

17. Rutkowski M., Grzegorzczak K. Modifications of spectrophotometric methods for antioxidative vitamins determination convenient in analytic practice. *Acta Sci. Pol., Technol. Aliment.* 2007; 6(3): 17-28.
18. Stal'naya I.D. Modern methods in biochemistry. [Sovremennyye metody v biokhimi]. Orekhovich V.N., ed. Moscow: Meditsina; 1977. (in Russian)
19. Roberts J.H., Hubel C.A. The two stage model of preeclampsia: variations on the theme. *Placenta.* 2009; 30(A): 32-7.
20. Deponte M. Glutathione catalysis and the reaction mechanisms of glutathione-dependent enzymes. *Biochim. Biophys. Acta.* 2013; 1830: 3217-66.
21. Wu B., Dong D. Human cytosolic glutathione transferases: structure, function, and drug discovery. *Trends Pharmacol. Sci.* 2012; 33: 656-68.
22. Spiegler E., Kim Y.K., Wassef L., Shete V., Quadro L. Maternal-fetal transfer and metabolism of vitamin A and its precursor β -carotene in the developing tissues (2012) *Biochim. Biophys. Acta.* 2012; 1821(1), 88-98.
23. Pogorelova T.N., Gunko V.O., Linde V.A. Proteomic profile of the placenta during physiological pregnancy and pregnancy complicated by preeclampsia. *Akusherstvo i ginekologiya.* 2013; (7): 24-8. (in Russian)
24. Asha Rani N., Naidu J.N. Protein carbonylation, lipid peroxidation and serum alpha tocopherol activity in preeclampsia. *International Journal of Recent Trends in Science and Technology.* 2013; 8(3): 163-6.
25. Gao H.J., Zhu Y.M., He W.H., Liu A.X., Dong M.Y., Jin M. et al. Endoplasmic reticulum stress induced by oxidative stress in decidual cells: a possible mechanism of early pregnancy loss. *Mol. Biol. Rep.* 2012; 39(9): 9179-86.
26. Pogorelova T.N., Gunko V.O., Linde V.A. The role of the processes of destruction and oxidative modification of proteins in the development of preeclampsia. *Rossiyskiy vestnik akushera-ginekologa.* 2015; 15(2): 10-3. (in Russian)
27. Qian Y., Zhang L., Rui C., Ding H., Mao P., Ruan H. et al. Peptidome analysis of amniotic fluid from pregnancies with preeclampsia. *Mol. Med. Rep.* 2017; 16(5): 7337-44.
28. Possomato-Vieira J.S., Khalil R.A. Mechanisms of Endothelial Dysfunction in Hypertensive Pregnancy and Preeclampsia. *Adv. Pharmacol.* 2016; 77: 361-431.

Поступила 03.04.18
Принята к печати 11.05.18

©КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2018

УДК 612.313.1

Колсанов А.В., Чаплыгин С.С., Соколов А.В., Власов М.Ю., Мьякишева Ю.В.

ЭКСПРЕСС-МЕТОДЫ ОПРЕДЕЛЕНИЯ ПОКАЗАТЕЛЕЙ МЕТАБОЛИЗМА В РОТОВОЙ ЖИДКОСТИ (ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ)

ФГБОУ ВО «Самарский государственный медицинский университет» Минздрава РФ, 443099, Самара, Россия

Поиск новых способов диагностики заболеваний различной этиологии и внедрение их в практическое здравоохранение остаётся одним из приоритетных направлений современной медицины. Среди известных методов анализа биологических жидкостей особое место занимают методы экспресс-диагностики различных патологических состояний по маркерам, обнаруживаемым в ротовой жидкости (РЖ). В данной статье представлен критический обзор последних разработок отечественных и зарубежных исследователей (проанализировано 56 источников), касающихся как уже существующих и широко применяемых, так и находящихся на стадии разработки устройств. Обсуждаются перспективы использования РЖ в качестве диагностической среды, а также различные методы быстрого определения маркеров патологических состояний. Приведены основные принципы, преимущества и недостатки иммунохроматографических тестов, электрохимического, микрофлюидного анализа, изотермической амплификации и устройств на основе смартфонов для экспресс-диагностики различных маркеров в РЖ.

Ключевые слова: экспресс-диагностика; ротовая жидкость; метаболизм; биомаркеры; обзор.

Для цитирования: Колсанов А.В., Чаплыгин С.С., Соколов А.В., Власов М.Ю., Мьякишева Ю.В. Экспресс-методы определения показателей метаболизма в ротовой жидкости. *Клиническая лабораторная диагностика.* 2018; 63 (8): 489-495. DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0869-2084-2018-63-8-489-495>

Kolsanov A.V., Chaplygin S.S., Sokolov A.V., Vlasov M.Yu., Myakisheva Yu.V.

EXPRESS METHODS FOR DETECTION THE INDICATORS OF METABOLISM IN THE ORAL LIQUID (A REVIEW)

Samara State Medical University, 443099, Russia, Samara

The search for new ways to diagnose diseases of different etiologies and their introduction into practical health care remains one of the priority areas of modern medicine. Among the known methods for the analysis of biological fluids, a special place is occupied by the methods of express diagnostics of various pathological conditions by markers found in the oral fluid. This article presents a critical review of the latest developments of domestic and foreign researchers (56 sources are analyzed) concerning both existing and widely used devices and those that are at the development stage. The prospects of using oral fluid as a diagnostic medium, as well as various methods for the rapid detection of markers of pathological conditions, are discussed. The main principles, advantages and disadvantages of immunochromatographic tests, electrochemical, microfluidic analysis, isothermal amplification, and devices based on smartphones for express diagnostics of various markers in oral fluid are presented.

