

МЕДИЦИНА

# ДЕТЕКТОР БОЛЕЗНЕЙ

Крошечные зонды позволяют обнаружить возбудителя инфекции за 20 минут и могут делать это прямо в кабинете врача

Шана Келли

## Почему так трудно мгновенно диагностировать инфекционное заболевание?

Измерение таких жизненно важных показателей, как температура тела или артериальное давление, — рутинная процедура, но установить столь же быстро наличие инфекции мы не можем. А между тем неспособность сразу же идентифицировать болезнетворную бактерию или вирус дорого обходится пациенту. Процедура занимает несколько дней, а за это время возбудитель распространяется по разным органам и тканям, бороться с ним становится все труднее, и наиболее уязвимые пациенты — дети и старики, у которых иммунная система ослаблена, — могут так и не дождаться помощи.

Такая отсрочка возникает несмотря на все высокотехнологичные достижения в медицине и особенно больно ударяет по небольшим амбулаториям в странах Африки, где тестирование на патоген занимает гораздо больше времени. В результате больных малярией нередко начинают лечить от тифа, которого у них нет, а носителей вируса лихорадки Эбола не изолируют должным образом и они заражают окружающих.

Тестирование занимает много времени потому, что молекулярные «отпечатки пальцев» возбудителей находятся не на поверхности тела пациента, а в его органах и тканях, в окружении огромного количества обычных белков и других биомолекул. В одной пробе крови может присутствовать всего тысяча или около того специфичных для бактерий маркеров — и триллионы не имеющих отношения

**ОБ АВТОРЕ**

**Шана Келли** (Shana O. Kelly) — профессор химии, биохимии, фармацевтики и биомедицинской инженерии, работающая в Университете Торонто. Руководит компанией *Xagenic*, занимающейся производством описанных в статье наноустройств в промышленных масштабах.



к делу молекул. И чтобы идентифицировать достаточное количество целевых веществ, нужны время, дорогие сложные приборы и квалифицированные специалисты.

Сегодня мы находимся на пороге революционного прорыва в этой области. Вместо того чтобы тратить время на транспортировку биологического материала в специализированные лаборатории, мы можем идентифицировать маркерные молекулы на месте, и это занимает не больше 20 минут. Такой результат дает использование нанозондов, крошечных сенсорных устройств, помещенных в пластиковый картридж. Достаточно внести в него капельку крови пациента, и через несколько минут вы получите результат. Высокая чувствительность зондов и их быстрое действие связаны отчасти с близостью размеров устройств и молекул ДНК — тот самый случай, когда размер имеет значение. Приведем такой пример: слабое волнение на море пассажиры большого морского лайнера даже не заметят, а сидящим в шлюпке придется несладко — волны начнут захлестывать суденышко и могут его потопить. Наши нанозонды реагируют на окружение — жидкость, в которую они погружены, — так чутко, как ни один сенсор больших размеров, и мы сразу это видим.

Мы с коллегами с нетерпением ожидаем результатов клинических испытаний нашего устройства, которые должны начаться в 2016 г. Разработкой диагностических наноприспособлений занимаемся не только мы, все разработчики используют достижения современных нанотехнологий. Ученые создали прецизионные методы формирования различных материалов, часто в атомном масштабе, и сегодня в лабораториях по всему миру используется этот сверхтонкий контроль при разработке миниатюрных устройств, которые отличаются быстродействием и точностью,

недостижимыми для их более крупных аналогов. И мы надеемся, что эти инновации смогут быстро справляться с задачами, над решением которых другими способами приходится трудиться гораздо дольше.

**Наживка для патогена**

Исследовательскую группу, занимающуюся разработкой наноустройств, я возглавляла примерно десять лет назад. Мы с коллегами с восхищением смотрели на простой, удобный для пользователя приборчик, применяемый больными диабетом для измерения уровня глюкозы в крови. По существу, молекулы глюкозы в этом устройстве замыкали электрическую цепь, отдавая свои электроны. Сила возникающего электрического тока служит мерой содержания глюкозы. И мы подумали: нельзя ли использовать аналогичный подход для идентификации бактериальной или вирусных ДНК и РНК — маркеров инфекции?

