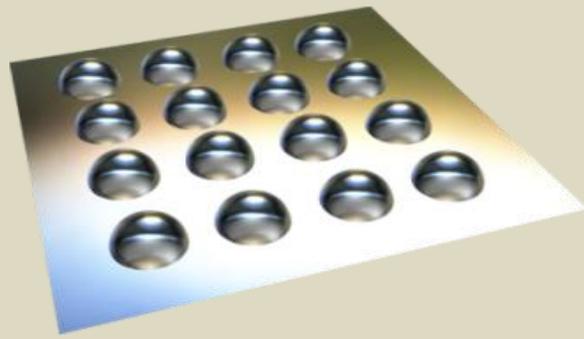


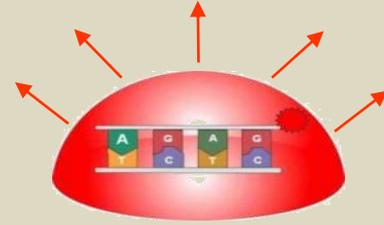
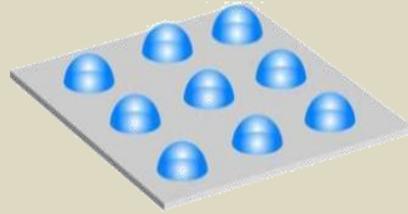
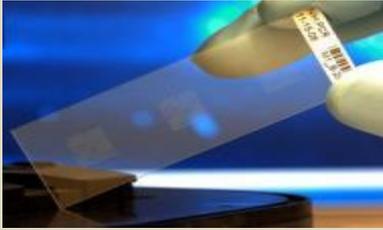


*Технология гидрогелевых биочипов для  
молекулярного профилирования биомаркеров  
социально-значимых заболеваний*

Дмитрий Грядунов

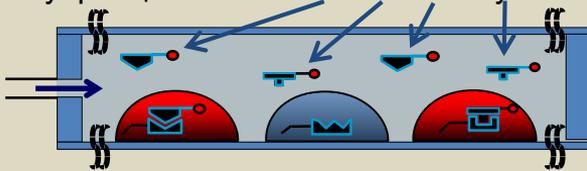


# Трехмерные гидрогелевые биочипы

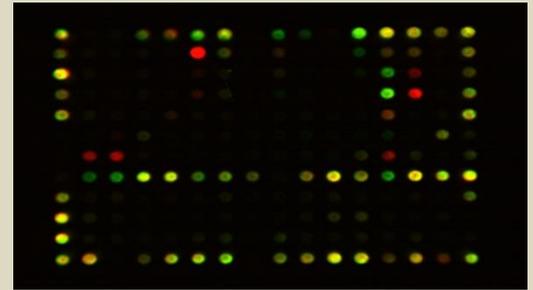


- Диаметр элемента – 50 – 200  $\mu\text{m}$
- Кол-во элементов – до 4096 (100-500)
- Отклонение размеров элементов внутри чипа – менее 10%
- Отклонение параметров чипа между сериями (партиями) - менее 20%

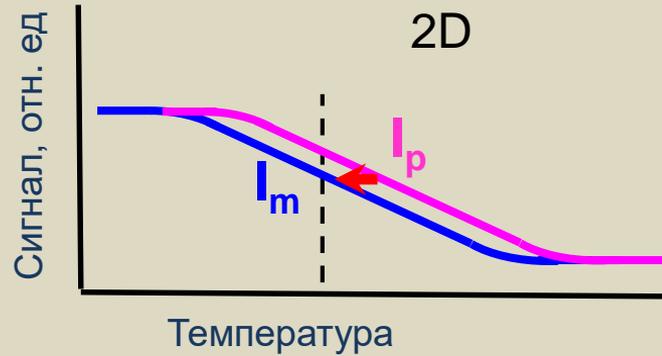
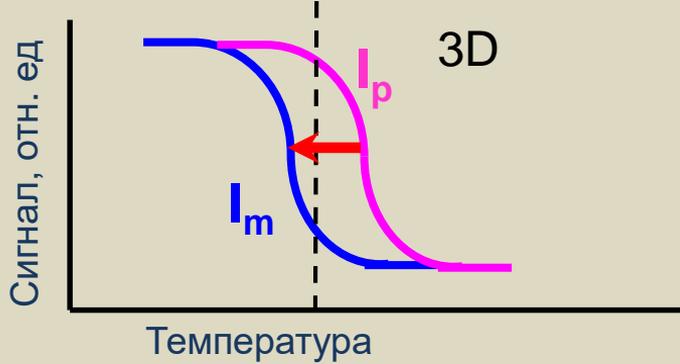
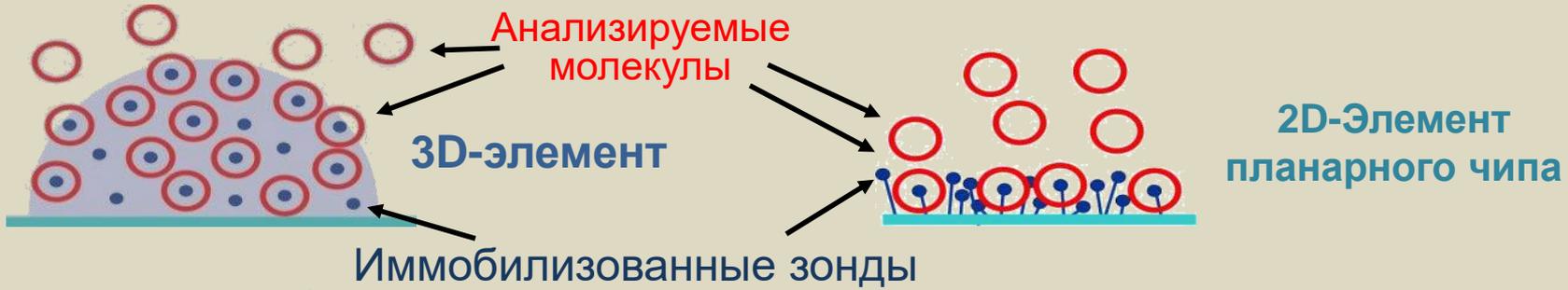
Флуоресцентно-меченные молекулы образца



Ячейки с иммобилизованными зондами

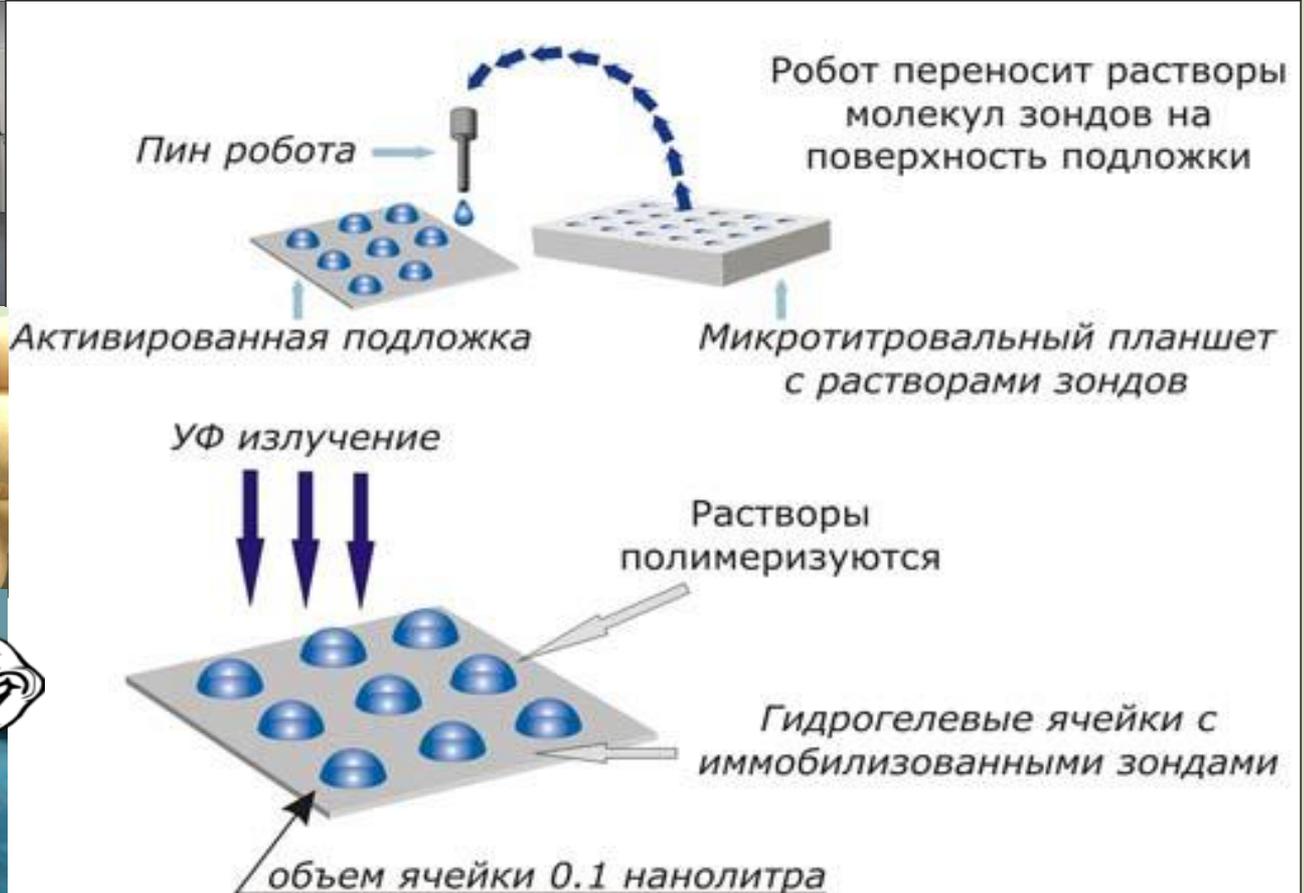


# Why 3D ? Гидрогелевые и планарные биочипы



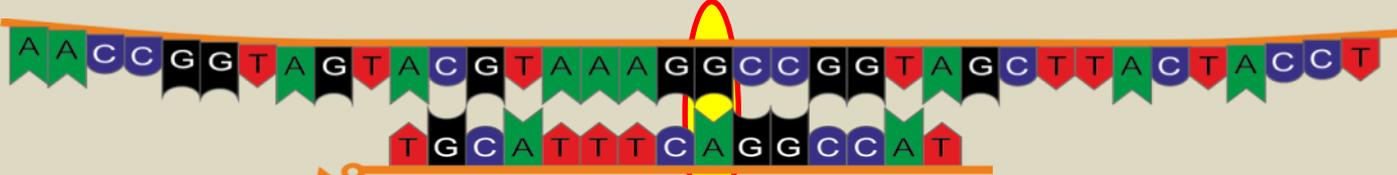
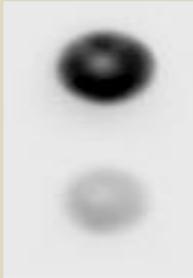
- в гидрогеле иммобилизованные молекулы сохраняют биологическую активность
- расстояние между иммобилизованными детектирующими молекулами  $> 1000 \text{ \AA}$
- емкость иммобилизации в 3D ячейках в 1000 раз выше

