

УДК 666.233

И. В. Шугалей докт.хим.наук¹; **В.В. Тофтунова**¹, **Н.П. Дубяго**¹, **В.В. Гусейнова**¹, **А.А. Иванова**¹, **А.М. Иванов**, докт.мед.наук²; **В.Ю. Долматов**, канд.хим.наук³

¹Санкт-Петербургский государственный технологический институт
(Технический университет), г. Санкт-Петербург, Россия

²Санкт-Петербургская государственная военно-медицинская академия,
г. Санкт-Петербург, Россия

³Федеральное государственное унитарное предприятия СКТБ «Технолог»,
г. Санкт-Петербург, Россия

НОВЫЙ ИММУНОХИМИЧЕСКИЙ ДИАГНОСТИКУМ ДЛЯ ВЫЯВЛЕНИЯ ОПАСНЫХ ИНФЕКЦИЙ НА ОСНОВЕ УЛЬТРАДИСПЕРСНЫХ АЛМАЗОВ ДЕТОНАЦИОННОГО СИНТЕЗА

Ultradisperse diamonds of detonation synthesis (NDs) being possible firmly to adsorb specific antigens on the surface of the grain were chosen as the basic core of immunochemical diagnosticum. It was shown that only specially treated sample of NDs – TAN does not agglomerate in physiological conditions.

One of the first constructed diagnosticums of such type is the test-system for exposing syphilis infection. Several antigens of Treponema pallidum being the pathogenic organism and provoking syphilis infection in humans were tested for binding with NDs particles. The protein antigen with $M = 41000$ was chosen as the preferable one. The complex of NDs with this antigen is the base of the created diagnosticum. Currently the composition of the diagnosticum has been optimized, the ratio of NDs:antigen has been chosen and the reaction conditions have been selected. The constructed diagnosticum is stable for 30 days. It shows high sensitivity (95 %). The diagnosticum also displays very high specificity (up to 100 %).

В последнее десятилетие выявлен широкий круг различных необычных биологических свойств наноалмазов детонационного синтеза (НА) и данный продукт находит широкое применение в различных областях биологии и медицины: онкологии, дерматологии, гастроэнтерологии. Применение наноалмазов в биологической сфере основывается как на разнообразных химических свойствах водных суспензий НА, так и на их высокой сорбционной емкости. При этом сочетание химической активности и высокой сорбционной способности придает материалу уникальные свойства.

Наноалмазы проявляют очень высокую активность по отношению к патогенным вирусам, микробам и бактериям, интенсивно поглощая их благодаря высокой адсорбционной способности и иным специфическим свойствам. Ультрадисперсные алмазы (УДА) являются сверхактивными сорбентами, иммобилизаторами биологически активных веществ, способны резко усиливать действие лекарственных препаратов.

Было установлено, что УДА наиболее полно проявляют свои свойства в жидкой среде (водной, спиртовой), а сухой порошок очищенных УДА малоэффективен.

Присутствующие на поверхности наноалмазов функциональные группы придают частицам НА в водном растворе заряд, знак и величина которого зависят от числа и константы диссоциации этих групп, а также pH раствора.

Свойства НА, позволяющие использовать их в медицине:

высокая адсорбционная способность;

большая удельная поверхность;

обилие свободных электронов на поверхности (множественный радикал – донор);

нанометрические размеры;

большое количество кислородсодержащих функциональных групп на поверхности кристаллов;

гидрофильный характер поверхности;

отсутствие токсического действия.

В настоящей работе представлены некоторые аспекты нового направления использования НА в медицинской практике, а именно в качестве гидрозолевых препаратов для иммунодиагностики.

В этом случае водный раствор УДА может применяться в реакции гидрозолевой иммунохимической агглютинации в качестве твердой фазы.

Иммунохимический диагностикум создается путем адсорбционного связывания специфического библиганда наночастицами УДА. В качестве одного из вариантов такого диагностикума был разработан экспресс-тест для детекции специфических антител к бледной трепонеме для выявления заболевания сифилисом.

Последние годы в России и других странах СНГ характеризуются значительным ростом заболеваемости сифилисом. За последние 10 лет заболеваемость возросла в 100 раз. В Санкт-Петербурге показатели болезни превышают среднероссийские в 2–2,5 раза [1]. Кроме того, в последние десятилетия во всем мире отмечается увеличение доли бессимптомного сифилиса [2, 3] и сифилиса со стертой клинической картиной.

