

К 80-летию со дня рождения академика Андрея Дарьевича Мирзабекова – основателя технологии 3D-гидрогелевых биологических микрочипов

БИОЧИПЫ — ВЫСОКИЕ ТЕХНОЛОГИИ В МЕДИЦИНСКОЙ ДИАГНОСТИКЕ

На фото: гидрогелевый биочип высокой плотности демонстрирует м.н.с лаборатории биологических микрочипов ИМБ РАН Ольга Антонова

Открытие функционального значения тысяч генов и молекулярных механизмов действия множества ферментов стало революционным событием в биологии, оказавшим и продолжающим оказывать огромное влияние на развитие медицины XXI в. Перед учеными и медиками открылись уникальные возможности для выяснения причин многих инфекционных и наследственных заболеваний, а также разработки эффективных методов их лечения. В свою очередь, развитие новых диагностических методов потребовало и создания новых технологий многопараметрического анализа биологических образцов, с помощью которых можно одновременно исследовать множество белковых и ДНК-маркеров различных заболеваний, функционально-значимых биологических макромолекул и их комплексов. Так появилась технология биологических микрочипов, способных, подобно микрочипам электронным, извлекать и обрабатывать огромные массивы информации из одного небольшого образца биологического материала, полученного от конкретного пациента

Ключевые слова: гидрогелевые биочипы, туберкулез, лекарственная устойчивость, вирус гепатита С, лейкемия, хромосомные транслокации, онкомаркеры, фармакогенетика, иммуноанализ, аллергены.
Key words: hydrogel biochips, tuberculosis, drug resistance, Hepatitis C virus, leukemia, chromosomal translocations, cancer biomarkers, pharmacogenetics, immune analysis, allergens

Д. А. ГРЯДУНОВ, А. С. ЗАСЕДАТЕЛЕВ



ГРЯДУНОВ Дмитрий Александрович – кандидат биологических наук, заместитель директора по научной работе и заведующий лабораторией технологий молекулярной диагностики ИМБ РАН (Москва). Лауреат Государственной премии РФ для молодых ученых (2003), российской Премии Галена (2014). Автор и соавтор 60 научных работ и 27 патентов

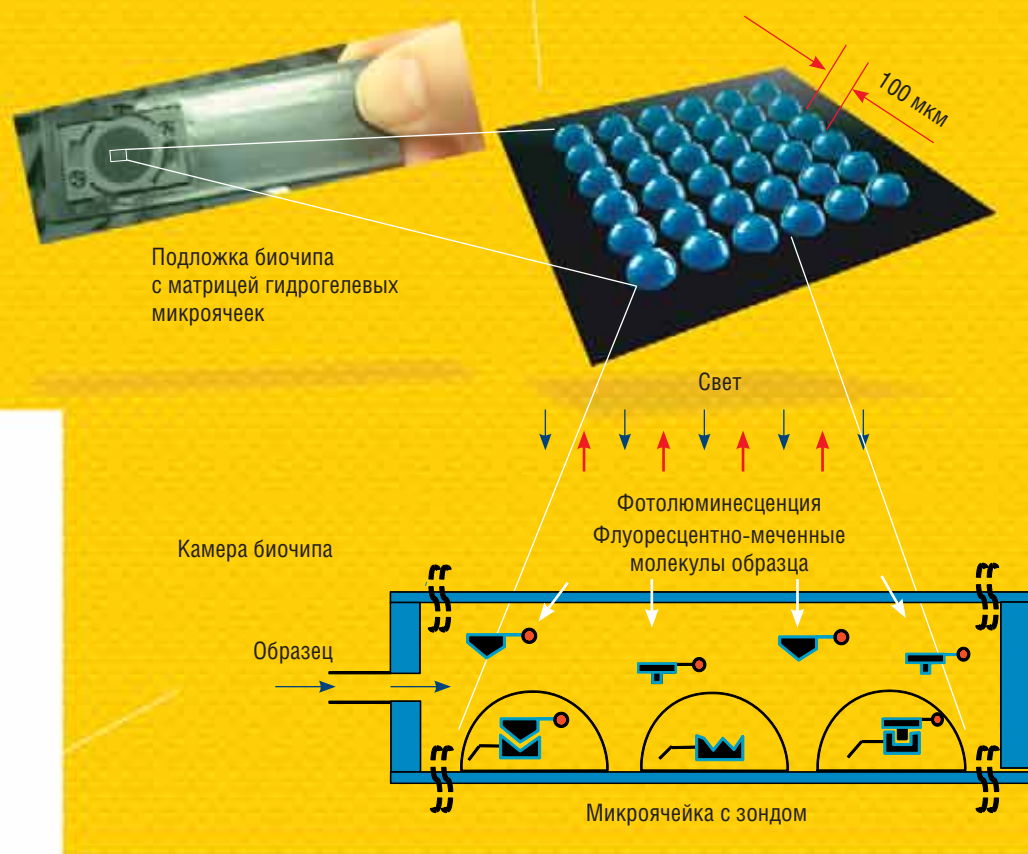


ЗАСЕДАТЕЛЕВ Александр Сергеевич – доктор физико-математических наук, профессор, заведующий лабораторией биологических микрочипов ИМБ РАН (Москва), заведующий кафедрой молекулярной и клеточной биологии Московского физико-технического института. Лауреат российской Премии Галена (2014), кавалер ордена Академических Пальм Франции (2016). Автор и соавтор 190 научных работ и 37 патентов

