

Новые подходы для определения кардиотропонина I в плазме крови

Л.Е.Агафонова¹, А.А.Шумков¹, В.В.Шумянцева^{1,2}, А.И.Арчаков^{1,2}

¹Научно-исследовательский институт биомедицинской химии им. В.Н.Ореховича, лаборатория биоэлектрохимии отдела персонализированной медицины, Москва (зав. лабораторией — д.б.н. В.В.Шумянцева);

²Российский национальный исследовательский медицинский университет им. Н.И.Пирогова, кафедра биохимии медико-биологического факультета, Москва (зав. кафедрой — акад. РАМН, проф. А.И.Арчаков)

Цель исследования — разработать новые подходы для быстрого и чувствительного определения кардиотропонина I в плазме крови. Были разработаны гравиметрический и электрохимический иммуносенсоры с экспериментальными пределами обнаружения кардиотропонина I в плазме крови 0,4 нг/мл (17 пМ) и 0,1 нг/мл (4 пМ), что соответствует физиологическим концентрациям кардиомаркера для диагностики острого инфаркта миокарда. Методом кварцевых кристаллических микровесов исследована кинетика высокоспецифичных взаимодействий в системе моноклональные антитела к кардиотропонину I — кардиотропонин I в режиме реального времени без дополнительного введения меток и многостадийного процесса иммобилизации антител на золотом электроде, а также без использования вторичных меченых антител.

Ключевые слова: кардиотропонин I, кардиомаркер, иммуносенсор, инфаркт миокарда, наночастицы золота, метод инверсионной вольтамперометрии, метод кварцевых кристаллических микровесов

New Approaches for Screening of Cardiac Troponin I in Plasma

L.E.Agafonova¹, A.A.Shumkov¹, V.V.Shumyantseva^{1,2}, A.I.Archakov^{1,2}

¹V.N.Orekhovich Research Institute of Biomedical Chemistry, Laboratory of Bioelectrochemistry of Department of Personalized Medicine, Moscow (Head of the Laboratory — DBiolSci V.V.Shumyantseva);

²Pirogov Russian National Research Medical University, Department of Biochemistry of Medical-Biological Faculty, Moscow (Head of the Department — Acad. of RAMS, Prof. A.I.Archakov)

The aim of the study was to develop new approaches for rapid and sensitive screening of cardiac troponin I in plasma. In this paper we developed a gravimetric and electrochemical immunosensors with experimental detection limits of cardiac troponin I in plasma: 0.4 ng/mL (17 pM) and 0.1 ng/mL (4 pM), which corresponds to the physiological level of cardiac marker in plasma for the diagnosis of acute myocardial infarction. The kinetics of highly specific interactions between the monoclonal antibody of cardiac troponin I and cardiac troponin I were also investigated by quartz crystal microbalance in real time, without multiple labeling procedures and multi-step process of immobilization of antibodies on a gold electrode, and secondary antibody staining.

Key words: cardiac troponin I, cardiac marker, immunosensor, myocardial infarction, gold nanoparticles, stripping voltammetry method, quartz crystal microbalance method

Сердечно-сосудистые заболевания занимают 1-е место среди причин смерти населения в России, что составляет 61% всех летальных исходов согласно имеющимся на

настоящий момент статистическим данным за 2011 г. [1]. Сходная ситуация и в Европе — 47% (за 2012 г.) [2]. Одно из наиболее опасных сердечно-сосудистых заболеваний — инфаркт миокарда (ИМ). Он сопровождается появлением в крови специфичных биомаркеров — белков, высвобождающихся при разрушении миоцитов: миоглобина, тропонинов I и T, белка, связывающего жирные кислоты, и специфичных ферментов — креатинкиназы-MB, гликогенфосфорилазы ВВ, лактатдегидрогеназы и др. [3]. Когда симптоматическая и электрокардиографическая диагностика инфаркта миокарда затруднена, существенную помощь в постановке диагноза оказывает определение в крови кардиомаркеров.