В таких условиях большое значение приобретает эффективная диагностика данного заболевания [4, 5]. Особая роль при этом должна отводиться методам массового профилактического обследования (скрининга) с целью выявления инфекции, что диктует необходимость повышения требований к показателям диагностической эффективности скрининговых тестов [3].

При развитии заболевания в биологических жидкостях: крови, моче, слюне появляются определенные маркеры (антитела) – специфические вещества сложной, как правило, белковой природы. При обнаружении тех или иных специфических маркеров врач может судить о факте заболевания. Следовательно, следует внедрять в практическую деятельность врача новые экспрессные методы ранней диагностики, позволяющие осуществить хотя бы качественную диагностику (по принципу «да» – «нет») с последующим более полным исследованием при наличии патологии, соответствующей его специальности.

Разрабатываемые экспресс-тесты должны отвечать следующим требованиям:

низкая стоимость;

экспрессность – постановка реакции и считывание результатов не более 30 минут;

для проведения теста не нужны дополнительные приборы (возможность

проводить реакции непосредственно на рабочем месте);

возможность ставить реакции с малыми объемами препарата и биоматериала,

взятого от больного (10–20 мкл);

стабильность и воспроизводимость иммунохимических свойств, т.е. способность

выявлять маркеры того или иного заболевания в самом широком спектре

биологических жидкостей (в моче, слюне, сыворотке крови и т.д.) в

минимальных концентрациях.

Традиционные классические методы диагностики, используемые в настоящее время для скрининга, к сожалению, далеки от сформулированных выше требований [5].

Именно поэтому основным предметом нашего исследования стали разработка и создание экспрессного иммунохимического препарата, который соответствовал бы вышеперечисленным требованиям.

Для создания диагностикума следует правильно подобрать носитель. Исходя из требований нетоксичности, химической инертности, большой удельной поверхности нами были выбраны наноалмазы в качестве основы для создания диагностикума.

Принцип работы диагностикума основан на укрупнении частиц активного носителя (в данном случае НА), на поверхности которого связаны вещества (антигены), обладающие высокой специфичностью и сродством к маркерам, присутствующим в исследуемом биоматериале, полученном от больного.

Находящиеся на поверхности частиц НА вещества, способствующие такому укрупнению, рассматриваются как биолиганды.

Для выявления заболевания сифилисом в качестве биолигандов использованы специфические для возбудителя сифилиса *Treponema pallidum* соединения.

Бледные трепонемы *T.pallidum* имеют сложную антигенную структуру, обусловленную наличием в их составе полисахаридных, липидных и белковых комплексов. В работе были использованы 2 антигена – трепонемный, соответствующий природному антигену возбудителя сифилиса с молекулярной массой 41000, и кардиолипиновый, представляющий собой смесь трех высокоочищенных липидов: кардиолипина, лецитина и холестерина в спирте этиловом абсолютном.

На основе тестирования был отобран антиген белковой природы, который хорошо связывается частицами НА, не удаляется при промывках, что обеспечивает стабильную работу диагностикума.

Далее нужно было выбрать наиболее подходящий образец наноалмазов.

В ходе работы исследованию подвергались 2 вида наноалмазов:

окисленная форма ультрадисперсных алмазов - водная суспензия наноалмазов темно-серого цвета;

наноалмазы, обработанные соляной кислотой.

Так как реакция на положительный образец сыворотки предполагает образование агломератов (реакция агглютинации), то первым этапом работы стала проверка исследуемых носителей (НА) на способность к аутоагглютинации в физиологических условиях.

Визуальная оценка результатов реакции агглютинации осуществлялась по следующей шкале:

4+ – положительная реакция алмаз-агглютинации (РАА). Агломераты равномерно расположены по всей поверхности капли;

3+ – положительная РАА. Агломераты равномерно расположены по поверхности капли, но агломераты менее ярко выражены;

2+ – слабopоложительная РАА. Агломераты с трудом различимы в общем сером облаке частиц суспензии;

1+ – отрицательная РАА. Агломераты неразличимы;

– – отрицательная РАА. Сплошное серое облако, нет следов образования агломератов;

Установлено, что НА, не подвергнувшиеся обработке соляной кислотой, способны к аутоагглютинации в физиологических условиях, а, следовательно, не могут использоваться нами как основа для создания диагностикума, во избежание заведомо ложных результатов. Таким образом, все последующие исследования осуществляли с НА, обработанными кислотой.

