

Возможности прогнозирования и раннего обнаружения социально значимых заболеваний по анализу слюны человека

Е.В. Силина¹, В.А. Ступин², С.А. Румянцева²

¹ГБОУ ВПО Первый МГМУ им. И.М. Сеченова МЗРФ

²ГБОУ ВПО РНИМУ им. Н.И. Пирогова МЗРФ

Резюме. В работе представлены результаты изучения новейших мировых достижений по детектированию изменений состава слюны человека при развитии социально значимых сердечно-сосудистых заболеваний для разработки скринингового диагностикума слюны человека. Был проведен обзор мировой литературы и патентная проработка в области достижений имплантируемых биосенсоров-анализаторов здоровья человека по составу слюны, оценена возможность и преимущества анализа слюны человека для диагностики и мониторинга социально значимых заболеваний, установлен достаточный минимальный набор биомаркеров для диагностики, прогнозирования и раннего обнаружения острого коронарного синдрома; описаны принципы и методы работы разрабатываемого технического устройства, которое позволит повысить качество и скорость диагностики различных сердечных заболеваний и предупредить их прогрессирование.

Ключевые слова: биосенсор, слюна, кардиомаркеры, сердечно-сосудистые заболевания.

В настоящее время особую актуальность имеет разработка технологии прогнозирования и раннего обнаружения социально значимых заболеваний, таких как инфаркт миокарда. В данной связи целесообразным является изучение новых принципов и методов работы имплантируемых и неимплантируемых биосенсоров, контролирующих параметры работы сердечно-сосудистой системы по различным биологическим жидкостям.

Слюна (лат. saliva) — прозрачная бесцветная жидкость, является смешанным секретом околоушных, подчелюстных, подъязычных и других мелких слюнных желез с удельным весом 1,001-1,017, вязкостью в диапазоне 1,10-1,32 пуаза. Жидкая биологическая среда организма слюна, выполняющая основные три функции (пищеварительная, защитная и метаболическая), непрерывно обновляется, неся в себе богатую информацию. Удобство анализа слюны обусловлено отсутствием необходимости инвазии, а значит болезненных ощущений с возможностью несложной скрининговой диагностики даже в домашних условиях. Это делает ее перспективной альтернативой крови. Поэтому слюна стала предметом пристального внимания ученых всех континентов. В базе данных Pubmed найдено 9680 работ,

посвященных слюне, первая из которых датируется 1827 г. Резкий рост числа научных исследований в данном направлении начался в 2006 году, когда ежегодное количество работ превысило 200. Это подтверждает перспективность данного научного направления.

Развитие технологий привело к идентификации в слюне многих биологических веществ, в том числе белков (цитокины, гормоны, ферменты) [8, 12, 13], антител [9], микробов [10], наркотиков [6, 11, 14]. Благодаря высоким технологиям слюна стала использоваться в качестве индикатора разных заболеваний, инфекционных агентов, для терапевтического мониторинга лекарств, гормонов, а также для получения генетической информации. Сегодня накоплен опыт коррелирующих уровней биомаркеров крови и слюны, что позволит в дальнейшем во многих случаях отказаться от забора крови. Уже сегодня достаточно 1 мл слюны, чтобы дать заключения по 100 параметрам. Однако использование слюны в качестве скрининг-диагностики социально значимых сердечно-сосудистых заболеваний затруднена из-за низкой чувствительности методов и отсутствия отработанных технологий.

Цель работы — изучение новейших мировых достижений по детектированию изменений состава слюны человека при развитии социально значи-

мых сердечно-сосудистых заболеваний для последующей разработки скринингового диагностикума на основе слюны человека и создания имплантируемого биосенсора.

Материал и методы

Для реализации поставленной цели на первом этапе нашего исследования был проведен обзор мировой литературы и патентная проработка с анализом технических решений в области достижений анализаторов здоровья человека по составу слюны с помощью различных лабораторных методов и биосенсорных устройств. После чего было проведено мультидисциплинарное консультирование с ведущими специалистами в технических и медицинских областях.

