

УДК 539.2; 620.3; 612.017.1

Юрій ДУДЗІНСЬКИЙ, д.ф.-м.н., професор,

Наталія МАНІЧЕВА, к.т.н., доцент

Національний університет «Одеська політехніка», Одеса, Україна, e-mail: dudzinyurij@gmail.com,
vmanichev@ukr.net

АНАЛІЗ ШВИДКОСТІ МОЛЕКУЛЯРНИХ МІКРОМОТОРІВ ДЛЯ ДІАГНОСТИКИ ВІЛ

Анотація. Розглянуто успіхи, проблеми й напрямки наступних досліджень по розробці мобільного аналізатора для молекулярного визначення ВІЛ-1. Детально розглянуто мікроскопічні молекулярні пристрої, які здатні перетворювати енергію в рух – наномотори. Швидкість руху цих мікро структур суттєво залежить від концентрації в розчині ампліконів РНК для ВІЛ-1, гепатиту С і В, герпесу, папіломавірусу 16 (HPV-16). Показано високу чутливість даних приладів в діагностиці.

Ключові слова: наномотори, мікромотори, діагностика ВІЛ, ДНК-амплікон, агарозовий гель.

Дисфункції імунної системи – клінічно маніфестне імунне порушення, верифіковане за результатами імунологічних лабораторних досліджень в динаміці, а також за анамнестичними критеріями, яке не притаманне віку, особливостям чи стадії розвитку патологічного процесу або лікуванню.

Виділяють тимчасові дисфункції імунної системи та постійні дисфункції імунної системи.

Імунодефіцит (ІД) – стан, при якому порушені один або декілька компонентів адаптивного або вродженого імунітету, в результаті чого організм не може ефективно боротися з інфекціями або захворюваннями [1].

Даний пристрій можна описати таким чином: мобільний аналізатор для молекулярного визначення ВІЛ-1 на базі петлевої ізотермічної ампліфікації (LAMP) і наномоторів (CALM). Розглянемо докладніше.

Наномоторами (ще їх називають мікромотори) називаються мікроскопічні молекулярні пристрої, які здатні перетворювати енергію в рух. Якщо їх помістити в певний хімічний розчин, вони починають самостійно пересуватися по певному маршруту, що можна використовувати й у діагностиці, і навіть в енергозабезпеченні нано-технологічних пристроїв [2].

Мікромотори являють собою сфери з полістиролу, що покриті наночастинками Pt (платини) із щільністю 1.04 г/см³. Далі були використані ще й наночастинки Au (золота) для модифікації мікромоторів ДНК-зондами (на схемі вище вони представлені у вигляді червоних «щупалець») [1, 2].

ПЕМ (просвітчастий електронний мікроскоп) показав, що наночастинки платини й золота, що використані в покритті мікромоторів, були сферичної форми, а їхній діаметр становив 57,721±5,181 нм для Pt і 3,43±1,336 нм для Au [2].

Необхідно оцінювати, наскільки ефективно ДНК-зонд повністю сформованого мікромотора може захоплювати молекули ДНК. Для цього була застосована техніка електрофореза в агарозовому (C12H18O9) гелі. Дана методика дозволила підтвердити, що мікромотори мають ДНК-зонди на своїй поверхні, оскільки ті змогли приєднати штучну молекулу ДНК приблизно на 180 bp (спарені підстави), що для подібного (штучного) зразка є відмінним результатом. Ступінь ефективності захоплення складала під час перших тестів приблизно 30%, що підтверджується флуориметрією [2, 3].

Також необхідно було перевірити найважливішу особливість мікромоторів – рух. Для цього використовувався розчин з і без H₂O₂. Коли пероксид водню був відсутній, мікромотори вібрували, що пов'язано із броуновським рухом. Коли ж у розчин почали вводити H₂O₂,

швидкість руху мікромоторів збільшилася приблизно на 0,7 мкм/с на кожний 1% пероксиду водню в розчині.