Key words: express diagnostics, oral fluid, metabolism, biomarkers, review

For correspondence: Myakisheva Yu.V., Head of the Department of Medical Biology, Genetics and Ecology, MD, Associate Professor, e-mail: myakisheva@yandex.ru

For citation: *Kolsanov A.V., Chaplygin S.S., Sokolov A.V., Vlasov M.Yu., Myakisheva Yu.V. Express METHODS FOR DETECTION THE INDICATORS OF METABOLISM IN THE ORAL LIQUID (A REVIEW). Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika (Russian Clinical Laboratory Diagnostics). 2018; 63 (8): 489-495 (in Russ.) DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0869-2084-2018-63-8-489-495>*

Для корреспонденции: Мьякишева Юлия Валерьевна, д-р мед. наук, доц., зав. каф. мед. биологии, генетики и экологии; e-mail: myakisheva@yandex.ru

Information about authors:

Kolsanov A.V., <http://orcid.org/0000-0002-4144-7090>
Chaplygin S.S., <http://orcid.org/0000-0002-9027-6670>
Sokolov A.V., <http://orcid.org/0000-0003-4965-3136>
Vlasov M.Yu., <https://orcid.org/0000-0003-4995-5839>
Myakisheva Yu.V., <https://orcid.org/0000-0003-0947-511X>

Conflict of interest. *The authors declare no conflict of interest.*

Acknowledgment. *The study had no sponsorship.*

Received 13.03.2018

Accepted 13.04.2018

Введение. Разработка быстрых, неинвазивных и недорогих способов определения инфекционных заболеваний и критических состояний организма является одним из важных направлений в развитии экспресс-диагностики, основанной на анализе маркёров непосредственно у постели пациента. С растущим потенциалом развития данного направления Всемирная организация здравоохранения представила основополагающие критерии, согласно которым проектируемые устройства должны быть доступными, чувствительными, специфичными, удобными для пользователя, без сложного оборудования, быстрыми и надёжными. Время проведения исследования и получения результата с помощью таких устройств должно составлять не более 30 мин [1, 2].

Традиционный подход в тестировании ограничивается медицинской лабораторией, что влечёт за собой отправку образцов из стационаров в специализированные лаборатории (особенно в случае проведения редких и дорогостоящих анализов), а затем ожидание результатов несколько часов или дней, в течение которых лечение должно продолжаться без желаемой информации. Это привело к возникновению предпосылок для смещения проводимых анализов из централизованной лаборатории к анализам непосредственно у постели больного, что обусловлено стремлением врачей как можно быстрее получить результат и дать предварительную оценку состояния пациента.

Методы экспресс-диагностики позволяют диагностировать вне лаборатории некоторые патологические состояния организма в течение достаточно короткого промежутка времени. Особую ценность «быстрый анализ» приобретает в районах, где населению недоступна лабораторная служба из-за расстояний либо финансовых возможностей населения. Несомненным преимуществом является сокращение времени с момента постановки диагноза до начала лечения либо первой неотложной помощи. Для пациентов, особенно детей, первостепенным при сдаче анализа является минимальный риск заражения и отсутствие физического и эмоционального дискомфорта.

Сегодня экспресс-тесты рассматриваются как «простые» исследования, не требующие специальной подготовки и навыков. Однако при всей кажущейся простоте большая часть экспресс-тестов представляет собой высокотехнологичный продукт, созданный на основе современных представлений в области иммунологии и электрохимии. Актуальным также является вопрос о выборе диагностической среды для экспресс-определения показателей, характеризующих состояние обменных процессов в организме. Рассматриваются как традиционные, так и альтернативные биологические жидкости. В настоящее время в литературе накоплено достаточно данных, свидетельствующих о том, что РЖ является ценной диагностической средой, своеобразным индикатором, отражающим как локальное состояние ротовой полости, так отдельных систем организма. Установлено, что в РЖ содержится более 2000 пептидов и белков [3, 4] и с каждым годом спектр обнаруживаемых биомолекул дополняется. Среди большого количества биомолекул, присутствующих в РЖ,

многие являются маркёрами физиологических изменений состояния организма и находятся в плазме крови и слюне в корреляционных соотношениях.

Одним из основных ограничений использования РЖ является то, что по сравнению с сывороткой крови биомаркёры обычно присутствуют в ней в более низкой концентрации. Вследствие этого аналитические системы должны быть очень высокоточными и чувствительными. Таким образом, качественный анализ маркёров РЖ в настоящее время выполним, но количественная оценка данных параметров является реальной проблемой. Кроме того, наличие муцинов и продуктов жизнедеятельности клеток делает слюну сложной для работы биологической жидкостью [5]. В связи с этим особую ценность приобретают методы диагностики с использованием РЖ, не требующие предварительной обработки пробы. Известно, что некоторые биомолекулы синтезируются и секретируются исключительно слюнными железами и не имеют корреляции с уровнями в крови [6].