Патентный поиск проводился с использованием интернет-источников с принципиальной опорой на мнение экспертов, хорошо знающих не только предметную область, но и суть патентного поиска, патентные базы данных мировых патентных ведомств и дополнительные научно-технические материалы. В ходе исследования были отобраны 18 новейших работ, из них 5 наиболее близких из следующих источников: информационно-поисковые системы Бюро по регистрации патентов и торговых марок США; патентная база данных Google; база данных Европейского патентного ведомства; база данных Евразийского патентного ведомства; база данных патентного ведомства Японии; база данных Всемирной Организации Интеллектуальной Собственности; информационно-поисковая система Федерального института промышленной собственности (Роспатент); международная патентная база данных Patent Lens.

Литературный обзор проводили с помощью базы данных научных публикаций Scopus; научной электронной библиотеки eLibrary; базы данных научных исследований ScienceDirect; базы данных медицинской информации PubMed; информационно-поисковой системы Национального центра биотехнологической информации США.

Результаты и их обсуждения

В ходе первого этапа исследования, посвященного анализу состояния рынка и научных разработок, установлено, что на сегодняшний день единственными существующими отработанными решениями, применяемыми в медицинской практике для диагностикума сердечно-сосудистых заболеваний, являются кардиостимуляторы различной функциональной направленности. За последнее время сделан существенный шаг в развитии имплантируемых устройств, предназначенных для измерения артериального давления. Данное направление является наиболее эффективным с точ-

ки зрения дальнейших технологических и коммерческих перспектив. Однако провести полноценный анализ таких датчиков затруднительно, поскольку существующие решения находятся на стадии проектирования прототипов устройств или испытания прототипов на малых выборках животных.

Выявлена слабая защищенность интеллектуальной собственности по тематике исследования российских компаний и научных организаций. При этом установлена тенденция проникновения иностранных компаний на отечественный патентный рынок за счет переоформления «просроченных» патентов отечественных организаций. Подавляющее большинство научно-исследовательских групп в сфере биосенсоров, предназначенных для диагностики и лечения сердечно-сосудистых заболеваний, являются иностранными. В части коммерциализации полученных научных результатов доминирует США, европейские научные группы ориентированы на американский рынок, что свидетельствует об экономической рентабельности данного направления.

Установлено, что сегодня для персонального мониторинга используются в основном наружные устройства. Имплантируемые устройства на рынке пока не представлены, однако, учитывая возросший интерес исследователей, появление на рынке как имплантируемых, так и неимплантируемых устройств широкого потребления является ожидаемым в ближайшие 5-10 лет.

На втором этапе работы проведен глубокий анализ разработок в области биосенсоров слюны для диагностикума сердечно-сосудистой системы. Выявлены единичные охраноспособные документы, достоверно демонстрирующие значимость сердечно-сосудистой диагностики по образцам слюны.

Так, нидерландские ученые в 2011 году запатентовали неинвазивный способ измерения состояния свертывания крови по образцу слюны путем измерения концентрации различных белков, уровень которых коррелирует с показателем международного нормализованного отношения (МНО) в слюне [2]. Ученые предполагают, что данная методика будет иметь существенное значение для скрининговой диагностики инфаркта и инсульта.

Японские ученые в 2012 году запатентовали способ диагностики церебрального инсульта и бессимптомного инфаркта мозга у человека по концентрации в слюне акролеина, интерлейкина-6, С-реактивного белка, полиаминовой оксидазы или полиамин-оксидазы [4]. В настоящее время ведется разработка прототипа данного устройства и исследование на животных.

В большей степени в данном направлении продвинулись ученые США (Кентукки, Техас), которые в 2008 году изобрели методы определения сердечно-сосудистых биомаркеров для оценки риска, диагностики или прогноза сердечно-сосудистых

заболеваний по анализу различных биологических жидкостей (кровь, слюна, моча, плазма, спинно-мозговая жидкость), назвав свой первый патент «Кардиобиоиндекс / кардиобиооценка и полезность слюнного протеома для сердечно-сосудистой диагностики» [5]. Методика включает следующие этапы: 1) Измерение уровня 2-х и более биомаркеров: С-реактивный протеин (СРП), интерлейкины 1, 4, 5, 6, 8, 10, 13 (IL-beta, IL-4, IL-5, IL-6, IL-8, IL-10, IL-13), сердечный тропонин I (сTnI), фактор некроза опухоли альфа (TNF-а), интерферон гамма (IFN-γ), CD40, миоглобин, металлопротеиназа (ММР9), растворимый молекулярный белок внутриклеточной адгезии-1 (SICAM-1), В-натрийуретический пептид (BNP), креатинкиназа-МВ (СК-МВ), Е-селектин, миелопероксидазы. 2) Оценка уровней биомаркеров в отношении индексации: (а) присвоение индекса для каждого биомаркера или комбинации биомаркеров на основе его / их измерений по отношению к норме, (б) определение порогового уровня биомаркеров с индексом больше 0,8, определение кардиоиндекса методом логистической регрессии; (в) определение степени риска сердечно-сосудистого события, в частности ИБС, инфаркта миокарда.

