Современная медицинская диагностика: быстрее и точнее

Ученые СПбПУ разработали биосенсор на основе графена для быстрого выявления респираторных вирусных инфекций и персонифицированную мультиплексную иммунодиагностику на основе белковых биочипов.

Еще на заре цивилизации люди поняли: для того, чтобы эффективно бороться с болезнью, нужно точно установить, что это за болезнь. Методы определения заболевания постепенно складывались в систему диагностики. В так называемом «Хирургическом папирусе», относящемся ко временам Древнего Египта, рассказывается о визуальной оценке состояния спинномозговой жидкости у травмированных пациентов. Отец медицины Гиппократ в своей «Прогностике» дает описание свойств и макроскопических характеристик мочи, кала и мокроты у здорового человека и при различных заболеваниях.

На рубеже XIX – XX веков как самостоятельная отрасль медицины лабораторная диагностика сформировалась окончательно. Сегодня в ее арсенале много проверенных временем и весьма точных методов. Это и оптическая микроскопия, и биохимические анализы, серологические исследования, и культивирование микроорганизмов на питательных средах (бакпосев). Но время ставит перед исследователями новые задачи по созданию эффективных диагностических технологий – достаточно в качестве такого вызова упомянуть проблемы массовой, точной и оперативной диагностики вирусной инфекции, с которыми человечество столкнулось в ходе пандемиии COVID-19. Среди перспективных направлений в этой области – разработка биосенсоров на основе графена для быстрого выявления респираторных вирусных инфекций и персонифицированная мультиплексная иммунодиагностика на основе белковых биочипов. О них мы поговорили с заведующим лабораторией разработки молекулярных диагностических систем Научно-исследовательского института гриппа имени А. А. Смородинцева, кандидатом биологических наук Сергеем Клотченко.

- Чем обусловлена необходимость разработки новых методов диагностики?

- Быстрая и точная молекулярная диагностика заболеваний различной этиологии и вызываемых ими осложнений позволит применять наиболее эффективную терапию, что повысит качество лечения, снизит количество негативных исходов при различных заболеваниях и себестоимость медицинского обслуживания.

- В чем актуальность быстрого выявления респираторных вирусных инфекций?

- Своевременная и точная диагностика респираторных вирусных инфекций является важнейшим аспектом их лечения и профилактики, так как позволяет применять соответствующие развивающемуся заболеванию эффективные медикаменты и терапию. Высокая точность диагностики вирусных заболеваний позволяет избегать применения избыточных доз лекарственных средств, снижать вредные побочные эффекты от применения лекарств, контролировать проведение лечения и эффективной профилактики.

- Что такое диагностический биосенсор?

- Диагностический биосенсор – это полупроводниковый прибор, действие которого в нашем случае основано на методе иммуноферментного анализа и позволяет определять вирусные белки в биологических образцах в низких концентрациях в течение нескольких секунд. Поскольку данный метод основан на взаимодействии антиген-антитело, то потенциально с его помощью можно определять не только вирусные белки, но и, например, белковые биомаркеры в сыворотке крови пациента.

- Почему графен?

- Графен – один из наиболее изученных углеродных материалов. Развитая поверхность графена толщиной в один атом, химическая и механическая стойкость, высокая электро- и теплопроводность, способность легкой функционализации поверхности различными молекулами, хорошая биосовместимость графеновых материалов – все это привлекает специалистов из различных областей науки и техники. Диапазон исследования графеновых материалов очень широк: суперконденсаторы, системы утилизации CO_2, очистки воды, катализ, наноносители для доставки лекарственных средств, сенсоры.

Электропроводность графена в значительной мере изменяется при присоединении к его поверхности других молекул. На этом принципе основано действие графеновых сенсоров. Однако сама по себе графеновая пленка не является избирательно чувствительным сенсором, поскольку легко сорбирует на своей поверхности разнообразные молекулы. При создании биосенсора с целью повышения авидности и селективности графена в отношении белковых молекул его поверхность функционализируют активными аминогруппами, на которых затем заякориваются белковые молекулы (антигены или антитела). Присоединение к поверхности графена биологически активных молекул, например, антигенов или антител, позволяет создавать биосенсоры, способные селективно выявлять биологические молекулы в различных средах, что может быть применимо в молекулярной диагностике.

- Как это работает?

- Предлагаемый нами метод экспресс-диагностики вирусных инфекций основан на использовании высокочувствительного и быстродействующего устройства для детектирования сигнала путем измерения электрического импеданса в биосенсорах на пленках графена. На поверхность графена иммобилизуются моноклональные антитела к определяемым вирусным антигенам. Принцип работы тест-системы основан на детекции специфического связывания антитела, закрепленного на поверхности графена в сенсоре, с антигеном, находящимся в анализируемом клиническом образце (например, назофарингеальном мазке или образце слюны больного). Взаимодействие антиген-антитело изменяет сопротивление слоя графена, что с высокой чувствительностью и скоростью может быть зарегистрировано измерительным прибором (потенциометром). В процессе анализа выявляется непосредственно антиген.

- Насколько быстрее такая система выявляет заболевания, чем традиционные методы диагностики?

- По типу взаимодействия данный метод сопоставим с традиционным иммуноферментным анализом, однако значительно быстрее (не более минуты против пары часов) и чувствительнее. По чувствительности он превосходит метод полимеразной цепной реакции, при этом проведение анализа не требует специальных лабораторных навыков.

- Насколько близки разработки биосенсора к широкому внедрению в клиническую практику?