Для корреспонденции:

Агафонова Любовь Евгеньевна, кандидат химических наук, научный сотрудник лаборатории биоэлектрохимии отдела персонализированной медицины Научно-исследовательского института биомедицинской химии им. В.Н.Ореховича

Адрес: 119121, Москва, ул. Погодинская, 10, стр. 8

Телефон: (499) 246-5820

E-mail: agafonovaluba@mail.ru

Статья поступила 22.03.2013, принята к печати 25.04.2013

Высокоспецифичными для миокарда белками являются тропонины I и T, так как их изоформы значительно отличаются по аминокислотной последовательности в сердечной и скелетных мышцах [4]. Их концентрация начинает возрастать через 4–6 ч после приступа ИМ. Повышенный уровень кардиотропонинов в крови сохраняется, по крайней мере, в течение 8–10 дней и даже дольше у пациентов с обширным инфарктом. Определение содержания сердечных тропонинов также дает возможность диагностики микронекроза миокарда, иногда возникающего в случае нестабильной стенокардии. Повышение концентрации тропонинов имеет высокое прогностическое значение, что позволяет оценивать степень риска пациентов со стенокардией [4]. Сравнительное исследование тропонинов I и T выявило более высокую диагностическую значимость тропонина I [5]. Так, уровень в крови тропонина I при ИМ может почти в 100 раз превышать верхнюю границу нормы, составляющую около 20,4 пг/мл [6].

Таким образом, определение белков-кардиомакеров в крови пациентов служит одним из основных критериев при постановке диагноза ИМ, а актуальность создания аналитических устройств определения биомаркеров для экспресс-диагностики ИМ не вызывает сомнений.

В настоящей работе разработаны методы определения кардиотропонина I (сTnI) в плазме крови: 1) с помощью пьезокварцевого иммуносенсора; 2) по регистрации интенсивности сигналов золотых наночастиц (AuНЧ) на электродах методом инверсионной вольтамперометрии.

Материалы и методы

В работе использовали следующие коммерческие реактивы и расходные материалы: многоразовые 6 МГц пьезокварцевые резонаторы (ПКР) АТ-среза с золотыми электродами, $d = 0,67$ см (Eco Chemie, Utrecht, Netherlands), 3-контактные одноразовые печатные электроды (ПГЭ), $d = 0,2$ см, с графитовыми рабочим и вспомогательным электродами и хлорсеребряным электродом сравнения (ООО НПП «Автоком», Москва); 30% перекись водорода (Fisher Chemicals, UK), серная кислота (ХимМед, Россия), этанол (ХимМед, Россия), дидодецилдиметиламоний бромид (ДДАБ; Sigma, USA), тетрахлорзолотая кислота (Sigma, USA) и 0,1 М соляная кислота (ХимМед, Россия). Были использованы белки фирмы USBiological (USA): мышинные антитела к человеческому кардиотропону I, aa 16–20 (анти-сTnI, 4,5 мг/мл, T8665-17C) и кардиотропонин I, калибровочный набор на основе сыворотки крови (сTnI, 0, 0,54 и 2,54 нг/мл, T8665-15R).

Растворы антител концентрацией 118 нг/мл использовали для иммунохимических процедур. Стандартные растворы с сTnI были приготовлены разведением лиофилизированных порошков в фосфатном буфере (0,1 М KH_2PO_4 + 50 мМ NaCl, pH = 7,4). Во всех электрохимических экспериментах использовали 0,1 М фосфатный буфер (ФБ). Периферическая венозная плазма крови информированных добровольцев (пациентов, больных ИМ, и здоровых доноров) была предоставлена к.м.н. А.В.Лисицей (ЦКБ № 1 ОАО «Российские железные дороги», Москва). Концентрация тропонина I в образцах плазмы была предварительно установлена

с помощью стандартного альтернативного метода — иммуноферментного анализа (экспресс-флуориметра RAMP® Clinical Reader производства компании Response Biomedical Corp., Canada) (таблица).