Для этого нужно было найти способ «привлекать» и улавливать молекулы ДНК патогенов, возможно присутствующих в пробах крови пациентов. Итак, мы собирались заняться чем-то вроде уженья рыбы, а для этого нужна была приманка. Одна из многих замечательных особенностей любого сегмента ДНК заключается в его способности связываться специфическим образом с другим сегментом, который мы можем синтезировать сами. Так, мы можем создать последовательность-приманку для ДНК стафилококка и прикрепить ее к сенсору, кусочку золотой проволоки диаметром не больше миллиметра, по которой начинает течь электрический ток, как только на «наживку» «клюнет» бактериальная ДНК.

Но поскольку ДНК сама по себе не может высвободить электроны в количестве, достаточном для создания измеримого электрического тока, мы использовали некий усилитель. К нашей пробе был

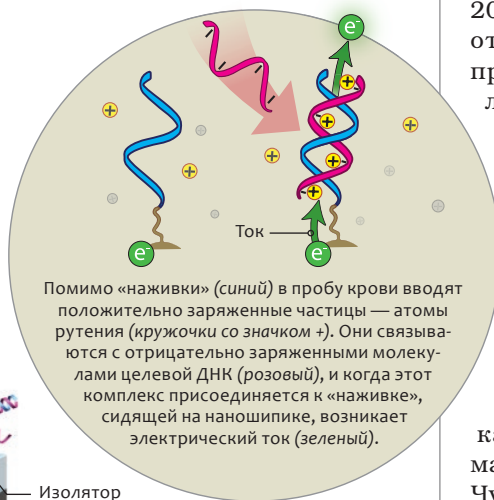
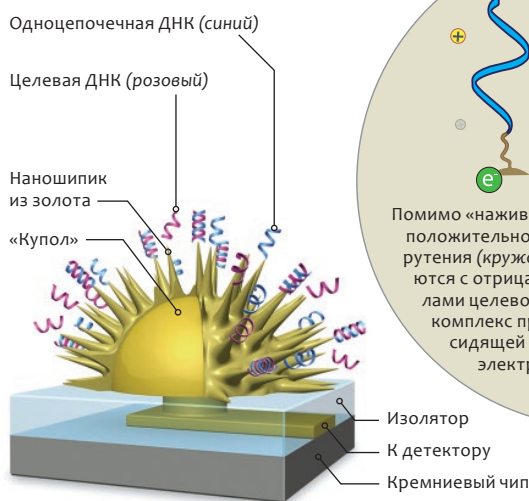
**ОСНОВНЫЕ ПОЛОЖЕНИЯ**

- Обычно тест на наличие в организме человека патогенного микроорганизма занимает несколько дней.
- За это время патоген успевает распространиться на разные органы и ткани больного, его состояние ухудшается, а лечение не прицельно.
- Новые наноустройства способны выполнить всю диагностическую работу за минуты прямо в кабинете врача.

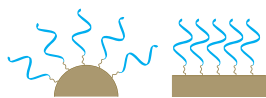
ДИАГНОСТИКА

## Крошечное устройство с небывалым потенциалом

Нанозонд, способный обнаруживать всего несколько молекул ДНК в пробе крови пациента, обладает тремя особенностями. Во-первых, он несет «наживку» — молекулы, связывающие специфические сегменты ДНК болезнетворных бактерий. Во-вторых, эта «наживка» располагается на наношипиках искривленной поверхности, что обеспечивает доступ к ним целевых молекул. В-третьих, связывание «наживок» с последними порождает электрический ток, регистрируемый чувствительными датчиками.



На искривленной поверхности («куполе») шипики располагаются более свободно, и целевым молекулам легче к ним приблизиться и связаться с «наживками». На плоской поверхности шипики тесно прилегают друг к другу, свободного пространства между ними почти нет.