Главное преимущество диагностики РЖ по сравнению с отбором сыворотки крови – простое и неинвазивное взятие образцов для анализа. Экспресс-тесты существенно сокращают время проведения диагностических процедур и дают возможность принять экстренные меры по оказанию помощи пациенту. Исследование РЖ обеспечивает также повышенную экономическую эффективность и удобство. Всё чаще РЖ используется для психосоциальных исследований, включающих определение стероидных гормонов (кортизола), участники которых могут собирать несколько образцов, находясь в комфортной среде, исключающей воздействие стресса [7–9]. Неинвазивность и удобство получения позволяют использовать данную биологическую среду в исследованиях с участием детей. Взятие РЖ не требует подготовленного медицинского персонала и оборудования, снижен риск инфицирования медицинских работников, участвующих в обработке и анализе её параметров [10]. Данные биологические образцы можно хранить и транспортировать при температуре окружающей среды, что в целом позволяет уменьшить затраты на исследование.

Целью данной работы является анализ и обобщение современных научных сведений, приведённых в отечественных и зарубежных источниках, в базах данных PubMed-NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/>), eLibrary (<https://elibrary.ru/>), посвящённых методам и инструментальному обеспечению экспресс-определения показателей метаболизма в РЖ.

Методология взятия проб ротовой жидкости. РЖ представляет собой смесь секрета слюнных желез, околодесневой жидкости (гингивальная кревicularная жидкость), трансудата слизистой оболочки полости рта, слизи из носовой полости и глотки, микробиоты полости рта и продуктов бактериального метаболизма [9]. В качестве диагностического образца в клинике РЖ имеет много преимуществ в плане взятия, хранения, транспортировки и преаналитической подготовки проб. РЖ не обладает свертываемостью, как кровь, за счёт чего её легче обрабатывать во время диагностических процедур, что уменьшает количество требуемых манипуляций.

Таблица 1

Способы взятия РЖ [4]

Тип РЖ	Метод взятия
Нестимулированная РЖ	<p><i>Накопление и сплевывание.</i> В течение 5 мин осуществляют накопление РЖ в ротовой полости. После этого примерно 5 мл сплевывают в пластиковый флакон или пробирку.</p> <p><i>Свободное слюнотечение.</i> РЖ в данном случае свободно стекает с нижней губы в пробирку до требуемого количества.</p> <p><i>Дренажное (абсорбция).</i> В ротовую полость, чаще всего под язык, на 1–2 мин помещают небольшой цилиндрический тампон, впитывающий РЖ. Затем тампон извлекается, помещается в специальную пробирку и центрифугируется, после чего РЖ используется для анализа.</p>
Стимулированная РЖ	<p>Для стимуляции слюноотделения испытуемому дают жевать воск, натуральные смолы. С этой же целью используют кристаллы лимонной кислоты либо ее 10% раствор, которые наносят на поверхность языка.</p>

Для взятия РЖ предлагаются различные способы и устройства [4, 5, 11, 12], которые можно классифицировать в зависимости от способа стимуляции слюноотделения. Стимулированную слюну обычно собирают путём индукции жевательного воздействия на парафиновый воск или жевательную резинку для увеличения скорости потока слюны. Очевидно, что этот метод, влияет на количество и pH слюны и обычно используется только у пациентов с затрудненной секрецией слюны, при ксеростомии, сахарном диабете, в старческом возрасте.

Общими процедурами перед взятием РЖ являются отказ от приёма пищи за 1 ч и полоскание ротовой полости дистиллированной водой в течение 1 мин. Дальнейшие процедуры описаны в табл. 1.

Для взятия нестимулированной РЖ путём сплевывания и свободного слюнотечения используют стерильные или нестерильные контейнеры. Слюна собирается без экзогенной стимуляции, и скорость её потока в основном зависит от степени гидратации. Наиболее распространёнными подходами к взятию нестимулированной слюны являются методы дренажного, сплевывания и свободного истечения. Независимо от используемого метода испытуемые тщательно промывают рот водой, чтобы избежать загрязнения пробы [5].

В работе W. Schramm и соавт. [13] описано устройство для взятия РЖ путём адсорбции. Это устройство состоит из целлюлозной прокладки, прикреплённой к пластмассовому стержню, который содержит индикаторный краситель, уведомляющий человека, собирающего образец, о том, что получено соответствующее количество образца. Прокладка помещается в рот пациента сублингвально, пока индикаторная панель не станет синей. Это происходит, когда впитывается около 1 мл образца. Устройство далее помещают в трубку, содержащую модифицированный фосфатный буфер с физиологическим pH, азидом натрия и неионным детергентом. Слюна обрабатывается (экстрагируется из оставшегося целлюлозного материала и смешивается с буфером) с помощью поршневого фильтра, который вручную вдавливаются в трубку.

Так получают около 1 мл прозрачного раствора, состоящего примерно из равных объёмов слюны и буфера.

Имеются сведения о зависимости значений аналитических характеристики РЖ от метода её взятия. Так, исследование T. Robles и соавт. [14] показало, что активность альфа-амилазы слюны сохранялась в пределах физиологических значений даже после промежуточных этапов обработки (замораживания, оттаивания, центрифугирования) при получении РЖ методом пассивного слюнотечения.

Одним из преимуществ РЖ является возможность её длительного хранения. Показано, что слюна стабильна 5 дней при комнатной температуре, но может храниться в течение более длительного времени при температуре от 4 до -20°C [15]. С целью проведения более точной количественной оценки маркеров в РЖ и исключения влияния муцинов на результаты анализа для её первичной обработки используют буферные растворы, содержащие муколитические ферменты [11].

На сегодняшний день для исследования показателей в РЖ используются различные методы (табл. 2).