За последние десятилетия был накоплен огромный объем знаний о молекулярных основах биохимических процессов в живых организмах. Это дало возможности не только точно диагностировать то или иное заболевание, но и оценить вероятность его возникновения еще до проявления у пациента клинических симптомов, а также подобрать эффективную терапию. Подавляющую часть такой информации получают с помощью лабораторной диагностики, на которую в мире ежегодно расходуется свыше 100 млрд долларов. В России в 1970 г. она насчитывала 81 биохимический / молекулярный тест, в 2000 г. – 170, а сегодня число тестов измеряется тысячами!

Большинство важнейших современных методов молекулярной диагностики основано на анализе данных, полученных при исследовании структуры геномов человека и микроорганизмов. В первую очередь речь идет о полимеразной цепной реакции (ПЦР). Обычно ДНК содержится в образцах в минимальных количествах, однако с помощью ПЦР можно в миллионы раз «размножить» в исследуемой пробе биоматериала определенные фрагменты этих макромолекул. «Мишенями» могут служить бактериальные или вирусные гены, генетические маркеры раковых опухолей и т. п. С помощью этого метода можно определить наличие, к примеру, возбудителя болезни, даже если в пробе присутствует всего несколько молекул его ДНК.

© Д. А. Грядун, А. С. Заседателев, 2017



В биочипе ячейки с иммобилизованными зондами располагаются упорядоченными рядами, причем каждая ячейка содержит уникальный зонд. В зависимости от типа биочипа диаметр ячеек варьирует от 50 до 300 мкм, а их число зависит от сложности анализируемой мишени(ей) и задач эксперимента и составляет от нескольких десятков до нескольких тысяч. Молекулы исследуемого образца помечают флуоресцентной меткой, поэтому при облучении светом определенной длины волны ячейки, где произошло связывание зондов с молекулами-мишенями, будут светиться (две крайние ячейки)

В 2011 г. Национальная ассоциация фтизиатров России наградила ИМБ РАН кубком и дипломом «Лучший инновационный проект» за разработку молекулярно-генетической технологии биологических микрочипов и создание тест-системы для диагностики туберкулеза на ее основе. Согласно расчетам, выполненным ФГУ «Центральный НИИ организации и информатизации здравоохранения», «...экономия бюджетных средств при внедрении технологии биочипов для диагностики туберкулеза и определения лекарственной чувствительности возбудителя составляет не менее 70 рублей на каждый вложенный рубль» (Министерство здравоохранения и социального развития РФ, 2009)

Однако возможности методов, базирующихся на ПЦР, ограничены в случае, когда речь идет об одновременном анализе десятков и сотен различных биомаркеров. И здесь на первый план выходит уже успешно зарекомендовавшая себя технология *биологических микрочипов* (биочипов). Достоинство этой технологии в том, что тест проводится в формате «один образец – один реакционный объем биочипа», т.е. образец не нужно разделять на несколько частей и их отдельно анализировать. Такой формат намного повышает чувствительность анализа и снижает его трудоемкость и стоимость, что дает возможность клинико-диагностическим лабораториям тестировать десятки и сотни образцов за одну рабочую смену.

Сегодня ведущие научные журналы регулярно публикуют обзоры, посвященные биологическим микрочипам, которые производят многие десятки компаний, а объем продаж составляет сотни миллионов долларов в год. Вместе с тем сама идея создания биочипов родилась лишь четверть века назад, и одним из мест рождения этой технологии стал Институт молекулярной биологии им. В. А. Энгельгардта Российской академии наук.

С самого начала подход российских исследователей отличался удачным выбором ключевых технологических решений, благодаря которым технологии биочипов ИМБ РАН продолжают оставаться конку-

РОССИЯ – ПИОНЕР «БИОЧИПОСТРОЕНИЯ»

Большие матрицы с ДНК и белками, иммобилизованными на фильтре или зафиксированными в лунках планшета, были известны достаточно давно. Но идея о создании микрочипов современного формата появилась лишь в конце прошлого века. Первая работа по ДНК-микрочипам и одна из первых – по белковым чипам были опубликованы группой академика А. Д. Мирзабекова из московского Института молекулярной биологии им. В. А. Энгельгардта АН СССР (Khrapko *et al.*, 1989; Arenkov *et al.*, 2000).

Эта революционная идея родилась как предложение для нового метода секвенирования ДНК с использованием гибридизации – процесса объединения двух комплементарных одноцепочечных молекул ДНК в двуцепочечную. Работы по совершенствованию методик секвенирования были стимулированы все более возрастающим интересом к проблеме расшифровки генома человека.

