

8. Классификация цирроза печени. Симптомы и лечение декомпенсированного цирроза печени. Available at: <http://moyapechen.ru/bolezni/cirrhosis/klassifikaciya-cirroza-pecheni-simptomu-i-lechenie-dekompensirovannogo-cirroza.html>.
9. Диагностика и лечение системных васкулитов. Available at: <http://www.vasculitis.ru/index>.

REFERENCES

1. Dunaeva N.V., Neustroeva Yu.A., Tikhomirova T.A., Sysoev K.A., Alekseeva N.P., Lapin S.V. et al. Prevalence and risk factors for cryoglobulinemia associated with chronic hepatitis C. *Meditinskaya immunologiya*. 2007; 9(6): 575—80. (in Russian)
2. Konstantinova N.A. *Cryoglobulins and Pathology* [Krioglobuliny i patologiya]. Moscow: Meditsina; 1999. (in Russian)
3. Konstantinova N.A., Kirsanov A.Yu. Evaluation of serum cryoglobulins subject circulating immune complexes. *Laboratornoe delo*. 1989; (11): 62—5. (in Russian)
4. Neustroeva Yu.A. Optimization of semi-quantitative method of detection of cryoglobulins in a clinical diagnostic laboratory. *Klinicheskaya laboratornaya diagnostika*. 2007; (1): 37—41. (in Russian)
5. Tikhomirov A.A. Cryoglobulins and their clinical significance. *Terapevticheskiy arkhiv*. 1977; 49: 144—7. (in Russian)
6. Hilgard P., Treichel U., Dries V., Dienes H.P., Gerken G. Cryoglobulin-associated uptake of hepatitis C virus into human hepatocytes. *Hepato-gastroenterology*. 2005; 52(65): 1534—40.
7. Hwang S.J., Chu C.W., Huang D.F., Lan K.H., Chang F.Y., Lee S.D. Genetic predispositions for the presence of cryoglobulinemia and serum autoantibodies in Chinese patients with chronic hepatitis C. *Tissue Antigens*. 2002; 59(1): 31—7.
8. The classification of cirrhosis. The symptoms and treatment of decompensated cirrhosis. Available at: <http://moyapechen.ru/bolezni/cirrhosis/klassifikaciya-cirroza-pecheni-simptomu-i-lechenie-dekompensirovannogo-cirroza.html>. (in Russian)
9. Diagnosis and treatment of systemic vasculitis. Available at: <http://www.vasculitis.ru/index>. (in Russian)

Поступила 14.07.16

Принята к печати 01.08.16

ОБЩЕКЛИНИЧЕСКИЕ МЕТОДЫ

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2017

УДК 616-078.33

Дон Е.С.¹, Тарасов А.В.², Эпштейн О.И.¹, Тарасов С.А.²

БИОМАРКЕРЫ В МЕДИЦИНЕ: ПОИСК, ВЫБОР, ИЗУЧЕНИЕ И ВАЛИДАЦИЯ

¹ФГБНУ «Научно-исследовательский институт общей патологии и патофизиологии», 125315, Москва;

²ООО «НПФ Материя Медика Холдинг», 129272, Москва

Поскольку сфера применения биомаркеров с каждым годом расширяется и уже включает в себя использование их в качестве индикатора наличия или отсутствия заболевания, ответа на терапию, эффективности лекарственного средства или доклинической модели диагностического параметра и даже участника процесса поиска механизма действия лекарственных препаратов, значимость изучения биомаркеров нельзя переоценить. Данная работа посвящена систематизации и структурированию существующей информации о биомаркерах, начиная с первичного скрининга и заканчивая валидацией выбранной молекулы или характеристики.

Ключевые слова: биомаркер; диагностика.

Для цитирования: Дон Е.С., Тарасов А.В., Эпштейн О.И., Тарасов С.А. Биомаркеры в медицине: поиск, выбор, изучение и валидация. *Клиническая лабораторная диагностика*. 2017; 62(1): 52-59. DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0869-2084-2017-62-1-52-59>

Don E.S.¹, Tarasov A.V.², Epshtein O.I.¹, Tarasov S.A.²

THE BIOMARKERS IN MEDICINE: SEARCH, CHOICE, STUDY AND VALIDATION

¹The research institute of general pathology and pathophysiology, 125315 Moscow, Russia

²The "NPF Materia Medica Holding", 129272 Moscow, Russia

The sphere of application of biomarkers is expanding every year and already comprises their using as indicator of presence or absence of disease, response to therapy, efficiency of medications or pre-clinical model of diagnostic parameter and even participant of process of search of mechanism of effect of medications. Hence, it is impossible to overestimate significance of studying of biomarkers. The article is dedicated to systematization and structuring of present information concerning biomarkers, starting from primary screening and completing with validation of chosen molecule or characteristic.

Key words: biomarker; diagnostics.

For citation: Don E.S., Tarasov A.V., Epshtein O.I., Tarasov S.A. The biomarkers in medicine: search, choice, study and validation. *Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika (Russian Clinical Laboratory Diagnostics)* 2017; 62 (1): 52-59. (in Russ.). DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0869-2084-2017-62-1-52-59>

For correspondence: Don E.S., senior researcher of the laboratory of physiologically active substances. e-mail: don_es@mail.ru

Для корреспонденции: Дон Елена Сергеевна, ст. науч. сотр. лаб. физиологически активных веществ ФГБНУ «НИИ общей патологии и патофизиологии», e-mail: don_es@mail.ru

Conflict of interests. *The authors declare absence of conflict of interests.*

Acknowledgment. *The study had no sponsor support*

Received 27.06.2016
Accepted 06.07.2016

Возможность безошибочно предсказывать развитие рака и вовремя начать лечение, возможность выбирать терапию в зависимости от индивидуальных особенностей пациента, возможность ранней диагностики заболевания и определения стадии заболевания за секунды *in vitro* — ключом к решению этих и многих других задач современной медицины могут стать биомаркеры. Биомаркер определяют как количественно и объективно измеряемый индикатор биологического, патогенного процесса или фармакологического ответа на терапию [1] и используют [2—4]:

- как индикатор наличия (или отсутствия) заболевания, его степени тяжести;
- на разных этапах разработки лекарственного средства;
- в оценке пригодности доклинических моделей на животных;
- в клинических исследованиях для разделения пациентов по группам;
- как диагностический или сопутствующий диагностике параметр;
- индикатор ответа на терапию;
- характеристику эффективности и безопасности/токсичности лекарственного средства;
- при поиске механизмов действия лекарственных препаратов;
- анализе и регистрации биоаналоговых лекарственных средств.