Методы иммунной хроматографии. Иммунный хроматографический анализ (ИХА) основан на реакции антиген-антитело при движении жидкости под воздействием капиллярных сил по тонкой абсорбирующей полосе из нитроцеллюлозы, на которую наносятся специфические видовые антитела или антигены в комплексе с красителем, которым являются наночастицы коллоидного золота [16, 17].

Иммунохроматографические экспресс-тесты, являются наиболее распространёнными и востребованными на сегодняшний день. Самое широкое применение находят тест-системы для определения ВИЧ в околодесневой жидкости и слюне [13, 18–20], гепатита С (анти-НСV) в слюне [21], наркотических [22] и лекарственных веществ [23], а также *Helicobacter pylori* в РЖ [24]. В целом, основной тенденцией в экспресс-диагностике инфекционных заболеваний является использование новых перспективных методов молекулярной биологии с применением тестирования неинвазивных биосред на портативных устройствах [2].

Наиболее часто для тестирования околодесневой жидкости на ВИЧ и гепатит С применяются тест-полоски, позволяющие получить результат в течение 20–30 мин. В исследованиях M. Jaspard и соавт. [25] показано, что чувствительность и специфичность иммунохроматографического анализа (ИХА) на ВИЧ в капиллярной крови выше, чем аналогичный показатель для тестов околодесневой жидкости. Однако малозатратные технологии для диагностики и мониторинга ВИЧ являются основным предметом текущих исследований в сфере здравоохранения. Учитывая значительную потребность в расширении доступа к недорогим способам мониторинга ВИЧ в сельских районах, была проделана большая работа в развитии технологий экспресс-диагностики, которые доступны по цене, эффективны, просты в использовании, мобильны и обеспечивают достаточную точность количественных данных, необходимых для принятия клинических решений. Данные преимущества и особенности применения недорогих тестов для диагностики и мониторинга ВИЧ-инфекции в условиях ограниченных ресурсов представлены в обзорной статье [1]. Кроме того, по данным N. Rakesh и соавт. [26] образцы слюны можно использовать для тестирования на ВИЧ с помощью диагностических наборов для сыворотки и

Таблица 2

Методы определения показателей в РЖ

Метод	Принцип	Исследуемые показатели РЖ
Иммунная хроматография	Реакция комплекса антиген-антитело с красителем на нитроцеллюлозном носителе	Антитела и антигены к ВИЧ 1 и 2 типов; гепатит С, корь и другие инфекционные маркеры; матриксные металлопротеиназы
Электрохимия	Электрохимическая реакция	Глюкоза, α-амилаза, иммуноглобулины

цельной крови. В работе L. Warrener и соавт. [27] предложен экспресс-тест для диагностики кори. Отмечено, что внедрение разработанной тест-системы в глобальных программах борьбы с корью требует дальнейших исследований.

Тестирование на наркотические вещества широко применяется при проведении предварительных и периодических медицинских осмотров. При определении наркотических веществ в РЖ, как правило, в корпус устройства помещаются хроматографические полоски для определения 3–5 аналитов. Большинство доступных устройств для тестирования РЖ могут обнаруживать метамфетамин, амфетамины и опиаты, с меньшей точностью – кокаин и каннабиноиды [22], а также лекарственные препараты [23]. В судебной медицине используется простой ИХА-тест на наличие РЖ в исследуемом образце по качественной реакции на α -амилазу [28].

Электрохимические методы. Данные методы определения молекул в исследуемом образце основаны на распознавании характерного электрического сигнала, который появляется в ходе химической реакции. Наиболее часто используются тест-полоски с нанесёнными на них реагентами и прибор, переводящий электрический сигнал в цифровую форму на экране. Принцип метода позволяет создавать ферментативные и неферментативные сенсоры для определения различных маркеров в РЖ. Так, с использованием электрохимического метода разработана простая в использовании автоматизированная система, обеспечивающая одновременное и точное обнаружение большого количества белков и нуклеиновых кислот в РЖ. Система может использоваться для экстренной диагностики заболеваний полости рта [29]. Появляются сообщения о потенциальных возможностях применения нанобиосенсоров для контроля по слюне гликемических отклонений у больных сахарным диабетом [30].

В обзоре S. Mishra и соавт. [31] приведены современные технологии и устройства, которые обнаруживают в слюне специфические биомаркеры, связанные с различными видами рака. Подробно рассмотрены характеристики методов обнаружения. Устройства разделены на 5 групп, в числе которых электрохимические и микрофлюидные методы.

Предложен электрохимический метод обнаружения в РЖ одного из психоактивных компонентов каннабиса – тетрагидроканнабинола, оказывающего, в частности, неблагоприятное влияние на способность вождения транспортных средств [32]. Разработан одноразовый датчик (печатный углеродный электрод) с нанесённым реагентом, который вступает во взаимодействие с наркотическим веществом с образованием продукта, обнаруживаемого хроноамперометрическим восстановлением. Специфичность датчиков к тетрагидроканнабинолу составила 99%, однако чувствительность – лишь 28%. Время реакции составило 30 с, а концентрация исследуемого вещества – 25–50 нг/мл. Авторы пришли к выводу о необходимости дальнейшей оптимизации формата анализа. Подобные тест-системы могут быть в первую очередь востребованными специалистами экстренных служб для подтверждения факта употребления водителями наркотических веществ.

