

На правах рукописи

К.Серебря

СЕРЕБРЕННИКОВА Ксения Вячеславовна

**Высококчувствительные экспресс-методы латерального
проточного иммуноанализа биомаркеров для целей
медицинской диагностики**

03.01.06 – биотехнология (в том числе бионанотехнологии)

Автореферат диссертации на соискание ученой степени

кандидата химических наук

Москва - 2018

Работа выполнена на кафедре химической энзимологии
химического факультета Московского государственного университета
имени М.В. Ломоносова

Научный руководитель:

Осипов Александр Павлович

кандидат химических наук, доцент Химического факультета
Московского государственного университета имени М.В.Ломоносова

Официальные оппоненты:

Дзантиев Борис Борисович

доктор химических наук, профессор, заместитель директора по науке
Федерального исследовательского центра «Фундаментальные основы
биотехнологии» РАН, заведующий лабораторией иммунобиохимии

Дрыгин Юрий Федорович

доктор химических наук, доцент, заведующий лабораторией
нуклеиново-белковых взаимодействий НИИ физико-химической
биологии имени А.Н.Белозерского МГУ

Максименко Александр Васильевич

доктор биологических наук, профессор, ФГБУ Национальный
медицинский исследовательский центр кардиологии Министерства
здравоохранения Российской Федерации

Защита диссертации состоится «26» июня 2018 г. в 15:00 часов на засе-
дании диссертационного совета МГУ.02.08 Московского государственного
университета имени М.В. Ломоносова по адресу: г. Москва ул. Ленинские
горы д. 1 стр. 11, ауд. 202.

E-mail: d50100159@yandex.ru

С диссертацией можно ознакомиться в отделе диссертаций научной
библиотеки МГУ имени М.В. Ломоносова (Ломоносовский просп., д. 27) и на
сайте ИАС «ИСТИНА»: <http://istina.msu.ru/dissertations/117548930/>

Автореферат разослан «25» мая 2018 г.

Ученый секретарь диссертационного совета,
кандидат химических наук



И.К. Сакодынская

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы. Одной из наиболее важных и актуальных задач в области аналитической биотехнологии является разработка новых простых методов и устройств, позволяющих осуществлять экспресс-анализ различных соединений в объектах окружающей среды или в биологических жидкостях. В основе функционирования таких биоаналитических устройств лежат общие процессы первоначального "узнавания" анализируемого вещества в растворе, осуществляемого, как правило, за счет эффективных биоспецифических взаимодействий (например, типа антиген-антитело), и последующие преобразования в системе, приводящие к их "визуализации" путем введения в образующийся иммунокомплекс специальной метки. В результате наличие в образце анализируемого вещества может быть определено визуально или с использованием соответствующего инструментального оборудования.

Наиболее распространенным из быстрых методов определения целевых аналитов является латеральный проточный иммуноанализ (ЛПИА), также известный в литературе как иммунохроматографический анализ. Принцип действия ЛПИА объединяет иммунохимический и хроматографический методы и основан на специфических взаимодействиях между аналитом и распознающими его антителами, протекающих в различных частях мембранной тест-полоски с предварительно иммобилизованными специфическими реагентами и инициируемых добавлением жидкого образца. Результатом ЛПИА является появление окрашенных линий в тестовой зоне устройства, интенсивность окраски которых соответствует содержанию исследуемого аналита. Как правило, метод ЛПИА используется для полуколичественного определения содержания определенных веществ в крови или сыворотке, называемых биомаркерами. Тесты на основе принципа иммунохроматографии предельно просты в использовании и могут применяться на любом этапе оказания медицинской помощи населению, как для самодиагностики или диагностики непосредственно в кабинете врача при проведении профилактических осмотров, так и в клинко-диагностических лабораториях с высоким уровнем оснащенности.

В области медицинской диагностики одной из актуальных проблем является своевременное выявление сепсиса и бактериальных инфекций. Вследствие поздней диагностики и лечения уровень смертности от сепсиса остается высоким. В связи с этим важна дифференциальная диагностика инфекции и сепсиса. По результатам исследований последних лет, наиболее перспективным маркером сепсиса является белок прокальцитонин (ПКт). При бактериальных инфекциях и различных формах тяжелого системного воспаления, уровень ПКт в крови повышается в десятки и сотни раз и часто коррелирует с тяже-

стью состояния. На сегодняшний день для определения уровня ПКт в сыворотке предложен ряд качественных и количественных методов анализа. Обычно количественное определение ПКт проводится с помощью специализированных аналитических платформ, обеспечивающих наименьшие затраты труда. Однако, недостатками данных видов анализа являются высокая стоимость и достаточно длительное время проведения тестирования, что во многих случаях оказывается критичным параметром.

В связи с этим основным направлением данного исследования является разработка простых и недорогих тест-систем для полуколичественного или количественного экспресс-определения ПКт в сыворотке крови человека, которые можно использовать для ранней диагностики тяжелой бактериальной инфекции (сепсиса) и контроля за эффективностью антибиотикотерапии.

Цели и задачи исследования. Целью настоящей работы является разработка методов ЛПИИ для количественного и визуального полуколичественного определения ПКт в сыворотке крови в клинически важных диапазонах концентраций для выявления и контроля развития сепсиса.

Для достижения поставленной цели требовалось решить следующие задачи:

- получить и охарактеризовать компоненты разрабатываемых аналитических тест-систем, оптимизировать условия иммобилизации антител на мембранах, состав и свойства конъюгатов антител с наночастицами золота сферической и несферической формы различного размера для определения ПКт методом ЛПИИ в необходимых диапазонах концентраций;
- разработать тест-системы, позволяющие осуществлять определение ПКт в клинически важных диапазонах концентраций с приборной регистрацией результатов путем использования различных типов меток и высокочувствительных систем регистрации измеряемого аналитического сигнала (например, золотые наночастицы несферической формы, квантовые точки, агрегаты наночастиц золота, гигантское комбинационное рассеяние и др.);
- разработать полуколичественные тест-системы для визуального безинструментального экспресс-определения модельных маркеров и ПКт, позволяющие проводить оценку наличия анализируемых соединений в заранее заданном числе определенных концентрационных диапазонов;
- апробировать разработанный полуколичественный ЛПИИ для экспрессного определения ПКт на реальных образцах сыворотки крови и провести сравнительную оценку полученных результатов с методом иммуноферментного анализа (ИФА).

Научная новизна. Разработаны основные принципы создания быстрых тест-систем на основе принципа ЛПИИ с использованием наночастиц золота в качестве метки для определения концентрации ПКт с целью дифференциальной диагностики между различными

клиническими состояниями и тяжелой бактериальной инфекцией (сепсисом). Изучено влияние размера наночастиц золота на характеристики ЛПИА, подобраны оптимальные компоненты, комбинации и концентрации антител, иммобилизованных на аналитической мембране и в конъюгате с наночастицами золота. Разработан количественный ЛПИА ПКт с использованием наночастиц золота в качестве метки на основе фотометрической детекции. С целью точного определения ПКт в "серой зоне" концентраций (от 0,25 до 2 нг/мл) разработаны новые подходы для снижения предела обнаружения антигена, основанные на модификации наночастиц золота (например, использование укрупненных агломератов наночастиц золота, дополнительное введение ферментной метки, применение наночастиц золота несферической формы в виде «звезд», «попкорна»).

Предложен новый визуальный экспресс-метод на основе градиентного принципа ЛПИА для определения биомаркеров в заранее заданном количестве диапазонов концентраций путем подсчета числа проявившихся тестовых линий на тест-полосках. Отработка принципа градиентного ЛПИА проведена на модельной тест-системе для полуколичественного определения хорионического гонадотропина человека (ХГЧ) в пяти диапазонах концентраций, соответствующих начальным (до 4 недель) срокам беременности. Данный принцип градиентного ЛПИА с использованием в качестве метки наночастиц золота в форме сфер или попкорна реализован для быстрой визуальной оценки клинически значимых диапазонов концентраций ПКт в сыворотке крови: менее 0,25 нг/мл (отсутствие заболевания); от 0,25 до 0,5 нг/мл (локальная бактериальная инфекция); от 0,5 до 2 нг/мл (системная инфекция); от 2 до 10 нг/мл (инфекционный процесс с системным воспалением, приводящем к сепсису); более 10 нг/мл (тяжелый сепсис или септический шок).

Практическая значимость работы. В результате проведенных исследований создана тест-система на основе градиентного принципа ЛПИА для визуального и быстрого определения клинически значимых диапазонов концентраций ПКт в сыворотке крови. Эффективность разработанной тест-системы была подтверждена сравнением результатов градиентного ЛПИА ПКт с результатами, полученными стандартным твердофазным ИФА. Было показано, что разработанная тест-система позволяет проводить дифференциальную диагностику между различными клиническими состояниями и тяжелой бактериальной инфекцией (сепсисом). Основными преимуществами разработанного градиентного ЛПИА для полуколичественного определения ПКт являются быстрота (10-15 минут) и простота тестирования путем соотнесения числа окрашенных тестовых линий с диапазоном концентраций исследуемого соединения, а также возможность проведения анализа вне лабораторных условий.