Работа была условно разделена на 2 этапа: этап приготовления диагностикума и этап постановки реакции.

Основные этапы приготовления диагностикума включали:

Приготовление ультрасуспензии УДА заданной концентрации.

Интенсивную гомогенизацию полученной суспензии и формирование полукolloидного раствора.

Приготовление рабочего раствора биолиганда – трепонемного антигена (M=41000),

Собственно адсорбцию биолиганда на поверхности наночастиц УДА.

Удаление несорбированного избытка антигена.

Нами подобраны оптимальные условия приготовления диагностикума: соотношение НА:антиген, процесс ведется в дистиллированной воде, в динамических условиях (центрифугирование).

Так как полнота сорбции антигена на носитель во многом определяет конечный результат эксперимента, то подбор оптимальных условий сорбции являлся одним из важнейших факторов в создании диагностикума

Постановка реакции с готовым диагностикумом проводилась следующим образом. К подготовленной суспензии диагностикума в количестве 50 мкл, внесенной в лунку стандартной планшетки или нанесенной на стекло, добавляли тестируемую сыворотку в количестве 20 мкл. В положительных образцах сыворотки (т. е. сыворотки больного с диагнозом, подтвержденным другим независимым методом) наблюдалась четко видимая агглютинация, в отрицательных образцах сыворотки агглютинации не было. Время наступления наглядного результата составляло 8–10 мин. Результаты оптимизации диагностикума по концентрации антигена представлены в табл. 1.

Таблица 1. Зависимость течения реакции алмазагглютинации от концентрации белкового антигена в дистиллированной воде при тестировании сывороток больных сифилисом с независимо подтвержденным диагнозом

Концентрация трепонемного АГ, мкг/мг	Тип сыворотки	
	положительная	отрицательная
10	–	–
50	+	–
100	++	–
150	+++	–
200	++++	–

Было протестировано 20 положительных и 20 отрицательных сывороток, предварительно охарактеризованных в стандартных диагностических тестах.

В случае заведомо положительных образцов сывороток – РАА дала 19 положительных ответов.

Из 20 заведомо отрицательных образцов сывороток – РАА дала все 20 отрицательных ответов.

Таким образом, можно говорить о 95 % чувствительности и 100 % специфичности РАА.

Выводы

1. В результате проведенной работы был разработан принципиально новый диагностикум на основе ультрадисперсных алмазов детонационного синтеза. Основой данного диагностикума стала реакция алмаз-агглютинации (РАА).

2. Были определены оптимальные условия проведения РАА, такие как:
использование определенной формы наноалмазов как основы диагностикума;
использование трепонемного антигена в качестве тестируемого объекта;
концентрация трепонемного антигена лежит в пределах 150–200 мкг/мл;
использование дистиллированной воды как среды для проведения реакции;
центрифугирование образцов для наиболее полного связывания ТР-АГ с поверхностью УДА;

3. Были определены показатели чувствительности (95 %) и специфичности (100 %) данного диагностикума, что позволяет говорить о РАА как об альтернативном варианте в подгруппе трепонемных непрямых серологических тестов в диагностике сифилиса.

4 Таким образом, наноалмазы детонационного синтеза можно рассматривать как перспективный новый материал для конструирования бесприборных диагностикумов для выявления опасных инфекций.

Литература

1. Долматов В. Ю. Ультрадисперсные алмазы детонационного синтеза. – С-Пб.: СПбГПУ, 2003. – 344 с.
2. Долматов В. Ю., Кострова Л. Н. Наноалмазы детонационного синтеза и возможность создания нового поколения лекарственных средств // Сверхтв. материалы. – 2000. – № 3. – С. 82–85.
3. Родионов А. Н. Сифилис: руководство для врачей. – СПб.: Питер, 2000. – 288 с.
4. Брико Н. И., Иваненко И. П., Громько А. И., Тихонова Л. И. Современная ситуация по болезням, передающимся половым путем, в России и тенденции ее развития. // Эпидемиология и инфекционные болезни. – 1999. – Вып. 1. – С. 4–7.
5. Шувалова Т. М., Туманян А. Г., Юдакова В. М., Соколова И. М. Современные проблемы врожденного сифилиса // Иммунологические проблемы практической педиатрии. – 1999. – № 4. – С. 13–18.

Поступила 04.07.07.