка (рис. 1, *з* и рис. Д1 в Приложении). Общая калибровочная кривая для всех аналитов показана на рис. 1, *з* (черная кривая), а статистически неразличимые кривые для отдельных антигенов приведены на рис. Д2 в Приложении. Таким образом, мы разработали способ, который может оценивать концентрации четырех антигенов в диапазоне 0,1–10 пг/мл с точностью полпорядка.

Обнаружение раково-сетчаточных антигенов в моче и сыворотке больных ПКР и контрольной группы. Мы сравнили содержание раково-сетчаточных антигенов в образцах сыворотки и мочи больных ПКР, собранных до нефрэктомии, с контрольной группой. После анализа сыворотки крови от 25 пациентов с ПКР и 15 контрольных пациентов стало ясно, что ни один из использованных биомаркеров не обладает предсказательной силой. Соответствующие кривые ROC, представленные на рис. Д3 в Приложении, дают значение AUC $0,5 \pm 0,1$. Вследствие чего анализы сыворотки крови больных больше не проводились.

Мочевые биомаркеры оказались более эффективными, и для них было собрано больше данных. Для оценки предварительных значе-

ний их эффективности использовали образцы мочи 59 больных ПКР и 50 контрольных пациентов. Репрезентативные примеры изображений микрочипов представлены на рис. 2. Расчетные значения AUC для родопсинкиназы и трансдуцина составили 0,65 (95% ДИ 0,55–0,76) и 0,64 (95% ДИ 0,54–0,75) соответственно (рис. 3, *а*). Учитывая то, что аррестин и рековерин показали более высокую эффективность, в их случае было дополнительно проанализировано 30 образцов мочи пациентов с ПКР, так что общее количество образцов составило 89. Окончательные оценки AUC для аррестина и рековерина составили 0,93 (95% ДИ 0,89–0,97) и 0,82 (95% ДИ 0,75–0,89). Гистограммы, показывающие распределение содержания антигенов в образцах мочи при ПКР и контролях, представлены на рис. 3, *б*. Общие результаты анализа образцов мочи и сыворотки, по которым были оценены значения AUC, приведены в табл. Д1 (пациенты с ПКР) и Д2 (контрольная группа) в Приложении. Недостаточное количество точек на кривых ROC на рис. 3, *а* и рис. Д3 в Приложении связано с полуколичественным характером нашего анализа, при котором доступны только пять пороговых значений: 0,1, 0,3, 1, 3 и 10 пг/мл, как обсуждалось выше. При пороге 0,1 пг/мл аррестин показал чувствительность 89% и специфичность 94%, а рековерин – чувствительность 66% и специфичность 96%. Наилучшие результаты были достигнуты при использовании комбинации аррестина с