Разработан новый высокочувствительный электрохимический иммуносенсор для простой и быстрой детекции антигена фактора некроза опухоли в РЖ и сыворотке крови. В качестве иммобилизационной матрицы электрода использован конъюгированный полимер поли(3-тиофен) уксусной кислоты, содержащий карбоксильные группы на своей поверхности, которые обеспечивают большую поверхность биологического распознавания. Иммуносенсор показал низкий предел обнаружения (3,7 мкг/мл), приемлемую специфичность и селективность [33].

Среди неферментативных сенсоров интерес представляют устройства для определения концентрации глюкозы [34, 35]. Исследование проводят с использованием колло-

идных наночастиц серебра, нанесённых на сульфид молибдена (MoS_2). Простой в исполнении, обладающий высокой воспроизводимостью (97,5%), высокой чувствительностью, низким пределом обнаружения и высокой селективностью, данный биосенсор может обладать большим потенциалом для неинвазивного обнаружения глюкозы в различных биосредах организма человека, в том числе РЖ [34].

Однако производительность неферментативных электрохимических датчиков имеет недостатки в виде медленной кинетики электродов и низкой стабильности сигнала. G. Dutta и соавт. [36] сообщили о новом датчике на основе уникальной конкурентной схемы обнаружения с использованием метилевого синего, гидразина и платиновых наночастиц. В присутствии обнаруживаемого антигена поверхностно иммобилизованный метиленовый синий потребляет межфазный гидразин, тем самым уменьшая электроокисление гидразина на наночастицах платины. Таким образом, концентрация антигена прямо пропорциональна уменьшению электрохимического сигнала. Для доказательства концепции этот датчик использовался для обнаружения в РЖ богатого гистидином белка *Plasmodium falciparum*, важного биомаркера малярии. Показано, что биосенсор демонстрирует высокую специфичность и хорошую воспроизводимость, что делает его подходящим для многих исследований, включая неинвазивное диагностическое тестирование.

Впервые предложен высокочувствительный электрохимический иммуноанализ РЖ с целью диагностики целиакии [37]. Данный метод позволяет исключить проблемы, связанные с высокой вязкостью и низкой концентрацией антител IgA к трансглутаминазе в РЖ. Система детекции использует магнитные шарики, покрытые антигенами к трансглутаминазе, которые реагируют с антителами, присутствующими в образцах. В качестве метки использовано антитело против человеческого IgA, конъюгированное со щелочной фосфатазой. В качестве электрохимического преобразователя используется полоса из восьми намагниченных экранированных электродов. Исследование показало, что можно проводить скрининг целиакии с помощью быстрого, недорогого, чувствительного и неинвазивного метода, способного обнаруживать антитела к трансглутаминазе в РЖ. Это имеет принципиальное значение для скрининга большого количества пациентов, особенно в педиатрии.

Изотермическая петлевая амплификация. Данный метод позволяет проводить амплификацию ДНК в изотермических условиях без использования устройства для термоциклирования [38]. Высокий уровень специфичности обеспечивается использованием большего количества праймеров по сравнению с традиционной полимеразной цепной реакцией.

Разработана и протестирована одноразовая кассета для обнаружения нуклеиновых кислот, выделенных из патогенов [39]. В кассете использована одна реакционная камера для изотермической амплификации нуклеиновых кислот. Камера оснащена интегрированной проточной мембраной для изоляции, концентрации и очистки ДНК или РНК. Нуклеиновые кислоты, захваченные мембраной, непосредственно используются в качестве шаблонов для амплификации без элюирования, что упрощает управление потоком кассеты. Мембрана также служит для удаления ингибиторов, которые значительно уменьшают чувствительность обнаружения. Устройство снабжено внешним тонкоплёночным нагревателем. Процесс амплификации контролировался в реальном времени с помощью портативного компактного флуоресцентного считывателя. РНК ВИЧ подвергали обратной транскрипции и петлевой изотермической амплификации. При этом предел обнаружения составил менее 10 частиц ВИЧ в образцах РЖ. Авторы указывают на возможность модификации кассеты для обнаружения нуклеиновых кислот других патогенов не только в слюне, но в других жидкостях организма.

Z. Chen и соавт. [40] предложена система, состоящая из одноразового устройства и портативного блока с программным управлением, автоматически выполняющая все этапы анализа без вмешательства пользователя после первоначальной загрузки образцов и реагентов. Микрофлюидный картридж имеет несколько микроканалов, клапанов, насосов и резервуаров, которые изолируют вирусную РНК, проводят изотермическую амплификацию с участием обратной транскриптазы. Данная система способна обнаруживать антитела против ВИЧ, вирусную РНК в образце крови или РЖ, и может являться важным инструментом для борьбы с эпидемией ВИЧ.

Применение системы обратной изотермической амплификации для обнаружения арбовируса Зика в РЖ показало, что специфичность и чувствительность метода на порядок выше, чем у традиционной полимеразной реакции в реальном времени. Предел обнаружения образцов соответствовал таковому при использовании коммерческих наборов для экстракции нуклеиновой кислоты. Это позволило авторам разработать прийти к заключению о ценности данного метода для быстрой первичной диагностики вируса вне лаборатории [41]. N. Chotiwan и соавт. [42], а также M. Mauk и соавт. [43] предложили быстрое, чувствительное и недорогое обнаружение вируса Зика в слюне с использованием отдельных специфичных праймеров. Предел обнаружения может составлять всего 11 копий в пробе РЖ объёмом 30 мкл. Для изотермического проведения изотермической реакции амплификации без необходимости в электроэнергии использовался химически нагреваемый контейнер [42].