Апробация работы. Основные результаты работы представлены на IX Всероссийской конференции "Высокореакционные интермедиаты химических и биохимических реакций" (Москва, 2014), I Всероссийской конференции с международным участием "Химический анализ и медицина" (Москва, 2015), VIII Московском международном конгрессе "Биотехнология: состояние и перспективы развития" (Москва, 2015), IX Международной конференции молодых ученых по химии "Менделеев 2015" (Санкт-Петербург, 2015), VI Международном молодежном медицинском конгрессе "Санкт-Петербургские научные чтения – 2015" (Санкт-Петербург, 2015), 10-й Международной конференции "Биокатализ-2015" (Москва, 2015), Международном студенческом форуме (Кельце, Польша, 2015), Европейской конференции «ЕвроАнализ 2015» (Бордо, Франция, 2015), Международном молодежном форуме "Ломоносов-2016" (Москва, 2016), IV Международной научно-практической конференции "Нanomатериалы и живые системы" (Москва, 2016), Международном научном форуме "Open science" (Санкт-Петербург, 2016), Международной конференции со школой и мастер-классами для молодых ученых "Химическая технология функциональных наноматериалов" (Москва, 2017), 5-ой Международной научно-практической конференции "Нanomатериалы и живые системы" (Казань, 2018).

Публикации. По материалам диссертационной работы опубликовано 16 работ, в том числе 4 статьи в изданиях, индексируемых в базах данных "Web of Science" и "Scopus" и входящих в Перечень журналов ВАК, 12 тезисов докладов на международных и российских конференциях.

Объем и структура работы. Диссертационная работа состоит из введения, обзора литературы (глава 1), экспериментальной части (глава 2), результатов и обсуждения (глава 3), выводов, списка цитируемой литературы. Работа изложена на 145 страницах, содержит 13 таблиц и 51 рисунок. Список литературы включает 186 ссылок.

Используемые сокращения. ЛПИА – латеральный проточный иммуноанализ, ПКт – прокальцитонин, ИФА – иммуноферментный анализ, НЧЗ – наночастицы золота, Ат – антитела, пАт – поликлональные антитела, мАт – моноклональные антитела, ЗХВК – золотохлористоводородная кислота, ПЭМ – просвечивающая электронная микроскопия, ПХ – пероксидаза хрена, КТ – квантовые точки, ГКР – гигантское комбинационное рассеяние, МБК – меркаптобензойная кислота, ХГЧ – хорионический гонадотропин человека.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ ДИССЕРТАЦИОННОЙ РАБОТЫ

1. ЛПИА с использованием в качестве метки сферических НЧЗ для определения ПКт

Основной задачей данного этапа работы являлась разработка быстрой тест-системы на основе стандартной схемы ЛПИА с использованием в качестве инструментально (или визуально) детектируемой метки - НЧЗ сферической формы. Разработка стандартного ЛПИА ПКт включала решение следующих задач: получение сферических НЧЗ и стабильных конъюгатов метки со специфическими Ат; подбор оптимальных компонентов, материалов и соотношений реагентов. С целью изучения влияния размера метки на аналитические характеристики ЛПИА в работе исследовали НЧЗ размером от 20 до 100 нм.

1.1. Получение НЧЗ и определение размерных характеристик

Сферические НЧЗ диаметром 20-50 нм получали по методу Френса путем варьирования количества добавляемого к ЗХВК восстановителя, цитрата натрия. Образцы НЧЗ большого диаметра готовили путем двухстадийного синтеза. На первой стадии готовили зародышевый коллоидный раствор НЧЗ, который на втором этапе объединяли с ростовым раствором (ЗХВК, цитрат натрия, гидрохинон) для получения сфер большого размера. Размерные характеристики образцов НЧЗ оценивали спектрально и с помощью ПЭМ (таблица 1).

Таблица 1. Размерные характеристики образцов НЧЗ

Образец	Пик плазмонного резонанса, нм	Средний диаметр, нм (ПЭМ)
№ 1	520	$20,0 \pm 1,0$
№ 2	530	$35,1 \pm 2,3$
№ 3	537	$50,4 \pm 1,6$
№ 4	547	$70,2 \pm 1,8$
№ 5	582	$100,2 \pm 2,0$

1.2. Получение конъюгатов Ат с НЧЗ

Для получения стабильных конъюгатов пАт с НЧЗ определяли оптимальные значения рН и концентрации Ат. По зависимостям оптических поглощений коллоидных растворов НЧЗ при добавлении NaCl (10 %) от концентрации Ат при различных значениях рН были установлены следующие оптимальные условия образования конъюгатов: рН=7,0-7,5 и концентрация пАт 15 мкг/мл (диаметр 20 и 35 нм); 20 мкг/мл (диаметр 50 нм) и 40 мкг/мл (диаметр 70, 100 нм). Таким образом, для получения стабильных конъюгатов Ат, меченных золотыми наносферами большого размера, необходимо использовать более высокие концентрации иммунореагентов.

1.3. Выбор компонентов ЛПИА тест-системы для определения ПКт

Одной из задач при разработке ЛПИА тест-системы является выбор пары Ат, обеспечивающей низкий предел обнаружения и широкий диапазон определяемых концентра-

ций исследуемого анализата. В этой связи были исследованы возможные парные комбинации доступных коммерческих мАт и пАт, когда на мембрану наносили один вид Ат, а конъюгат с НЧЗ готовили с другими Ат. Наиболее низкий предел обнаружения и высокий аналитический сигнал были получены для пары мАт <СВ5>, иммобилизованных на мембране, и конъюгата пАт с НЧЗ.

Поскольку целью работы является разработка тест-системы для определения ПКт в сыворотке крови, выбор аналитической мембраны и мембраны для образца осуществляли путем пропускания образца по тест-полоске, не содержащей специфических реагентов. Для проведения эксперимента фиксировали объем (100 мкл сыворотки) и время протекания (10 минут) образца. Комбинации аналитической и мембраны для образца выбирали согласно условию прохождения образца до впитывающей мембраны. Для разных комбинаций мембран проводили ЛПИИ в стандартных растворах ПКт. Для дальнейших экспериментов была выбрана аналитическая мембрана CNPC (15 мкм, MDI, Индия), обеспечивающая наиболее высокий аналитический сигнал и быстроту проведения тестирования, в комбинации с мембраной для образца GFB-R4 (MDI).

1.4. Разработка ЛПИИ тест-системы для определения ПКт

Тест-полоску для проведения ЛПИИ с использованием НЧЗ в качестве метки собирали согласно схеме, представленной на рис. 1. Поскольку ПКт является высокомолекулярным соединением, то в работе использовалась сэндвич-схема анализа. Для формирования тестовой и контрольной линий на аналитическую мембрану наносили мАт к ПКт и белок А, соответственно. Стекловолоконную мембрану для конъюгата пропитывали раствором пАт, меченных НЧЗ, и затем высушивали. При добавлении образца, содержащего ПКт, на мембрану 2, начиналось его движение вдоль полоски под действием капиллярных сил. В присутствии антигена при прохождении вдоль полоски происходило взаимодействие его с конъюгатом Ат, меченных НЧЗ, с образованием комплекса антиген-меченые Ат. В тестовой зоне полоски специфические Ат связывали иммунокомплекс с образованием тройного окрашенного сэндвич-комплекса. Интенсивность окрашивания тестовой линии зависела от количества исследуемого вещества в образце.



Рис. 1. Схема строения ЛПИИ тест-полоски: 1- аналитическая мембрана; 2- мембрана для образца; 3- мембрана для конъюгата, модифицированная раствором конъюгата пАт с НЧЗ; 4- тестовая линия, на которой иммобилизованы мАт; 5- контрольная линия; 6- впитывающая мембрана; 7- пластиковая подложка.

С увеличением размера используемой метки до 35 нм наблюдалось незначительное усиление аналитического сигнала в области низких концентраций ПКт (рис. 2), что можно объяснить более контрастной, пурпурной окраской метки на полоске, которая визуальнее легче детектируется; а также увеличением площади поверхности частиц, что повышает выход иммобилизованных Ат на поверхности частиц. Однако, дальнейшее увеличение размера НЧЗ до 50 нм приводит к снижению аналитического сигнала, а частицы с размером 70 и 100 нм формируют полосу бледно-серого цвета, которую трудно оценить визуальнее или с помощью прибора.