Наскільки ефективно система мікромоторів здатна пізнавати ВІЛ-1? Відповідь на це питання криється в LAMP реакціях. Для тестування було підготовлено кілька зразків з різною концентрацією РНК (рибонуклеїнової кислоти) ВІЛ. Результат ампліфікації оцінювався електрофорезом в агарозовому гелі. Результати електрофореза показали східчасте формування великих ДНК-амплікон (послідовність ДНК, результат ампліфікації). Число ампліконів виявилось пропорційним концентрації РНК ВІЛ-1. Мікромотори були змішані з ампліконами РНК ВІЛ-1, що дало можливість пройти процес гібридизації (при температурі 80°C). Далі отриману «суміш» тестували в 5% розчині H₂O₂. Коли в системі були присутні амплікони РНК ВІЛ-1, швидкість руху мікромоторів дуже сильно знижувалася, приблизно на 95,26%. Зниження швидкості спостерігається навіть при незначній концентрації ампліконів (біля 3,394±0,245 нг/мкл) [2, 3].

Вченим вдалося також здійснити відновлення мікромоторів і їхньої швидкості. Для цього «заражений» зразок з мікромоторами й ампліконами інкубувався часом 30 секунд при температурі 90 °С. Це дозволило визволити амплікони від ДНК-зондів мікромоторів. Далі було центрифугування при 6000об/хв протягом 5 хвилин. Перевірка отриманого зразка в 5% розчині H₂O₂ показала, що швидкість мікромоторів відновилася до рівня 75,52% від початкової, до проведення тестування за участю ампліконів РНК ВІЛ-1 [3].

Також була перевірена реакція системи на інші види вірусів, що передаються статевим шляхом: гепатит С і В, герпес, папіломавірус 16 (HPV-16). Через числені випадки паралельного зараження як ВІЛ, так і якимись із перерахованих вище вірусів, цей тест мав також велике значення. Результат був задовільний – ДНК- амплікони формувалися тільки при наявності ВІЛ. Тобто наявність інших вірусів у тестованому зразку не вплинув на процес проведення його перевірки.

Необхідно провести калібрування, щоб система могла відрізнити наявність і відсутність вірусу в зразку, орієнтуючись на стандартне значення концентрації в 1000частинок/мл. Якщо концентрація нижче цього показника, то результат негативний (вірус відсутній), якщо ж концентрація вище – позитивний. Для проведення калібрування необхідно було визначити яка швидкість мікромоторів відповідає певній концентрації. Для цього було використано PBS – натрій-фосфатний буфер і плазма пацієнтів з і без ВІЛ.

Калібрування проходило за допомогою PBS, у якому рівень концентрації синтетичних стабілізованих РНК ВІЛ-1 варіювалися від 0 до 107. Після проведення калібрування стало ясно, що середня швидкість мікромоторів при концентрації ВІЧ в 1000частинок/мл дорівнює 0,705±0,082 мкм/с [3].

Також вчені провели аналіз роботи системи з використанням ROC- кривої, що показав дуже перспективні результати. Чутливість випробовуваної системи склала порядку 94,6% при значенні ДІ – 81,8...99,3%, а специфічність склала 99,1% при ДІ – 80,5...100%. Діаграма розсіювання результатів роботи системи також показала неймовірні результати. Так, точність визначення зразка з високою концентрацією ВІЛ як позитивного дорівнює 100%, а точність визначення негативних зразків – 90% [3].

Висновок. Використання технологій на підставі наномоторів дає змогу створювати нові медичні прилади для виміру з великою точністю наявності клітин РНК ряду небезпечних вірусів у людини. Цей напрямок наукових досліджень дуже важливий для діагностики захворювань.

Література

1. О.О. Ханюков, К.Ю. Гашинова, І.В. Євстігнєєв, Є.М. Дитятковська, Є.Д. Єгудіна, О.І. Кравченко, О.С. Хмель. «Імунодефіцитні стани у клінічній практиці» Навчальний посібник для практичних занять та самостійної підготовки. Дніпро, 2019 – 228 с.
2. ВІЧ-інфекція і СПИД: Национальное руководство / под ред. В.В. Покровского. – Москва: ГЭОТАР-Медиа, 2013. – 608 с.
3. Вторая конференция по вопросам ВИЧ/СПИД в Восточной Европе и Центральной Азии. – М.: 2008. – С. 26.