Гравиметрические измерения

Гравиметрические измерения выполняли с помощью пьезокварцевого резонаторного модуля (QCM, кварцевых кристаллических микровесов) к потенциостату/гальваностату «PGSTAT12 Autolab» и программного обеспечения «NOVA» в стационарной ячейке (Eco Chemie, Utrecht, Netherlands). Пьезокварцевый иммуносенсор представлял собой ПКР АТ-среза с золотым электродом, покрытым 1 мкл анти-сTnI (физическая иммобилизация). Аналитическим сигналом пьезокварцевого иммуносенсора служило уменьшение частоты колебаний резонатора при увеличении массы рецепторного слоя в результате взаимодействия его с сTnI при вводе 1 мкл плазмы или сыворотки крови. ПКР предварительно обезжиривали этанолом, высушивали, затем на золотой электрод наносили свежеприготовленный раствор (H_2SO_4 : 30% H_2O_2 — 7:3) и выдерживали в течение 5 мин при комнатной температуре, избегая контакта со спаями; обильно промывали дистиллированной водой, этанолом и высушивали на воздухе до постоянной массы.

Таким образом, селективность и специфичность определения сTnI обеспечивали иммобилизацией 1 мкл раствора анти-сTnI (118 нг/мкл) на золотом электроде. После стабилизации резонансной частоты вводили 1 мкл плазмы или сыворотки крови и регистрировали сигнал иммуносенсора в режиме реального времени. Новизна данного подхода заключается в исследовании методом кварцевых кристаллических микровесов высокоаффинных взаимодействий в режиме реального времени без дополнительного введения меток и без многостадийного процесса иммобилизации антител на золотом электроде, а также без использования вторичных меченых антител. Прямую регистрацию иммунохимических взаимодействий осуществляли на основе различия кинетических параметров специфических взаимодействий и неспецифической сорбции, что позволило исключить стадию отмывки последующих неспецифических взаимодействий.

Образец	$C_{\text{сTnI}}$ (RAMP®), нг/мл	$C_{\text{сTnI}}$ (RAMP®) $\times 10^{-12}$, М
ИМ-0010	0,40 ± 0,04	17,0 ± 1,7
ИМ-0020	0,62 ± 0,06	26,4 ± 2,6
ИМ-0030	0,88 ± 0,09	37,4 ± 3,7
ИМ-0040	0,95 ± 0,10	40,0 ± 4,0
ИМ-0050	1,20 ± 0,12	51,1 ± 5,1
ИМ-0060	1,40 ± 0,14	59,6 ± 6,0
ИМ-0070	0,10 ± 0,01	4,30 ± 0,43
ИМ-0080	2,05 ± 0,21	87,2 ± 0,43
ИМ-0090	5,09 ± 0,51	217 ± 22
ИМ-0100	16,3 ± 1,6	694 ± 69
ИМ-0110	18,4 ± 1,8	783 ± 78
ИМ-0120	>32	>1362

Электрохимические измерения

Электрохимические измерения выполняли с использованием потенциостата/гальваностата «PGSTAT12 AutoLab» и программного обеспечения «GPES». Для получения AuНЧ на поверхность ПГЭ наносили 60 мкл 5 мМ раствора $\text{HAuCl}_4/0,1 \text{ M HCl}$. Электролиз проводили в течение 180 с при потенциале $-0,5 \text{ V}$ в горизонтальном режиме. После процедуры электронанесения поверхность электрода промывали дистиллированной водой и высушивали на воздухе. Электрод модифицировали последовательным нанесением 1 мкл $0,1 \text{ M}$ ДДАБ в хлороформе (5 мин), затем 1 мкл раствора анти-сТnI (20 мин, 25°C). Иммуносенсор оставляли на ночь в холодильнике при температуре 4°C . На поверхность иммуносенсора наносили 1 мкл образца плазмы или сыворотки крови и проводили связывание сТnI с анти-сТnI в термостате 45 мин при 37°C . Для удаления неспецифически адсорбированных белков электрод перед измерением сигнала помещали в электрохимическую ячейку с 1 мл ФБ (30 мин, 37°C). Регистрацию сигнала осуществляли методом инверсионной вольтамперометрии (ИВА) с линейной разверткой ($v = 50 \text{ мВ/с}$) в диапазоне сканирования от $+0,6$ до $-0,6 \text{ V}$. Аналитическим сигналом иммуносенсора служила высота пика восстановления оксидов золота, измеренная после 30-секундного окисления AuНЧ при потенциале $+1,2 \text{ V}$ и рассчитанная по полученным ИВА как $\Delta i = i_{\text{сигнал}} - i_{\text{фон}}$ с использованием пакета программ «GPES».