Классификации биомаркеров. При введении биомаркеров в медицинскую практику они были в основном физиологическими (температура тела, кровяное давление и сердечный ритм) и служили сигналом наличия нарушений в работе внутренних органов [2]. В настоящее время, исходя из широкого спектра их применения, стало ясно, что биомаркерами могут быть различные, как правило, измеряемые количественно параметры, как то: молекулы, изображения, свойства клеток, тканей, органов и организма в целом, а также их комбинации. Все чаще биомаркерами становятся белки, особенно перспективным выглядит использование белков сыворотки крови ввиду их доступности, наличия разработанных методов анализа и диагностического потенциала [5]. За последние годы сотни потенциальных биомаркеров — белков сыворотки крови были оценены на предмет возможного использования в диагностике болезней; к сожалению, только единицы нашли применение в клинической практике. К примеру, для диагностики рака яичников в качестве потенциальных биомаркеров рассматривали цитокины, факторы роста, коагуляции и апоптоза, гормоны, адгезионные молекулы; зарегистрированным биомаркером стал только СА 125 [6]. Также в последнее время большую популярность приобрели биомаркеры на основе ДНК и РНК, которые включают в себя саму ДНК (циркулирующая ДНК для диагностики рака легкого [7]), вариации числа копий гена, длинные некодирующие РНК [8], паттерны метилирования ДНК (фекальные ДНК-тесты для выявления колоректального рака [9]), микроРНК (биомаркер при диагностике и прогнозировании рака яичников [10]) или модифицированные гистоны. Более традиционные биомаркеры представляют собой простые характеристики состояния здоровья человека, такие как величина артериального давления, объем легких, концентрация глюкозы в сыворотке/плазме крови, объем мочи, клеточные метаболиты, липиды и другие физические и биохимические измеряемые величины. Параметры, оцениваемые при проведении компьютерной

или магнитно-резонансной томографии [11], могут также выступать в качестве биомаркеров.

Рабочая группа по биомаркерам и суррогатным конечным точкам Национального института здравоохранения США [1] классифицировала биомаркеры на три типа:

- тип 0 отражает естественный ход заболевания и коррелирует с известными клиническими показателями в течение всей длительности заболевания (например, концентрация глюкозы в крови натощак);
- тип I отражает влияние терапии с учетом механизма действия лекарственного средства (как маркеры противовоспалительной активации);
- тип II — суррогатные конечные точки, которые предсказывают клиническую эффективность или вред при использовании лекарственного средства.

Также биомаркеры можно разделить по их применению (табл. 1).

Клинические биомаркеры — это определенные валидированные характеристики или переменные, отражающие самочувствие и качество жизни пациента в результате лечения. Они являются объективным отражением уровня здоровья человека и характеризуют протекание и исход его патологического и естественного биологического процессов и связанных с ними функциональных и физиологических реакций, а также ответа на фармакологическое вмешательство [16]. Суррогатные биомаркеры — это мера замещения клинической конечной точки, которая используется для оценки эффективности фармакологического вмешательства на основании изменения биологических маркеров. Такие маркеры, в отличие от клинических точек, могут быть не очевидны с первого взгляда, поскольку не характеризуют здоровье пациента в полной мере. Примерами суррогатных биомаркеров могут быть изменение кровяного давления и/или степени снижения концентрации липопротеинов высокой плотности в плазме крови при использовании соответствующих лекарств [17] (тогда как клиническим биомаркером будет, например, головная боль), а также использование уровня гликированного гемоглобина (HbA1c) в крови в качестве суррогатной конечной точки при диабете [18]. Проверка суррогатных конечных точек требует обширных данных, в том числе полученных в ходе крупных рандомизированных клинических испытаний, которые должны продемонстрировать, что суррогат является достаточно прогностическим для истинного клинического параметра, и эффект терапии на суррогат прогнозирует его влияние на истинную конечную точку. Как следствие, при всей обширности изучения таких маркеров, количество зарегистрированных и используемых в реальной клинической практике биомаркеров крайне мало.

Диагностические маркеры — это биомаркеры наличия заболевания у индивидуума; такие маркеры в некоторых случаях могут быть использованы для определения этапа болезни, и при этом они также будут прогностическими биомаркерами. Наличие таких маркеров особенно важно для ранней диагностики заболеваний, для которых в настоящее время не существует эффективной терапии на поздних стадиях, как, например, некоторые формы рака.

Тем не менее при отсутствии эффективной терапии на первый план выходит другая роль диагностических биомаркеров — помощь в фундаментальных исследованиях процесса течения болезни или оценка новых лекарственных веществ в качестве потенциальных терапевтических средств. Прогно-

Основные типы биомаркеров, используемых на разных стадиях жизнедеятельности

Биологические процессы	Патогенные процессы	Ответ на терапию
Конечная точка клинической эффективности — характеристика, отражающая самочувствие, функционирование и выживаемость пациента [1]	Конечная точка клинической эффективности	Конечная точка клинической эффективности
Суррогатный биомаркер — биомаркер, используемый взамен какой-либо конечной точки и предсказывающий либо клиническую эффективность, либо вред, либо отсутствие какой-либо реакции [12]	Суррогатный биомаркер	Суррогатный биомаркер
Прогностический биомаркер — биомаркер, который используют при прогнозах развития болезни или исхода заболевания у пациента вне зависимости от используемой/неиспользуемой терапии [13, 14]. Иногда выделяют биомаркеры состояния, которые применяются для определения тяжести заболевания, или верификационные биомаркеры, подтверждающие заболевание на субклинической стадии (до появления первых клинических признаков)	Прогностический биомаркер	Фармакодинамический биомаркер — биомаркер, показывающий прямой фармакологический эффект лекарственного препарата [15]
	Диагностический биомаркер — биомаркер для идентификации заболевания у пациента	Предиктивный биомаркер — это такой, который предсказывает пользу или вред медикаментозной или иной терапии [13], в том числе:

стические биомаркеры также могут быть использованы для прогнозирования развития заболевания или возможности его вылечить у пациентов вне зависимости от принимаемой терапии [3], как, например, при применении коммерческих диагностических тест-систем для изучения материала, полученного при биопсии опухоли.