- В данный момент мы занимаемся разработкой биосенсора в рамках программы «Приоритет-2030». Сейчас находимся на этапе прикладных научных исследований. По окончании данного проекта в 2024 году мы планируем представить опытный образец высокочувствительной тест-системы на пленках графена для детектирования вируса гриппа в режиме экспресс-анализа. Тест-система будет состоять из стержня с размещенным внутри графеновым чипом на держателе, измерительного блока и персонального компьютера со специализированным программным обеспечением для проведения измерений. После успешного завершения данного проекта мы планируем провести клиническую апробацию тест-системы, затем выйти на регистрацию медицинского изделия, после чего уже можно будет задуматься о широком внедрении биосенсора в клиническую практику.

- Что включает в себя мультиплексная иммунодиагностика?

- Методы мультиплексной иммунодиагностики позволяют одновременно выявлять до нескольких десятков вирусных белков или биомаркеров в одном клиническом образце, что делает возможным проведение пациент-ориентированной диагностики и лечения,

в том числе основанного на использовании рациональных принципов антибиотикотерапии.

- Что такое белковый биочип?

- Биочип – это своеобразный миниатюрный прибор, с помощью которого можно проводить одновременный параллельный анализ специфических взаимодействий биологических макромолекул. Принцип действия белкового биочипа состоит в следующем. На химически модифицированную поверхность предметного стекла роботом для печати (споттером) наносятся первые захватывающие антитела и производится их ковалентное связывание. Далее биочипы инкубируют с клиническим образом от пациента для определения в аналите уровня искомых вирусных белков или биомаркеров. Захваченные белки затем детектируются вторыми выявляющими антителами, меченными биотином. В конечном итоге производится детекция связавшихся вторых антител посредством стрептавидина, меченного флуорофором (Cy5 или Cy3), с помощью флуоресцентного сканера. По уровню интенсивности флуоресценции от аналита в сравнении со стандартом судят о концентрации вирусных белков или биомаркеров в исследуемом образце.

В настоящее время мы ведем разработку мультиплексной диагностической тест-системы на основе белковых биочипов в формате стандартного иммунологического планшета (96 лунок). Система предназначена для исследования биологического образца, полученного от больного (обычно это назофарингеальный мазок), на наличие в нем респираторных вирусов, обладающих наибольшим эпидемическим потенциалом в человеческой популяции. Анализ одной биологической пробы проходит в одной лунке микропланшета, содержащей одновременно несколько антител, специфически выявляющих поверхностные антигены вирусов. Наряду с выявлением вирусного патогена разрабатываемая тест-система также направлена на одновременное определение уровней нескольких специфических белковых маркеров воспаления, характеризующих острую фазу заболевания (в качестве образца для анализа обычно используют сыворотку крови). Метод основан на твердофазном иммунофлуоресцентном анализе в варианте двойного специфического связывания («сэндвич»-формат) с использованием двух моноклональных антител с различными антигенными детерминантами к каждому из анализируемых вирусных белков или биомаркеров. Анализ одной биологической пробы проходит в индивидуальной лунке микропланшета.

Концепция и методология такого подхода заключается в том, что на дно лунки микропланшета в матричном порядке наносятся и иммобилизуются одновременно несколько белков (захватывающих антител), способных к специфическому связыванию тех или иных антигенов (вирусных белков или биомаркеров), а выявляющие антитела представляют собой смесь биотинилированных антител, каждое из которых специфически связывается с одним из антигенов. Затем биочип инкубируют с раствором флуоресцентного комплекса стрептавидин-Cy5 или Cy3 и проводят визуализацию полученных результатов с использованием флуоресцентного анализатора (планшетного ридера), позволяющего в высоком разрешении зарегистрировать и обсчитать флуоресцентные сигналы, получаемые от каждого элемента биочипа (спота) в лунке микропланшета. Согласно полученным от спотов сигналам, можно оценить содержание каждого вирусного белка или биомаркера (соответствующего конкретному споту в лунке) в анализируемой пробе.

- Что принесет внедрение персонифицированной мультиплексной иммунодиагностики на основе белковых биочипов?

- Преимущества персонифицированной мультиплексной диагностики на основе белковых биочипов в формате микропланшета: возможность исследования до 96 биологических проб одновременно; простота и легкость выполнения анализа; возможность использования технического инструментария, применяемого в ИФА, в том числе высокопроизводительного оборудования, такого как автоматические станции для раскапывания; одновременное измерение до нескольких десятков вирусных антигенов и белковых биомаркеров в одном образце; сравнительная дешевизна и экономичность метода; полный цикл проведения анализа за один рабочий день.

- **Ваш взгляд на перспективы здравоохранения в обозримом и более далеком будущем в свете внедрения новых методов диагностики.**

- Потребность практического здравоохранения в мультиплексных диагностических системах определяется необходимостью проведения исследований клинического материала одновременно у большого количества пациентов сразу на несколько вирусных инфекций и/или биомаркеров воспаления, имеющих прогностическую значимость. Такая мультиплексная диагностическая система позволит медицинскому персоналу параллельно проводить анализ десятков и даже сотен пациентов в течение одного рабочего дня.

Предлагаемая нами платформа для мультиплексной молекулярной диагностики обладает высоким рыночным потенциалом в России. Это объясняется несколькими факторами. Во-первых, создание российской индустрии медицинской техники и оборудования является одной из приоритетных задач государственной политики, необходимой для развития и повышения уровня здравоохранения. Во-вторых, в настоящее время на рынке представлены в основном поставщики импортного оборудования, в то время как отечественных разработчиков и поставщиков готовых диагностических тест-систем – единицы. В-третьих, лабораторная диагностика входит в тройку направлений, обладающих наибольшим потенциалом для развития, и, вследствие этого, создания новых стартапов в рыночной нише диагностической медицины.