Все гравиметрические и электрохимические измерения проводили при комнатной температуре и повторяли трижды.

Результаты исследования и их обсуждение

Гравиметрические измерения. Методом кварцевых кристаллических микровесов прямую регистрацию иммунохимических взаимодействий в системе анти-сТnI/сТnI в плазме и сыворотке крови осуществляли на основе различия кинетических параметров специфических взаимодействий и неспецифической сорбции, что позволило исключить стадию отмычки последующих неспецифических взаимодействий. На рис. 1 представлены сенсограммы изменения частоты гравиметрического иммуносенсора после ввода 1 мкл сыворотки крови с сТnI концентрацией $1,08 \text{ нг/мл}$ (кривая а) и без сТnI (кривая б). Из вставки на рис. 1 видно, что с увеличением концентрации сТnI в сыворотке крови сдвиг резонансной частоты колебаний кварцевого резонатора возрастает.

При исследовании образцов плазмы крови здоровых доноров наблюдали ниспадающий характер кривой зависимости изменения частоты от времени. Анализ полученных данных с образцами плазмы пациентов, больных инфарктом миокарда, показал наличие на кривой участка с практически постоянным значением частоты (наличие горизонтального плато), который свидетельствовал об образовании комплекса антиген–антитело. Плато продолжительностью 10–30 с регистрировали по истечении 30–90 с после ввода образца. Кривая б (см. рис. 1) не содержит линейного участка, соответствующего связыванию антител с тропонином I. На рис. 2 представлен калибровочный график изменения частоты колебаний резонатора с увеличением концентрации сТnI в плазме крови.

личением концентрации сТnI в плазме крови пациентов, больных инфарктом миокарда. Данные рис. 2 аппроксимировали методом наименьших квадратов линейным уравнением:

$$\Delta f / \text{Гц} = -(71,42894 \pm 9,19389) + (177,07721 \pm 10,35299) \times C(\text{сТnI}) / \text{нг-мл}^{-1}.$$

Коэффициент линейной регрессии составил $R^2 = 0,98$.

Взаимодействие антиген–антитело является высокоаффинной реакцией с константой ассоциации порядка $\sim 10^9 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$, именно поэтому ее изучение с помощью традиционных кинетических методов сильно затруднено. В настоящей работе значения констант скоростей образования (ассоциации) k_o и разрушения (диссоциации) k_p комплекса устанавливали по методике Скэтчарда, преобразуя полученные экспериментальные данные Δf от t в зависимость $d(\Delta f) / dt$ от Δf и учитывая линейный характер кинетической зависимости изменения частоты колебаний сенсора

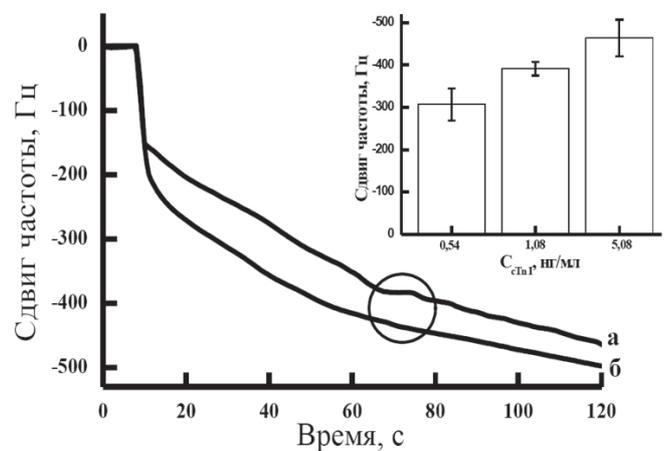


Рис. 1. Сенсограммы изменения частоты гравиметрического иммуносенсора после ввода 1 мкл сыворотки крови (стандартные растворы) с сТnI концентрацией $1,08 \text{ нг/мл}$ (а) и без сТnI (б). На вставке приведено изменение сигнала иммуносенсора в зависимости от концентрации сТnI в стандартных растворах.