Предиктивные биомаркеры полезны при анализе пользы или вреда конкретного лекарственного средства для пациента [3]. Яркий пример — оценка эффективности лечения рака молочной железы трастузумабом (рекомбинантные гуманизированные моноклональные антитела к рецептору эпидермального фактора роста человека 2 типа — HER₂) путем амплификации онкогена HER₂/neu на ранних стадиях рака груди [19]. Биомаркеры также полезны при изучении эффектов новых лекарственных веществ и их фармакодинамики.

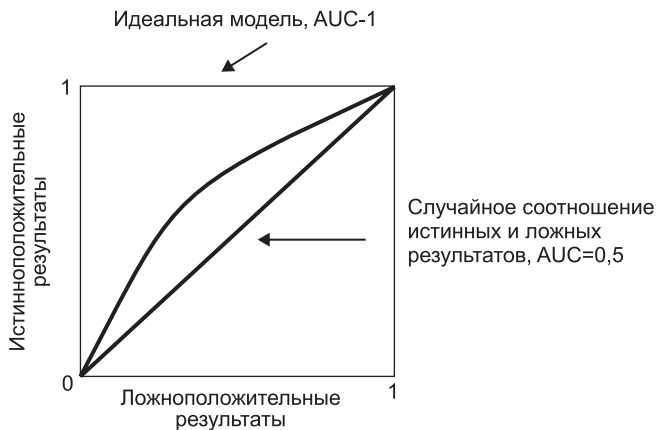
Биомаркеры могут быть классифицированы по их отношению к мишеням лекарственных препаратов. Такие мишени в основном представляют белками. Если биомаркер совпадает с предполагаемой терапевтической мишенью, как, например, для большинства противоопухолевых препаратов, концентрация биомаркера может говорить о влиянии или отсутствии влияния препарата на мишень и соответственно свидетельствовать о его эффективности/неэффективности [19]. В этом случае совместное изучение биомаркера и препарата в клинических испытаниях может ускорить процесс разработки лекарственного средства. Тем не менее, хотя первичные мишени лекарства могут быть наиболее подходящими биомаркерами, во многих случаях различные клеточные белки, которые связываются с препаратом, также оказывают непосредственное влияние на взаимодействие лекарственно-го препарата и его первичной мишени. В таких случаях для представления правильной клинической картины необходимо учитывать все возможные взаимодействия.

Поиск биомаркеров. Для успешного применения биомаркер необходимо выбрать, изучить и валидировать. Для поиска биомаркеров существуют две основные стратегии: стратегия, основанная на гипотезе или основанная на открытии [20]. Идентификация биомаркеров на основе гипотезы осуществляется в результате анализа механизмов развития

болезни. Например, данные о том, что при сахарном диабете наблюдается стабильно повышенный уровень глюкозы в крови, привели к идентификации гликированного гемоглобина в качестве биомаркера для диагностики сахарного диабета [21]. Выбор, основанный на открытии, чаще является результатом скрининга множества молекул, потенциально связанных с изучаемой болезнью. В таком случае на начальной стадии определяют только категорию потенциального биомаркера. Тем не менее такой скрининг часто приводит к появлению новых гипотез. Так, при изучении генов в опухолевых клетках яичников и молочной железы было обнаружено повреждение гена BRCA1 при данных видах злокачественных новообразований, после чего последующее его изучение привело к пониманию его роли в репарации ДНК, т. е. к гипотезе [22]. При поиске биомаркеров особенно следует отметить инновационные подходы, объединенные суффиксом «-омика» (от англ. -omics), которые относятся к таким перспективным технологическим платформам, как транскриптомика, геномика, протеомика и метаболомика. Эти подходы, хотя и недавно разработанные, позволяют исследователям обнаружить и идентифицировать различные присутствующие в организме молекулы или их части (ДНК, РНК, белки, пептиды, липиды, метаболиты) для количественной оценки их уровня в крови, плазме и моче [23]. Все чаще омика-стратегии становятся первым этапом поиска биомаркеров, за которым следует огромная аналитическая работа по квалификации выбранных молекул для использования в разработке лекарств и последующей постановке диагноза [2].

Вне зависимости от стратегии, которой придерживается исследователь, при поиске биомаркера необходимо ответить на следующие вопросы:

- Каким будет предполагаемое использование биомаркера(ов)? Например, для выявления заболевания на начальных этапах, для оценки влияния лекарственных средств на течение заболевания, для идентификации мишеней лекарственных средств и т. д.
- Какой источник материала будет использован (ткань, биологическая жидкость)? Так, использование образцов, собранных не специально для изучения биомаркера, часто



ROC-анализ.

приводит к ошибкам измерения и трудностям при валидации биомаркера. Моча, сыворотка, плазма, слюна или мокрота, как правило, доступнее, чем ткани, требующие биопсии.

- Какой способ измерения будет использован (микрочип для изучения экспрессии генов, иммунологический метод анализа, масс-спектрометрия и т. п.)?
- Как будут выбраны пациенты и контрольные группы?
- Какова специфика клинического исследования, какие конечные клинические точки представляют интерес?
- Как будут интерпретированы результаты измерения уровня биомаркера?
- Можно ли использовать экспериментальные модели заболевания на животных вместо клинических испытаний на людях?