# Производство гидрогелевых биочипов

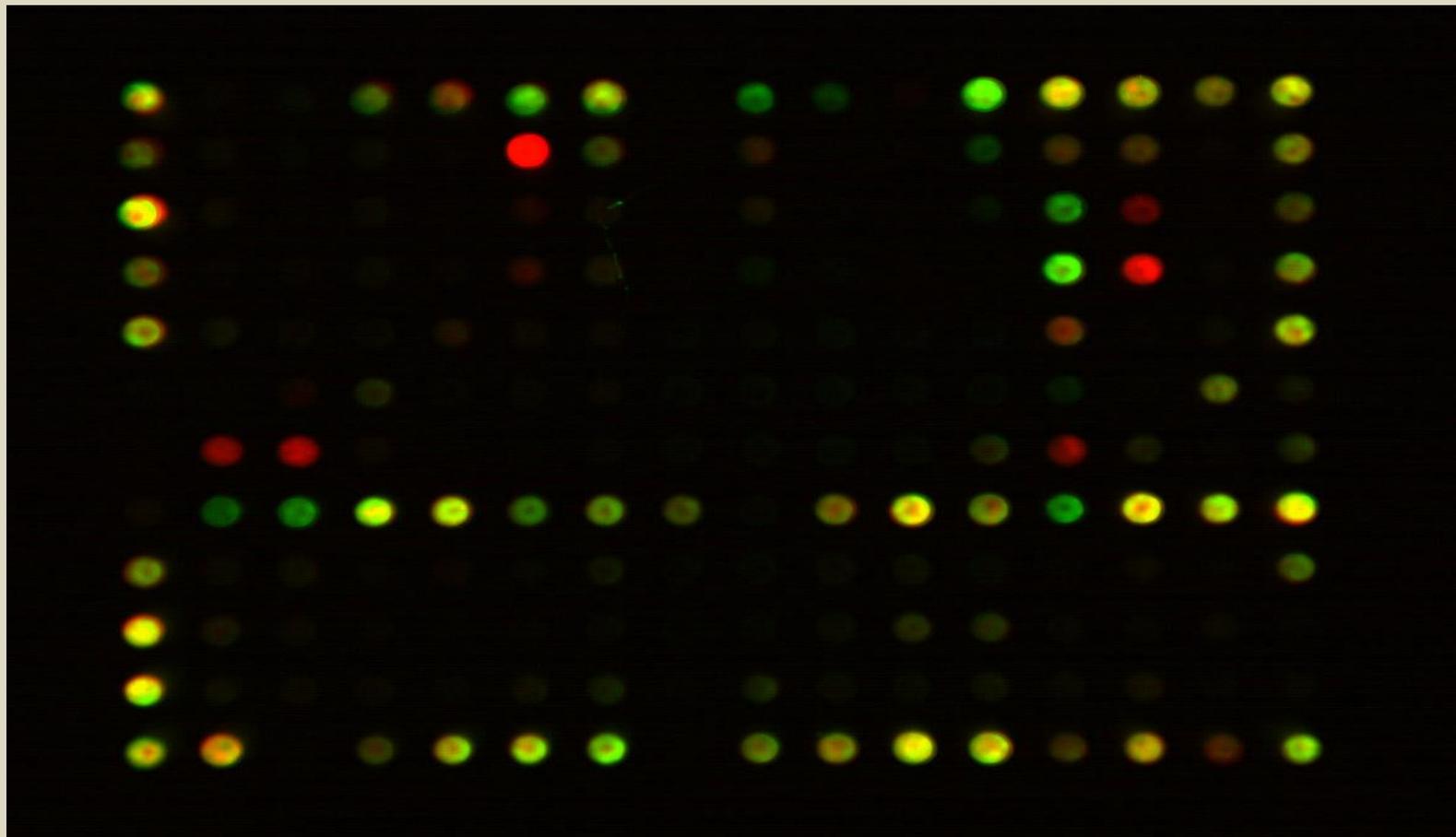


# ДНК-биочипы

---



# ФЛУОРЕСЦЕНТНАЯ КАРТИНА БИОЧИПА

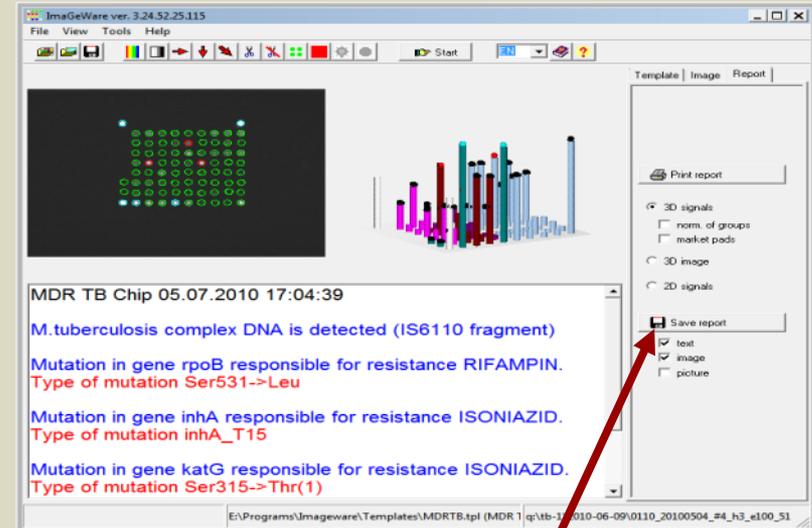
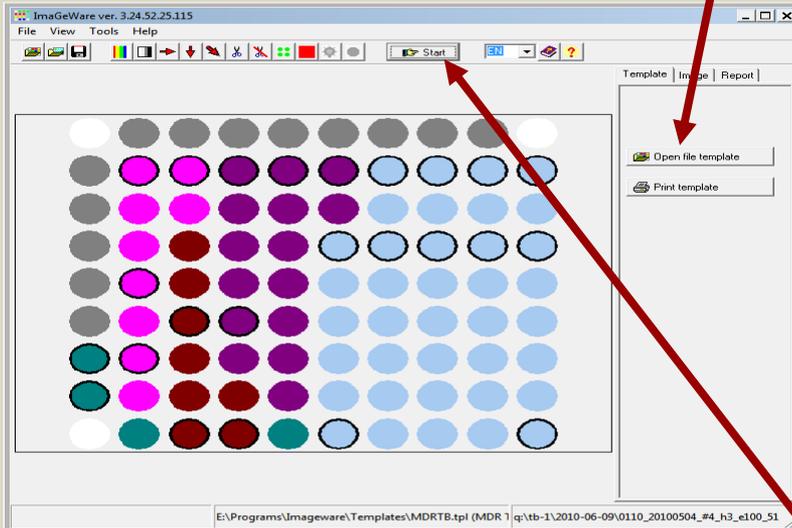


# Флуоресцентный анализатор биочипов – универсальный аппаратно-программный комплекс для анализа биочипов



# АНАЛИЗ БИОЧИПА (программа ImaGeWare)

Выбрать шаблон биочипа (только при смене типа чипа)



Поместить чип в анализатор

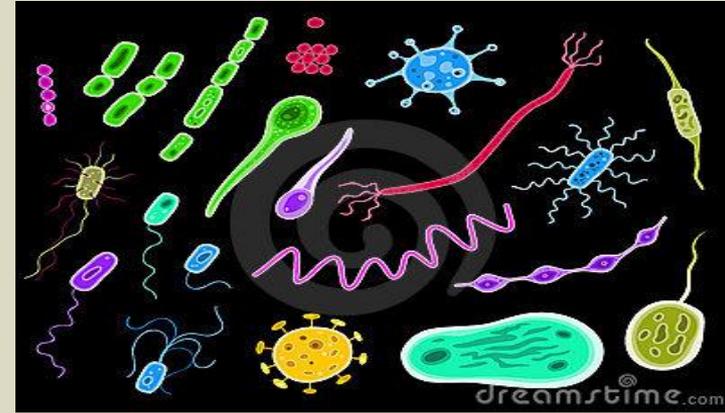
Нажать «Пуск»

Сохранить отчет

# Биочипы в молекулярной диагностике

## Анализ геномов микроорганизмов и вирусов

- ✓ лекарственная устойчивость возбудителей туберкулеза и гонореи
- ✓ генотипирование ВИЧ, вируса гепатита С и вируса гриппа



## Мультиплексный иммуноанализ на биочипах

- ✓ Установление хромосомных транслокаций, определяющих тип терапии при лейкозах
- ✓ Выявление аллерген-специфичных иммуноглобулинов различных классов
- ✓ Выявление возбудителей тяжелых острых мультифакториальных заболеваний (рак, респираторных инфекций и антител к ним, включая COVID-19, нейродегенеративные патологии, шизофрения)
- ✓ Фармакогенетика
- ✓ Установление маркеров аутоиммунных заболеваний, в т.ч. эндокринного генеза
- ✓ Идентификация личности