В то время в научной среде широко дискутировался вопрос, должна ли эта задача решаться масштабированием существующих подходов или нужно разрабатывать новые, более эффективные. Ученые сначала пошли по первому пути. Так, в 1977 г. появился «метод Сенгера», основанный на ферментативном синтезе комплементарной последовательности ДНК на матрице анализируемой одноцепочечной ДНК, а его разработчики получили в 1980 г. Нобелевскую премию. В своей нобелевской речи один из лауреатов, американский биохимик У. Гилберт, отметил, что «идея метода

пришла только после второго визита А. Мирзабекова» в его лабораторию (Gilbert, 1984).

При секвенировании гибридизацией «расшифровка» ДНК идет не отдельными буквами-нуклеотидами, а «словами» определенной величины, и такой словарь может содержать тысячи слов. Стала очевидной необходимость создания микрочипов: в это время и вышла первая статья ученых из ИМБ, где были описаны приготовление и свойства гелевых микрочипов (Khrapko *et al.*, 1989).

Технология производства гелевых биочипов прошла несколько этапов развития. Технология первого поколения, еще достаточно громоздкая и несовершенная, была разработана и запатентована в ИМБ в 1989—1993 гг., а впоследствии реализована в совместной лаборатории, организованной институтом и Аргоннской национальной лабораторией (США), и лицензирована американскими компаниями Motorola и Packard Instruments. Однако из-за технологических проблем фирмы стали производить биочипы, матрица которых представляла собой поверхность, сплошь покрытую полиакриламидным гелем.

В ИМБ РАН технология гелевых биочипов продолжала развиваться. Современная, достаточно простая, универсальная и дешевая технология позволяет производить даже в лабораторных условиях сотни и тысячи олигонуклеотидных, ДНКовых или белковых микрочипов в день (Колчинский и др., 2004)

рентоспособными в мировой науке. Многие из этих подходов (например, замена радиоактивных меток на флуоресцентные, применение гидрогеля и элементов сферической формы) стали использовать в своей работе другие исследователи, занимающиеся разработкой биочипов. А с 2000 г. в ИМБ РАН при поддержке Международного научно-технического центра начались работы по созданию биочипов для медицинской диагностики возбудителей социально значимых заболеваний.

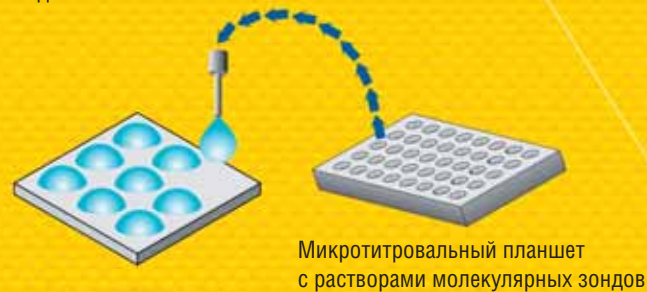
Биочипы в деле

Главным элементом любого биочипа служит матрица из сотен и тысяч микроячеек, каждая из которых содержит так называемые *молекулярные зонды* – молекулы, способные специфично связываться только со строго определенными биологическими молекулами или их фрагментами. Зондами могут служить олигонуклеотиды, участки геномной ДНК, РНК, антитела, олигосахариды, различные низкомолекулярные соединения и др. Каждая ячейка биочипа служит своего рода отдельной

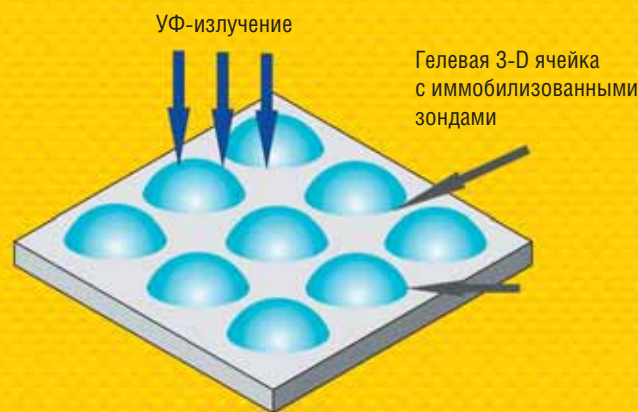
«нанопробиркой», где иммобилизованный зонд распознает в анализируемом образце только свою мишень. Таким образом удается проводить параллельное распознавание сразу множества мишеней, например, генов, ответственных за лекарственную устойчивость возбудителя болезни.

Принципиальное отличие технологии матричных биочипов, разработанной в ИМБ РАН, в том, что зонды располагаются не на плоской подложке, а в заполимеризованных «каплях» гидрогеля полусферической формы. Размещение молекулярных зондов в трехмерном объеме, а не на плоскости, дает ряд существенных преимуществ. Оно позволяет в десятки и сотни раз увеличить емкость биочипа на единицу поверхности и, соответственно, чувствительность измерений. Кроме того, гель – насыщенное водой желеобразное вещество, исключает возможность взаимодействия зондов друг с другом и с твердой поверхностью подложки, а также обеспечивает отличную изоляцию отдельных ячеек на биочипе.