Так как кровеносные сосуды пронизывают все ткани организма, логично предположить, что кровь является источником биомаркеров по умолчанию, однако связь между тестируемыми образцами и заболеванием может оказаться важнее. Так, при болезнях ЦНС можно использовать спинномозговую жидкость [24], кровь идеально подходит при сердечно-сосудистых заболеваниях, моча — при метаболических болезнях, болезнях печени или почек. При заболеваниях желудочно-кишечного тракта в качестве источника биомаркеров могут быть использованы желудочный сок или слюна [25], при болезнях легких — слюна, мокрота или даже пары выдыхаемого воздуха. При заболеваниях, локализованных в конкретном месте, могут быть использованы ткань или тканевая жидкость. Вместе с тем иногда образцы, полученные из очагов, удаленных от источников заболевания, тоже могут содержать подходящие биомаркеры. Например, анализ РНК, выделенной из образцов крови, позволяет диагностировать болезнь Альцгеймера или ее отсутствие со 100% чувствительностью и 96% специфичностью [26].

N. Rifai и соавт. [27] отмечают важность наличия «золотого стандарта» образцов для белковых биомаркеров, которые не только были бы отобраны близко к пораженной ткани/органу (чтобы измеренные показатели превосходили таковые для остальных белков сыворотки/плазмы на достаточное число порядков), но и обеспечивали бы максимальный контраст между здоровыми добровольцами и больными пациентами. Отдельные пациенты могут выступать в качестве собственного контроля (например, при изучении каких-либо характеристик до и после терапии).

Однако в случае если заболевание является системным, а не локализованным в каком-либо участке тела, при таком подходе потенциальные биомаркеры могут быть потеряны. Поскольку каждый из пациентов-доноров биомаркеров в

данном случае является больным, можно говорить о некоторой предвзятости данного подхода при отборе пациентов. Если исследования для обнаружения биомаркеров проводят на ограниченном числе пациентов, в дальнейшем обязательно должны быть проведены дополнительные исследования на большем числе пациентов с адекватной статистической моделью и с включением в исследуемые группы здоровых индивидуумов и/или лиц с сопутствующими заболеваниями.

Если есть возможность, следует использовать положительный контроль (например, «золотой стандарт» терапии данного заболевания при изучении лекарства-кандидата) для возможности сравнения с существующими биомаркерами. Кроме того, для ряда гетерогенных заболеваний, как например рак молочной железы, одного биомаркера или даже панели биомаркеров недостаточно для использования у всей популяции больных. В таком случае исследования для выявления биомаркеров могут потребовать гораздо большего объема образцов и групп, чем для однородных заболеваний, а также использования различных методов статистического анализа.

Подходы к выбору биомаркеров. Универсального подхода к выбору биомаркеров не существует, и выбор его зависит от задачи исследования [28]. Два основных подхода к оценке биомаркеров — это логистическая регрессия и ROC-анализ.

Логистическую регрессию широко используют для оценки связи биомаркеров с бинарными событиями в рамках клинических исследований. Исследователи должны решить, рассматривают ли они биомаркер как непрерывную или категориальную переменную. Измеряемые параметры, которые распределены асимметрично, должны быть нормализованы, прежде чем они могут быть оценены как непрерывные; для этого и используют логарифмическое преобразование. Если биомаркеры включены в расчет как переменные с непрерывным значением в логистической регрессии, модель предполагает, что данные по биомаркеру подчинены нормальному распределению среди испытуемых, испытывающих «событие», а также среди тех, кто его не испытывает (контрольная группа) [29]. Несмотря на то что распределение измеряемых параметров биомаркеров часто отличается от нормального, применение трансформации по логарифмической шкале или лямбда-преобразование позволяют приблизить их к нормальному распределению. Коэффициенты соотношения, полученные из логистической регрессии, описывают взаимосвязь между наличием биомаркера и клиническим событием, однако неточное математическое преобразование может привести к ошибочным оценкам [28].

На практике несколько чаще используют определение рабочей характеристики приемника (ROC) и измерение площади под кривой (AUROC, или просто AUC) (т. н. ROC-анализ) [30]. Этот подход предложен в качестве наиболее оптимального способа выбора биомаркеров на Консорциуме по экспериментально-прогностической оценке безопасности [31] и служит частью процесса проверки каждого индивидуального биомаркера-кандидата, а затем и для панели различных комбинаций биомаркеров в исследовательской организации ранней диагностики (EDRN) Национальных институтов онкологии США, вплотную занимающейся изучением биомаркеров [13]. Кривая рабочей характеристики приемника отражает способность маркера указывать на различие между двумя группами субъектов. Для этого варьируют какой-либо из параметров и строят график «специфичность против чувствительности». Так, например, при использовании в качестве примера двухкомпонентной диагностики рака на ось ординат наносят процент истинно-положительных измерений (количество субъектов с достоверно определенным раком — характеристика чувствительности), а на ось абсцисс — процент ложноположительных результатов (пациенты без рака,

которым ошибочно поставлен диагноз «рак», — характеристика специфичности). AUC 0,5 свидетельствует о том, что эффективность биомаркера не выше случайной (50%), в то время как AUC 1,0 означает, что найден идеальный классификатор, который верно диагностирует как наличие рака, так и его отсутствие (см. рисунок). Такая обработка учитывает ошибки как первого, так и второго рода, то есть прогнозирует как ложноположительные, так и ложноотрицательные результаты. AUC позволяет сравнивать эффективность (если анализ проводят на том же наборе проб) различных биомаркеров или панели биомаркеров, но предполагает наличие другого признанного метода, позволяющего определить истинно-положительные срабатывания (т. н. «золотого стандарта»), как например гистопатология органов).