Таким образом, можно сделать вывод, что увеличение размера сферических НЧЗ от 20 до 35 нм приводит к незначительному повышению предела детекции в анализе. Предел обнаружения ПКт методом ЛПИИ с использованием в качестве метки сферических НЧЗ размером 35 нм составил 0,5 нг/мл (рис. 3). Применение в качестве метки в ЛПИИ сферических наночастиц большого размера (более 40 нм) нецелесообразно из-за низкой стабильности таких коллоидных растворов, а также снижения интенсивности окрашивания метки, что приводит к сложности визуального или приборного детектирования результата на тест-полоске.

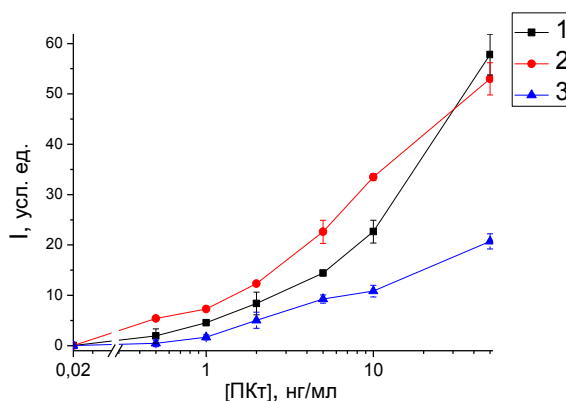


Рис. 2. Градуировочные графики ЛПИИ с использованием в качестве метки сферических НЧЗ размером 20 нм (1), 35 нм (2) и 50 нм (3) для определения ПКт.

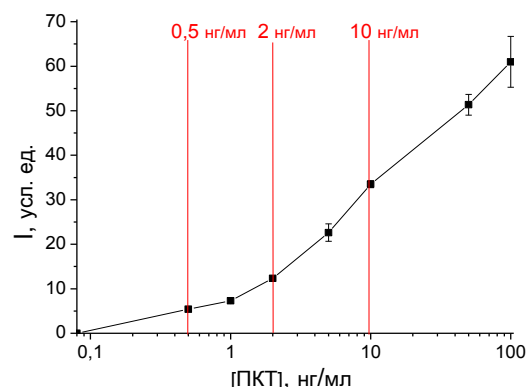


Рис. 3. Градуировочный график ЛПИИ ПКт в стандартных растворах, полученный для сферических НЧЗ размером 35 нм.

Разработанная тест-система ЛПИИ с использованием сферических НЧЗ (35 нм) для определения ПКт позволяет регистрировать значения ПКт, соответствующие наличию системной инфекции, однако не позволяет определять ПКт в достаточно малом клинически важном диапазоне его концентраций (ПКт от 0,25 до 0,5 нг/мл), характерном для локальной бактериальной инфекции в организме. Поэтому для разработки высокочувствительного ЛПИИ, позволяющего детектировать низкие концентрации ПКт, необходимо было рассмотреть различные известные подходы и разработать новые способы, позво-

ляющие снизить предел обнаружения антигена. Были рассмотрены несколько основных подходов, основанных на использовании других видов меток, а также методов регистрации генерируемого сигнала, в том числе: 1) для НЧЗ - модификация метки или введение дополнительной стадии анализа с целью усиления регистрируемого сигнала; 2) применение меток более сложного состава или разработка новых типов меток и систем, направленных на повышение аналитического сигнала; 3) оптимизация анализа или системы регистрации сигнала.

2. Подходы, направленные на повышение чувствительности ЛПИИ, на примере тест-системы для определения ПКт

2.1. ЛПИИ с использованием двойной метки состава НЧЗ-фермент

Одним из преимуществ НЧЗ является возможность их использования не только как основной метки в ЛПИИ, но и в качестве носителей дополнительной ферментной метки. В работе предложено использовать в качестве такой двойной метки конъюгат НЧЗ с Ат, предварительно уже меченными ПХ. Таким образом, визуальную окраску в тестовой линии, формируемую за счет образования меченого НЧЗ специфического иммунокомплекса, можно дополнительно "усилить" образованием окрашенного продукта ферментативной реакции. Для разработки ЛПИИ с использованием двойной метки получали конъюгат пАт-ПХ-НЧЗ на основе коммерческого препарата пАт к ПКт, меченных ПХ. Для проведения ЛПИИ конъюгат Ат, меченных ПХ и НЧЗ, использовали в жидком виде, так как при высушивании раствора на мембране для конъюгата наблюдалось снижение ферментативной активности. Для проведения анализа, конъюгат НЧЗ с мечеными ПХ Ат смешивали со стандартными растворами ПКт и наносили на мембрану для образца. После пропускания растворов детектировали два сигнала, один из которых соответствовал красному окрашиванию НЧЗ, а второй – окраске хромогена, образующейся в результате ферментативной активности ПХ. Красное окрашивание наночастиц позволило визуально определять 1 нг/мл ПКт. После проведения дополнительной стадии инкубации тест-полосок в растворе субстрата (тетраметилбензидина) с добавлением декстрансульфата, который фиксирует окрашенный продукт в тестовой и контрольной зонах полоски, появлялось синее окрашивание на аналитической мембране. Сравнение градуировочных графиков, полученных для ЛПИИ на основе НЧЗ (35 нм) и ЛПИИ с введением дополнительной ферментной метки показало, что предложенный подход для усиления аналитического сигнала позволяет значительно сместить область определяемых концентраций ПКт в сторону низких концентраций с пределом обнаружения 0,1 нг/мл (рис. 4). Однако, несмотря на возможность

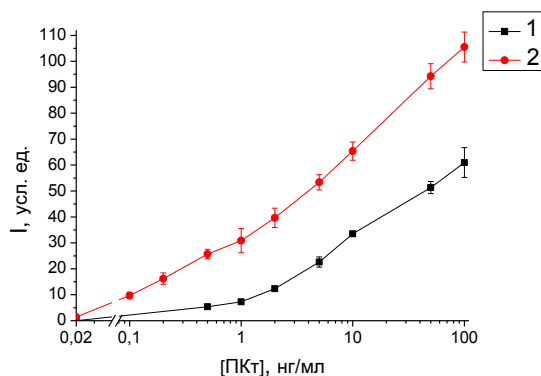


Рис. 4. Градуировочные графики ЛПИА на основе метки НЧЗ размером 35 нм (1) и ЛПИА на основе метки НЧЗ-ПХ (2) для определения ПКТ в стандартных растворах.

снижения предела обнаружения, данный подход усиления сигнала, генерируемого НЧЗ, заключающийся в использовании наночастиц в качестве дополнительного носителя ферментной метки, имеет ряд недостатков, связанных с нестабильностью реагентов, а также необходимостью проведения дополнительных стадий анализа, что увеличивает продолжительность анализа до 30 минут. Таким образом, метод ЛПИА на основе двойной метки состава НЧЗ-ПХ не вполне соответствует требованиям быстрых тест-систем для анализа различных биомаркеров вне лабораторных условий.

2.2. ЛПИА с использованием агрегатов НЧЗ в качестве метки

В качестве одного из новых способов усиления регистрируемого аналитического сигнала метки в виде НЧЗ, и, следовательно, снижения предела обнаружения аналита, предлагается применение в ЛПИА стабильных укрупненных НЧЗ, предварительно получаемых на основе системы биотин-стрептавидин, характеризующейся высокой константой связывания. Агломерат НЧЗ формировали путем предварительной инкубации со стрептавидином обычного конъюгата биотинилированных пАт с НЧЗ (35 нм) (рис. 5).

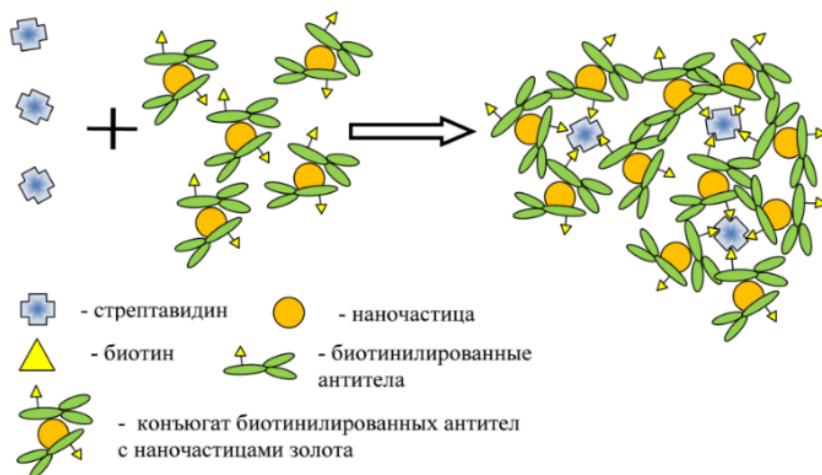


Рис. 5. Схема получения комплексного агрегата из стрептавида и конъюгата биотинилированных Ат с НЧЗ.