В течение последующих трех лет эти же ученые разрабатывали техническое устройство, работающее по принципу лаборатории-на-чипе, и в 2012 году запатентовали новый метод экспресс-диагностики острого инфаркта миокарда, отдав предпочтение именно слюне [3]. Это экономически эффективный, ультрачувствительный экспресс-метод ранней диагностики острого инфаркта миокарда у человека, основанный на одновременной идентификации нескольких биомаркеров, уровень которых коррелирует в сыворотке крови и слюне. Так, определение уровней нескольких биомаркеров в слюне – С-реактивного белка, миоглобина и миелопероксидазы (МПО), а также одного или более дополнительных белков: сердечный тропонин I (сTnI), ММР-9, IL-6, растворимый молекулярный белок внутриклеточной адгезии-1 (SICAM-1), В-натрийуретический пептид (BNP), креатинкиназа-МВ (СК-МВ), Е-селектин. Точность метода остается на высоком уровне даже при одновременном измерении уровня 2-х биомаркеров в образце слюны – С-реактивного белка и любого из дополнительных биомаркеров. Концентрация биомаркеров измеряется с помощью микротекучей решетки датчиков.

На основании указанных разработок в Университете Кентукки провели пилотное исследование с включением 59 человек контрольной группы (средний возраст 49,3 года) и 56 человек (36 женщин и 20 мужчин) с острым инфарктом миокарда (в возрасте от 29 до 84 лет, средний возраст – 54,8 года). Ученые исследовали 21 белковый биомаркер, имеющий отношение к сердечно-сосудистым заболеваниям [1].

Установлено, что в наибольшей степени достоверно при инфаркте миокарда повышался уровень сTnI, СК-МВ, BNP, СРБ, МРО и миоглобина.

Тест работает следующим образом: пациент сплевывает в трубочку, через которую слюна попадает на прибор, несущий нанобиочип. Затем этот прибор вставляется наподобие кредитной карты в анализатор, скринингово определяющий состояние человека и риск развития сердечно-сосудистых заболеваний в ближайшем будущем. Полученные результаты анализа слюны согласуются с ранее полученными значениями этих же маркеров в сыворотке крови (в исследовании участвовало более 2000 пациентов). Эта новая технология сегодня находится на стадии клинических испытаний (добровольцы) при Университете Техаса в Остине.

Единственным наиболее близким российским техническим решением является медицинский сенсор-чип радиочастотной идентификации (РЧИ) [1]. Устройство состоит из метки со встроенным сенсором для забора слюны, считывателя, анализатора и зуба-имплантата, содержащего лекарство. Сенсор осуществляет забор слюны, которая проникает под давлением в микроскопические пробирки, покрытые антителами, снабженными флуоресцентными метками. При взаимодействии с белками-маркерами эти метки начинают испускать свечение различной длины волны, интенсивность которого регистрируется. Полученная информация записывается в РЧИ и считывается по запросу. Считывающее устройство – активные элементы, которые используются для считывания информации, хранящейся в метках (датчиках), состоит из батареи, металлического кольца, которое работает как антенна, микрочипа, который хранит информацию и контролирует анализ слюны и слюнного сенсора, а также емкости для лекарства. Основными недостатками технологии является лимитированность заряда батареи (до 1 месяца), а также картриджа. Картридж внутри имплантата необходимо регулярно перезаряжать новыми реагентами для проведения последующих анализов, что обязывает пациента ежемесячно посещать стоматолога. Обращает на себя внимание ограниченность емкости для лекарства.

Таким образом, для прогнозирования и раннего обнаружения острой сердечно-сосудистой катастрофы по анализу слюны человека должны быть использованы основные (не менее 2-х) и дополнительные белковые маркеры слюны (не менее 2-х). Из более 100 определяемых сегодня биологически активных веществ, обнаруживаемых в слюне, для достоверной диагностики острой ишемии миокарда необходимыми и достаточными маркерами являются: тропонин I, креатинкиназа МВ, миоглобин и С-реактивный белок.