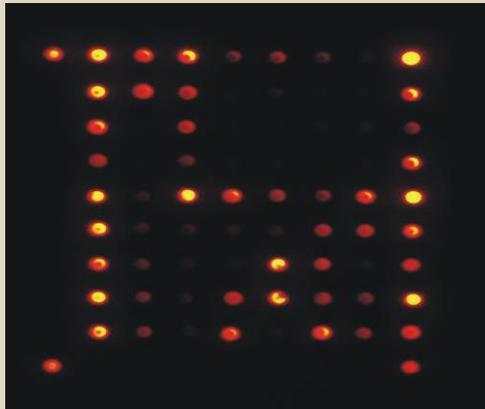


# ТБ-Биочипы для выявления возбудителя туберкулеза и определения его лекарственной устойчивости



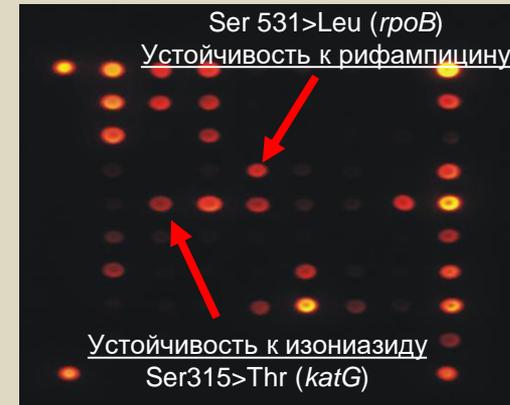
Начиная с 2005 г. пользователями тест-систем ТБ-Биочип опубликовано > **150** статей в реферируемых отечественных и зарубежных журналах о клинической эффективности ранней диагностики туберкулеза

## Чувствительный штамм



Стандартная терапия

## Обнаружена устойчивость !



Терапия резервными препаратами

Согласно независимой оценке МЗ и СР РФ (2009), экономия бюджетных средств при анализе возбудителя туберкулеза с использованием биочипов составляет **70** рублей на каждый вложенный рубль

# Учреждения противотуберкулезной службы РФ и лаборатории ФСИН, использующие технологию биочипов для диагностики туберкулеза (ежегодные поставки ТБ-Биочипов осуществляет ООО «БИОЧИП-ИМБ»)

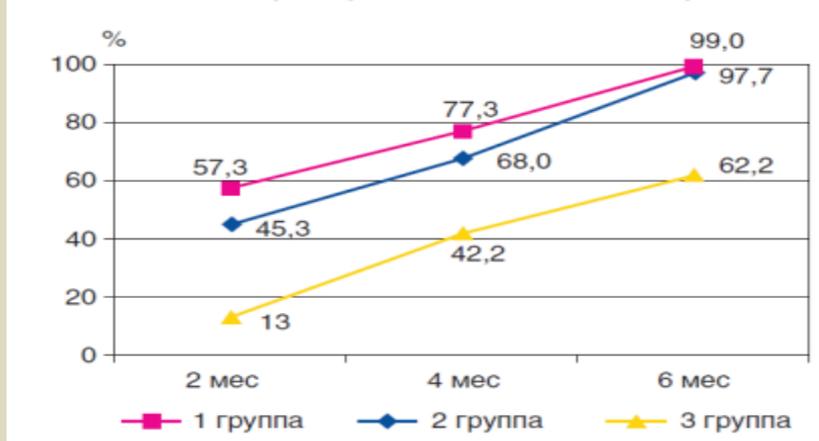


 Московский научно-практический Центр борьбы с туберкулезом ДЗ г. Москвы

 Учреждения противотуберкулезной службы МЗ и СР РФ  
 Лаборатории ФСИН

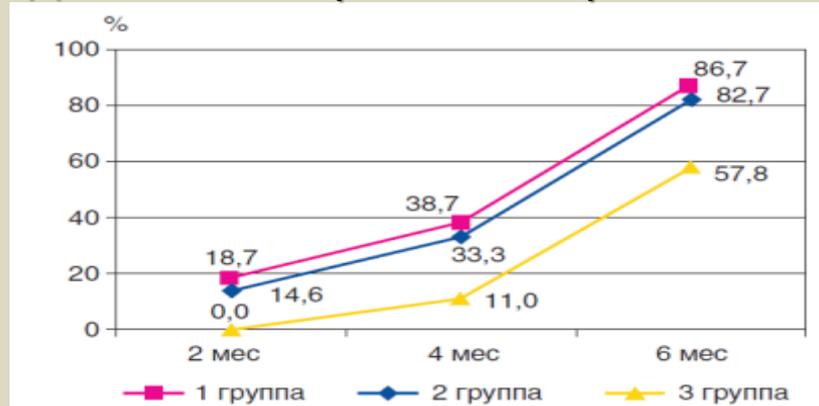
# Клиническая значимость анализа с применением биочипов

## Динамика прекращения бактериовыделения



- Определение ЛУ с исп. ТБ-Биочип, при обнаружении МЛУ – переход на резервные и аддитивные препараты
- Определение ЛУ с исп. ТБ-Биочип, чувствительные формы – терапия 4 препаратами первого ряда
- Определение ЛУ посевом на твердых средах, назначение 1-го режима терапии с последующей коррекцией по результатам определение ЛУ

## Динамика закрытия каверн в легких



*Васильева с соавт., 2012. Вестник РАМН  
Gryadunov et al., 2018. Acta Naturae*

# ТБ-ТЕСТ – набор реагентов нового поколения



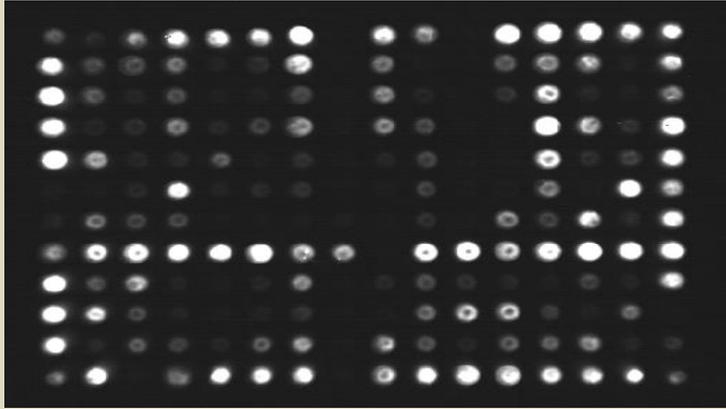
Установление принадлежности *M.tuberculosis* к семействам  
Haarlem, LAM, Ural, Beijing, включая кластер Beijing B0/W148

Патент РФ 2741099

Регистрационное удостоверение  
Федеральной службы по надзору  
в сфере здравоохранения  
№ РЗН 2014/1709

Выявление ДНК  
возбудителя туберкулеза  
с одновременным  
анализом **120**  
генетических  
детерминант  
устойчивости к  
**рифампицину,**  
**изониазиду,**  
**фторхинолонам,**  
**канамицину, амикацину,**  
**капреомицину,**  
**этамбутолу**

# ТБ-ТЕСТ. Результаты гибридизационного анализа



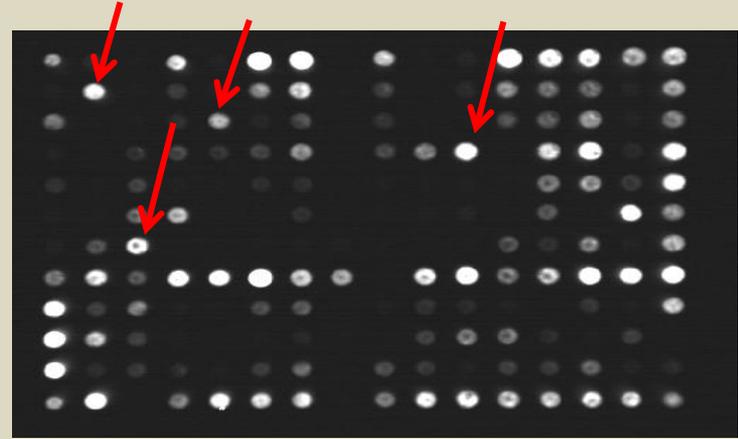
Обнаружена ДНК микобактерий туберкулезного комплекса (фрагмент IS6110).

Мутации, ответственные за устойчивость к Рифампицину не обнаружены (*rpoB*).

Мутации, ответственные за устойчивость к фторхинолонам не обнаружены (*gyrB*, *gyrA*).

Мутации, ответственные за устойчивость к Изониазиду не обнаружены (*inhA*, *katG*, *ahpC*).

Штамм принадлежит Европейско-Американской линии.  
Генотип штамма не определен.



Обнаружена ДНК микобактерий туберкулезного комплекса (фрагмент IS6110).

Мутация в гене *rpoB*, приводящая к устойчивости к Рифампицину.

Тип мутации *His526->Asp*

Мутация в гене *gyrA*, приводящая к устойчивости к фторхинолонам.

Тип мутации *D94N S95T*

Мутация в гене *katG*, приводящая к устойчивости к Изониазиду.

Тип мутации *S315T(1)*

Мутация в гене *ahpC*, приводящая к устойчивости к Изониазиду.