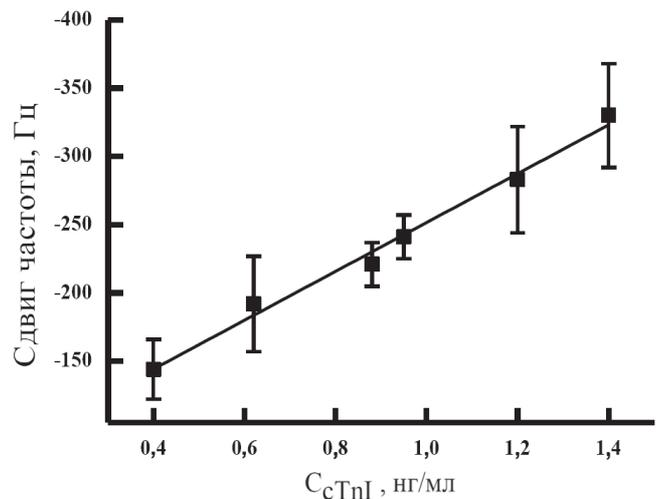


Рис. 2. Калибровочный график изменения частоты колебаний резонатора с увеличением концентрации сТnI в плазме крови.

в начальный момент времени. Достаточно широкий интервал ($d(\Delta f) / dt - \Delta f$) точек использовали, чтобы уменьшить влияние шумов и тем самым обеспечить прецизионное определение кинетических параметров. Находя тангенс угла наклона полученных прямых b и отрезок a , отсекаемый по оси абсцисс, рассчитывали k_o и k_p :

$$b = -(k_o C + k_p) \quad \text{и} \quad a = k_o \times \Delta f_{\max} \times C,$$

где C — молярная концентрация кардиомаркера, Δf_{\max} — максимальное изменение частоты пьезокварцевого имму-

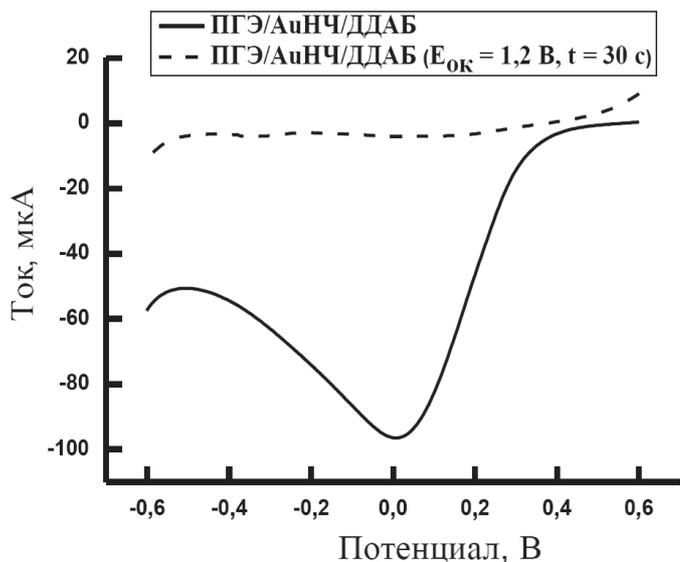


Рис. 3. ИВА ($\nu = 50$ мВ/с), полученные для системы ПГЭ/АuНЧ/ДДАБ в ФБ (рН = 7,4). Катодный пик, регистрируемый после предварительного 30-секундного окисления при потенциале +1,2 В.