Молекула стрептавидина, имеющая четыре центра связывания биотина, выполняет роль сшивки между НЧЗ небольшого размера с сорбированными на поверхности биотинилированными Ат, в результате чего образуются стабильные укрупненные агрегаты, обладающие более интенсивной окраской. При добавлении образца, содержащего определяемый антиген, происходило его взаимодействие с комплексным агрегатом из стрептавидина и меченых биотинилированных Ат. В тестовой зоне происходило связывание сложного иммунокомплекса иммобилизованными специфическими Ат и наблюдалось появление окрашенной полосы, интенсивность которой пропорциональна содержанию анализируемого вещества в образце.

С целью выбора необходимых условий для обеспечения наиболее низкого предела обнаружения ПКт варьировали концентрационные соотношения конъюгата с золотыми наночастицами биотинилированных пАт к стрептавидину – 15:1, 15:3, 15:5 и 15:10. С увеличением концентрации стрептавидина, добавляемого к конъюгату биотинилированных Ат с НЧЗ, на спектрах оптического поглощения наблюдался сдвиг пика плазмонного резонанса в красную область, что свидетельствует об образовании более крупных комплексных конъюгатов (рис. 6А), при этом цвет тестовой линии на полосках менялся от красного к фиолетовому. Однако, с увеличением размера комплекса регистрируемый аналитический сигнал снижался, что, вероятно, связано со стерическими затруднениями, возникающими при связывании иммобилизованных на мембране Ат с комплексом антиген-агломерат конъюгатов Ат с НЧЗ (рис. 6Б).

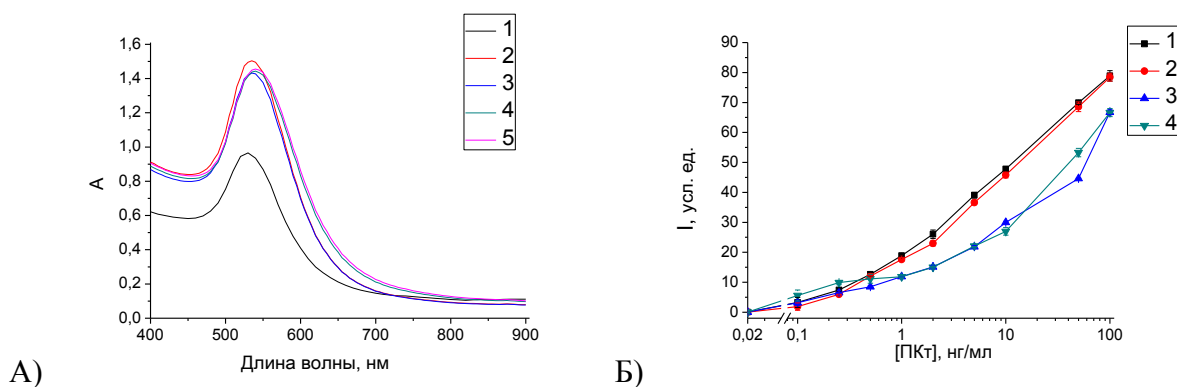


Рис. 6. Спектры поглощения, полученные для конъюгата без использования системы биотин-стрептавидин (1); для комплексных конъюгатов с разным соотношением биотинилированных Ат к стрептавидину: 15:1 (2), 15:3 (3), 15:5 (4) и 15:10 (5) (А). Градуировочные графики ЛПИА на основе комплексного конъюгата для определения ПКт (15:1 (1); 15:3 (2); 15:5 (3) и 15:10 (4)) (Б).

Таким образом, оптимальным для формирования агломератов, используемых в целях снижения предела обнаружения ПКт методом ЛПИИ, было выбрано соотношение концентраций биотинилированных пАт в конъюгате к стрептавидину - 15:1 (рис. 7). Сравнение предложенного ЛПИИ с использованием укрупненных агломератов в качестве метки с описанным ранее ЛПИИ на основе сферических НЧЗ (35 нм) показало снижение предела обнаружения ПКт в 5 раз до диапазона низких концентраций биомаркера, соответствующих наличию бактериальной инфекции в биологических образцах. Таким образом, основным преимуществом данного способа является возможность повышения чувствительности количественного визуального анализа биологически активных соединений без изменения самой схемы проведения анализа и усложнения строения используемой тест-системы.

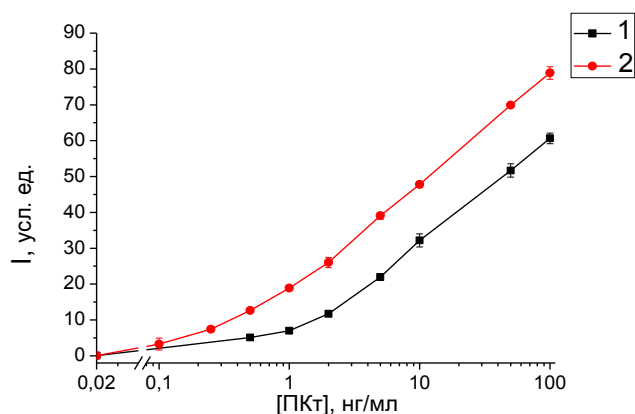


Рис. 7. Сравнение градуировочных графиков ЛПИИ на основе НЧЗ размером 35 нм (1), и ЛПИИ на основе комплексного конъюгата с соотношением компонентов 15:1 (2)

2.3. ЛПИИ с использованием несферических НЧЗ большого размера в качестве метки

На сегодняшний день НЧЗ несферической формы являются объектом интенсивного изучения и применения в биомедицинских целях, включая клиническую химию, лазерную фототерапию раковых клеток и опухолей, адресную доставку лекарственных средств и т.д. НЧЗ несферической формы обладают большей общей площадью поверхности по сравнению со сферическими наночастицами того же эффективного размера из-за сложной трехмерной структуры. Кроме того, несферические НЧЗ обладают более контрастной визуально детектируемой окраской. В работе было предложено использовать несферические НЧЗ в качестве меток в ЛПИИ, а также изучить влияние формы метки на примере НЧЗ в виде попкорна (цветов) и звезд на характеристики ЛПИИ ПКт.

НЧЗ в форме попкорна или звезд получали в ходе двухступенчатого синтеза с промежуточной стадией образования зародышей и дальнейшим объединением ростового раствора с суспензией зародышей. По данным, полученным из спектров поглощения и ПЭМ, эффективный размер НЧЗ в форме попкорна и звезд составил $100,1 \pm 5,7$ нм и $64,3 \pm 3,0$ нм, соответственно (рис. 8).

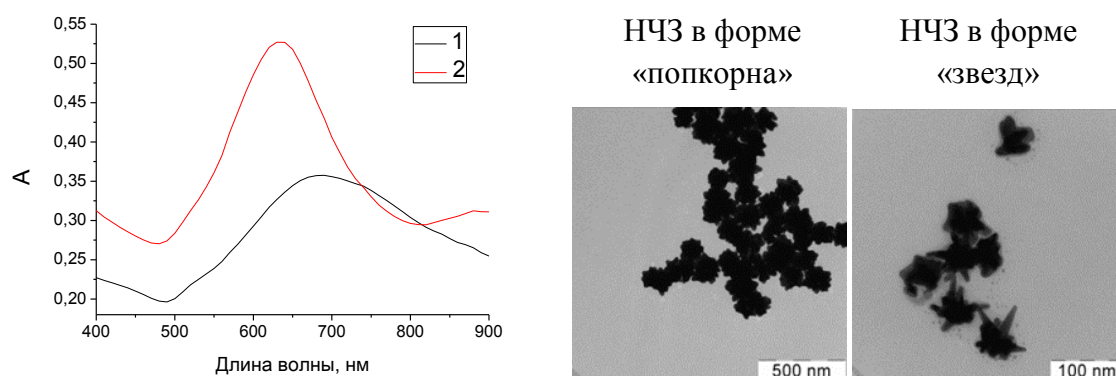


Рис. 8. Спектры поглощения и ПЭМ изображения для образцов НЧЗ в форме попкорна (1) и звезд (2).

В соответствии с экспериментально установленными оптимальными условиями получения реагентов были разработаны тест-системы ЛПИИ с использованием несферических НЧЗ в качестве метки для определения ПКт. По сравнению со сферическими НЧЗ большого размера, описанными выше, структурированные наночастицы формировали на полосках контрастное и визуально хорошо детектируемое серо-синее окрашивание тестовой линии после пропускания стандартных растворов ПКт. Это объясняется сдвигом пика плазмонного резонанса несферических частиц в длинноволновую область, к примеру, пик плазмонного резонанса для сфер размером 100 нм находится при 582 нм, а для нанопопкорна – 683 нм.

Применение НЧЗ в форме звезд как метки в ЛПИИ не привело к улучшению характеристик анализа (рис. 9). Вероятно, игольчатая структура частиц способствует неравномерному распределению Ат на поверхности нанозвезд или создает стерические затруднения для связывания комплекса антиген-меченые Ат со вторыми Ат, иммобилизованными на аналитической мембране. Однако, использование НЧЗ в форме попкорна в качестве метки позволило значительно сместить область определяемых концентраций в сторону низких концентраций с пределом визуального обнаружения, равным 0,1 нг/мл.