Другим важным моментом, на который стоит обратить внимание, является количество субъектов, проанализированных при оценке эффекта биомаркера. Это принципиальный момент для дизайна клинических исследований при изучении биомаркеров. Многие биомаркеры исследовали менее чем на ста пациентах, однако в таком случае связь биомаркеров с определенным состоянием не имеет достаточной статистической мощности. Количество и объем получаемых образцов также важно заранее предусмотреть. Для идеальной оценки биомаркеров желательно иметь как наборы данных для определения параметров метода, так и независимые наборы данных для оценки стабильности результатов [20]. Во многих случаях из-за ограниченности средств и времени для оценки данных используют «бутстрэп» подходы, основанные на перекрестной валидации или многократном делении одного набора данных на разные выборки, которые могут быть использованы для оценки общей эффективности метода (англ. bootstrapping) [32]. Такая парадигма позволяет оценить производительность на «независимых» данных, но не всегда учитывает влияние неизвестных или неучтенных отношений в рамках этих данных [32]. Однако таким образом можно довольно эффективно провести понижающую селекцию биомаркеров, что может значительно упростить установление потенциальных биомаркеров-кандидатов, когда данные независимых тестов недоступны.

Методы оценки биомаркеров. Критическим моментом при количественном определении биомаркеров является использование стандартных операционных процедур для сбора и хранения проб для экспериментов, ведь даже небольшие различия в обработке и подготовке проб могут сыграть важную роль в надежности результатов и воспроизводимости анализов. Поэтому разработка биомаркеров должна быть завершена валидацией анализа для определения биомаркеров, особенно такого его параметра, как устойчивость, характеризующего способность анализа давать правильные воспроизводимые результаты при незначительных колебаниях условий проведения эксперимента [33], а также проверкой анализа при значительных изменениях этих условий.

Для обнаружения биомаркеров могут быть использованы различные методы. Если метод основан на известной ранее информации (т. е. на гипотезе), его чаще всего используют для наблюдения за изменениями содержания аналита (потенциального биомаркера), исходя из общих знаний. Сильной стороной такого подхода будет применение общеизвестного метода анализа, например, использование мультиплексных анализов при оценке уровня цитокинов в ходе стимуляции иммунного ответа. Методы, основанные на открытиях, когда биомаркеры ищут «вслепую», путем скрининга, более распространены. Часто в этом случае можно заранее определить только категорию потенциального биомаркера (белковый биомаркер, генетический биомаркер, продукт метаболизма и т. д.), но не идентифицировать его. Для определения биомаркеров в случае, когда известно об их белковой природе,

часто используют различные варианты масс-спектрометрии, позволяющие фракционировать несколько сотен пептидов и даже выявлять посттрансляционные модификации [13]. Для детекции метаболитических биомаркеров применяют в комбинации с масс-спектрометрией такие методы, как газожидкостная (ГЖХ) и высокоэффективная жидкостная хроматография (ВЭЖХ), капиллярный электрофорез, а также ядерный магнитный резонанс (ЯМР) [34]. Подходы для анализа генома (ДНК-секвенирование и т. д.) также довольно перспективны, а поскольку в качестве биомаркеров могут применяться различные изображения, методы их получения также можно добавить к этому списку [35]. Бывают и случаи, когда в обнаружении искомого биомаркера может помочь только комбинация нескольких методов.

Валидация биомаркеров. После того как биомаркеры выбраны, необходимо их тщательно квалифицировать и валидировать в клинических исследованиях. Под валидацией понимают процесс документированного подтверждения достижений разумной степени уверенности в том, что выбранный биомаркер выполняет свое функциональное назначение, а его использование приводит к ожидаемым результатам. Такая работа является многопрофильной и требует привлечения множества лабораторий и организаций различного профиля.

Валидацию любого биомаркера следует начинать с валидации анализа для его определения, а иногда и с предварительной его разработки. В связи с особенностями изучения биомаркеров (динамические или слишком низкие/высокие концентрации в образцах, чувствительность к условиям забора и хранения образцов, влияние компонентов раствора и отсутствие хорошо охарактеризованного стандарта [36]), валидация метода их оценки сложнее валидации обычного метода определения биомолекул. Поэтому единой стратегии валидации методов для оценки биомаркеров не существует. Разные исследователи классифицируют их на несколько категорий, самой распространенной из которых является подход «пригодности для конкретных целей» (англ. «fit-for-purpose»), когда методику валидируют под определенные задачи, допуская ее непригодность для альтернативных целей [37]. При таком подходе анализы для принятия решения о дальнейшем изучении биомаркера, о выборе биомаркеров-кандидатов и концепции доклинических исследований, анализы для тестирования образцов из клинических исследований валидируют в различном объеме (табл. 2).

При валидации биомаркера для клинического применения задачи анализов также можно разделить на первичную оценку пригодности (показывают прямой биологический или фармакологический эффект), на анализ для оценки вторичных эффектов (корреляция прямого биологического или фармакологического эффекта с известным терапевтическим действием: фармакодинамика, анализ ответа, выбор дозы и режима дозирования), и анализы для оценки безопасности или подтверждения/постановки диагноза. В зависимости от цели строгость требований также различна, например, валидация биомаркера для установления диагноза должна быть проведена в сертифицированных лабораториях, действующих согласно Резолюции по улучшению работы клинических лабораторий (CLIA), а образцы могут быть только из клинического исследования, тогда как в остальных случаях это не принципиально [3].

Кроме валидации метода, сам биомаркер должен пройти квалификацию, то есть должен быть оценен на предмет корреляции с клиническими эффектами. Признанный валидный биомаркер — это маркер, который можно определить аналитическим методом с установленными воспроизводимыми характеристиками и о котором существует общепризнанное мнение в научном и медицинском сообществе касательно физиологической, токсической и клинической значимости