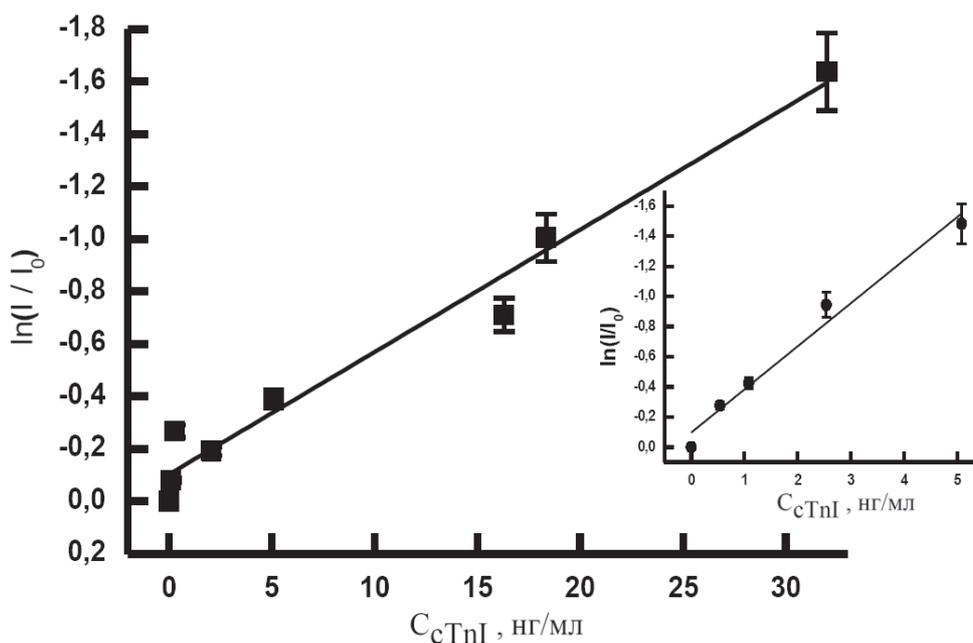


Рис. 4. Калибровочная зависимость сигнала иммуносенсора от концентрации сТnI в плазме крови. На вставке представлена калибровочная зависимость, полученная при исследовании стандартных растворов с сТnI.

носенсора после биоаффинного взаимодействия. Величины k_o и k_p комплекса (анти-сТnI + сТnI) составили $3,9 \times 10^9$ и $1,1 \times 10^9$ $M^{-1} \cdot s^{-1}$ и 0,200 и 0,156 s^{-1} в плазме и сыворотке крови соответственно.

Константы аффинности K получали по формуле: $K = k_o / k_p$. Рассчитанные величины константы аффинности составили $1,9 \times 10^{10}$ и $7,1 \times 10^9$ M^{-1} в плазме и сыворотке крови соответственно.

Таким образом, данный подход позволяет рассчитывать кинетические и термодинамические параметры реакции из экспериментальных данных и определять сТnI в неразбавленной плазме крови с высокой чувствительностью 0,4 нг/мл (17 пМ), используя при этом малые объемы плазмы (1 мкл). Данный подход отвечает главным критериям в практике здравоохранения, в частности, простоте проведения анализа и скорости учета его результатов, что имеет большое значение для обширного числа клинических анализов.

Электрохимические измерения. Методом инверсионной вольтамперометрии с использованием золотых наночастиц, предварительно полученных на графитовом электроде электросинтезом, регистрировали иммунохимические взаимодействия в системе ПГЭ/АuНЧ/ДДАБ/anti-сТnI/сТnI в плазме и сыворотке крови. ДДАБ использовали не только в качестве биомембраны для встраивания антител, но и как стабилизирующий агент для золотых наночастиц. На рис. 3 показан сигнал сенсора ПГЭ согласно разработанной методике. Традиционное использование блокирующего буфера, содержащего бычий сывороточный альбумин (0,1% вес/объем), снижает интенсивность сигнала металла и, как следствие этого, уменьшает предел обнаружения сТnI методом ИВА. Поэтому неспецифическое связывание исключали с помощью отмычки системы в ФБ непосред-

ственно перед электрохимическими измерениями. С увеличением концентрации cTnI в плазме и сыворотке крови наблюдали линейное ($R^2 = 0,97$) уменьшение сигнала иммуносенсора в результате биоаффинного взаимодействия anti-cTnI/cTnI (рис. 4). Калибровочное уравнение для плазмы крови имеет вид:

$$\ln(I/I_0) = -(0,10304 \pm 0,04782) - (0,04662 \pm 0,00332) \times C(\text{cTnI}) / \text{нг}\cdot\text{мл}^{-1},$$

где за I_0 взята средняя величина высоты тока катодного пика AuNP, полученная при анализе плазмы здоровых доноров.