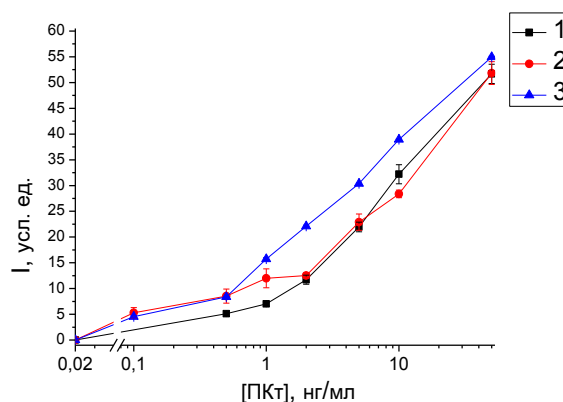


Рис. 9. Градуировочные графики ЛПИИ с использованием НЧЗ сферической формы (1), в форме звезд (2) и НЧЗ в форме попкорна (3) для определения ПКт в стандартных растворах.

2.4. ЛПИИ с использованием метода усиления серебром

Одним из известных способов усиления аналитического сигнала, формируемого НЧЗ, является метод усиления серебром. Согласно литературным данным, размер сферических НЧЗ, используемых в ЛПИИ с дополнительной стадией усиления серебром, обычно не превышает 30 нм. Усиление сигнала с помощью метода усиления серебром объясняется увеличением размера наночастиц и контрастным черным окрашиванием на белом фоне аналитической мембраны, формируемым наночастицами серебра, по сравнению с красным цветом, обеспечиваемым НЧЗ.

С целью снижения предела обнаружения ПКт методом ЛПИИ была реализован метод усиления серебром. Для формирования окрашенной тестовой линии на мембрану для конъюгата наносили раствор конъюгата пАт с НЧЗ размером 20 нм; на аналитическую мембрану наносили специфические мАт. После пропускания стандартных растворов ПКт, на аналитической мембране появлялось красное окрашивание тестовых линий, связанное с формированием иммунного комплекса, меченного сферическими НЧЗ. Затем тест-полоски погружали в усиливающий раствор из коммерческого набора для усиления серебром на 10 минут. Окрашенные линии в аналитической зоне тест-полоски меняли свой цвет с красного на контрастный, черный. Из анализа градуировочных графиков (рис. 10), полученных для ЛПИИ с использованием в качестве метки сферических НЧЗ размером 20 нм и после процедуры усиления серебром, следует, что данный подход позволяет на порядок снизить предел обнаружения ПКт в стандартных растворах.

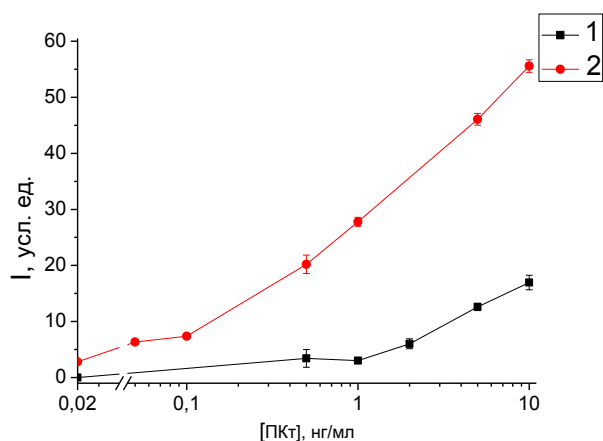


Рис. 10. Градуировочные графики, полученные для ЛПИИ на основе сферических НЧЗ (20 нм) до (1) и после проведения стадии усиления серебром (2).

Однако, апробация ЛПИИ на основе метода усиления серебром в условиях реальных образцов сыворотки крови показала недостаточную воспроизводимость результатов. Вероятно, это связано с невымытыми остатками хлорид-ионов и других анионов на тест-полосках, которые образуют нерастворимые осадки с серебром, что приводит к появлению неспецифического сигнала. Интенсивное промывание тест-полосок, рекомендованное для снижения неспецифического связывания, занимает много времени и не всегда,

как видно на примере данной системы, эффективно. Поэтому можно сделать вывод о нецелесообразности применения подхода, основанного на методе усиления серебром, для проведения ЛПИИ в образцах, содержащих хлорид-ионы. Кроме того, к недостаткам данного метода следует также отнести необходимость в дополнительных реагентах и увеличение продолжительности тестирования за счет дополнительной стадии усиления.

2.5. ЛПИИ с использованием КТ в качестве метки

В последние годы все большее распространение в биомедицинских исследованиях получают полупроводниковые флуоресцентные нанокристаллы – КТ, которые являются перспективной меткой в ЛПИИ благодаря своим уникальным свойствам (возбуждение в широком диапазоне длин волн и узкий симметричный пик эмиссии, повышенная фотостабильность). В работе использовали коммерческий препарат КТ состава CdSe/ZnS с пиком эмиссии 655 нм (красный цвет), покрытых полимерной оболочкой с карбоксильными группами. По данным производителя, на поверхности одной КТ располагается около 100 карбоксильных групп. Поэтому для получения конъюгата КТ с пАт к ПКт использовали карбодиимидный ковалентный метод сшивания между аминок группами белка и карбоксильными группами на поверхности КТ. Для разработки ЛПИИ с использованием КТ для определения ПКт в стандартных растворах, раствор конъюгата пАт с КТ наносили на мембрану для конъюгата, на аналитической мембране иммобилизовали мАт. После пропускания образца, содержащего ПКт, конъюгат пАт с КТ практически не вымывался из мембраны. В связи с этим было предложено проводить анализ путем внесения аналитической части тест-полоски в смесь исследуемого раствора с конъюгатом Ат, меченных КТ. Результаты ЛПИИ оценивали количественно путем облучения аналитической зоны тест-полоски ультрафиолетовым светом с длиной волны 340 нм и последующей программной обработкой полученных результатов.

Применение КТ в качестве метки для ЛПИИ позволило снизить предел обнаружения ПКт до 0,25 нг/мл (рис. 11). Несмотря на незначительное улучшение характеристик метода, КТ обладают рядом недостатков, связанных с высокой стоимостью метки, трудоемкой процедурой приготовления конъюгатов с биомолекулами, а также необходимостью использования портативных флуориметров для оценки результатов анализа, что ограничивает применимость тест-систем с флуоресцентным методом регистрации результатов.

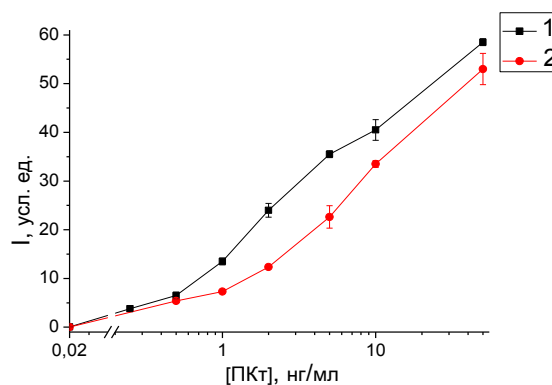


Рис. 11. Градуировочные графики ЛПИИ ПКТ на основе КТ (1) и сферических НЧЗ размером 35 нм (2).

2.6. ЛПИИ на основе ГКР

Одним из перспективных подходов для повышения чувствительности ЛПИИ и перевода качественной оценки результатов по принципу "да-нет" в количественную может быть использование ГКР в качестве метода детекции сигнала. Золотые наночастицы, используемые и в методе ГКР и в ЛПИИ, служат мостом для объединения этих двух аналитических методов. Принцип ЛПИИ на основе ГКР аналогичен традиционной схеме ЛПИИ. В качестве молекулы-репортера использовали МБК, обладающую характерными пиками в области 1074 см^{-1} и 1583 см^{-1} . Из литературных данных известно, что наибольшая интенсивность ГКР наблюдается при использовании НЧЗ размером 50 нм с одинаковой общей площадью поверхности или концентрацией наночастиц, что объясняется зависимостью между усилением и размером или площадью поверхности НЧЗ. В этой связи для разработки ЛПИИ получали сферические НЧЗ размером 50 нм, которые обеспечивают формирование визуально детектируемого сигнала при проведении стандартной процедуры ЛПИИ и достаточную интенсивность при регистрации сигнала ГКР. Иммунопробу состава Ат-НЧЗ-МБК получали путем смешения раствора НЧЗ с раствором МБК, которая связывалась с наночастицами посредством тиольных групп кислоты (рис. 12А). Полученную иммунопробу наносили на мембрану для конъюгата. После пропускания стандартных растворов ПКТ, в области тестовой и контрольной линий формировались окрашенные полосы фиолетового цвета. После высыхания тест-полосок, результаты анализа сначала измеряли фотометрически. Также для количественного определения содержания ПКТ в образце измеряли интенсивность сигнала ГКР МБК при 1074 см^{-1} в тестовой зоне полоски с помощью спектрометра DXR Raman Microscope (Thermo Fisher Scientific, Madison, WI, США). Интенсивность сигнала МБК определяли, как среднее арифметическое 10 величин сигналов в точках вдоль средней части тестовой полосы.