Тип мутации *ahpC\_T10*

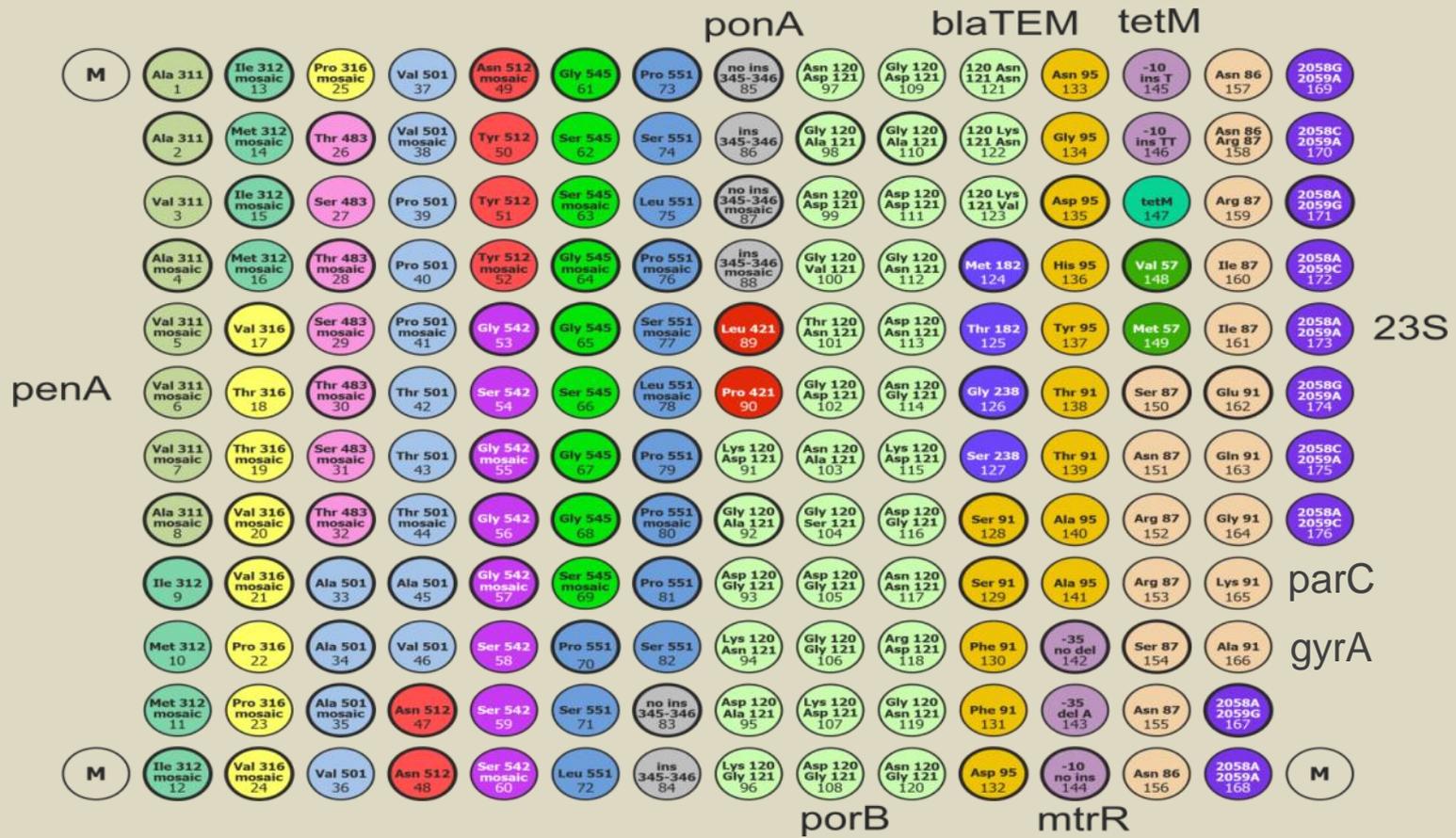
Мутации, ответственные за устойчивость к аминогликозидам не обнаружены (*eis*, *rrs*).

Штамм HE принадлежит Европейско-Американской линии.

Генотип штамма: Beijing

вариант B0/W148

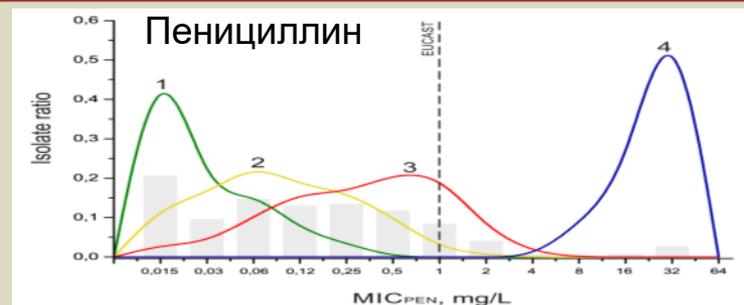
# Биочип для идентификации генетических детерминант устойчивости возбудителя гонококковой инфекции к антимикробным препаратам



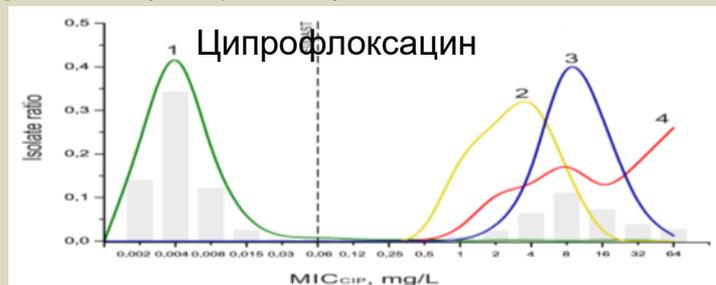
# Корреляции мутационных профилей с фенотипической чувствительностью *Neisseria gonorrhoeae* к антимикробным препаратам



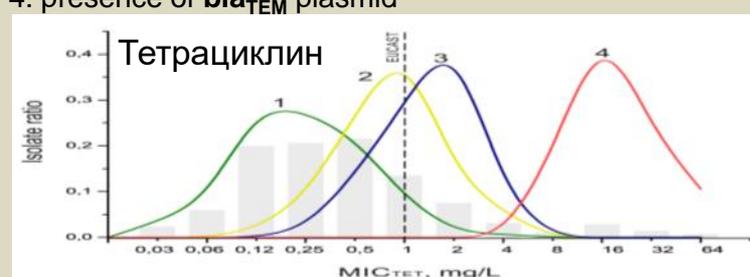
- 1: **penA** (wt); **porB** (wt)
- 2: **penA** insAsp345, 542Ser; **porB** 120Lys, 121Asp/Asn
- 3: **penA** insAsp345, 542Ser; **porB** 120Lys/Thr/Asn/Asp, 121Gly/Asp/Asn
- 4: **mosaic penA** 312Met, 316Thr, 512Tyr, 545Ser; **porB** 120Lys/Asp, 121Gly/Asn



- 1: **penA** (wt); **ponA** (wt); **porB** (wt); **mtrR** (wt)
- 2: **penA** insAsp345; **porB** 120Lys/Asn or 121Gly/Asp; **ponA** (wt); **mtrR** (wt)
- 3: **penA** insAsp345; **ponA** 421Pro; **porB** 120Lys/Asp, 121Gly/Asn/Asp; **mtrR** -35delA
- 4: presence of **bla<sub>TEM</sub>** plasmid

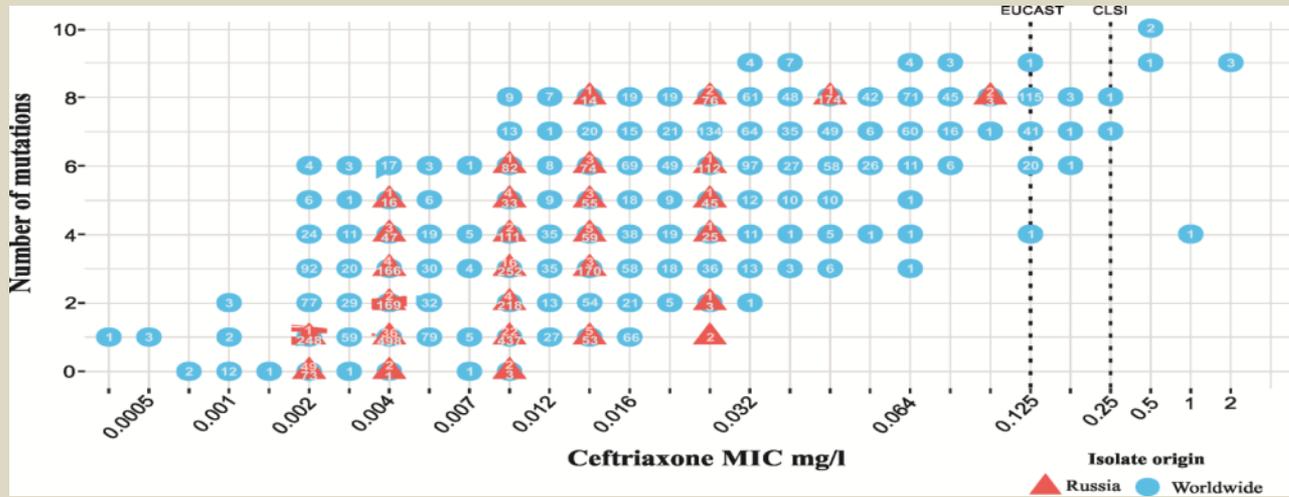


- 1: **gyrA** (wt); **parC** (wt)
- 2: **gyrA** 91Phe; **parC** (wt)
- 3: **gyrA** 91Phe, 95Asn; **parC** 87Asn/Ile, or 91Gly/Lys
- 4: **gyrA** 91Phe, 95Gly; **parC** 87Arg/Ile, 91Gly



- 1: **rpsJ** (wt); **porB** (wt); **mtrR** (wt)
- 2: **rpsJ** 57Met; **porB** (wt); **mtrR** -35delA
- 3: **rpsJ** 57Met; **porB** 120Lys; **mtrR** -35delA
- 4: presence of **tetM** plasmid

# Регрессионный анализ уровня устойчивости патогенных микроорганизмов к актуальным антимикробным препаратам



$$\log_2 \text{MIC}_{\text{cro}} = -8.993 + (3.340 \times \text{Ala311Val}) + (1.268 \times \text{Ile312Met}) + (1.386 \times \text{insAsp345-346}) + (1.312 \times \text{Ala501Val}) + (0.717 \times \text{Ala501Thr}) + (5.203 \times \text{Ala501Pro}) + (0.711 \times \text{Asn512Tyr}) + (1.277 \times \text{Gly542Ser}) + (1.468 \times \text{Gly545Ser}) + (0.757 \times \text{Pro551Leu}) + (1.033 \times \text{Pro551Ser}) + (0.638 \times \text{Gly120Asn}) + (0.521 \times \text{Gly120Asp}) + (1.248 \times \text{Gly120Lys}) + (2.466 \times \text{Gly120Arg}) - (0.313 \times \text{Ala121Gly}) + (0.227 \times \text{Ala121Ser}) - (0.137 \times \text{Ala121Asp}) - (0.997 \times \text{Ala121Val}) + (0.095 \times \text{Leu421Pro})$$