добавлен рутений, молекулы которого несут положительный заряд. ДНК заряжена отрицательно, и рутений охотно с ней связывается. Когда такая молекула ДНК присоединяется к сенсорной ДНК, вместе с ней присоединяются и атомы рутения. ДНК-рутениевый комплекс легко оттягивает электроны от золотой проволоки, в результате чего возникают поддающийся измерению электрический ток. Используя разные наживки, можно идентифицировать ДНК разных патогенов.

Беда, однако, в том, что метод, так хорошо проявивший себя в эксперименте, в реальной ситуации не работает. Электрический ток в цепи возникает только при достаточно больших — порядка триллиона — количествах молекул бактериальной ДНК в образце. В обычной пробе крови, взятой из пальца, целевых молекул не больше 1 тыс. Ничего не получается и в том случае, когда их миллион.

Целый год мы потратили на то, чтобы понять, почему наше устройство не может работать при меньших концентрациях ДНК. Никакие

ухищрения не давали результата — чувствительность не повышалась ни на йоту. Дело дошло до того, что два студента-дипломника из моей группы попросили перевести их на другую тематику. Я и сама начала сомневаться в успехе; возникали мысли, что коллектив распадается.

Помогли счастливый случай и интуиция. Однажды (это был уже 2004 г.) мы обсуждали не имеющий отношения к нашим проблемам проект, в котором тоже предполагалось использовать золотой проводник, но диаметром всего 10 нм. На нем могло поместиться не более пяти молекул ДНК. И нам пришла в голову мысль — раз уж ничего больше не оставалось — попробовать заменить проводник диаметром один миллиметр нанометровым.

И чудо произошло! Одна из наших аспиранток вбежала в мой кабинет, размахивая листом бумаги с результатами первого теста. Чувствительность нашего устройства повысилась в миллион раз! Мы бросились друг друга поздравлять, но, немного поостыв, решили повторить эксперимент. Все подтвердилось, и мы были уверены, что сможем работать с реальными пробами, содержащими 1 тыс. частиц патогенов, и тем самым диагностировать заболевание.

В чем же преимущество нанопроводников перед тем материалом, с которым мы до этого работали? Дело в том, что с переходом в нанообласть на поверхности проводника начинают проявлять себя крошечные остроконечные выступы (шипики), неразличимые у проводников обычного диаметра. У последних поверхность выглядит абсолютно гладкой. Вокруг «наживок», прикрепившихся к шипикам по разные их стороны, остается гораздо больше свободного пространства, чем если бы они располагались на плоскости. Жидкость свободно обтекает шипики, принося с собой новые целевые молекулы, и возможности для их контактирования с «наживками» существенно повышаются.

Все было бы хорошо, но мои студенты могли изготавливать не более десяти зондов в день, в то время как для применения в клинике нужны тысячи. И тогда мы, как и многие ученые и инженеры до нас, намеревающиеся перейти к массовому производству своих электрических устройств, прибегли к кремниевым чипам.

К ним можно присоединять большое количество электродов и изготавливать их в промышленных масштабах. Мы намеревались сконструировать на таком чипе кусочек золотого нанопроводника с шипиками и через шесть месяцев упорной работы достигли цели, прибегнув к методу гальваностегии. Но вместо того чтобы использовать особенности поверхности кремния на микроуровне и наносить на него тончайшие слои золота, мы решили создать некое подобие золотого купола со множеством шипиков, который имитировал кусочек золотого проводника нанометрового диаметра. На них можно было насадить «наживки», оставляя достаточно много места для целевых молекул — все как в случае с золотым нанопроводником.