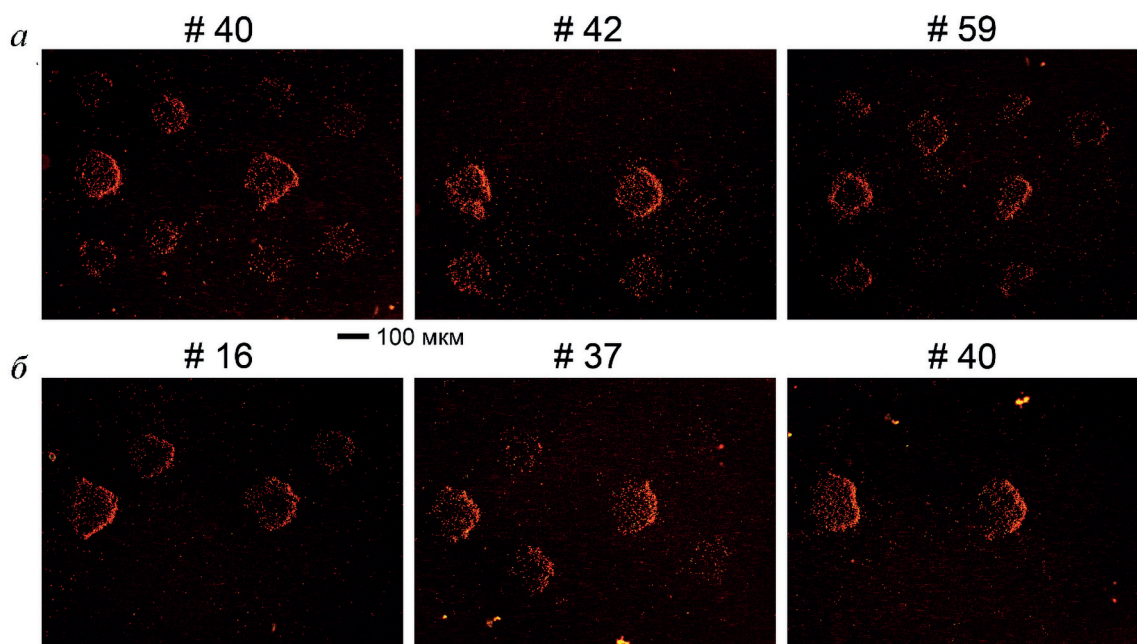


Рис. 2. Репрезентативные примеры результатов иммуноанализа мочи пациентов с ПКР (*а*) и контрольной группы (*б*). Номера соответствуют обозначениям в табл. Д1 (*а*) и Д2 (*б*) в Приложении. Масштабная линейка является общей для всех изображений

рековерином, когда тест считался положительным, если концентрация любого из этих биомаркеров превышала 0,1 пг/мл. В этом случае соответствующее значение AUC составило 0,96 (95% ДИ 0,93–0,99), при этом значения чувствительности и специфичности достигли 96% и 92% соответственно, что является одним из

лучших показателей среди всех опубликованных биомаркеров ПКР в сыворотке и моче. Можно также отметить значительные положительные попарные корреляции между концентрациями различных антигенов в моче пациентов с ПКР (табл. Д3 в Приложении). Если предположить, что концентрация этих биомар-