Глобальная выборка для обучения модели – 5631 изолятов

Российская выборка для экспериментальной валидации с использованием биочипа – 448 изолятов

Совпадение рассчитанного значения  $\text{MIC}_{\text{cro}}$  с измеренным  $\text{MIC}_{\text{cro}}$  – 94,4% изолятов

# «ГЕРДА-БИОЧИП»: набор реагентов для выявления 23 герминальных мутаций в генах *BRCA1*, *BRCA2*, *PALB2* и *ATM* у больных раком молочной железы, раком яичников или раком поджелудочной железы



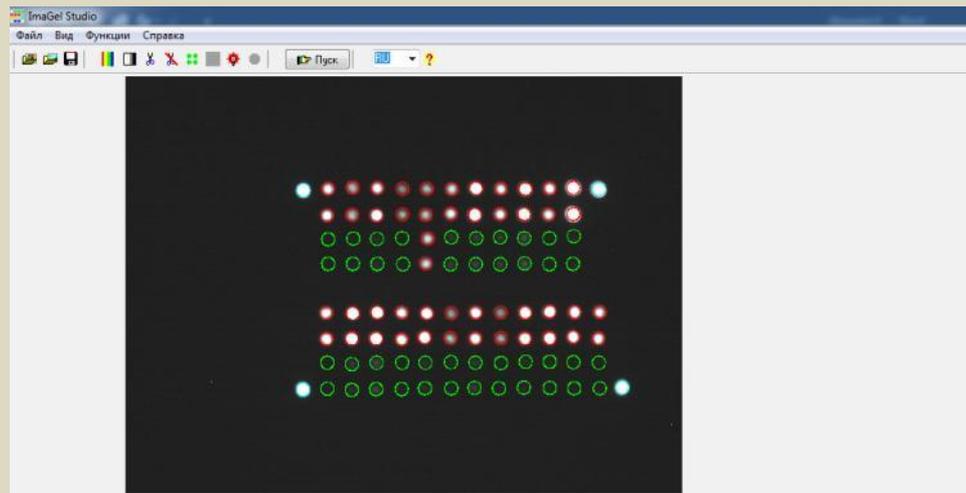
Количество образцов – 530;

**Диагностическая чувствительность** – не менее 95%

**Диагностическая специфичность** – не менее 95%

Метод сравнения, используемый для определения диагностических характеристик:

высокопроизводительное секвенирование

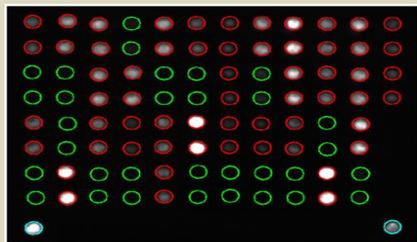
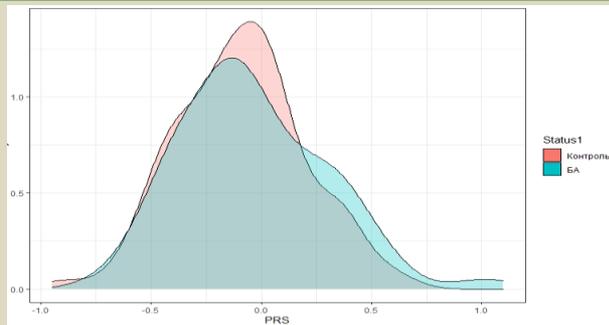


**Обнаружена мутация в гене *BRCA1*, ассоциированная с повышенной чувствительностью опухоли к препаратам платины и *PARP*-ингибиторам**

Регистрационное удостоверение  
Федеральной службы по надзору  
в сфере здравоохранения  
№ РЗН 2022/17662



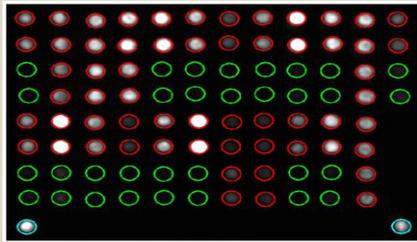
# «БИОЧИП-А»: оценка полигенного риска развития болезни Альцгеймера



Генотип образца:

1	rs6656401	GG
2	rs6733839	CC
3	rs5349669	CT
4	rs190982	GG
5	rs9271192	AA
6	rs10948363	AA
7	rs2718058	AG
8	rs1476679	AA
9	rs11771145	GA
10	rs28834970	TC
11	rs9331896	TC
12	rs10838725	TC
13	rs983392	AA
14	rs10792832	AA
15	rs11218343	TT
16	rs17125944	TT
17	rs10498633	GT
18	rs8093731	CC
19	rs4147929	GG
20	rs3865444	CC
21	rs7274581	TT
22	rs429358	CC
23	rs7412	CC

квартиль ПГР: **Q4**



Генотип образца:

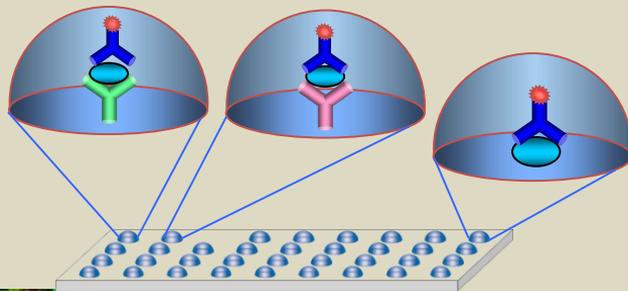
1	rs6656401	GG
2	rs6733839	CT
3	rs5349669	CT
4	rs190982	AG
5	rs9271192	AA
6	rs10948363	AA
7	rs2718058	AA
8	rs1476679	TT
9	rs11771145	GG
10	rs28834970	TT
11	rs9331896	TC
12	rs10838725	TT
13	rs983392	AA
14	rs10792832	GG
15	rs11218343	TT
16	rs17125944	TT
17	rs10498633	GG
18	rs8093731	CC
19	rs4147929	GA
20	rs3865444	CA
21	rs7274581	TT
22	rs429358	TT
23	rs7412	CT

квартиль ПГР: **Q1**

Флуоресцентная картина  
гибридизации и генотип образца  
ДНК от пациента с болезнью  
Альцгеймера

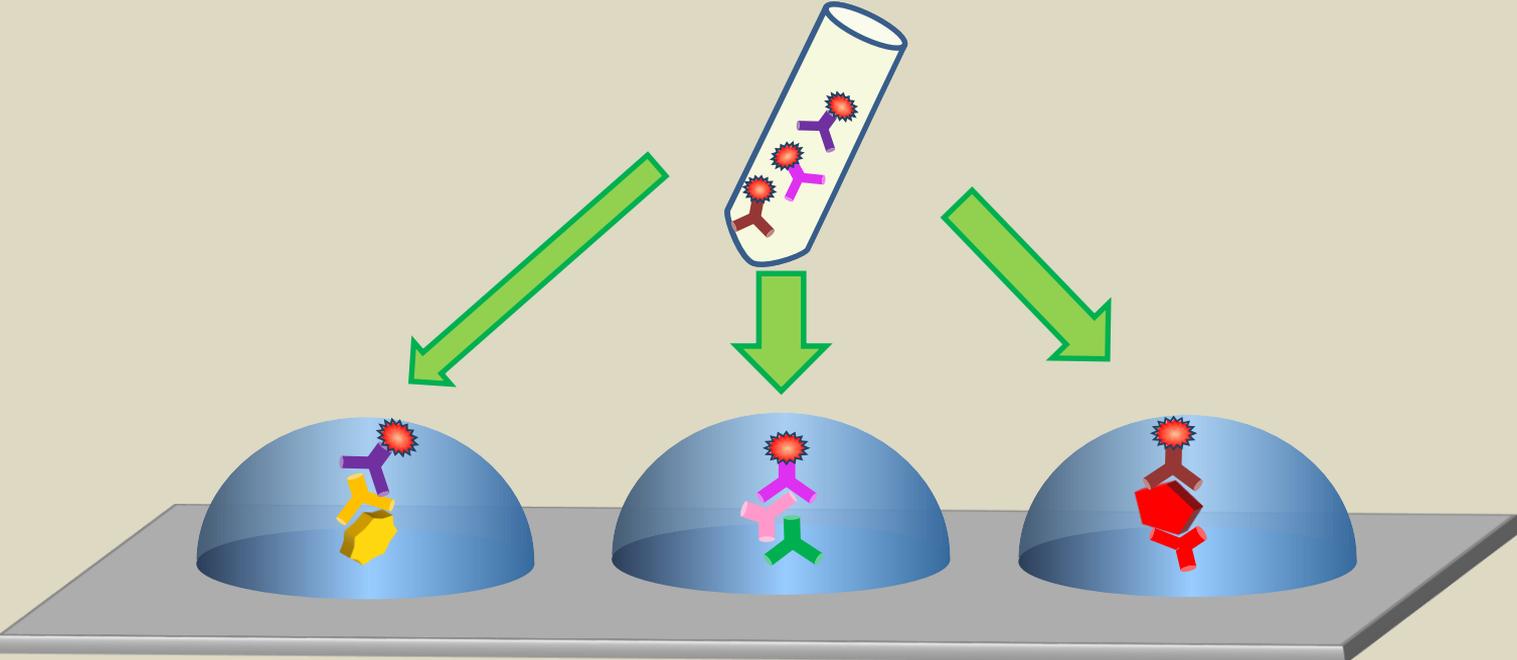
Флуоресцентная картина  
гибридизации и генотип образца  
ДНК пациента без  
зарегистрированных когнитивных  
нарушений