Робот переносит капли раствора на поверхность активированной подложки



Микротитровальный планшет с растворами молекулярных зондов



Гелевая 3-D ячейка с иммобилизованными зондами

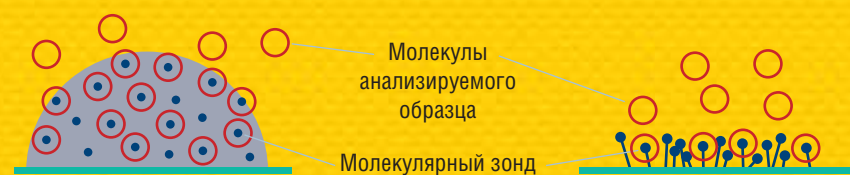


Анализатор биочипов состоит из оптико-электронного блока, системы лазеров для возбуждения флуоресценции и оптической части, совмещенной с CCD-камерой, которая передает изображение чипа на компьютер, где сигналы в каждой ячейке вычисляются и анализируются по определенному алгоритму

Для получения матрицы биочипа растворы молекул зондов смешивают с гелеобразующими добавками. Капли смеси наносят на поверхность полимерной подложки будущего чипа с помощью робота и облучают ультрафиолетовым светом, под действием которого идет полимеризация. В ходе реакции молекулярные зонды присоединяются к растущим полимерным цепям геля и в итоге равномерно распределяются по всему объему ячейки

Объемная ячейка

Поверхностная ячейка



Объемные гидрогелевые 3D-ячейки биочипов имеют ряд преимуществ в сравнении с поверхностными. Например, в гидрогеле иммобилизованные молекулы-зонды, в том числе белки, сохраняют свою активность, а емкость наполнения ячейки зондами в десятки раз выше, чем в «плоских» биочипах

Для регистрации результатов анализа используют флуоресцентные метки, которые вводят в молекулы образца. Если зонд специфично распознает и свяжется с мишенью, в ячейке возникает *флуоресценция*. Интенсивность свечения ячеек биочипа измеряется с помощью специальных аппаратно-программных комплексов-анализаторов, которые и выдают отчет о присутствии в исследуемом образце специфичных молекулярных мишеней, информирующих о наличии микроорганизмов или генных мутаций, онкомаркеров или аллергенов и т. п.

Оригинальная технология создания таких гелевых чипов, разработанная в ИМБ РАН, была запатентована и сертифицирована по европейским стандартам. Биочипы, созданные по этой технологии, занимают отдельную нишу диагностических микроматриц и применяются в российских клиниках. Коммерческие микроматрицы, произведенные ведущими научно-производственными корпорациями Германии и США применяются, в основном, в исследовательских целях.

Туберкулез и лекарственная устойчивость

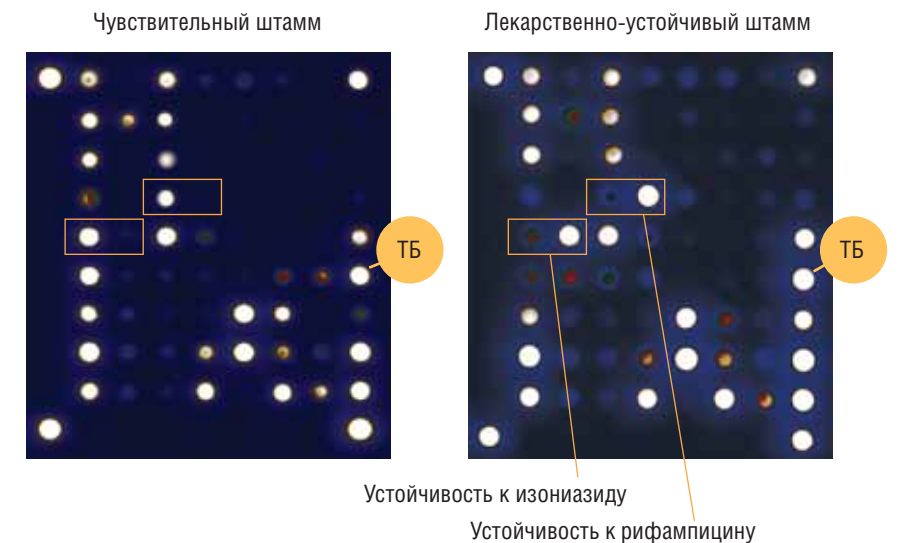
Первой в мире тест-системой на основе биочипов, зарегистрированной для медицинского применения, стал разработанный в ИМБ в 2004 г. набор «ТБ-Биочип-1». С его помощью можно определить наличие в геноме микобактерии туберкулеза 47 мутаций, приводящих к устойчивости к двум основным противотуберкулезным препаратам – *рифампицину* и *изониазиду*.