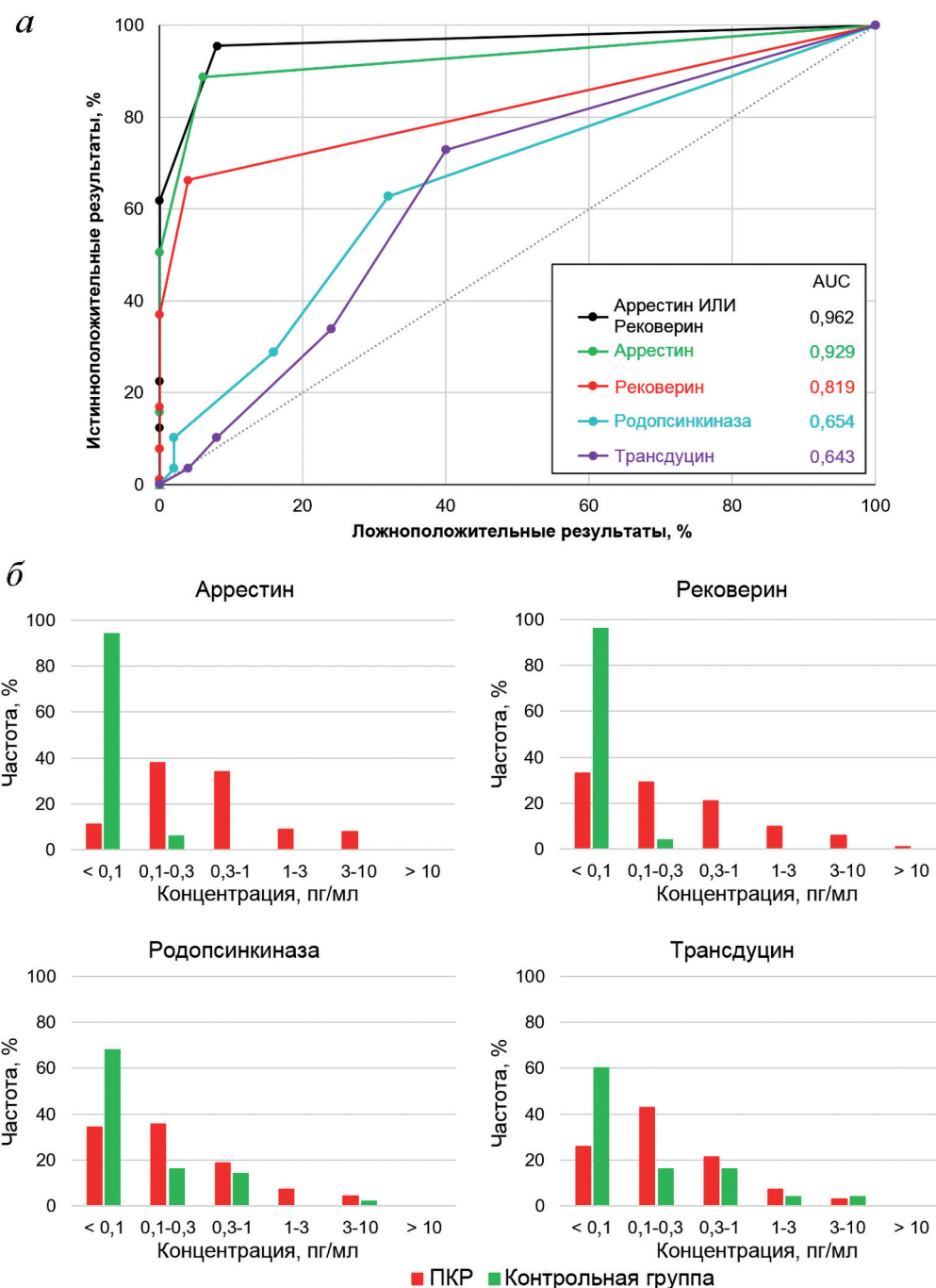


Рис. 3. *а* – ROC-кривые для обнаружения в моче четырех отдельных антигенов (цветные линии) и комбинации аррестина и рековерина (черная линия); *б* – распределение концентраций антигенов в моче пациентов с ПКР (красный) и контрольной группы (зеленый). Размер выборки составил 50 человек из контрольной группы, 59 (для родопсинкиназы и трансдуцина) и 89 (для аррестина и рековерина) пациентов с ПКР. Значения χ^2 -критерия для различий между ПКР и контрольными группами были $< 10^{-10}$ для аррестина и его комбинации с рековерином; 10^{-9} – для рековерина; 0,02 – для родопсинкиназы и 0,01 – для трансдуцина

керов в моче определяется их аберрантной экспрессией в опухолевой ткани, то этот результат закономерен, так как уровни экспрессии в группе близкородственных генов могут иметь положительную корреляцию.

Уровень раково-сетчаточных антигенов после хирургического лечения ПКР. Если раково-сетчаточные антигены, обнаруженные в моче, имеют опухолевое происхождение, то после удаления опухоли они должны исчезнуть. В группе ПКР мы отобрали 10 пациентов, у которых были обнаружены антигены, и проанализировали образцы мочи, собранные через 7 дней после нефрэктомии. Результаты анализа представлены в табл. 2. Во всех случаях содержание аррестина и рековерина в моче было ниже предела детектирования. Родопсинкиназа и трансдуцин были обнаружены в одном и двух образцах соответственно, что согласуется с их относительно низкими значениями специфичности. Эти данные подтверждают, что данные антигены имеют опухолевое происхождение и при удалении опухоли исчезают вместе с ней.

Содержание раково-сетчаточных антигенов в моче больных с различными стадиями и формами ПКР. Наконец, мы исследовали, влияет ли на содержание аррестина и рековерина в моче конкретная форма и стадия опухоли. Мы не нашли существенных различий между группами светлоклеточного, хромофобного и папиллярного ПКР (рис. Д4, А в Приложении), что позволяет предположить, что аберрантная экспрессия раково-сетчаточных антигенов

является общей чертой различных опухолей. Стадия опухоли также не влияет на концентрации данных антигенов в моче, как показано на рис. Д4, Б в Приложении. Вполне вероятно, что не размер опухоли, а другие её характеристики, такие как способность эффективно промываться мочой, определяют высвобождение антигенов в мочу.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Очевидно, что открытие новых молекулярных маркеров для раннего выявления и прогнозирования ПКР по-прежнему остается сложной задачей для исследователей. В данной работе мы отмечаем полезность жидкой биопсии для обнаружения продуктов опухолевых клеток, а именно раково-сетчаточных антигенов. Наши данные свидетельствуют о том, что некоторые из них практически всегда экспрессируются при злокачественных опухолях почки. В то же время имеющиеся в литературе данные об экспрессии этих биомаркеров в других тканях злокачественных опухолей демонстрируют более низкую частоту встречаемости. При меланоме все раково-сетчаточные антигены выявлялись в ткани не более чем в 80% случаев как на белковом уровне (Вестерн-блоттинг), так и с помощью мРНК (RT-PCR) [31]. Экспрессия рековерина наблюдалась в 10–40% случаев рака легкого, желудка и толстой кишки [38, 39]. Экспрессия

Таблица 2. Концентрация антигенов в моче до удаления опухоли и через семь дней после

Пациент №	Аррестин		Рековерин		Родопсинкиназа		Трансдуцин	
	До	После	До	После	До	После	До	После
2	0,1–0,3	< 0,1	< 0,1	< 0,1	0,1–0,3	< 0,1	0,1–0,3	< 0,1
6	0,3–1	< 0,1	0,3–1	< 0,1	0,3–1	< 0,1	0,3–1	< 0,1
9	3–10	< 0,1	0,1–0,3	< 0,1	0,1–0,3	< 0,1	0,3–1	< 0,1
12	3–10	< 0,1	0,3–1	< 0,1	0,3–1	< 0,1	0,3–1	< 0,1
15	0,3–1	< 0,1	> 10	< 0,1	1–3	< 0,1	3–10	< 0,1
29	1–3	< 0,1	1–3	< 0,1	1–3	0,1–0,3	0,3–1	< 0,1
40	0,1–0,3	< 0,1	0,1–0,3	< 0,1	0,1–0,3	< 0,1	0,3–1	0,3–1
41	0,1–0,3	< 0,1	0,1–0,3	< 0,1	0,1–0,3	< 0,1	1–3	< 0,1
52	0,1–0,3	< 0,1	0,1–0,3	< 0,1	< 0,1	< 0,1	0,1–0,3	0,3–1
72	1–3	< 0,1	1–3	< 0,1	–	–	–	–