Таким образом, экспериментальный предел обнаружения cTnI в плазме крови с помощью предложенного иммуносенсора составил 0,1 нг/мл (4 пМ). Разработанный подход определения cTnI методом ИВА может быть применен для быстрого и чувствительного скрининга кардиомаркера в крови.

Заключение

В настоящей работе разработаны гравиметрический и электрохимический иммуносенсоры с экспериментальными пределами обнаружения кардиотропонина I в плазме крови: 0,4 нг/мл (17 пМ) и 0,1 нг/мл (4 пМ), что соответствует физиологическим концентрациям кардиомаркера для диагностики острого инфаркта миокарда. Предложенные подходы позволяют регистрировать иммунохимические взаимодействия без дополнительного введения меток, без использования вторичных меченых антител и без химической иммобилизации рецепторных молекул. Поэтому данные подходы могут быть применены для быстрого и чувствительного скрининга кардиотропонина I с использованием для анализа всего 1 мкл неразбавленной плазмы крови. Методом кварцевых кристаллических микровесов также исследована кинетика высокоспецифичных взаимодействий в системе anti-cTnI/cTnI в режиме реального времени.

Авторы выражают благодарность к.м.н. Александру Валерьевичу Лисице (ЦКБ № 1 ОАО «Российские железные дороги», Москва) за предоставление образцов плазмы крови информированных добровольцев: пациентов, больных инфарктом миокарда, и здоровых доноров.

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ (проект № 12-04-31329).

Литература

1. Естественное движение населения. Коэффициенты смертности по основным классам причин смерти от 17.01.2013 [Электронный ресурс] // Федеральная служба государственной статистики [Официальный сайт]. URL: http://www.gks.ru/wps/wcm/connect/rosstat_main/rosstat/ru/statistics/population/demography/# (дата обращения: 27.02.2013).
2. CVD Statistics. European Cardiovascular Disease Statistics 2012 [Electronic resource] // The European Heart Network [Official website]. URL: <http://www.ehnheart.org/cvd-statistics.html> (accessed: 27.02.2013).
3. Будников Г.К. Химический анализ в медицинской диагностике // Проблемы аналитической химии: В 14 т. М.: Наука, 2010. Т.11. 224 с.
4. Никулин Б.А. Пособие по клинической биохимии. М.: ГЭОТАР-Медиа, 2007. С.135–137.
5. Бочков В.Н., Добровольский А.Б., Кушлинский Н.Е. и др. Клиническая биохимия. М.: ГЭОТАР-Медиа, 2008. 324 с.
6. Xu Q., Xu H., Gu H. et al. Development of lateral flow immunoassay system based on superparamagnetic nanobeads as labels for rapid quantitative detection of cardiac troponin I // Mater Sci Eng C. 2009. V.29. P.702–707.

Информация об авторах:

Шумков Андрей Алексеевич, младший научный сотрудник лаборатории биоэлектрохимии отдела персонализированной медицины Научно-исследовательского института биомедицинской химии им. В.Н.Ореховича
Адрес: 119121, Москва, ул. Погодинская, 10, стр. 8
Телефон: (499) 246-5820
E-mail: sumkov@list.ru

Шумянцова Виктория Васильевна, доктор биологических наук, заведующая лабораторией биоэлектрохимии отдела персонализированной медицины Научно-исследовательского института биомедицинской химии им. В.Н.Ореховича, профессор кафедры биохимии медико-биологического факультета Российского национального исследовательского медицинского университета им. Н.И.Пирогова
Адрес: 119121, Москва, ул. Погодинская, 10, стр. 8
Телефон: (499) 246-5820
E-mail: Viktoria.Shumyantseva@ibmc.msk.ru

Арчаков Александр Иванович, академик РАН, доктор биологических наук, профессор, заведующий кафедрой биохимии медико-биологического факультета Российского национального исследовательского медицинского университета им. Н.И.Пирогова, директор Научно-исследовательского института биомедицинской химии им. В.Н.Ореховича
Адрес: 119121, Москва, ул. Погодинская, 10, стр. 8
Телефон: (499) 246-5820
E-mail: inst@ibmc.msk.ru