Почему внимание исследователей привлечено именно туберкулез? Дело в том, что многие десятилетия для борьбы с этой болезнью использовали комбинированное лечение сразу несколькими химиопрепаратами,

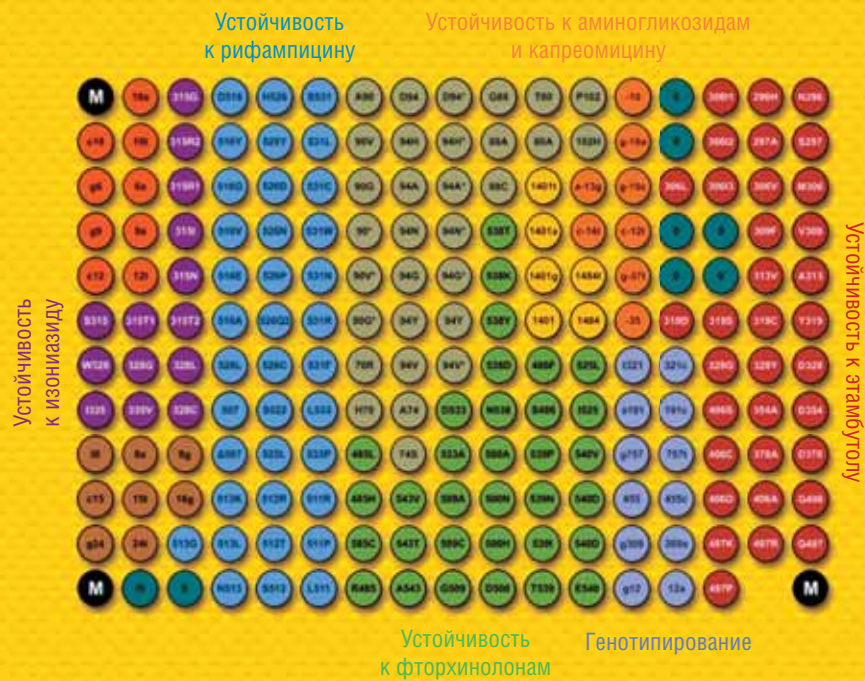
Тест-системами серии «ТБ-Биочип» и оборудованием для их анализа были оснащены 20 учреждений противотуберкулезной службы РФ и 8 бактериологических лабораторий Федеральной службы исполнения наказаний. Число излеченных больных с лекарственно-устойчивым туберкулезом увеличилось по меньшей мере в 3 раза при ранней постановке диагноза с использованием биочипов в отличие от диагностики традиционными методами (Gryadunov *et al.*, 2011). В этом случае огромную роль играет такой фактор, как время анализа: в первом случае для диагностики достаточно нескольких часов, тогда как выращивание микобактерий на средах с разными противотуберкулезными препаратами занимает 2–3 месяца

чтобы повысить его эффективность. При монотерапии больные быстро приобретали устойчивость к лекарству. Однако такая стратегия привела к тому, что уже в конце прошлого века в мире, в том числе и в России, начал повсеместно распространяться туберкулез со *множественной лекарственной устойчивостью*. Именно этот фактор в наши дни чаще всего является причиной неудачного исхода лечения и возникновения рецидива болезни, от которой ежегодно в мире умирает более 3 млн человек.

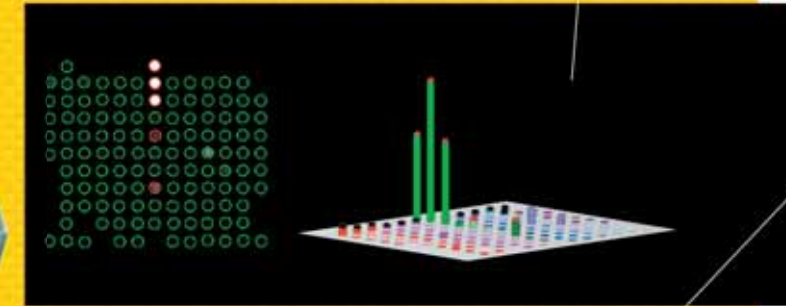
Изониазид и рифампицин относятся к популярным и наиболее эффективным препаратам первого (основного) ряда. И если выделенный от пациента возбудитель окажется устойчивым к этим лекарствам, нужно обращаться к химиопрепаратам второго (резервного) ряда, к которым будет чувствительна эта бактериальная популяция. Сегодня одними из наиболее перспективных препаратов для лечения таких форм туберкулеза являются



Пример определения лекарственной чувствительности возбудителя туберкулеза к основным противотуберкулезным препаратам с помощью биочипа. Слева – флуоресцентная картина, свидетельствующая о чувствительности к стандартной терапии; справа – о наличии мутаций в ДНК, придающих возбудителю устойчивость к рифампицину и изониазиду, что требует перевода на схему лечения резервными препаратами. Свечение ячейки «ТБ» говорит о присутствии последовательности IS6110, однозначно свидетельствующей о принадлежности анализируемой ДНК возбудителю туберкулеза



Флуоресцентная картина при анализе ДНК возбудителя туберкулеза особо опасного генотипа Beijing B0/W148, устойчивого ко всем противотуберкулезным препаратам. Красные точки – ячейки, по которым проведена идентификация мутаций



Идентифицирован генотип 3 вируса гепатита С, подтип 3а

Тест-система «HCV-Биочип» используется для идентификации 6 генотипов и 36 подтипов вируса гепатита С на основе анализа региона NS5B вирусного генома. Справа – гибридационная картина анализа конкретного образца и его интерпретация

фторхинолоны. Поэтому следующей тест-системой в ряду диагностических тестов ИМБ стал «ТБ-Биочип-2», с помощью которого можно выявить лекарственную устойчивость к различным классам этих препаратов (Грядун и др., 2009).