	ОШ (95% ДИ)	p-value
Qu1 ПГР	-0,2765	0,0012
Qu2 ПГР	-0,063	0,00029
Qu3 ПГР	0,1635	0,00541
Qu4 ПГР	1,94	0,006865
APOE_ε4 (hetero)	2,53	0,000115
APOE_ε4 (mut)	8,69	0,005689



Мультиплексный иммуноанализ антител  
на гидрогелевых биочипах

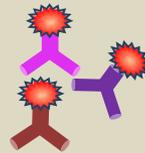
# Мультиплексный иммуноанализ на гидрогелевом биочипе



иммобилизованный антиген  
иммобилизованные антитела



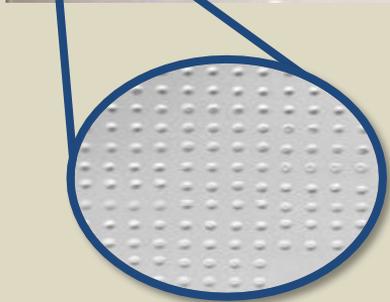
анализируемые антитела  
анализируемый антиген



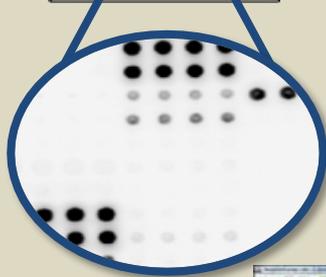
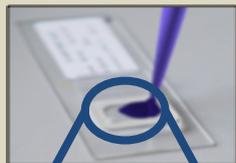
конъюгаты детектирующих антител и флуоресцентной метки

# Анализ образца сыворотки крови на гидрогелевом биочипе

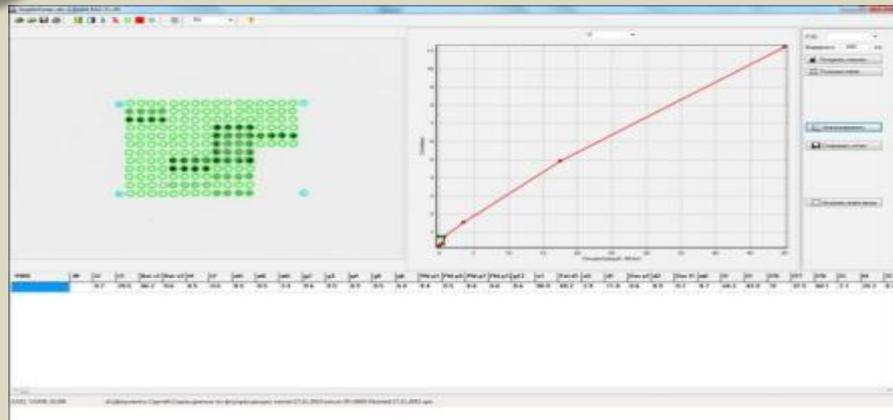
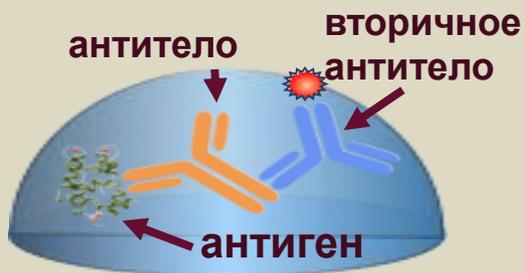
Инкубация биочипа с образцом



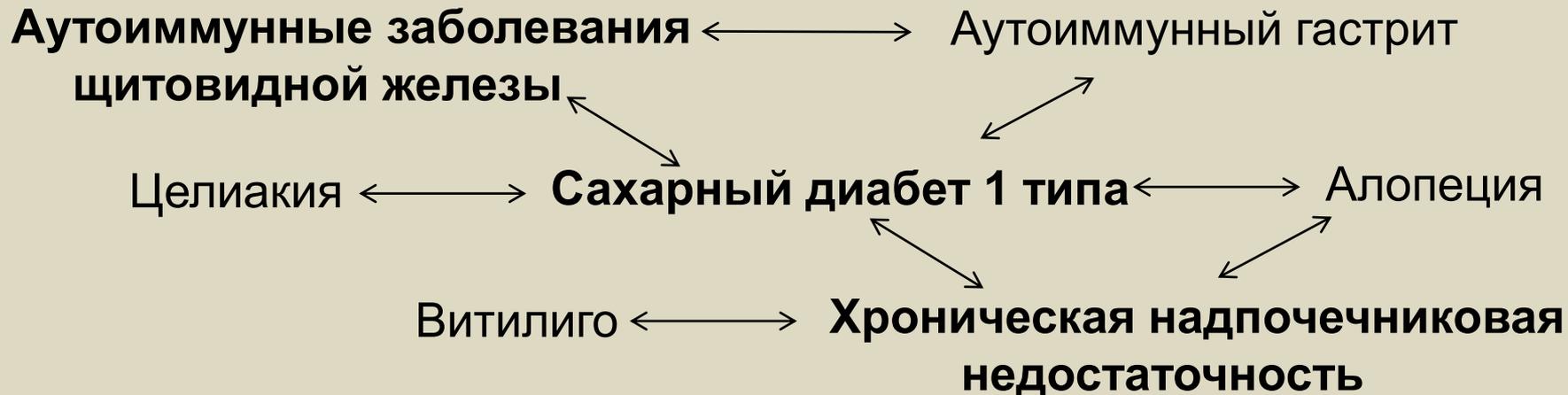
Инкубация с флуоресцентно-мечеными антителами



Регистрация сигналов флуоресценции, анализ данных



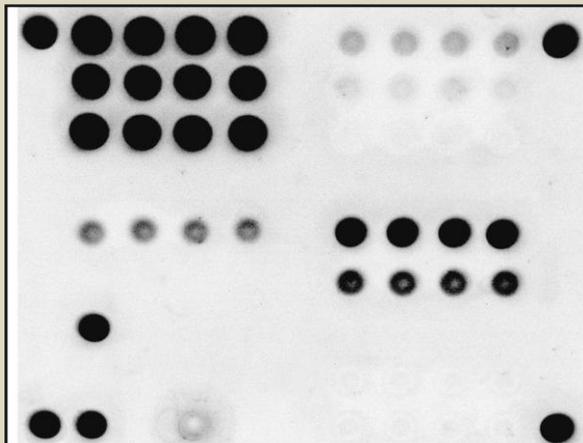
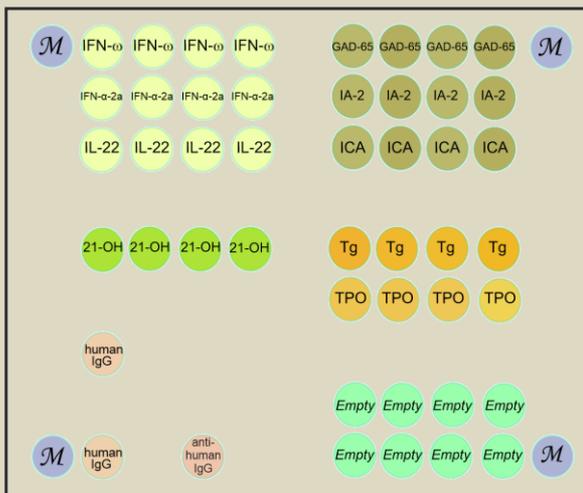
## Аутоиммунный полиэндокринный синдром I типа



## Аутоиммунные полиэндокринные синдромы взрослых

- ранняя доклиническая диагностика
- предотвращение осложнений
- выявление других затронутых членов семьи

# Биочип для выявления аутоантител, характерных для различных аутоиммунных эндокринных патологий



## Аутоиммунный полигландулярный синдром I типа (АПС-1)

IFN-omega (интерферон омега)  
 IFN-alpha 2a (интерферон – альфа -2a)  
 IL-22 (интерлейкин -22)

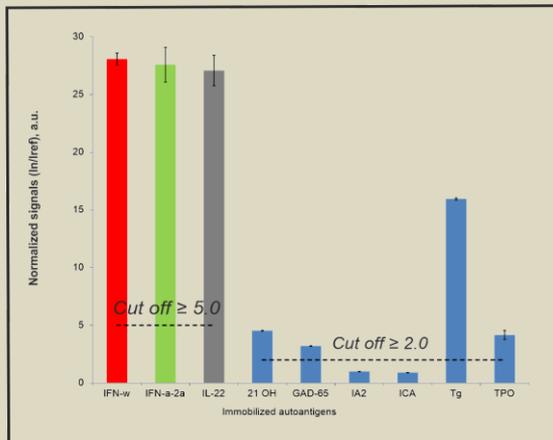
Первичная надпочечниковая недостаточность  
 21OH (21-гидроксилаза )

Аутоиммунные заболевания щитовидной железы

TPO (тиреопероксидаза)  
 TG (тиреоглобулин)

Сахарный диабет I типа

GAD (глутаматдекарбоксилаза)  
 ICA (цитоплазматический антиген островковых клеток)  
 IA2 (тирозинфосфатаза подобный белок)