Примечание. Пациенты пронумерованы в соответствии с табл. 1 в Приложении.

аррестина и рековерина в опухолевых тканях больных ПКР составила 59% и 68% случаев соответственно [19, 28]. При этом аутоантитела к аррестину были обнаружены в сыворотке крови у 76% больных ПКР [19]. Это означает, что частота появления аутоантител к аррестину выше, чем самого аррестина, то есть аррестин экспрессируется в количествах, недостаточных для детекции с помощью иммуногистохимии, но достаточно больших, чтобы вызвать иммунный ответ. Таким же образом можно объяснить и наши результаты. Даже если уровни экспрессии биомаркеров крошечные, они вымываются из опухоли в мочу, а ультрачувствительный анализ позволяет их обнаружить, несмотря на то что в миллилитре содержится около миллиона молекул. Кроме того, мочевые биомаркеры определяются надежнее по сравнению с сывороткой, поскольку белки, попадающие в кровоток, более разбавлены и могут метаболизироваться быстрее.

В настоящее время аквапорин-1 и перилипидин-2 отмечены как наиболее перспективные биомаркеры ПКР с чувствительностью и специфичностью 95% и 91% соответственно; в комбинации они показали 100% чувствительность и 95% специфичность [23]. Точно так же комбинация RKIP с его фосфорилированной формой продемонстрировала наибольшую диагностическую и прогностическую ценность при выявлении ПКР [25]. Závada et al. [40] сообщили, что САИХ в моче является биомаркером обнаружения ПКР с чувствительностью 70% и специфичностью 100% по сравнению с пациентами с доброкачественными урологическими опухолями. Однако, поскольку концентрации САИХ оказались слишком низкими у пациентов с ПКР, были введены предварительное концентрирование мочи и более сложный метод Вестерн-блоттинга, что снизило потенциал широкого использования этого биомаркера. Уникальная высокая специфичность САИХ может быть использована для улучшения перспектив его скрининга путем объединения его с другими потенциальными биомаркерами, демонстрирующими высокую чувствительность и низкую специфичность, в частности, при их детекции более чувствительными методами мультиплексного анализа. В целом, идея о том, что использование биомаркеров с разными характеристиками чувствительности и специфичности в одном анализе может улучшить диагностику рака, представляется весьма привлекательной и обоснованной [21]. Мы показали, что использование многокомпонентного микрочипа для одновременного определения аррестина и рековерина приводит к чрезвы-

чайно высоким значениям чувствительности и специфичности. При этом после хирургического удаления злокачественной опухоли уровень этих антигенов в моче снижается до нуля. Таким образом, можно ожидать, что эти биомаркеры будут очень эффективны при последующем наблюдении пациентов после нефрэктомии или других инвазивных процедур.

Следует обсудить проблему точности нашего анализа. Точность измерения концентрации составляла примерно половину десятичного порядка, что делает наш анализ полуколичественным. По этой причине мы не нормировали концентрацию мочевых биомаркеров по креатинину [22, 25]. Можно заключить, что применение нашего теста для качественного анализа представляется наиболее перспективным.

Наконец, для любого высокочувствительного теста, используемого для анализа образцов с большим избытком других белков, естественно возникает проблема специфичности. Несмотря на то что наш метод в целом демонстрирует хорошую специфичность [41], существуют некоторые проблемы. В частности, высокое содержание аррестина в контрольных образцах сыворотки крови, вероятно, обусловлено неспецифическими взаимодействиями, хотя нам и не удалось получить прямых доказательств. Проблемы со специфичностью могут возникать и по чисто физиологическим причинам. Показано, что данные антигены экспрессируются в тканях и без злокачественных новообразований, как в случае онкоцитомы [19, 20]. Антигены могут быть неспецифичны для ПКР, поскольку опухоли в других тканях, таких как мочевой пузырь или предстательная железа, также контактируют с мочой и могут высвобождать эти мочевые биомаркеры. Это является общей проблемой для широкого круга различных биомаркеров [21]. Поэтому необходимы исследования по определению уровня аррестина и рековерина в моче у больных с доброкачественными урологическими опухолями, а также с другими видами злокачественных новообразований. Мы полагаем, что предложенный метод, обладая высокой чувствительностью, имеет высокий диагностический и предиктивный потенциал: даже если при дальнейших исследованиях возникнут проблемы со специфичностью, наличие положительного результата теста даст первый сигнал для углубленного медицинского обследования. Многообещающей перспективой настоящей работы является также применение ультрачувствительного иммуноанализа для обнаружения других биомаркеров, имеющих более высокую специфичность.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