Все более широкое распространение форм туберкулеза со множественной лекарственной устойчивостью явилось стимулом для дальнейшей «эволюции» тест-системы. Требовалось, во-первых, максимально охватить весь спектр генетически детерминированной резистентности к широкому ряду противотуберкулезных препаратов. Во-вторых, возникла необходимость определять генотип и соответственно принадлежность выделенного штамма к основным семействам, циркулирующим на территории РФ, что важно не только для эпидемиологического мониторинга структуры популяции возбудителей туберкулеза, но и для назначения адекватной терапии.

Так в 2012–2013 гг. в результате масштабных геномных исследований был создан не имеющий мировых аналогов набор реагентов «ТБ-ТЕСТ», позволяющий одновременно идентифицировать 120 генетических

На структуре биочипа системы «ТБ-ТЕСТ» (слева) разными цветами отмечены группы ячеек с иммобилизованными в них олигонуклеотидными зондами, специфичными к вариантам генов, связанных с лекарственной устойчивостью к противотуберкулезным препаратам первого и второго ряда

локусов, отвечающих за развитие устойчивости к препаратам первой и второй «линии обороны»: рифампицину, изониазиду, этамбутолу, фторхинолонам и инъекционным препаратам (амикацину и капреомицину) (Zimenkov *et al.*, 2016). Такая диагностика позволяет дифференцированно назначать высокие дозы химиопрепаратов или, напротив, удалять те или иные лекарства из схем терапии.

Чтобы получить государственную регистрацию в Росздравнадзоре, тест-система прошла все виды испытаний и экспертиз и с 2014 г. разрешена к применению в медицинской практике РФ. В настоящее время «ТБ-ТЕСТ» приходит на смену наборам «ТБ-Биочип».

От гепатита до рака и аллергий

Еще одной актуальной проблемой мирового здравоохранения является лечение больных гепатитом С. Возбудитель этого вирусного заболевания может долгое время размножаться в печени, ничем не выдавая себя, а первые признаки болезни обнаруживаются лишь спустя пару месяцев после заражения. Еще недавно гепатит С считался практически неизлечимой болезнью, а основным терапевтическим средством служила комбинация из *интерферона* и *рибавирина*, которая зачастую оказывалась неэффективной и имела много негативных побочных эффектов.

Сегодня созданы новые противовирусные препараты, обладающие так называемым *прямым противовирусным действием* и блокирующие ключевые внутриклеточные этапы размножения возбудителя. Но вся сложность в том, что вирус гепатита С имеет 7 вариантов генотипа, при этом каждый генотип имеет еще несколько подтипов. Более того, разные генотипы/подтипы обладают и разной чувствительностью к традиционным и новым препаратам, и выбор противовирусной терапии должен проводиться в соответствии с генотипическими особенностями возбудителя.

В ИМБ РАН совместно с лабораторией вирусологии госпиталя Университета г. Тулузы (Франция) был разработан и запатентован не имеющий мировых аналогов подход, основанный на использовании платформы гидрогелевых биочипов для типирования вируса гепатита С на основе анализа области NS5B вирусного генома. Тест-система «HCV-БИОЧИП», способная

определять 6 генотипов и 36 подтипов этого вируса, успешно прошла клинические испытания в России и Франции (Gryadunov *et al.*, 2011).

Важнейшим направлением приложения технологии гидрогелевых биочипов служит анализ мутаций и полиморфизмов ДНК самого человека: ДНК-маркеров, ассоциированных с возникновением различных неинфекционных заболеваний.

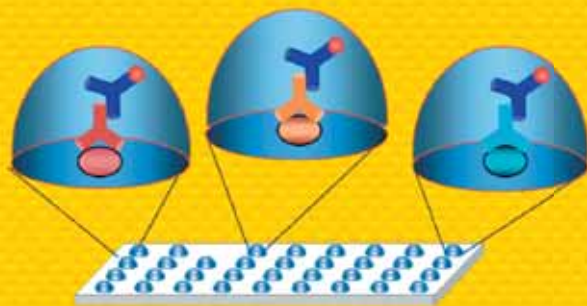
Среди онкологических заболеваний у детей ведущее место занимают лейкозы. Тест-система «ЛК-БИОЧИП» способна идентифицировать в образцах крови 13 наиболее клинически значимых *хромосомных транслокаций* (переносов фрагмента одной хромосомы на другую), характерных для некоторых типов острых и хронических лейкозов. Каждая из этих транслокаций определяет свой вариант развития лейкоза и важна для выбора стратегии лечения. Эта тест-система применяется в Национальном научно-практическом центре детской гематологии, онкологии и иммунологии им. Дмитрия Рогачева (Москва), где анализируются образцы из 18 региональных гематологических центров РФ (Gryadunov *et al.*, 2011).

Для ранней диагностики рака молочной железы и яичников создана тест-система «РМЖ-БИОЧИП», которая позволяет определять мутации в генах BRCA1/2, ассоциированные с высокой (до 80%) вероятностью возникновения наследственных форм этих заболеваний.