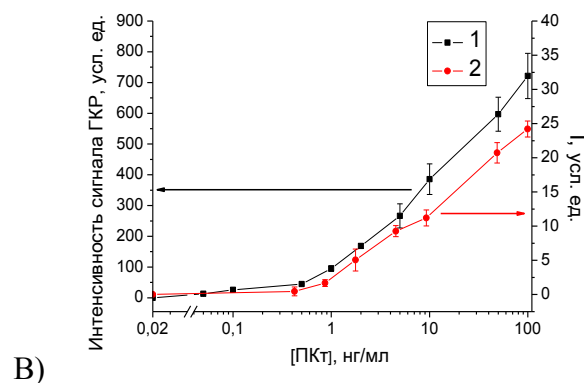
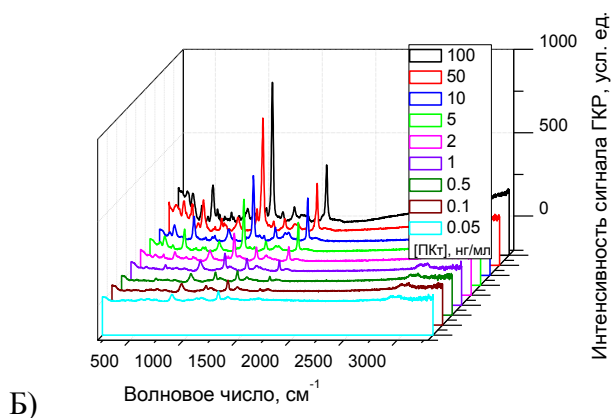
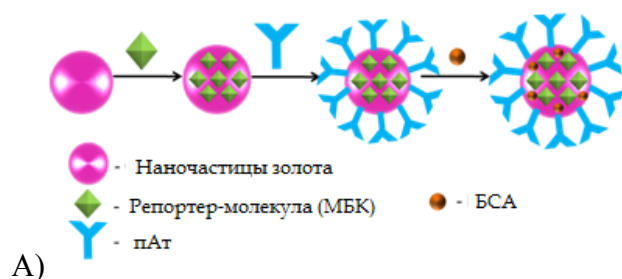


Рис. 12. Подготовка иммунопробы состава Ат-НЧЗ-МБК (А); спектры ГКР МБК, полученные для разных концентраций ПКт (Б); градуировочные графики ЛПИИ ПКт на основе ГКР (1) и фотометрического метода детекции сигнала (2) (В).

На рис. 12Б представлены полученные спектры ГКР с характерными пиками МБК при 1074 см^{-1} и 1583 см^{-1} , полученные для разных концентраций ПКт в образце. С увеличением концентрации ПКт величина ГКР сигнала МБК при 1074 см^{-1} пропорционально возрастает. По полученным результатам строили градуировочный график зависимости интенсивности сигнала рассеяния МБК при 1074 см^{-1} от концентрации ПКт в образце (рис. 12В). Предел обнаружения ПКт методом ЛПИИ на основе ГКР составил $0,5\text{ нг/мл}$. Были проанализированы и сопоставлены два метода детекции (фотометрический и ГКР) результатов ЛПИИ для определения ПКт с одинаковым размером и типом используемой метки. Показано, что результаты ЛПИИ на основе ГКР сравнимы с результатами, полученными методом ЛПИИ на основе сферических НЧЗ размером 50 нм . Кроме того, для реализации ЛПИИ в комбинации с ГКР вне лабораторных условий необходимо иметь портативные анализаторы, что в свою очередь, увеличивает конечную стоимость тест-системы.

Обобщенные результаты по использованию различных подходов для возможного снижения предела обнаружения на примере тест-системы для определения ПКт приведены в таблице 2. Предложенные методы позволяют снизить предел обнаружения ПКт в 2-10 раз.

Таблица 2. ЛПИИ с использованием подходов, направленных на снижение предела обнаружения ПКт

Подход	Метка	Метод регистрации	Предел обнаружения ПКт, нг/мл	Недостатки
Стандартный ЛПИИ	НЧЗ сферической формы	фотометрический	0,5	-
Модификация метки	НЧЗ-ПХ	фотометрический	0,1	Нестабильность реагентов, дополнительная стадия анализа
Модификация метки	Агломерат НЧЗ (35 нм)	фотометрический	0,1	-
Модификация метки	НЧЗ в форме попкорна или цветов	фотометрический	0,1	-
Модификация метки	НЧЗ, покрытые серебром	фотометрический	0,05	Нестабильность реагентов, дополнительная стадия анализа, мешающее влияние компонентов образца
Другой тип метки	КТ	флуориметрический	0,25	Дорогостоящая метка, необходимость приборной регистрации результатов
Система регистрации сигнала	НЧЗ сферической формы (50 нм)	ГКР	0,5	Необходимость приборной регистрации результатов, время анализа

Подходы, направленные на модификацию традиционно используемых НЧЗ путем введения дополнительной ферментной метки или усиления серебром, имеют ряд недостатков, которые приводят к сложности проведения анализа вне лабораторных условий. Апробация ЛПИИ на основе НЧЗ с дополнительной стадией усиления серебром на реальных образцах сыворотки показала высокую вероятность появления ложноположительных результатов, что свидетельствует о неэффективности данного подхода для разработки высокочувствительного и быстрого теста для определения ПКт. Напротив, ЛПИИ тест-система с использованием агломерата НЧЗ в качестве метки, формируемого за счет связывания биотина со стрептавидином, а также ЛПИИ тест-система с использованием в качестве метки НЧЗ в форме попкорна содержат все компоненты в высушенном виде и не требуют дополнительных реагентов и изменения технологии получения тест-систем и процедур анализа.

Таким образом, в случае, когда чувствительность стандартной схемы ЛПИИ не позволяет определять концентрации исследуемого соединения в необходимом диапазоне, может быть выбран один из описанных выше подходов в соответствии с требованиями и задачами, предъявляемыми к разрабатываемому анализу. Однако, в данной работе в целях разработки визуального, быстрого и бесприборного ЛПИИ, позволяющего определять диапазоны клинически значимых концентраций Пкт в сыворотке крови, был выбран наиболее удобный подход, основанный на применении метки - НЧЗ в форме попкорна.

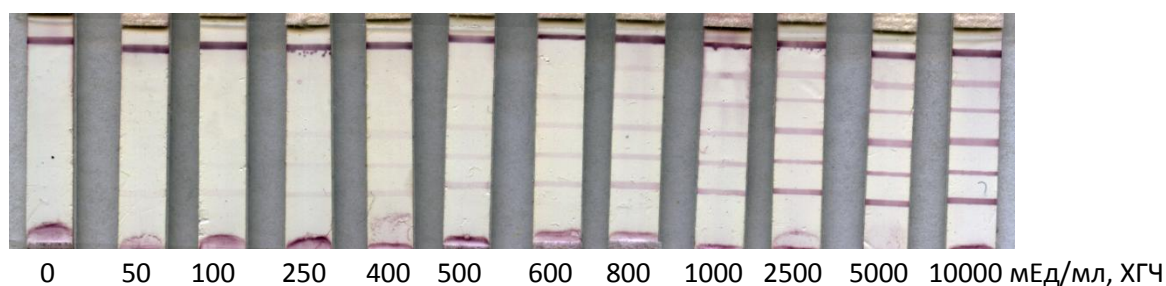
3. Градиентный ЛПИИ для полуколичественного определения диагностически важных соединений

Принципиальное отличие разработанного нами полуколичественного метода визуального анализа, которому предложено название "Градиентный ЛПИИ" от стандартного ЛПИИ состоит в способе оценки результатов: полуколичественное безинструментальное определение исследуемого аналита методом стандартного ЛПИИ обычно проводится путем сравнения интенсивности окрашивания тестовой линии с контрольной карточкой сравнения; полуколичественный анализ методом градиентного ЛПИИ проводится путем соотнесения количества проявившихся тестовых линий на полоске с диапазонами концентраций исследуемого аналита. Для формирования градиентного ЛПИИ на аналитическую зону устройства наносят растворы специфических Ат против определяемого соединения с последовательно возрастающей концентрацией в виде нескольких тестовых линий. Число таких линий (N) определяется количеством необходимых диапазонов анализируемых концентраций (N+1).