Микрофлюидные методы. Данное направление определения показателей в альтернативных биологических жидкостях является весьма перспективным, поскольку микрофлюидные системы оперируют очень малыми объёмами исследуемых проб (от микро- до нанолитров) в заданном ограниченном пространстве и интегрируются в недорогие, компактные приборы для экспресс-тестирования «на чипе» [31, 44, 45].

Микрофлюидные технологии, характеризующиеся манипуляциями с жидкостями в каналах с характерной длиной в десятки микрометров, обладают возможностями улучшения иммунологических анализов, которые могли бы преодолеть такие ограничения, как длительное время обработки, высокая стоимость, техническая сложность. Комбинация микрофлюидики и иммуноанализа может обнаруживать биомаркеры за короткий промежуток времени при значительном снижении объёмов реагентов и характеризуется низкими потребностями в энергии и более высокими уровнями интеграции и автоматизации по сравнению с традиционными подходами [46]. Пороги обнаружения биомаркеров в РЖ обычно находятся в фемто- и пиколярном диапазоне. Поэтому измерение в значительной степени зависит от высокотехнологичного, громоздкого и автоматизированного оборудования. Первые микрожидкостные устройства, способные измерять белковые биомаркеры в миниатюрных иммунологических анализах, обладали высокой чувствительностью и автоматизацией в компактном формате [44].

Описано устройство компактного оптического микрофлюидного биосенсора с высокочувствительными фотоприемниками, выполненными из гетероциклов полипифена-С₇₀ в качестве фотоактивного слоя. Биосенсор за короткое время с высокой специфичностью обнаружил интерлейкины 8, 1β и матриксную металлопротеиназу-8 в РЖ в пределах 80–120 мкг/л. Результаты измерения были статистически подтверждены результатами, полученными традиционными методами иммуноферментного анализа [47]. Представленный микрофлюидный биосенсор может быть эффективным инструментом для экспресс-диагностики и скрининга кардиоваскулярных, онкологических, системных заболеваний.

С целью непрерывного мониторинга уровня кортизола в РЖ во время циркадного цикла может использоваться диме-

тилсилоксановый иммуносенсор, в микрожидкостных каналах которого сорбируются антитела к кортизолу. Меченный пероксидазой кортизол измеряется по реакции фермента с субстратом – тетраметилбензидином. Количественную оценку проводят колориметрическим детектированием меченого кортизола путём оптического поглощения при 450 нм с использованием кремниевого фотодиода в качестве фотоприёмника [48].

Для определения неорганических метаболитов (тиоцианата, нитрита и нитрата) в РЖ разработан метод капиллярного электрофореза [49]. Селективное отделение данных веществ от других сосуществующих компонентов РЖ можно получить в течение 14 мин в буфере (pH 3,7) при напряжении разделения 18 кВ. Пределы количественного определения аналитов составили 10–16 нг/мл. По мнению авторов, метод представляет собой потенциальный инструмент быстрого неинвазивного анализа метаболитов оксида азота и цианида в РЖ.

С помощью микрофлюидных методов определены продукты жизнедеятельности *Helicobacter pylori* в РЖ. В устройстве используются органические красители с микрошариками ионообменной смолы. CO₂ и NH₃ реагируют с разными красителями, изменение окраски в микрожидкостной камере регистрируется с помощью оптического датчика [50].

Экспресс-тестирование с помощью смартфона. В последние годы ведутся разработки устройств, позволяющих провести персонализированный экспресс-анализ с применением смартфона. Данное направление обусловлено широким распространением устройства среди практически всех категорий населения. В этом отношении обнаружение отдельных аналитов РЖ методом «сухой химии» с последующей колориметрией бумажной тест-полоски в отражённом свете будет являться популярным, простым и недорогим способом. Несмотря на достаточное количество научных публикаций [51, 52], связанных с подобными биосенсорами, по-прежнему существуют проблемы низкой воспроизводимости, вызванной неоднородностью развития окраски, что приводит к низкому качеству анализа.

Разработан потенциометрический биосенсор на базе смартфонов для определения α-амилазы РЖ как чувствительного показателя активности вегетативной нервной системы, являющегося перспективным неинвазивным биомаркером психического здоровья [53]. В систему измерения входит смартфон, имеющий приложение для обнаружения амилазы, потенциометрический ридер и чувствительный чип с предварительно загруженными реагентами. РЖ проникает в зону реакции, активность фермента приводит к превращению электронного медиатора Fe(CN)₆³⁻ в Fe(CN)₆⁴⁻. Потенциал, измеренный считывателем на смартфоне, преобразуется в концентрацию α-амилазы на основе калибровочной кривой. Активность фермента в образце слюны количественно анализируется в течение 5 мин. Полученные результаты согласовались с результатами, полученными с использованием эталонного метода, и коррелировали с психологическими состояниями обследуемых.

Предложен метод точного определения концентрации этилового спирта в РЖ путём колориметрии в устройстве на основе смартфона. Анализ гистограмм на основе канальной визуализации цветового пространства и насыщенности оттенка обеспечивает однозначное определение концентрации алкоголя в РЖ и соотношение её с концентрацией в крови. Данная технология может быть использована для проведения анализа изменения цвета и адаптирована к любому смартфону [54].