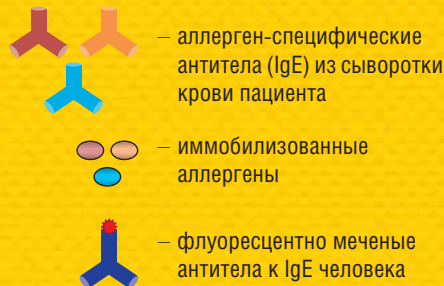
В настоящее время в ИМБ РАН разрабатываются варианты тест-систем на основе биочипов для определения чувствительности злокачественных клеток к противоопухолевой терапии. Например, с помощью биочипа



Гидрогелевые микроячейки

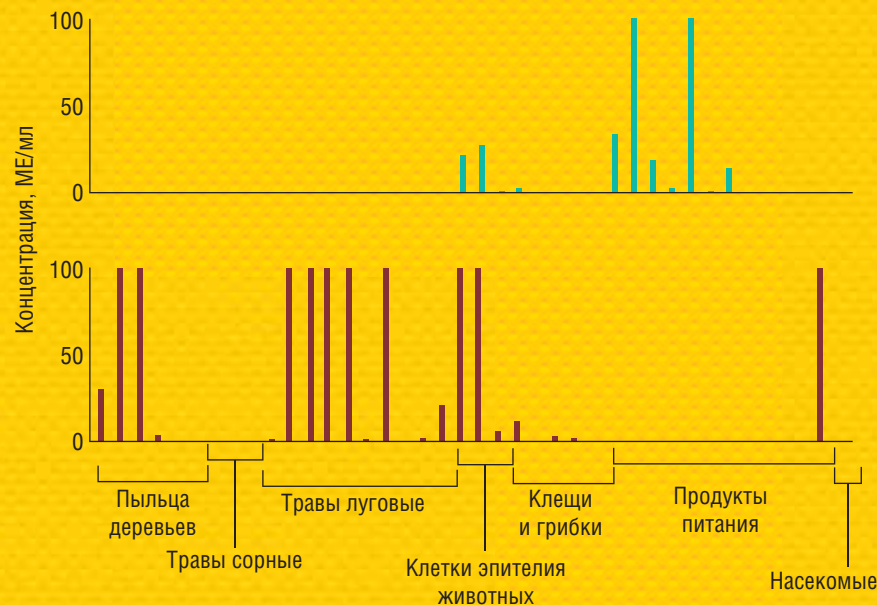
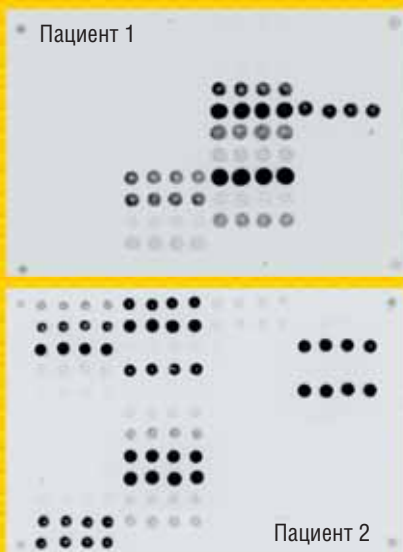


Биочип



В ячейках «АЛЛЕРГО-БИОЧИП» в качестве молекулярных зондов иммобилизованы экстракты 60 аллергенов, наиболее часто встречающихся в европейской части РФ. При проведении анализа сыворотку крови наносят на биочип и инкубируют, в результате чего образуются специфические комплексы антител с аллергенами. Для визуализации биочип обрабатывают вторичными флуоресцентно мечеными антителами, специфичными к антителам человека, а затем проводят регистрацию и обсчет сигналов от каждой ячейки и определяют концентрации комплексов с IgE по калибровочным кривым

Внизу – примеры изображений флуоресцентных картин и соответствующие профили концентраций, полученные при анализе образцов сывороток крови двух пациентов



для индивидуального подбора препаратов, эффективно воздействующих на молекулярные мишени в опухолевых клетках меланомы, можно выявить мутации генов, которые определяют целесообразность использования таких препаратов *таргетной* («молекулярно-прицельной») терапии поздних стадий и рецидивов меланомы, как *траметиниб*, *иматиниб* и *вемурафениб* (Emelyanova *et al.*, 2017).

Трехмерная структура гидрогеля, в котором на биочипах зафиксированы молекулярные зонды, позволяет

сохранить без изменений достаточно «чувствительную» нативную структуру белковых молекул. Поэтому такие биочипы можно использовать также для исследования белок-белковых взаимодействий, что требуется, к примеру, при проведении различных видов иммунохимического анализа.

В ИМБ РАН удалось перевести такой классический анализ в формат микрочипа и адаптировать его для диагностики аллергических заболеваний. Совместно с германской биотехнологической компанией *Dr. Foote*

Laboratorien GmbH, предоставившей наборы природных и рекомбинантных аллергенов, была разработана и запатентована тест-система «АЛЛЕРГО-БИОЧИП» для параллельного количественного определения больших панелей аллерген-специфичных антител E и G4 в сыворотке крови (Feyzkhanova *et al.*, 2017).