С помощью ультрачувствительного иммуноанализа мы выявили новые мочевые биомаркеры для неинвазивной диагностики ПКР. Для комбинации раково-сетчаточных антигенов аррестина и рековерина значение АУС достигает 0,965. При пороге 0,1 пг/мл чувствительность составляет 96%, а специфичность — 92%, что является одним из самых высоких показателей среди опубликованных биомаркеров ПКР. Высокая диагностическая эффективность обеспечивается аналитической методикой на основе белкового микрочипа с детекцией сигнала магнитными частицами без использования дорогостоящего оборудования. Дополнительным преимуществом является чрезвычайно низкий расход антител, который в одном анализе не превышает 3 нг по сравнению с ~100 нг в ИФА.

Новый метод может быть использован не только в первичной, но и в уточняющей диагностике ПКР, в частности, для определения оптимальной терапии. Новые опухолеспецифические белки имеют значительный потенциал не только в качестве диагностических, но и предиктивных биомаркеров ПКР. Полученные нами результаты по послеоперационной динамике аррестина и рековерина в моче дают возможность их использования для оценки эффективности оперативного вмешательства или других видов терапии, а также для доклинического выявления рецидивов заболевания. Очевидно, однако, что для определения оптимальной «философии» применения предложенного метода в клинической практике потребуются дополнительные исследования.

В настоящей работе применение нового метода иммуноанализа продемонстрировано на модели ПКР. Вместе с тем мы считаем, что полученные результаты могут быть также использованы в диагностике и терапии других онкозаболеваний, в первую очередь урологических: рака мочевого пузыря и простаты, при которых aberrantly экспрессируемые белки также могут экстрагироваться из опухоли в мочу. Это представляется перспективной темой для будущих исследований.

Вклад авторов. Ю.М. Шляпников, А.З. Винаров, А.А. Замятнин — концепция и руководство работой; Ю.М. Шляпников, Е.А. Малахова, Е.А. Шляпникова — проведение экспериментов; Н.В. Потолдыкова и Я.А. Светочева — сбор и обработка образцов; Д.В. Зинченко и Е.Ю. Зерний — получение антител и антигенов; Ю.М. Шляпников, А.З. Винаров, А.А. Замятнин — обсуждение результатов исследования; Е.А. Шляпникова и Ю.М. Шляпников — написание текста; Ю.М. Шляпников, А.А. Замятнин — редактирование финального текста статьи.

Финансирование. Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (грант № 19-75-10025).

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Соблюдение этических норм. Все применимые международные, национальные и/или институциональные принципы с участием людей были соблюдены.

Дополнительные материалы. Приложение к статье опубликовано на сайте журнала «Биохимия» (<https://biochemistrymoscow.com>).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Halabi, S., Yang, Q., Carmack, A., Zhang, S., Foo, W. C., et al. (2021) Tissue based biomarkers in non-clear cell RCC: correlative analysis from the ASPEN clinical trial, *Kidney Cancer J.*, **19**, 64-72, doi: 10.52733/kcjl19n3-a1.
- Li, F., Aljahdali, I. A. M., Zhang, R., Nastiuk, K. L., Krolewski, J. J., et al. (2021) Kidney cancer biomarkers and targets for therapeutics: survivin (BIRC5), XIAP, MCL-1, HIF1alpha, HIF2alpha, NRF2, MDM2, MDM4, p53, KRAS and AKT in renal cell carcinoma, *J. Exp. Clin. Cancer Res.*, **40**, 254, doi: 10.1186/s13046-021-02026-1.
- Kobayashi, G., Sentani, K., Babasaki, T., Sekino, Y., Shigematsu, Y., et al. (2020) Claspin overexpression is associated with high-grade histology and poor prognosis in renal cell carcinoma, *Cancer Sci.*, **111**, 1020-1027, doi: 10.1111/cas.14299.
- Signoretti, S., Flaifel, A., Chen, Y., and Reuter, V. E. (2018) Renal cell carcinoma in the era of precision medicine: from molecular pathology to tissue-based biomarker, *J. Clin. Oncol.*, **36**, 3553-3559, doi: 10.1200/JCO.2018.79.2259.
- Kim, S., Park, W., Park, E., Park, B., Joo, J., et al. (2017) The prognostic value of BAP1, PBRM1, pS6, PTEN, TGase2, PD-L1, CA9, PSMA, and Ki-67 tissue markers in localized renal cell carcinoma: A retrospective study of tissue microarrays using immunohistochemistry, *PLoS One*, **12**, e0179610, doi: 10.1371/journal.pone.0179610.
- Graham, J., Heng, D. Y. C., Brugarolas, J., and Vaishampayan, U. (2018) Personalized management of advanced kidney cancer, *Am. Soc. Clin. Oncol.*, **38**, 330-341, doi: 10.1200/EDBK_201215.