# Апробация метода

---

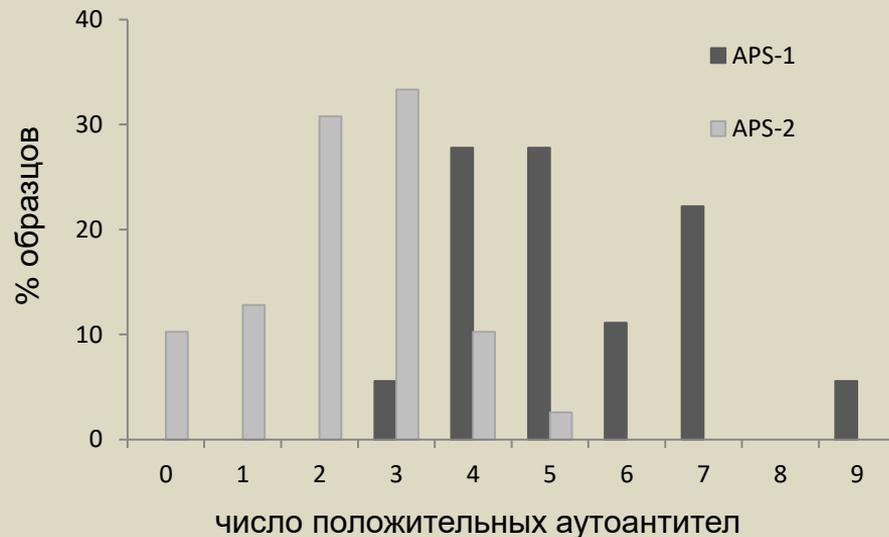
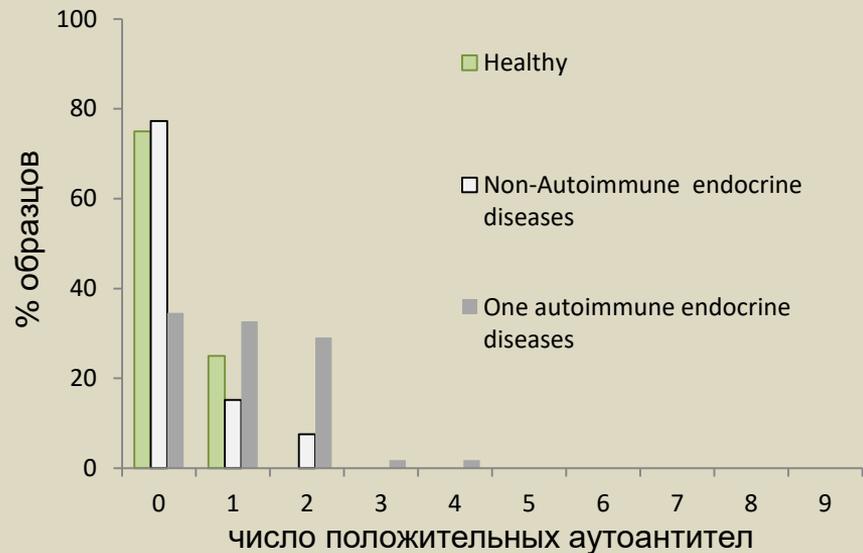
Одномоментное контролируемое когортное сравнительное исследование (n=206)



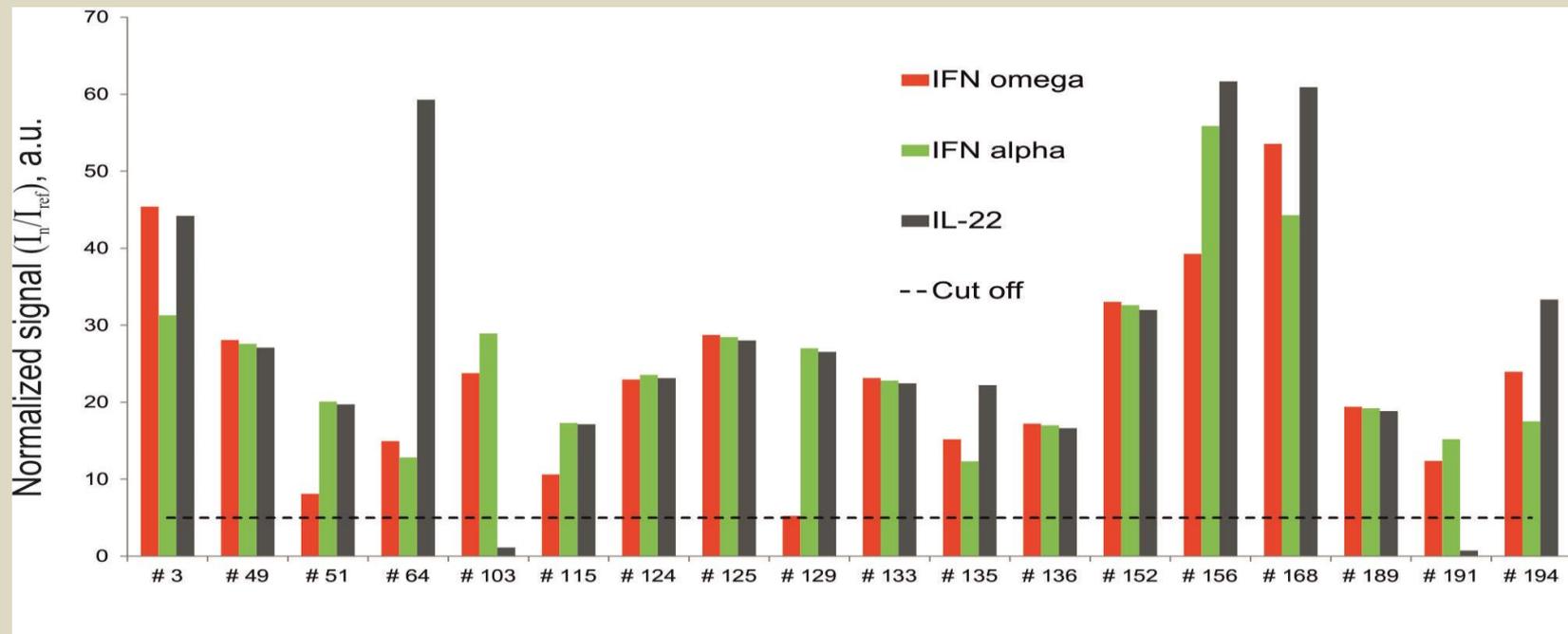
# Совпадение двух методов при детекции органо-специфических аутоантител

<b>AuAbs to</b>	<b>ELISA + Array +</b>	<b>ELISA - Array -</b>	<b>ELISA –Array +</b>	<b>ELISA + Array -</b>	<b>Accuracy, %</b>	<b>Precision</b>	<b>Recall</b>
<b>21-OH</b>	154	30	9	13	<b>89.3</b>	0.94	0.92
<b>GAD-65</b>	184	16	2	4	<b>97.1</b>	0.99	0.98
<b>IA2</b>	184	17	0	5	<b>97.6</b>	1.00	0.97
<b>ICA</b>	178	18	8	2	<b>95.1</b>	0.96	0.99
<b>TG</b>	160	35	8	3	<b>94.7</b>	0.95	0.98
<b>TPO</b>	126	57	14	9	<b>88.8</b>	0.90	0.93
Total	986	173	41	36	93.8	0.96	0.96

# Частота выявления положительных аутоантител, % от общего числа образцов

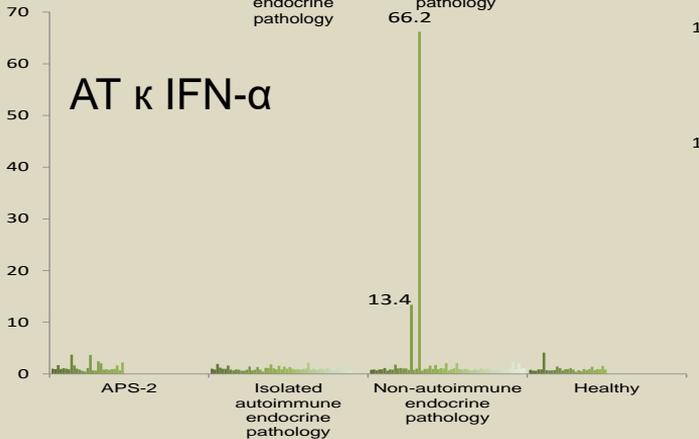
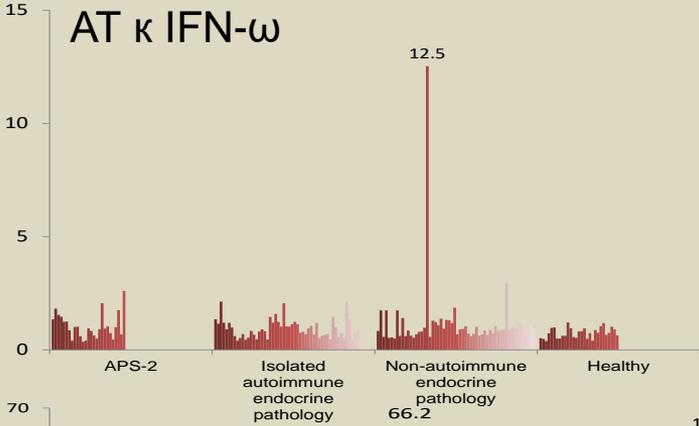


# Аутоантитела к IFN- $\omega$ , IFN- $\alpha$ и IL-22 у пациентов с АПС-1



- 16/18 - триплет аутоантител против INF- $\omega$  + INF- $\alpha$  + IL-22
- в 100% образцов – по крайней мере два из трех аутоантител

# Аутоантитела к IFN- $\omega$ , IFN- $\alpha$ and IL-22 в образцах от пациентов без диагностированного АПС-1



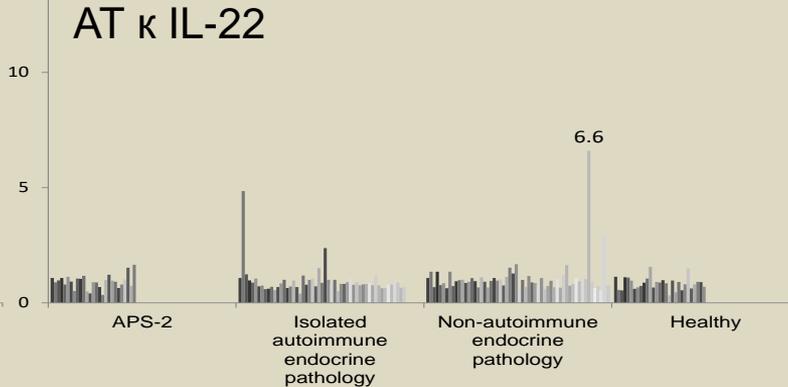
**0/185** - триплет аутоантител против INF- $\omega$  + INF- $\alpha$  + IL-22

**3/185** без диагностированного АПС-1:

- ( $\uparrow$  АТ к IL-22) поражение тимуса, кандидоз;
- ( $\uparrow$  АТ к IFN- $\alpha$ ) синдром множественной эндокринной неоплазии 1-го типа, терапия IFN в анамнезе;
- ( $\uparrow$  АТ к IFN- $\omega$ ,  $\uparrow$  АТ к IFN- $\alpha$ ) лимфома надпочечников

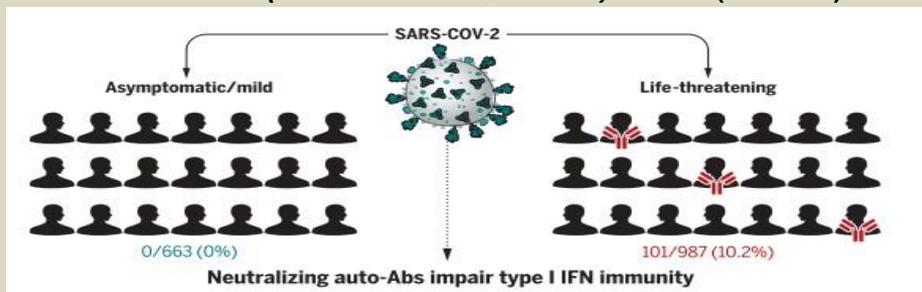
**Специфичность** выявления АПС-1 - **99.5 %**

**Чувствительность** выявления АПС-1 - **100 %**



# Важность скрининга на наличие аутоантител к интерферонам I типа

Bastard, Paul et al. 2020. Autoantibodies against Type I IFNs in Patients with Life-Threatening COVID-19. *Science (New York, N. Y.)* 370(6515).