Объем валидации анализа для определения биомаркеров в зависимости от задачи

Параметры, которые необходимо учесть	Принятие решения о дальнейшем использовании биомаркера (1)	Выбор дозы и режима дозирования, выбор/подтверждение концепции (2)	Безопасность биомаркера/подтверждение диагноза (3)
Выбор раствора с учетом влияния его компонентов	Выбирают теоретически наиболее вероятно подходящий	Выбирают наилучший (минимальное влияние на результат и стабильность анализа)	(2) + максимальное приближение к аналиту
Забор образцов	Выбирают теоретический способ как наиболее вероятно подходящий	При выборе метода забора образцов руководствуются их стабильностью при краткосрочном хранении, хранении при комнатной температуре и при замораживании—оттаивании	(2) + изучают стабильность при долгосрочном хранении
Документация	План валидации не нужен, описание анализа или использование документов из коммерческих наборов для описания результатов	Нужны и план и отчет по валидации	Нужны и план и отчет по валидации
Референсный стандарт и реагенты	Ограниченно охарактеризованы, исследования стабильности начаты	Хорошо охарактеризованы, установлен контроль изменений от партии к партии	Соблюдены требования GMP для референсного стандарта, реагенты охарактеризованы и стабильны
Калибраторы	Стандарты из набора или 6 ненулевых стандартов	6 ненулевых стандартов	(2)
Диапазон	Используют 3 валидационных прогона для нахождения нижнего и верхнего предела количественного определения на стандартных образцах	Используют 6 валидационных прогонов, нижний и верхний предел количественного определения рассчитывают на основании точности и прецизионности на независимых образцах	(2) + чувствительность как принципиальный параметр
Точность	На валидированных образцах или контролях из коммерческого набора, минимум 3 независимых прогона	4—6 валидированных образцов, минимум 6 независимых прогонов	(2)
Прецизионность			
Чувствительность	По схеме из набора или как стандарт с минимальной концентрацией для анализа в лаборатории	Основана на независимых валидированных образцах, измеренных минимум в 6 независимых прогонах	Чувствительность, адекватная для обнаружения разницы между большими и здоровыми пациентами
Селективность и специфичность	В соответствии с инструкцией набора или по разработанному в лаборатории методу анализа — специфичность к тестируемому препарату	От других изоформ, ко-медиаторов и эндогенных лигандов	(2)
Стабильность	На валидационных или актуальных образцах: замораживание-оттаивание — 1 цикл Стабильность при комнатной температуре — до 4 ч Стабильность при +4°C — до 4 ч Влияние разведения Краткосрочное хранение	На валидационных или актуальных образцах замораживание-оттаивание — 3 цикла Стабильность при комнатной температуре — до 24 ч Стабильность при +4°C — до 24 ч Стабильность при экстракции Стабильность при –20°C и при –80°C Стабильность 1 год	На актуальных образцах (2) + 2-летняя стабильность

результатов. Некоторые биомаркеры можно классифицировать как потенциально валидные, они отличаются от признанных валидных тем, что их значимость не установлена, а основана на научных гипотезах или предположениях. Все остальные биомаркеры относятся к категории исследуемых, и именно они составляют большую часть всех изучаемых на стадии разработки биомаркеров [38].

Кроме того, в клинических исследованиях биомаркеры также делят по функциям, которые они выполняют. Биомаркеры, играющие интегральную роль, используют в тестированиях в рамках текущих клинических исследований. Такие биомаркеры либо характеризуют пригодность исследования в принципе, либо помогают подразделить одно клиническое исследование на разные направления по мере необходимости.

Если интегральные маркеры служат для принятия индивидуального решения по пациенту, то их анализы должны быть проведены в соответствии с правилами CLIA. Так, в ходе I фазы клинического исследования интегральный биомаркер может быть использован для подтверждения правильности подобранной дозы лекарственного средства и оценки необходимости ее увеличения, а в ходе II фазы такой биомаркер помогает определить, следует ли продолжать или прекратить набор пациентов из-за отсутствия эффективности изучаемого лекарственного средства у дефицитных по биомаркеру участников исследования.

В тестах, предназначенных для идентификации или валидации методик анализа или маркеров, которые будут только изучены в планируемом клиническом исследовании для про-

верки гипотезы (с подробными планами по забору образцов, лабораторным измерениям и анализам), биомаркеры играют интеграционную роль. Так, в ходе I фазы клинического исследования такой биомаркер планируют к изучению при использовании минимальной токсической или выбранной дозы лекарственного средства для подтверждения влияния на мишень. В рамках II фазы предиктивный маркер измеряют во всех случаях, но не для использования в оценке пригодности метода, назначения лечения или контроля над ходом лечения в текущем клиническом исследовании, а для понимания общей картины происходящего. Статистический дизайн и объем пробы заданы заранее.

При вспомогательной или исследовательской роли биомаркеров клинические исследования используются для разработки биомаркеров и/или их методов анализа или для лучшего понимания терапевтического потенциала агента. Эти данные по биомаркерам сами по себе не могут служить основанием для завершения I или II фазы клинического исследования. Примерами могут служить ретроспективные анализы биомаркеров, пилотные или пробные биопсии или исследования, генерирующие гипотезу.

Панели биомаркеров. Ключевой вопрос при валидации биомаркеров — это потенциальная необходимость использования панели биомаркеров и достаточность использования одного биомаркера. В ряде случаев панель превосходит один маркер, но иногда один или два маркера могут прекрасно работать для решения конкретных задач. Факт наличия в трансформированных клетках нескольких сигнальных путей, а также широкое распространение гетерогенности опухолей при большинстве онкологических заболеваний с участием эпителия предполагают, что множественные биомаркеры более адекватно отражают биологию гетерогенных опухолей и превосходят по эффективности анализы по одному биомаркеру [39]. Наличие различных сопутствующих заболеваний у пациентов также может затруднить точный диагноз, что приводит к необходимости сбора дополнительной информации, которую зачастую можно получить только анализируя панель биомаркеров. Вместе с тем добавление дополнительных маркеров может повысить чувствительность за счет снижения специфичности. Например, по протоколу, разработанному для анализа биомаркеров в EDRN, после результатов слепого анализа биомаркеров по результатам установленного референсного набора данных на предмет специфичности и чувствительности, были протестированы отдельные биомаркеры, после чего сформированы панели биомаркеров для сравнения эффективности панели с эффективностью какого-либо одного биомаркера. Показано, например, что для идентификации рака простаты и рака яичников достаточно пары маркеров.