7. Gulati, S., and Vogelzang, N. J. (2021) Biomarkers in renal cell carcinoma: Are we there yet? *Asian J. Urol.*, **8**, 362-375, doi: 10.1016/j.ajur.2021.05.013.
8. Lin, J., Yu, M., Xu, X., Wang, Y., Xing, H., et al. (2020) Identification of biomarkers related to CD8⁺ T cell infiltration with gene co-expression network in clear cell renal cell carcinoma, *Aging*, **12**, 3694-3712, doi: 10.18632/aging.102841.
9. Linehan, W. M., Schmidt, L. S., Crooks, D. R., Wei, D., Srinivasan, R., et al. (2019) The metabolic basis of kidney cancer, *Cancer Discov.*, **9**, 1006-1021, doi: 10.1158/2159-8290.CD-18-1354.
10. Junker, K., and Zeuschner, P. (2019) Personalised medicine in renal cell tumours, *Aktuelle Urol.*, **50**, 513-523, doi: 10.1055/a-0895-9201.
11. Light, A., Ahmed, A., Dasgupta, P., and Elhage, O. (2020) The genetic landscapes of urological cancers and their clinical implications in the era of high-throughput genome analysis, *BJU Int.*, **126**, 26-54, doi: 10.1111/bju.15084.
12. Jonasch, E., Walker, C. L., and Rathmell, W. K. (2021) Clear cell renal cell carcinoma ontogeny and mechanisms of lethality, *Nat. Rev. Nephrol.*, **17**, 245-261, doi: 10.1038/s41581-020-00359-2.
13. Shan, L., Zhu, X. L., Zhang, Y., Gu, G. J., Cheng, X. (2021) Expression and clinical significance of NUF2 in kidney renal clear cell carcinoma, *Transl. Androl. Urol.*, **10**, 3628-3637, doi: 10.21037/tau-21-620.
14. Mytsyk, Y., Borys, Y., Tumanovska, L., Story, D., Kucher, A., et al. (2019) MicroRNA-15a tissue expression is a prognostic marker for survival in patients with clear cell renal cell carcinoma, *Clin. Exp. Med.*, **19**, 515-524, doi: 10.1007/s10238-019-00574-7.
15. Shi, L., Wang, M., Li, H., and You, P. (2021) MicroRNAs in body fluids: a more promising biomarker for clear cell renal cell carcinoma, *Cancer Manag. Res.*, **13**, 7663-7675, doi: 10.2147/CMAR.S330881.
16. Patel, S. H., Singla, N., and Pierorazio, P. M. (2021) Decision-making in active surveillance in kidney cancer: current trends and future urine and tissue markers, *World J. Urol.*, **9**, 2869-2874, doi: 10.1007/s00345-021-03786-3.
17. Voss, M. H., Chen, D., Marker, M., Hakimi, A. A., Lee, C.-H., et al. (2016) Circulating biomarkers and outcome from a randomised phase II trial of sunitinib vs everolimus for patients with metastatic renal cell carcinoma, *Br. J. Cancer*, **114**, 642-649, doi: 10.1038/bjc.2016.21.
18. Yap, N. Y., Yap, F. N., Perumal, K., and Rajandram, R. (2019) Circulating adiponectin as a biomarker in renal cell carcinoma: A systematic review and meta-analysis, *Biomarkers*, **24**, 1-24, doi: 10.1080/1354750X.2019.1634763.
19. Baldin, A. V., Grishina, A. N., Korolev, D. O., Kuznetsova, E. B., Golovastova, M. O., et al. (2019) Autoantibody against arrestin-1 as a potential biomarker of renal cell carcinoma, *Biochimie*, **157**, 26-37, doi: 10.1016/j.biochi.2018.10.019.
20. Dakubo, G. D. (2019) *Cancer Biomarkers in Body Fluids (Biomarkers in Proximal Fluids)*, doi: 10.1007/978-3-030-24725-6.
21. Flitcroft, J. G., Verheyen, J., Vemulkar, T., Welbourn, E. N., Rossi, S. H., et al. (2022) Early detection of kidney cancer using urinary proteins: a truly non-invasive strategy, *BJU Int.*, **129**, 290-303, doi: 10.1111/bju.15601.
22. Morrissey, J. J., London, A. N., Luo, J., and Kharasch, E. (2010) Urinary biomarkers for the early diagnosis of kidney cancer, *Mayo Clin. Proc.*, **85**, 413-421, doi: 10.4065/mcp.2009.0709.
23. Morrissey, J. J., Mellnick, V. M., Luo, J., Siegel, M. J., Figenschau, R. S., et al. (2015) Evaluation of urine aquaporin-1 and perilipin-2 concentrations as biomarkers to screen for renal cell carcinoma: a prospective cohort study, *JAMA Oncol.*, **1**, 204-212, doi: 10.1001/jamaoncol.2015.0213.
24. Hu, R., Gupta, R., Wang, Z., Wang, C., Sun, H., et al. (2019) Bioplasmonic paper-based assay for perilipin-2 non-invasively detects renal cancer, *Kidney Int.*, **96**, 1417-1421, doi: 10.1016/j.kint.2019.08.020.
25. Papale, M., Vocino, G., Lucarelli, G., Rutigliano, M., Gigante, M., et al. (2017) Urinary RKIP/p-RKIP is a potential diagnostic and prognostic marker of clear cell renal cell carcinoma, *Oncotarget*, **8**, 40412-40424, doi: 10.18632/oncotarget.16341.
26. Di Meo, A., Batruch, I., Brown, M. D., Yang, C., Finelli, A., et al. (2020) Searching for prognostic biomarkers for small renal masses in the urinary proteome, *Int. J. Cancer*, **146**, 2315-2325, doi: 10.1002/ijc.32650.
27. Shlyapnikov, Y. M., Malakhova, E. A., Vinarov, A. Z., Zamyatnin, A. A., and Shlyapnikova, E. A. (2021) Can new immunoassay techniques improve bladder cancer diagnostics with protein biomarkers? *Front. Mol. Biosci.*, **7**, 620687, doi: 10.3389/fmolb.2020.620687.
28. Golovastova, M. O., Tsoy, L. V., Bocharnikova, A. V., Korolev, D. O., Gancharova, O. S., et al. (2016) The cancer-retina antigen recoverin as a potential biomarker for renal tumours, *Tumour Biol.*, **37**, 9899-9907, doi: 10.1007/s13277-016-4885-5.
29. Chen, H., Werner, S., Tao, S., Zornig, I., and Brenner, H. (2014) Blood autoantibodies against tumour-associated antigens as biomarkers in early detection of colorectal cancer, *Cancer Lett.*, **346**, 178-187, doi: 10.1016/j.canlet.2014.01.007.
30. Savchenko, M. S., Goncharskaia, M. A., Skorikova, E. E., Eichmuller, S. B., Kushlinsky, N. E., et al. (2012) Autoantibodies against the Ca²⁺-binding protein recoverin in blood sera of patients with various oncological diseases, *Oncol. Lett.*, **3**, 377-382, doi: 10.3892/ol.2011.464.
31. Bazhin, A., Dalke, C., Willner, N., Abschutz, O., Wildberger, H., et al. (2009) Cancer-retina antigens as potential paraneoplastic antigens in melanoma associated retinopathy, *Int. J. Cancer*, **124**, 140149, doi: 10.1002/ijc.23909.
32. Potter, M. J., Adamus, G., Szabo, S. M., Lee, R., Mohaseb, K., et al. (2002) Autoantibodies to transducin in a patient with melanoma associated retinopathy, *Am. J. Ophthalmol.*, **134**, 128130, doi: 10.1016/s0002-9394(02)01431-9.