Используя технологию 3D-печати, A. Roda и соавт. [55] разработали одноразовый мини-картридж, который можно легко прототипировать, чтобы использовать любой смартфон или планшет в качестве портативного люцинометра. В данном случае устройство обнаруживает хемиллюминесценцию, происходящую от фермент-связанных реакций в течение короткого промежутка времени (до 5 мин). В частности, для

определения концентрации лактата в РЖ с помощью данной тест-системы регистрировали хемилюминесценцию при взаимодействии лактат-оксидазы с пероксидазой хрена. Показано, что устройство на базе смартфона демонстрирует адекватную аналитическую производительность и может стать экономически эффективной альтернативой для неинвазивного измерения лактата у спортсменов и для мониторинга лактоацидоза при различных патологических состояниях [56].

Заключение. Разработка устройств для экспресс-определения биомаркеров в ротовой жидкости обеспечит их широкую доступность всем категориям населения, низкую стоимость, быстроту и удобство в использовании. Парадигма внедрения «быстрых тестов» смещается от непосредственной диагностики заболевания в сторону улучшения качества жизни в целом. Несмотря на многие исследования и разработки в отношении экспресс-тестов, полученные результаты являются преимущественно качественными или полуквантитативными и по-прежнему требуют совершенствования. Прежде всего это касается наиболее распространённых иммунохроматографических носителей. Для коммерческого внедрения и стабильного массового производства других устройств использование новейших технологий и снижение цены конечного продукта являются очень важными. Исследование биосенсоров проложит путь для их применения в персонализированной диагностике, что может в конечном итоге снизить заболеваемость и повысить качество жизни.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Финансирование. Исследование не имело спонсорской поддержки.

ЛИТЕРАТУРА (пп. 1-17, 19-56 см. REFERENCES)

18. Царев В.Н., Шестакова И.В., Балмасова И.П. и др. Опыт применения экспресс-теста для определения антител к вирусу иммунодефицита человека в ротовой жидкости. *Стоматолог.* 2008; 2: 14 – 8.

REFERENCES

1. Wu G., Zaman M. Low-cost tools for diagnosing and monitoring HIV infection in low-resource settings. *Bull. World Health Organ.* 2012; 90: 914–20.
2. John A., Price C. Existing and emerging technologies for point-of-care testing. *Clin. Biochem. Rev.* 2014; 35(3): 155–67.
3. Bandhakavi S., Stone M.D., Onsongo G. et al. A dynamic range compression and three-dimensional peptide fractionation analysis platform expands proteome coverage and the diagnostic potential of whole saliva. *J. Proteome Res.* 2009; 8: 5590–600.
4. Khurshid Z., Zohaib S., Najeeb S. et al. Human saliva collection devices for proteomics: an update. *Int. J. Mol. Sci.* 2016; 17: 846.
5. Lee Yu-H., Wong D.T. Saliva: An emerging biofluid for early detection of diseases. *Am. J. Dent.* 2009; 22(4): 241–8.
6. Lazaro A.S., Mussavira S., Bindhu O.S. Clinical and diagnostic utility of saliva as a non-invasive diagnostic fluid: a systematic review. *Biochemia Medica.* 2015; 25(2): 177–92.
7. Thorn L., Hucklebridge F., Evans P., Clow A. The cortisol awakening response, seasonality, stress and arousal: a study of trait and state influences. *Psychoneuroendocrinology.* 2009; 34: 299–306.
8. Stalder T., Evans P., Hucklebridge F., Clow A. Associations between psychosocial state variables and the cortisol awakening response in a single case study. *Psychoneuroendocrinology.* 2009; 35: 209–14.
9. Farnaud S., Kosti O., Getting S., Renshaw D. Saliva: Physiology and diagnostic potential in health and disease. *The Scientific World Journal.* 2010; 10: 434–56.
10. Srivastava N., Nayak P.A., Rana S. Point of care - a novel approach to periodontal diagnosis – a review. *J. Clin. Diagn. Res.* 2017; 11(8): ZE01–06.
11. Malamud D. Saliva as a diagnostic fluid. *Dent. Clin. N. Am.* 2011. 55: 159–78.
12. Yamaguchi M., Tezuka Y., Takeda K., Shetty V. Disposable collection kit for rapid and reliable collection of saliva. *Am. J. Hum. Biol.* 2015; 27(5): 720–3.