Создание имплантируемого датчика мониторинга состояния сердечно-сосудистой системы по анализу слюны человека с внешним беспроводным

приемо-передающим устройством реализуемо.

В ходе дальнейшей работы требуется разработать: 1) биосенсор минимального размера; 2) систему класса лаборатория-на-кристалле (лаборатория-на-чипе), включающую в себя емкости для хранения реагента, используемого в реакции хемилюминесценции, систему микропомп для забора образца слюны и переноса реагента из емкости для хранения в емкость для проведения реакции (при необходимости), кремниевый фотоумножитель для регистрации люминесценции; 3) электронику, обеспечивающую функционирование кремниевого фотоумножителя, а также счет импульсов длительностью не менее 25 нс со скоростью не более 10 млн импульсов в секунду; 4) источник питания, способный поддерживать функционирование лаборатории-на-кристалле в течение длительного времени.

Перспективным является возможность дистанционного мониторинга, позволяющего в случае критических изменений биомаркеров передавать информацию на станцию скорой медицинской помощи, что существенно снизит смертность. Для этого необходимо создать набор интерфейсов для передачи цифровых данных на компьютер лечебно-профилактического учреждения и/или лечащего врача. Могут быть использованы такие сетевые системы связи, как WiFi и/или GPRS. Кроме того, длительный непрерывный дистанционный контроль за состоянием сердечно-сосудистой системы позволит пациенту контролировать выполнение лечебных мероприятий, а врачу - определять эффективность назначенного лечения и проводить своевременную фармакологическую коррекцию.

Таким образом, разрабатываемая система позволит повысить качество и скорость диагностики

различных сердечных заболеваний и предупредить их прогрессию.

Список использованной литературы

1. Floriano Perre N., Christodoulides Nicolaos, Miller Craig S. et al. Use of Saliva-Based Nano-Biochip Tests for Acute Myocardial Infarction at the Point of Care: A Feasibility Study. *Clinical Chemistry* (2009)55:8 1530-1538.
2. <http://patentscope.wipo.int/search/en/WO201049442> или https://www.google.com/patents/WO201049442A2?cl=en&dq=infarct*+saliva&hl=ru&sa=X&ei=WirPUtyeM8XJygnIIHoCg&ved=0CIYBEOgBMAk4Cg
3. <http://worldwide.espacenet.com/publicationDetails/biblio?CC=EP&NR=2467720A1&KC=A1&FT=D>
4. <http://worldwide.espacenet.com/publicationDetails/biblio?CC=EP&NR=2163645B1&KC=B1&FT=D> или https://www.google.com/patents/EP2163645B1?cl=en&dq=infarct*+saliva&hl=ru&sa=X&ei=DzDPUoaiNqijywOG1YCAw&ved=0CFoQ6AEwBDgU
5. https://www.google.com/patents/CA2697357A1?cl=en&dq=infarct*+saliva&hl=ru&sa=X&ei=0R_PUv2HMYeR5ASH94GwBw&ved=0CIUBEOgBMAk
6. Jarvis et al, *BMJ*, 321(7257):343-345, 2000.
7. Nogueira et al, *Infect. Immun.*, 73(9):5675-84, 2005.
8. Rhodus et al., *Cancer Detect. Prev.*, 29(1):42-5, 2005.
9. Stroehle et al, *J. Parasitol.*, 91(3):5.61-3, 2005.
10. Suzuki et al., *J. Clin. Microbiol.*, 43(9):4413-7, 2005.
11. Toennes et al, *Forensic Sci. Int.*, 152(2-3): 149-55, 2005;
12. Vasan, *Circulation*, 113(19):2335-2362, 2006.
13. Yang et al, *Lab. Chip.*, 5(10): 1017-23, 2005.
14. Zevin et al, *Drug Alcohol Depend.*, 60(1): 13-8, 2006.
15. Zhukov I. et al. Nano sensors integrated into dental implants for detection of acute myocardial infarction// *International Journal of Emerging Trends & Technology in Computer Science (IJETTCS)*, Volume 1, Issue 2, July – August 2012. www.ijettcs.org

Надійшла до редакції 14.08.2014