33. Morozov, V. N., Groves, S., Turell, M. J., and Bailey, C. J. (2007) Three minutes-long electrophoretically assisted zeptomolar microfluidic immunoassay with magnetic beads detection, *J. Am. Chem. Soc.*, **129**, 12628-12629, doi: 10.1021/ja075069m.
34. Shlyapnikov, Y. M., Shlyapnikova, E. A., Simonova, M. A., Shepelyakovskaya, A. O., Brovko, F. A., et al. (2012) Rapid simultaneous ultrasensitive immunodetection of five bacterial toxins, *Anal. Chem.*, **84**, 5596-5603, doi: 10.1021/ac300567f.
35. Morozov, V. N., Nikolaev, A. A., Shlyapnikov, Y. M., Mikheev, A. Y., Shlyapnikova, E. A., et al. (2018) Non-invasive approach to diagnosis of pulmonary tuberculosis using microdroplets collected from exhaled air, *J. Breath Res.*, **12**, 036010, doi: 10.1088/1752-7163/aab3f2.
36. Morozov, V. N., and Morozova, T. Ya. (2006) Active bead-linked immunoassay on protein microarrays, *Anal. Chim. Acta*, **564**, 40-52, doi: 10.1016/j.aca.2005.09.068.
37. Hanley, J. A., and McNeil, B. J. (1982) The meaning and use of the area under a receiver operating characteristic (ROC) curve, *Radiology*, **143**, 29-36, doi: 10.1148/radiology.143.1.7063747.
38. Matsuo, S., Ohguro, H., Ohguro, I., and Nakazawa, M. (2010) Clinicopathological roles of aberrantly expressed recoverin in malignant tumour cells, *Ophthalmic Res.*, **43**, 139-144, doi: 10.1159/000253486.
39. Ohguro, H., Odagiri, H., Miyagawa, Y., Ohguro, I., Sasak, M., et al. (2004) Clinicopathological features of gastric cancer cases and aberrantly expressed recoverin, *Tohoku J. Exp. Med.*, **202**, 213-219, doi: 10.1620/tjem.202.213.
40. Závada, J., Závadová, Z., Zat'ovičová, M., Hyřl, L., and Kawaciuk, I. (2003) Soluble form of carbonic anhydrase IX (CA IX) in the serum and urine of renal carcinoma patients, *Br. J. Cancer*, **89**, 1067-1071, doi: 10.1038/sj.bjc.6601264.
41. Morozova, T. Ya., and Morozov, V. N. (2008) Force differentiation in recognition of cross-reactive antigens by magnetic beads, *Anal. Biochem.*, **374**, 263-271, doi: 10.1016/j.ab.2007.12.007.