3.1. Разработка градиентного ЛПИИ на примере модельной тест-системы для определения хорионического гонадотропина человека

Для отработки принципов градиентного ЛПИИ использовали тест-систему для определения маркера беременности, ХГЧ. Выбор модельной системы обусловлен широким диапазоном возможных концентраций ХГЧ в моче, а также практическим значением маркера, так как содержание ХГЧ в моче коррелирует со сроком беременности. Для разработки градиентного ЛПИИ ХГЧ использовали сэндвич-схему анализа, описанную выше на примере маркера ПКТ. Сферические НЧЗ размером 35 нм и конъюгат специфических Ат к β -субъединице ХГЧ с наночастицами получали аналогичными методами, используемыми для разработки ЛПИИ. С целью подбора оптимальных концентраций Ат, иммобилизуемых на аналитической мембране, и количества формируемых тестовых линий, позволяющих оценить диапазон ХГЧ путем подсчета числа проявившихся линий, на аналитическую мембрану наносили растворы Ат в диапазоне 0,1-1 мг/мл и проводили ЛПИИ в стандартных растворах.

В результате проведенной оптимизации был разработан градиентный ЛПИИ в стандартных растворах ХГЧ, приготовленных в моче. На рис. 13 представлен внешний вид тест-полосок после пропускания стандартных растворов ХГЧ. При нанесении образца, содержащего ХГЧ, антиген связывался с Ат, меченными НЧЗ. Ввиду избытка Ат на поверхности НЧЗ, антиген должен находиться преимущественно в форме иммунокомплекса. Дальнейшее формирование иммунокомплексов на полоске характеризуется константой равновесия между свободными Ат и антигеном, поэтому при достижении участков с иммобилизованными Ат с образованием тройного окрашенного сэндвич-комплекса формирование окрашенной линии происходит только при достижении и превышении определенной концентрации Ат на мембране. Полуколичественную оценку проводили визуально путем подсчета количества проявившихся окрашенных линий на тест-полоске, соответствующего определенным диапазонам концентраций ХГЧ и сроку беременности.



Диапазон концентраций ХГЧ, мЕд/мл	Количество окрашенных линий на тест-полоске	Срок беременности, недели
от 50 до 100	1-2	1-2
от 100 до 400	3	3-4
от 400 до 600	4	
выше 600	5	

Рис. 13. Визуальные результаты градиентного ЛПИИ ХГЧ в моче и интерпретация полученных результатов.

Основные принципы градиентного ЛПИИ, реализованные на примере модельной системы определения ХГЧ, явились основой для разработки полуколичественной, визуальной и быстрой тест-системы, позволяющей путем подсчета числа окрашенных линий определять диапазон концентраций маркера бактериальных инфекций и сепсиса ПКт.

3.2. Разработка градиентного ЛПИИ для определения ПКт

За основу разработки градиентного ЛПИИ ПКт взяли ЛПИИ тест-систему с использованием сферических НЧЗ размером 35 нм в качестве метки. На основании рассмотренных выше подходов, направленных на снижение предела обнаружения ПКт, наряду с градиентным ЛПИИ с использованием сферических наночастиц был разработан градиентный ЛПИИ с использованием НЧЗ в форме попкорна. В тестовой зоне устройства им-

мобилизовали Ат в виде четырех линий в подобранных оптимальных концентрациях, позволяющих дифференцировать весь диапазон определяемых значений ПКт на пять клинически значимых диапазонов: менее 0,25 нг/мл; от 0,25 до 0,5 нг/мл; от 0,5 до 2 нг/мл; от 2 до 10 нг/мл и выше 10 нг/мл. В результате проведенной оптимизации условий, были разработаны градиентные ЛПИИ тест-системы с использованием в качестве метки НЧЗ сферической формы (35 нм) или в форме попкорна (100 нм) (рис. 14).

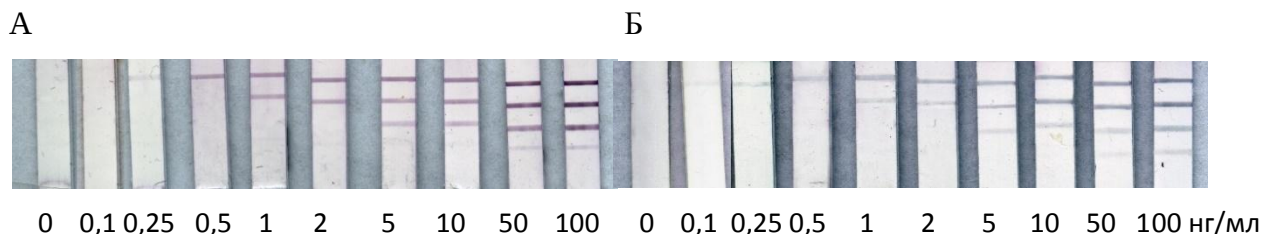


Рис. 14. Визуальные результаты градиентного ЛПИИ с использованием сферических НЧЗ (А) и градиентного ЛПИИ с использованием НЧЗ в форме попкорна (Б).

Предел визуального обнаружения ПКт методом градиентного ЛПИИ на основе сферических НЧЗ составил 0,25 нг/мл, а для градиентного ЛПИИ на основе НЧЗ в форме попкорна – 0,1 нг/мл. Основным преимуществом предложенного принципа градиентного ЛПИИ является возможность сдвига диапазона определяемых концентраций исследуемого соединения в тест-системе путем варьирования концентрации иммобилизованных на мембране специфических Ат.

3.3. Апробация градиентного ЛПИИ для определения ПКт в сыворотке крови

Для апробации градиентного ЛПИИ были проанализированы 82 образца сыворотки крови. С целью подтверждения эффективности разработанного градиентного ЛПИИ для определения ПКт параллельно проводили ИФА с помощью коммерческого набора. Полуколичественную оценку результатов градиентного ЛПИИ проводили путем соотнесения количества проявившихся линий на мембране с диапазоном концентраций определяемого аналита: отсутствие линий – менее 0,25 нг/мл, 1 линия - область от 0,25 до 0,5 нг/мл; 2 линии - от 0,5 до 2 нг/мл; 3 линии – от 2 до 10 нг/мл и 4 линии – выше 10 нг/мл.

Сравнение данных, полученных градиентным ЛПИИ, с методом ИФА показало хорошую сходимость для концентрации ПКт выше 2 нг/мл, однако в диапазоне концентраций от 0,25 до 2 нг/мл наблюдалось появление ложноотрицательных результатов (таблица 3). Следует отметить, что в диапазоне ПКт от 0,5 до 2 нг/мл к ложноотрицательным относили образцы, у которых результат соответствовал сдвигу диапазона концентраций в сторону ПКт от 0,25 до 0,5 нг/мл, то есть, на полоске проявлялась только одна окрашенная линия. В этой связи, полученные данные можно считать приемлемыми, поскольку основной задачей быстрой тест-системы является мониторинг динамики уровня ПКт в сыворотке

Таблица 3. Сравнение результатов, полученных ИФА и градиентными ЛПИИ тест-системами для определения ПКт в сыворотке крови.

Метод	менее 0,25 нг/мл (0 линий)	от 0,25 до 0,5 нг/мл (1 линия)	от 0,5 до 2 нг/мл (2 линии)	от 2 до 10 нг/мл (3-4 линии)	более 10 нг/мл (4 линии)
ИФА	25	16	14	14	13
Градиентный ЛПИИ с использованием сферических НЧЗ (35 нм)	24 1 – Л(+)	13 3 – Л(-)	11 3 – Л(-)	13 1 – Л(-)	12 1 – Л(-)
Градиентный ЛПИИ с использованием НЧЗ в форме попкорна	24 1 – Л(+)	11 5 – Л(-)	8 6 – Л(-)	11 3 – Л(-)	13

крови. Замена метки в виде сферических НЧЗ на частицы в форме попкорна не привела к улучшению характеристик градиентного ЛПИИ ПКт. Полученный результат можно объяснить сложной формой метки, которая в условиях образцов реальной сыворотки создает стерические затруднения для связывания меченных Ат с поверхностью анализируемого антигена. Чувствительности разработанных градиентного ЛПИИ с использованием сферических НЧЗ и градиентного ЛПИИ с использованием НЧЗ в форме попкорна составили 87,5% и 76,6%, соответственно. Таким образом, разработанные тест-системы на основе градиентного ЛПИИ, реализованные для двух типов метки, позволяют быстро (в течение 10-15 минут), визуально и с высокой чувствительностью определять 5 клинически значимых диапазонов концентраций ПКт и могут быть в дальнейшем адаптированы для использования в клинической практике с целью подтверждения или опровержения диагноза "сепсис", а также для мониторинга за ходом проводимого лечения.