Важно, что для анализа антител на 30 и более аллергенов на биочипе требуется очень небольшой (всего 60 мкл) объем сыворотки крови – ровно столько, сколько требуется для анализа на один аллерген традиционным иммуноферментным методом! Такое отличие особенно значимо в педиатрии. Лабораторный вариант этой тест-системы уже проходит доклинические испытания в Детской городской клинической больнице № 13 им. Н. Ф. Филатова (Москва).

Двенадцать специализированных тест-систем, созданных на основе технологии гидрогелевых биочипов в ИМБ РАН, получили разрешение к применению как медицинские изделия для лабораторной диагностики. Эти тест-системы успешно используются более чем в 50 научно-исследовательских и медицинских центрах РФ, стран СНГ и ЕС.

Технологии биочипов, разработанные в ИМБ РАН, защищены 42 отечественными и международными патентами. И эти технологии продолжают интенсивно развиваться. Разрабатываются новые подходы, позволяющие упростить и ускорить методики, интегрировать в единую процедуру все стадии проведения анализа: от обработки биологического образца до количественной идентификации в режиме реального времени.

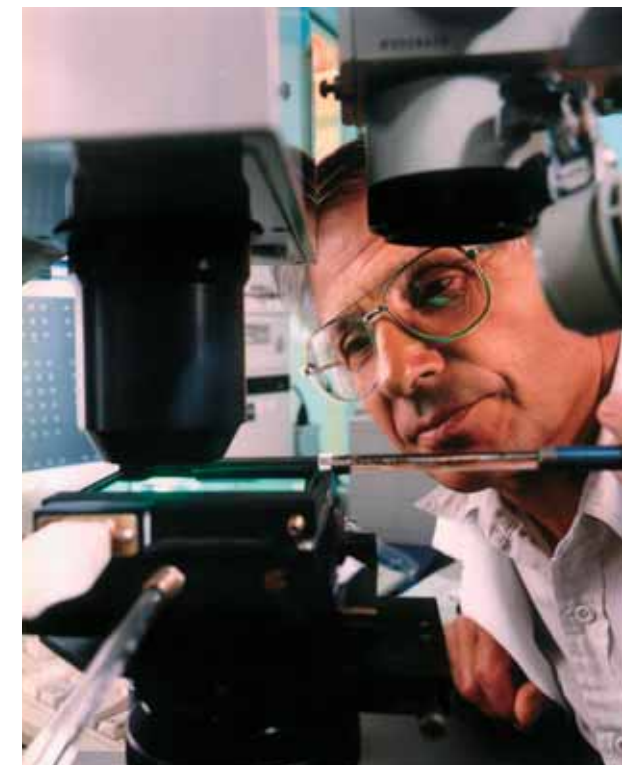
Ядро системы – гидрогелевый биочип – будет в дальнейшем модифицироваться в зависимости от назначения диагностического теста, в то время как остальные компоненты уже сейчас являются унифицированными. Такие «лаборатории на чипе» позволяют значительно улучшить качество лабораторной диагностики, снизить вероятность заражения медперсонала и в конечном счете повысить эффективность и сократить стоимость лечения.

Литература

Грядунов Д. А., Зименков Д. В., Михайлович В. М. и др. *Технология гидрогелевых биочипов и ее применение в медицинской лабораторной диагностике // Медицинский алфавит. 2009. № 3. С. 10–14.*

Заседателев А. С. *Биологические микрочипы для медицинской диагностики // Наука и технологии в промышленности. 2005. № 1. С. 18–19.*

Колчинский А. М., Грядунов Д. А., Лысов Ю. П. и др. *Микрочипы на основе трехмерных ячеек геля: история и перспективы // Молекулярная биология. 2004. Е. 38 № 1. С. 5–16.*



Выдающийся молекулярный биолог, академик А. Д. Мирзабеков в лаборатории биологических микрочипов ИМБ РАН (Москва)

Arenkov P., Kukhtin A., Gemell A., et al. *Protein microchips: use for immunoassay and enzymatic reactions // Analytical Biochemistry. 2000. V. 278. N. 2. P. 123–131.*

Emelyanova M., Ghukasyan L., Abramov I. et al. *Detection of BRAF, NRAS, KIT, GNAQ, GNA11 and MAP2K1/2 mutations in Russian melanoma patients using LNA PCR clamp and biochip analysis // Oncotarget. 2017. V. 32. N. 8. P. 52304–52320.*

Feyzkhanova G., Voloshin S., Smoldovskaya O. et al. *Development of a microarray-based method for allergen-specific IgE and IgG4 detection // Clinical proteomics. 2017. doi: 10.1186/s12014-016-9136-7.*

Gryadunov D., Dementieva E., Mikhailovich V. et al. *Gel-based microarrays in clinical diagnostics in Russia // Expert review of molecular diagnostics. 2011. N. 11 P. 839–853.*

Khrapko K. R., Lysov Yu. P., Khorlyun A. A. *An oligonucleotide hybridization approach to DNA sequencing // FEBS Letters. 1989. V. 256. N. 1-2. P. 118–122.*

Zimenkov D. V., Kulagina E. V., Antonova O. V., et al. *Simultaneous drug resistance detection and genotyping of Mycobacterium tuberculosis using a low-density hydrogel microarray // Journal of antimicrobial chemotherapy. 2016. V. 71. N. 6. P. 1520–1531.*