Bastard, Paul et al. 2021. Autoantibodies Neutralizing Type I IFNs Are Present in ~ 4% of Uninfected Individuals over 70 Years Old and Account for ~ 20% of COVID-19 Deaths. *Science Immunology* 6(62): eabl4340.

У **18%** пациентов с COVID-19 со смертельным исходом (**n=1 124**) были обнаружены аутоантитела к интерферонам I типа

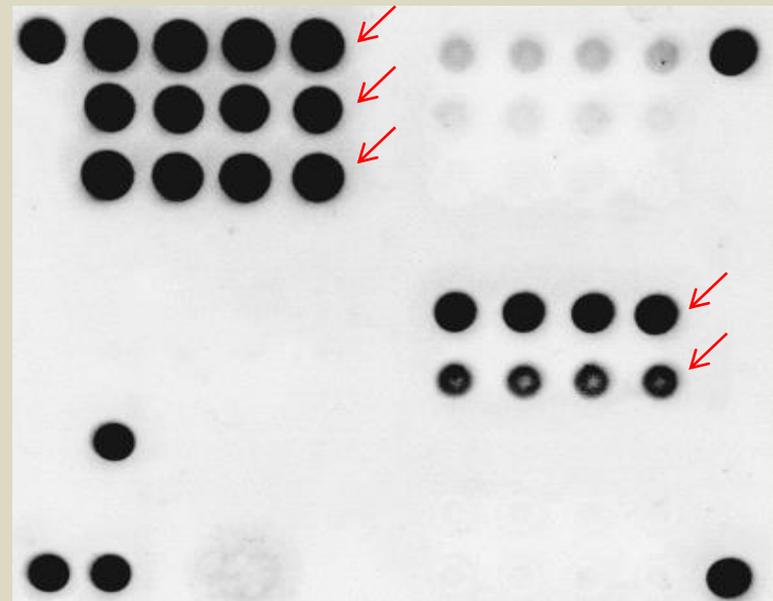
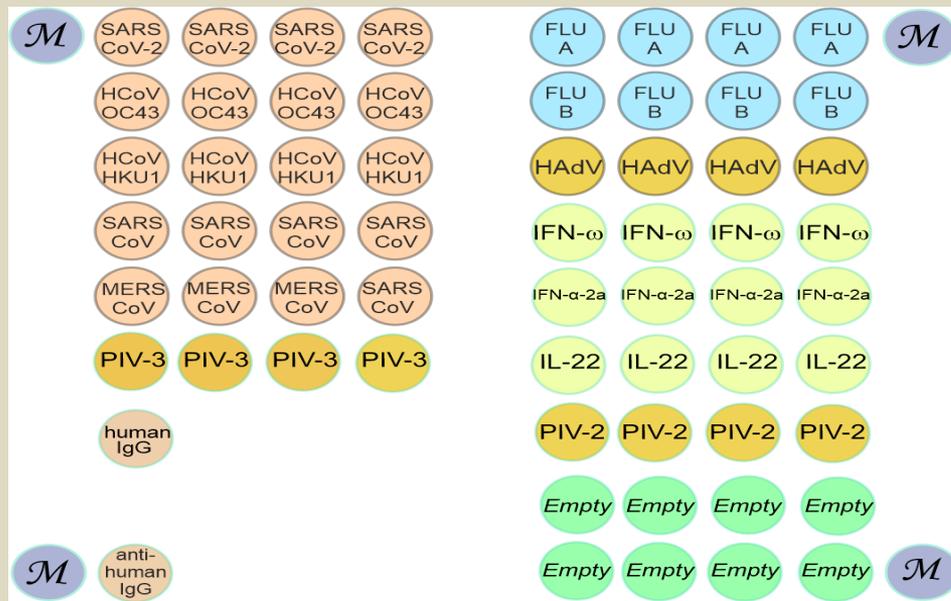
Частота выявления аутоантител к интерферонам I типа увеличивается с возрастом, резко возрастая после 70 лет (**n=34 159**) :

**0,18%** от **18 до 69 лет**,

**1,1%** от **70 до 79 лет**,

**3,4%** > **80 лет**

# Биочип для определения уровней антител к антигенам вирусных возбудителей респираторных инфекций, включая SARS-CoV-2



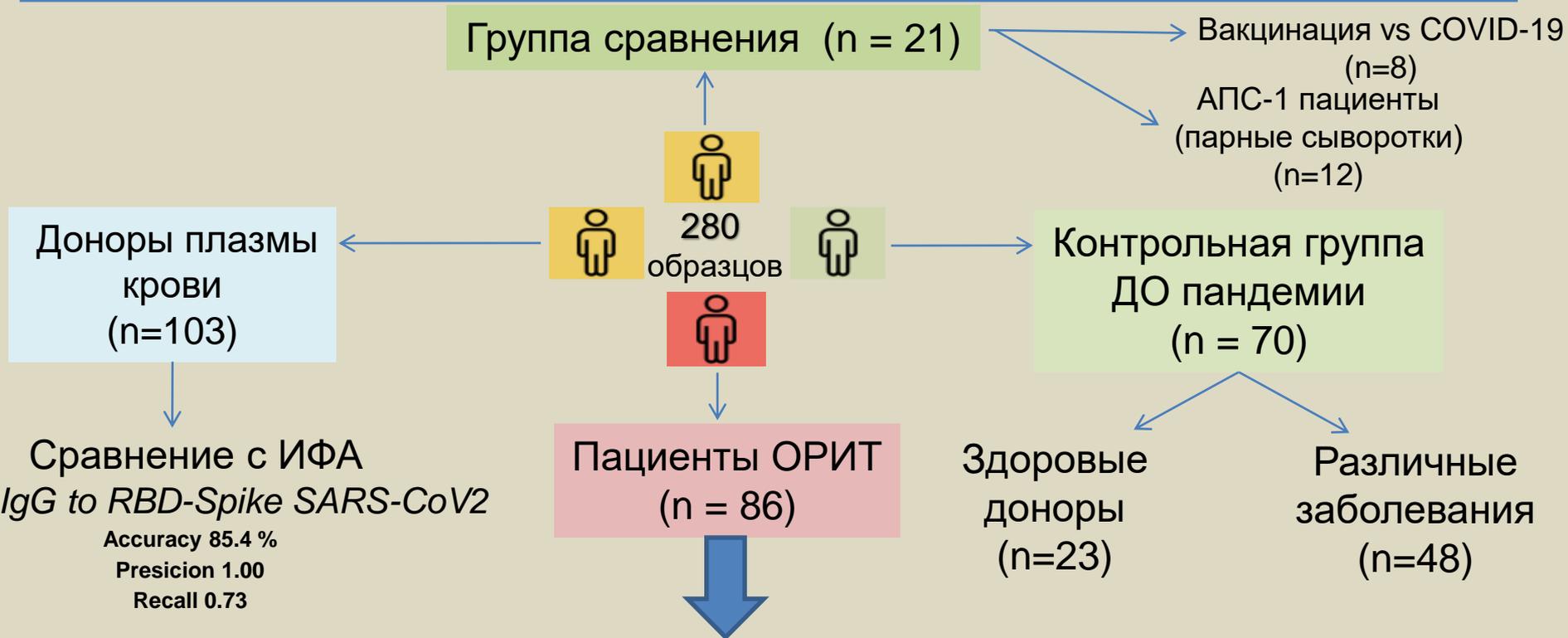
Одновременная детекция антител иммуноглобулинов класса G (IgG) и M (IgM) к:

- коронавирусам – SARS-CoV-2, HCoV-OC43, HCoV-HKU1, SARS-CoV, MERS-CoV
- вирусам гриппа A и B (FLU-A, FLU-B)
- возбудителям ОРВИ – аденовирусу (гексон V, HAdV), вирусам парагриппа (PIV1, PIV2, PIV3), респираторно-синцитиальному вирусу (RSV)

Выявление аутоантител к интерферонам I типа (IFN- $\omega$  и IFN- $\alpha$ -2a) - маркеров тяжелого течения COVID-19

COVID-19

# Апробация метода



- АТ к IFN- $\alpha$ -2а, IFN- $\omega$  **(10,5%)**

- $\geq 2$  IgM (SARS-CoV-2 + другие вирусы) **(23,3%)**

- Титр IgG против CoV OC43 выше по сравнению с контрольной группой ДО пандемии

## Исследования проводятся при поддержке:

---

- ✓ Соглашения с Министерством науки и высшего образования РФ № 075-15-2019-166
- ✓ Гранта Фонда научно-технологического развития Югры № 2022-05-01/2022
- ✓ Гранта Автономной некоммерческой организации «Московский центр инновационных технологий в здравоохранении» (Соглашение № 2708-1/22)