Заключение. К сожалению, огромное количество потенциальных биомаркеров остаются только на страницах научных журналов. Из 150 тыс. известных опубликованных данных биомаркеров-кандидатов меньше ста находят реальное применение в клинической практике [40]. Главной проблемой, конечно, остается финансирование, так как для того чтобы превратить пилотные исследования в комплект документов, необходимых для регистрации биомаркера, необходим большой объем ресурсов, межлабораторных взаимодействий и дополнительных экспериментов. Также проблемой может стать отсутствие воспроизводимости из-за неправильно спланированного исследования, неверной обработки данных или персонализированного характера действия биомаркера. Парадоксально, но даже при масштабных и дорогостоящих исследованиях причиной их провала могут быть обычные нарушения правил работ в лаборатории: нарушение сроков и условий хранения образцов, пулирование образцов и т. п. Помешать исследованию может и динамический характер

поведения белков в плазме, и их низкие концентрации по сравнению с основными белками. Тем не менее биомаркеры используются на всех фазах изучения лекарственного препарата — от этапа разработки до последней фазы клинических исследований. Остается надеяться, что в ближайшем будущем все больше биомаркеров будут стоять на страже здоровья пациентов и помогать работе врачей.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Финансирование. Исследование не имело спонсорской поддержки.

ЛИТЕРАТУРА (п.п. 1—4, 6—13, 17—29, 31—35, 37—40 см. REFERENCES)

5. Павлушкина Л.В., Черневская Е.А., Дмитриева И.Б., Белобородова Н.В. Биомаркеры в клинической практике. *Поликлиника*. 2013; (4-1): 10—4.
14. Садвакас А.С. *Современные концепции идеальных биомаркеров в медицине*. В кн.: Материалы XXXI международной научно-практической конференции «Современная медицина: актуальные вопросы». Новосибирск: СибАК; 2014: 99—104.
15. Имянитов Е.Н. Стандартные и потенциальные предиктивные маркеры при опухолях желудочно-кишечного тракта. *Практическая онкология*. 2012; 13(4): 219—28.
16. Ягудина Р.И., Чибилев В.А. Использование конечных и суррогатных точек в фармакоэкономических исследованиях. *Фармакоэкономика. Современная фармакоэкономика и фармакоэпидемиология*. 2010; 3(2): 12—8.
30. Никольский Ю.Е., Захарова Н.Б., Чехонацкая М.Л., Понукалин А.Н., Дурнов Д.А. Значение мочевых молекулярных маркеров в диагностике рака почки. *Бюллетень медицинских интернет-конференций*. 2015; 5(6): 915—7.
36. Беневоленский Д.С. *Биомаркеры в диагностике неотложных состояний*. В кн.: Научно-образовательный форум «Актуальные проблемы современной лабораторной диагностики». Казань; 2011: 18—20.

REFERENCES

1. Biomarkers Definitions Working Group. Biomarkers and surrogate endpoints: preferred definitions and conceptual framework. *Clin. Pharmacol. Ther.* 2001; 69(3): 89—95.
2. Hess S., Ozoux M.L., Gerl M. *Biomarker Definition and Validation During Drug Development*. Berlin: Springer; 2011: 223—44.
3. Dancy J.E., Dobbin K.K., Groshen S., Jessup J.M., Hruszkewycz A.H., Koehler M. et al. Guidelines for the development and incorporation of biomarker studies in early clinical trials of novel agents. *Clin. Cancer Res.* 2010; 16(6): 1745—55.
4. Mayeux R. *Biomarkers: potential uses and limitations*. *NeuroRx*. 2004; 1(2): 182—8.
5. Pavlushkina L.V., Chernevskaia E.A., Dmitrieva I.B., Beloborodova N.V. Biomarkers in clinical practice. *Poliklinika*. 2013; (4-1): 10—4. (in Russian)
6. Nowak M., Janas Ł., Stachowiak G., Stetkiewicz T., Wilczyński J.R. Current clinical application of serum biomarkers to detect ovarian cancer. *Prz. Menopauzalny*. 2015; 14(4): 254—9.
7. Jiang T., Ren S., Zhou C. Role of circulating-tumor DNA analysis in non-small cell lung cancer. *Lung Cancer*. 2015; 90(2): 128—34.
8. Riedmaier I., Pfaffl M.W. Transcriptional biomarkers — high throughput screening, quantitative verification, and bioinformatical validation methods. *Methods*. 2013; 59(1): 3—9.
9. Ahlquist D.A., Zou H., Domanico M., Mahoney D.W., Yab T.C., Taylor W.R. et al. Next-generation stool DNA test accurately detects colorectal cancer and large adenomas. *Gastroenterology*. 2012; 142(2): 248—56.
10. Pal M.K., Jaiswar S.P., Dwivedi V.N., Tripathi A.K., Dwivedi A., Sankhwar P. MicroRNA: a new and promising potential biomarker for diagnosis and prognosis of ovarian cancer. *Cancer Biol. Med.* 2015; 12(4): 328—41.
11. Klassen B.T., Hentz J.G., Shill H.A., Driver-Dunckley E., Evidente