### Расширение возможностей

В последующие несколько лет мы показали, что наш зонд можно использовать для идентификации маркеров патогенных микроорганизмов, причем тест занимает не более 20 минут — обычная продолжительность приема врачом пациента. Еще

## При помощи золотых наносфер стало возможным выявление раковых клеток задолго до того, как те начинают образовывать опухоль

одна ценная особенность детектора состоит в его «мультиплексности» — способности за один раз идентифицировать множество патогенов. На одном чипе можно разместить несколько золотых куполов, снабдив каждый из них своей «наживкой». Это давало возможность использовать всего одну пробу крови для тестирования разных патогенов. Большинство других методов позволяют идентифицировать за один раз только один из них. Самое большое наше достижение — тестирование на наличие сразу 20 разных бактерий с одновременным выявлением резистентности к пяти наиболее распространенным антибиотикам. Точность измерения составила 99%.

Для того чтобы расширить сферу применения нашего нанозонда, мы создали компанию *Xagenic*, в которой я заняла пост главного технолога. Чип с сенсорами мы поместили в пластиковый картридж, создав внутри него все условия, необходимые для проведения диагностического теста. Цель клинического испытания картриджей, запланированного на 2016 г., состоит в определении точности идентификации возбудителей хламидиоза и гонореи — заболеваний, передаваемых половым путем. В испытаниях примут участие врачи и их пациенты из 20 разных клиник. Если все пройдет успешно,

мы передадим результаты в Управление по санитарному надзору за качеством пищевых продуктов и медикаментов (*FDA*) США и попытаемся получить разрешение на продажу нашего продукта.

В своих усилиях по применению нанотехнологий в целях диагностики мы не одиноки. Так, группа Чада Миркина (*Chad A. Mirkin*) из Северо-Западного университета сконструировала золотые наносферы, связывающие ДНК раковых клеток, что позволяет выявлять последние задолго до того, как они начинают образовывать опухоль. А Дэвид Уолт (*David Walt*) из Университета Тафтса создал систему подсчета специфических маркеров в теле пациента, чрезвычайно полезную для диагностирования рака и отслеживания хода патологического процесса. Все эти новшества, к сожалению, можно применять только для тестирования в лабораторных условиях, а не непосредственно в кабинете врача.

Рустем Исмагилов (*Rustem Ismagilov*) с коллегами из Калифорнийского технологического института создал беспроводное устройство под названием *SlipChip*, позволяющее обнаруживать целевые молекулы ДНК без внешнего источника питания. А в начале 2015 г. Сэмюэл Сиа (*Samuel Sia*) опубликовал в журнале *Science Translational Medicine* статью, в которой сообщалось о создании миниатюрного пробоотборника, который загружается в смартфон с особым программным обеспечением и анализатором, сообщающим о наличии антител к ВИЧ.

Я уверен, что рано или поздно эти технологии — или совершенно другие, о которых мы пока не имеем представления, — войдут в повседневную практику врачей, и тогда диагностика и лечение станут качественно иными. ■

Перевод: Н.Н. Шафрановская

### ДОПОЛНИТЕЛЬНЫЕ ИСТОЧНИКИ

- Экер Д. Ловчая сеть для микробов // *ВМН*, № 9, 2014.
- Криш Дж. Зонд для раковых клеток // *ВМН*, № 5–6, 2015.
- *Miniature Analytical Methods for Medical Diagnostics*. David R. Walt in *Science*, Vol. 308, pages 217–219; April 8, 2005.
- *Drivers of Biodiagnostic Development*. David A. Giljohann and Chad A. Mirkin in *Nature*, Vol. 462, pages 461–464; November 26, 2009.
- *Advancing the Speed, Sensitivity and Accuracy of Biomolecular Detection Using Multi-Length-Scale Engineering*. Shana O. Kelley et al. in *Nature Nanotechnology*, Vol. 9, No. 12, pages 969–980; December 2014.
- *A Digital Microfluidic Device with Integrated Nanostructured Microelectrodes for Electrochemical Immunoassays*. Darius G. Rackus et al. in *Lab on a Chip*, Vol. 15, No. 18, pages 3776–3784; September 21, 2015.