NON-INVASIVE KIDNEY CANCER DIAGNOSTICS USING ULTRASENSITIVE IMMUNODETECTION OF CANCER-RETINA ANTIGENS

**Yuri M. Shlyapnikov^{1*}, Ekaterina A. Malakhova¹, Natalia V. Potoldykova²,
Yana A. Svetocheva², Andrei Z. Vinarov², Dmitry V. Zinchenko³, Evgeni Yu. Zernii⁴,
Andrey A. Zamyatnin, Jr.^{4,5,6,7}, and Elena A. Shlyapnikova¹**

¹ *Institute of Theoretical and Experimental Biophysics, Russian Academy of Sciences, 142290 Pushchino, Moscow Region, Russia; e-mail: yuri.shlyapnikov@gmail.com*

² *Institute for Urology and Reproductive Health, Sechenov First Moscow State Medical University, 119991 Moscow, Russia; e-mail: avinarov@mail.ru*

³ *Shemyakin and Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, Russian Academy of Sciences, 117437 Pushchino, Moscow Region, Russia; e-mail: zdv@bibch.ru*

⁴ *Belozersky Institute of Physico-Chemical Biology, Lomonosov Moscow State University, 119992 Moscow, Russia; e-mail: zerni@belozersky.msu.ru*

⁵ *Institute of Molecular Medicine, Sechenov First Moscow State Medical University, 119991 Moscow, Russia; e-mail: zamyat@belozersky.msu.ru*

⁶ *Department of Biotechnology, Sirius University of Science and Technology, 354340 Sochi, Russia*

⁷ *Faculty of Health and Medical Sciences, University of Surrey, Guildford GU2 7XH, Surrey, UK*

Renal cell carcinoma (RCC) is the most common urological malignancy with a high mortality and low detection rate. One of the approaches to improving its diagnostics may be the search for new non-invasive biomarkers in liquid biopsy and development of more sensitive methods for their detection. Cancer-retina antigens, which are known to be aberrantly expressed in malignant tumors, are present in liquid biopsy at extremely low concentrations. Using the developed multiplex immunoassay with a detection limit of 0.1 pg/ml, urine and serum samples of 89 patients with RCC and 50 non-cancer patients were examined for the presence of cancer-retina antigens (arrestin, recoverin, rhodopsin kinase, and transducin); the difference between the RCC and control groups was evaluated with the χ^2 test. The results showed high diagnostic efficiency of a combination of arrestin and recoverin: at a threshold of 0.1 pg/ml, the sensitivity was 96%, specificity 92%, and AUC = 0.96 (95% confidence interval, 0.93-0.99). Seven days after nephrectomy, the concentration of the antigens returned to the level characteristic of the control group. Therefore, arrestin in a combination with recoverin can serve as a diagnostic non-invasive urinary biomarker of RCC.

Keywords: cancer-retina antigens, renal cell carcinoma, immunoassay, magnetic particles