- V.G., Sabbagh M.N. et al. Quantitative EEG as a predictive biomarker for Parkinson disease dementia. *Neurology*. 2011; 77(2): 118—24.
12. Aronson J.K. Biomarkers and surrogate endpoints. *Br. J. Clin. Pharmacol.* 2005; 59(5): 491—4.
 13. Anderson D.C., Kodukula K. Biomarkers in pharmacology and drug discovery. *Biochem. Pharmacol.* 2014; 87(1): 172—88.
 14. Sadvakas A.S. Modern concepts of ideal biomarkers in medicine. In: Materials XXXI International Scientific-Practical Conference «Modern Medicine: Current Issues» [Materialy XXXI mezhdunarodnoy nauchno-prakticheskoy konferentsii «Sovremennaya meditsina: aktual'nye voprosy»]. Novosibirsk: SibAK; 2014: 99—104. (in Russian)
 15. Imyanitov E.N. Standard and potential predictive markers for gastrointestinal cancer. *Prakticheskaya onkologiya*. 2012;13(4): 219—28. (in Russian)
 16. Yagudina R.I., Chibilyaev V.A. *Clinical and surrogate endpoints application in pharmaco-economic researches. Farmakoekonomika. Sovremennaya farmakoekonomika i farmakoepidemiologiya*. 2010; 3(2): 12—8. (in Russian)
 17. Heinonen T.M., Aamer M., Marshall C., Black D.M., Tardif J.C. Cardiovascular biomarkers and surrogate end points: key initiatives and clinical trial challenges. *Expert. Rev. Cardiovasc. Ther.* 2012; 10(8): 989—94.
 18. International Expert Committee report on the role of the A1c assay in the diagnosis of diabetes. *Diabetes Care*. 2009; 32(7): 1327—34.
 19. Singer C.F., Kostler W.J., Hudelist G. Predicting the efficacy of trastuzumab-based therapy in breast cancer: current standards and future strategies. *Biochim. Biophys. Acta*. 2008; 1786(2): 105—13.
 20. McDermott J.E., Wang J., Mitchell H., Webb-Robertson B.J., Hafen R., Ramey J. et al. Challenges in Biomarker Discovery: Combining Expert Insights with Statistical Analysis of Complex Omics Data. *Expert Opin. Med. Diagn.* 2013; 7(1): 37—51.
 21. Executive summary: Standards of medical care in diabetes-2010. *Diabetes Care*. 2010; 33(Suppl.1): S4—10.
 22. Welch P.L., King M.C. BRCA1 and BRCA2 and the genetics of breast and ovarian cancer. *Hum. Mol. Genet.* 2001; 10(7): 705—13.
 23. Ma N., Rahmat Z., Lam S. A Review of the «Omics» approach to biomarkers of oxidative stress in *Oryza sativa*. *Int. J. Mol. Sci.* 2013; 14(4): 7515—41.
 24. Lleo A., Cavedo E., Parnetti L., Vanderstichele H., Herukka S.K., Andreasen N. et al. Cerebrospinal fluid biomarkers in trials for Alzheimer and Parkinson diseases. *Nat. Rev. Neurol.* 2015; 11(1): 41—55.
 25. Wong D. Clinical Utility of Salivary ExRNA Biomarkers for Gastric Cancer Detection. 2016. Available at: <http://grantome.com/grant/NIH/UH2-TR000923-02>. (accessed 27 April 2016).
 26. Fehlbaum-Beurdeley P., Jarrige-Le Prado A.C., Pallares D., Carriere J., Guihal C., Soucaille C. et al. Toward an Alzheimer's disease diagnosis via high-resolution blood gene expression. *Alzheimers Dement.* 2010; 6(1): 25—38.
 27. Rifai N., Gillette M.A., Carr S.A. Protein biomarker discovery and validation: the long and uncertain path to clinical utility. *Nat. Biotechnol.* 2006; 24(8): 971—83.
 28. Grund B., Sabin C. Analysis of Biomarker Data: logs, odds ratios and ROC curves. *Curr. Opin. HIV AIDS*. 2010; 5(6): 473—9.
 29. Cook R.D., Weisberg S. *Applied Regression Including Computing and Graphics*. Minnesota: John Wiley and Sons; 1999.
 30. Nikol'skiy Yu.E., Zakharova N.B., Chekhonatskaya M.L., Ponukalin A.N., Durnov D.A. The value of urinary molecular markers in the diagnosis of renal cancer. *Byulleten' meditsinskikh internet-konferentsiy*. 2015; 5(6): 915—7. (in Russian)
 31. Dieterle F., Sistare F., Goodsaid F., Papaluca M., Ozer J.S., Webb C.P. et al. Renal biomarker qualification submission: a dialog between the FDA-EMEA and Predictive Safety Testing Consortium. *Nat. Biotechnol.* 2010; 28(5): 455—62.
 32. Jiang W., Simon R. A comparison of bootstrap methods and an adjusted bootstrap approach for estimating the prediction error in microarray classification. *Stat. Med.* 2007; 26(29): 5320—34.
 33. GMP Guideline ICH Q2(R1) Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology 30 rue de St-Jean, P.O. Box 758, 1211 Geneva 13, Switzerland; ICH Secretariat, c/o IFPMA; 1995. Available at: http://www.gmp-compliance.org/eca_guideline_879.html. (accessed 27 April 2016).
 34. Wu Q., Zou M., Yang M., Zhou S., Yan X., Sun B. et al. Revealing Potential Biomarkers of Functional Dyspepsia by Combining 1H NMR Metabonomics Techniques and an Integrative Multi-objective Optimization Method. *Sci. Rep.* 2016; 6: 18852.
 35. Atluri G., Padmanabhan K., Fang G., Steinbach M., Petrella J.R., Lim K. et al. Complex biomarker discovery in neuroimaging data: Finding a needle in a haystack. *Neuroimage Clin.* 2013; 3: 123—31.
 36. Benevolenskiy D.S. Biomarkers in the diagnosis of emergency conditions. In: Actual Problems of Modern Laboratory Diagnostic [Nauchno-obrazovatel'nyy forum «Aktual'nye problemy sovremennoy laboratornoy diagnostiki»]. Kazan'; 2011: 18—20. (in Russian)
 37. Cummings J., Raynaud F., Jones L., Sugar R., Dive C. Fit-for-purpose biomarker method validation for application in clinical trials of anticancer drugs. *Br. J. Cancer*. 2010; 103: 1313—7.
 38. Guidance for industry. Pharmacogenomic data submissions. 2005. Available at: <http://www.fda.gov/downloads/RegulatoryInformation/Guidances/ucm126957.pdf>. (accessed 27 April 2016).
 39. Morgan T.M., Seeley E.H., Fadare O., Caprioli R.M., Clark P.E. Imaging the clear cell renal cell carcinoma proteome. *J. Urol.* 2013; 189(3): 1097—103.
 40. Poste G. Bring on the biomarkers. *Nature*. 2011; 469(7329): 156—7.

Поступила: 27.06.16
Принята: 06.07.16