4. Выводы

1. Для разработки экспресс-метода определения ПКт в буферных растворах и сыворотке крови проведена оптимизация состава компонентов тест-систем, в том числе золотых наночастиц сферической и несферической формы различного диаметра в качестве регистрируемых меток, определены оптимальные значения pH и концентрационные условия для получения конъюгатов антител с наночастицами золота, а также осуществлен выбор возможных комбинаций антител и свойств мембранных носителей.
2. Разработан количественный экспресс-метод ЛПИА ПКт на основе фотометрической детекции с использованием в качестве метки антител сферических наночастиц золота с диаметром 35 нм. Предел обнаружения ПКт составил 0,5 нг/мл, время определения - 10 минут, объем образца – 100 мкл. Разработанный метод позволяет визуально без использования специальных приборов определять концентрации ПКт выше 2 нг/мл, что свидетельствует о системном воспалении и возможном развитии сепсиса в организме.
3. Для более точного количественного определения концентраций ПКт в "серой" зоне (от 0,25 до 2 нг/мл) и верификации сепсиса рассмотрены возможные способы понижения предела обнаружения ПКт, включающие несколько основных подходов: снижение предела регистрации метки путем введения фермента ПХ в состав конъюгата золотых наночастиц с антителами; использование в качестве нового вида меток в иммуноанализе укрупненного агломерата конъюгата обычных сферических наночастиц золота с биотинилированными антителами в присутствии стрептавидина; использование в качестве метки наночастиц золота несферической формы ("нанозвезды" и "напопкорн"); введение дополнительной стадии "усиления" серебром; использование квантовых точек в качестве метки антител; и использование для регистрации конечного сигнала метода гигантского комбинационного рассеяния. Все предложенные подходы позволяют в 2-10 раз снизить определяемый предел обнаружения ПКт, однако для практического использования и визуальной детекции наиболее перспективными являются системы, в которых в качестве метки используются наночастицы золота в форме "попкорна" или укрупненного агломерата на основе системы стрептавидин-биотин.
4. На примере определения ХГЧ в диапазоне 50 – 10000 мЕд/мл разработан принцип полуколичественного визуального ЛПИА (градиентный иммуноанализ), позволяющий проводить оценку концентраций анализируемых веществ в заранее заданном числе определенных диапазонов концентраций путем подсчета числа видимых тестовых линий. Данный принцип проведения анализа был реализован для полуколичественного определения ПКт в пяти клинически значимых диапазонах концентраций в сыворотке, что дает возможность проведения дифференциальной диагностики между различными клиническими

состояниями и тяжелой бактериальной инфекцией (сепсисом). Предел обнаружения градиентного ЛПИИ для определения ПКТ в сыворотке крови составил 0,25 нг/мл, время проведения анализа – 10-15 минут, объем образца – 100 мкл. Показано соответствие результатов градиентного ЛПИИ ПКТ с результатами, полученными методом ИФА, в пяти диапазонах концентраций маркера.

СПИСОК ПУБЛИКАЦИЙ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

Статьи, опубликованные в рецензируемых научных изданиях, индексируемых в

базах данных Web of Science, Scopus, RSCI:

1. **Serebrennikova K.**, Samsonova J., Osipov A. Hierarchical Nanogold Labels to Improve the Sensitivity of Lateral Flow Immunoassay // Nano-Micro Letters. - 2018. – V. 10 (24). – P. 1-8.
2. **Серебренникова К.В.**, Самсонова Ж.В., Осипов А.П. Градиентный латеральный проточный иммуноанализ хорионического гонадотропина человека // Вестник Московского Университета. – 2018. – Серия 2. – Т. 59. - № 1. – С. 46-49. (**Serebrennikova K.V.**, Samsonova J.V., Osipov A.P. Gradient Lateral Flow Immunoassay of Human Chorionic Gonadotropin // Moscow University Chemistry Bulletin (Allerton Press, Inc.). – 2017. – V. 72 (6). – P. 325-327).
3. **Serebrennikova K.V.**, Samsonova J.V., Osipov A.P. Gold Nanoflowers and Gold Nanospheres as Labels in Lateral Flow Immunoassay of Procalcitonin // Nano Hybrids and Composites. – 2017. – V. 13. – P. 47-53.
4. **Серебренникова К.В.**, Самсонова Ж.В., Осипов А.П. Повышение чувствительности латерального проточного иммуноанализа с помощью системы биотин-стрептавидин // Вестник Московского Университета. – 2018. – Серия 2. – Т. 59. - № 3. – С. 230-235.

Тезисы докладов конференций:

1. **Серебренникова К.В.** Применение квантовых точек для разработки высокочувствительного иммунохроматографического анализа прокальцитонина // Наноматериалы и живые системы // Nanomaterials and living systems. NLS-2018: Материалы 5-ой Международной научно-практической конференции (21-23 марта 2018, г.Казань), Казань, КГМУ. -2018.-С.33-34.
2. **Серебренникова К.В.**, Самсонова Ж.В., Осипов А.П. Функционализированные наночастицы золота для медицинской диагностики // Сборник материалов Международной конференции со школой и мастер-классами для молодых ученых «Химическая технология функциональных наноматериалов», РХТУ им. Д.И. Менделеева, Москва. – 2017. – С. 238-239.
3. **Серебренникова К.В.**, Самсонова Ж.В., Осипов А.П. Использование различных типов меток для увеличения чувствительности латерального проточного иммуноанализа прокальцитонина // Сборник тезисов международного научного форума "Open Science", 16-18 ноября 2016, Гатчина, ФГБУ "ПИАФ" НИЦ "Курчатовский институт". – 2016. – С. 36.

4. **Серебренникова К.В.** Новые метки в латеральном проточном иммуноанализе // Сборник научных трудов молодых ученых по материалам IV Международной научно-практической конференции «Наноматериалы и живые системы», Москва, 2-3 июня 2016 г., – 2016. – С. 28-29.
5. **Серебренникова К.В.** Новые подходы к увеличению чувствительности латерального проточного иммуноанализа // Материалы Международного молодежного научного форума "ЛОМОНОСОВ-2016" [Электронный ресурс]. – Москва. – МАКС Пресс. – 2016.
6. **Серебренникова К.В.** Экспресс-метод определения прокальцитонина в сыворотке крови человека на основе латерального проточного иммуноанализа // Тезисы VI Международного молодежного медицинского конгресса «Санкт-Петербургские научные чтения 2015» 2-4 декабря 2015 г. – 2015. – С. 171.
7. **Serebrennikova K.V.**, Samsonova J.V., Osipov A.P. Detection of procalcitonin in human serum based on gradient lateral flow immunoassay // Book of Abstracts of 18th Edition of Euroanalysis The European Conference of Analytical Chemistry, 6-10 September 2015, Bordeaux, France. – 2015.- P. 512.
8. **Serebrennikova K.V.**, Samsonova J.V., Osipov A.P. Early diagnosis of sepsis based on lateral flow immunoassay using different types of labels // Book of Abstracts of International Conference BIOCATALYSIS-2015: Fundamentals and Applications, 21-26 June 2015, Moscow region, Russia. – 2015. – P. 133-134.
9. **Serebrennikova K.V.**, Samsonova J.V., Osipov A.P. Lateral flow immunoassay as express-method of procalcitonin detection // Book of Abstracts of IX International Conference of Young Scientists on Chemistry "Mendeleev 2015", 7-10 April 2015, Saint Petersburg. – 2015. – P. 420.
10. **Serebrennikova K.V.**, Samsonova J.V., Osipov A.P. New approaches to an express analysis of the markers of bacterial inflammation // Book of Abstracts of VIII Moscow International Congress "Biotechnology: State of the Art and Prospects of Development", JSC "Expo-biochem-technologies", D.I. Mendeleev University of Chemistry and Technology of Russia. – 2015. –V. 1. – P. 174-175. (**Серебренникова К.В.**, Самсонова Ж.В., Осипов А.П. Новые подходы к экспресс-анализу маркеров бактериального воспаления // Сборник тезисов VIII Московского международного конгресса "Биотехнология: состояние и перспективы развития", 17-20 марта 2015, ЗАО «Экспо-биохим-технологии», РХТУ им. Д.И. Менделеева, Москва. –2015. – Т. 1. – С. 174-175).
11. **Серебренникова К.В.**, Самсонова Ж.В., Осипов А.П. Экспресс-метод определения прокальцитонина на основе латерального проточного иммуноанализа // Сборник тезисов I Всероссийской конференции с международным участием "Химический анализ и медицина", 9-12 ноября 2015, Москва, печатный дом "КАСКОН" Москва. – 2015. – С. 141-142.
12. **Серебренникова К.В.**, Муратов Д.С., Мардан А.Р., Самсонова Ж.В., Осипов А.П., Кондаков С.Э. Возможности использования квантовых точек в качестве меток антител для создания быстрых систем иммуноанализа // Программа и тезисы докладов IX Всероссийской конференции "Высокореакционные интермедиаты химических и биохимических реакций" ChemInt 2014, 20-23 октября 2014 г., Московская область. – 2014. – С. 54.