13. Schramm W., Angulo G. B., Torres P.C., Burgess-Cassler A. A Simple saliva-based test for detecting antibodies to human immunodeficiency virus. *Clin. Vaccine Immunol.* 1999; 6(4): 577–80.
14. Robles T.F., Sharma R., Harrell L. et al. Saliva sampling method affects performance of a salivary α -amylase biosensor. *Am. J. Hum. Biol.* 2013; 25(6): 719–24.
15. Hodinka R. L., Nagashunmugam T., Malamud D. Detection of human immunodeficiency virus antibodies in oral fluids. *Clin. Vaccine Immunol.* 1998; 5(4): 419–26.
16. Murdock R.C., Shen L., Griffin D.K. et al. Optimization of a paper-based ELISA for a human performance biomarker. *Anal. Chem.* 2013; 85: 11634–42.
17. Johnson N., Ebersole J.L., Kryscio R.J. et al. Rapid assessment of salivary MMP-8 and periodontal disease using lateral flow immunoassay. *Oral Dis.* 2016; 22(7): 681–7.
18. Tsarev V.N., Shestakova I.V., Balmasova I.P. et al. Experience of using the rapid test to determine antibodies to the human immunodeficiency virus in the oral cavity. *Stomatolog.* 2008; 2: 14-8. (in Russian)
19. Jyoti B., Devi P. Detection of human immunodeficiency virus using oral mucosal transudate by rapid test. *Indian J. Sex. Transm. Dis.* 2013; 34(2): 95–101.
20. Gaydos C.A., Solis M., Hsieh Y.H. et al. Use of tablet-based kiosks in the emergency department to guide patient HIV self-testing with a point-of-care oral fluid test. *Int. J. STD AIDS.* 2013; 24(9): 716–21.
21. Visseaux B., Larrouy L., Calin R. et al. Anti-hepatitis C virus antibody detection in oral fluid: influence of human immunodeficiency virus co-infection. *J. Clin. Virol.* 2013; 58(2): 385–90.
22. Walsh J.M. New technology and new initiatives in U.S. workplace testing. *Forensic Sci. Int.* 2008; 174(2-3): 120–4.
23. Kuwayama K., Miyaguchi H., Yamamoto T. et al. Effectiveness of saliva and fingerprints as alternative specimens to urine and blood in forensic drug testing. *Drug. Test. Anal.* 2016; 8(7): 644–51.
24. Pellicano R., Vanni E., Palmas F. et al. Diagnosis of Helicobacter pylori infection: validation of a commercial noninvasive salivary test against urea breathe test and serology. *Minerva Gastroenterol. Dietol.* 2001; 47(3): 111–6.
25. Jaspard M., Le Moal G., Saberan-Roncato M. et al. Finger-stick whole blood HIV-1/-2 home-use tests are more sensitive than oral fluid-based in-home HIV tests. *PLoS One.* 2014; 9(6): e101148.
26. Rakesh N., Shetty S., Sujatha S. et al. Assessment of the accuracy of whole blood/serum Point-of-care HIV three-dot test for oral fluid specimens. *Curr. HIV Res.* 2016; 14(4): 354–9.
27. Warren L., Slibinskas R., Chua K.B. et al. A point-of-care test for measles diagnosis: detection of measles-specific IgM antibodies and viral nucleic acid. *Bull. World Health Organ.* 2011; 89(9): 675–82.
28. Old J.B., Schweers B. A., Boonlayangoor P.W., Reich K.A. Developmental validation of RSIDTM-Saliva: a lateral flow immunochromatographic strip test for the forensic detection of saliva. *J. Forensic Sci.* 2009; 54(4): 866–73.
29. Soong R.K., Bachand G.D., Neves H.P. et al. Powering an inorganic nanodevice with a biomolecular motor. *Science.* 2000; 290: 1555–8.
30. Du Y., Zhang W., Wang M.L. An on-chip disposable salivary glucose sensor for diabetes control. *J. Diabetes Sci. Technol.* 2016. 10(6): 1344–52.
31. Mishra S., Saadat D., Kwon O. et al. Recent advances in salivary cancer diagnostics enabled by biosensors and bioelectronics. *Biosens. Bioelectron.* 2016; 81: 181–97.
32. Wanklyn C., Burton D., Enston E. et al. Disposable screen-printed sensor for the electrochemical detection of delta-9-tetrahydrocannabinol in undiluted saliva. *Chem. Cent. J.* 2016; 10: eCollection 2016.
33. Aydin E.B., Aydin M., Sezgin M.K. A highly sensitive immunosensor based on ITO thin films covered by a new semi-conductive conjugated polymer for the determination of TNF α in human saliva and serum samples. *Biosens. Bioelectron.* 2017; 97: 169–76.
34. Anderson K., Poulter B., Dudgeon J. et al. A highly sensitive nonenzymatic glucose biosensor based on the regulatory effect of glucose on electrochemical behaviors of colloidal silver nanoparticles on MoS $_2$. *Sensors (Basel).* 2017; 17(8): pii: E1807.
35. Du Y., Zhang W., Wang M.L. An on-chip disposable salivary glucose sensor for diabetes control. *J. Diabetes Sci. Technol.* 2016; 10(6): 1344–52.
36. Dutta G., Nagarajan S., Lapidus L.J., Lillehoj P.B. Enzyme-free electrochemical immunosensor based on methylene blue and the

- electro-oxidation of hydrazine on Pt nanoparticles. *Biosens Bioelectron.* 2017; 92: 372–7.
37. Adornetto G., Fabiani L., Volpe G. et al. An electrochemical immunoassay for the screening of celiac disease in saliva samples. *Anal. Bioanal. Chem.* 2015; 407(23): 7189–96.
 38. Gill P., Ghaemi A. Nucleic acid isothermal amplification technologies – a review. *Nucleosides, Nucleotides and Nucleic Acids.* 2008; 27: 224–43.
 39. Liu C., Geva E., Mauk M. et al. An isothermal amplification reactor with an integrated isolation membrane for point-of-care detection of infectious diseases. *Analyst.* 2011; 136(10): 2069–76.
 40. Chen Z., Zhu H., Malamud D. et al. A rapid, self-confirming assay for HIV: simultaneous detection of anti-HIV antibodies and viral RNA. *J. AIDS Clin. Res.* 2016; pii: 540.
 41. Wang X., Yin F., Bi Y. et al. Rapid and sensitive detection of Zika virus by reverse transcription loop-mediated isothermal amplification. *J. Virol. Methods.* 2016; 238: 86–93.
 42. Chotiwan N., Brewster C.D., Magalhaes T. et al. Rapid and specific detection of Asian- and African-lineage Zika viruses. *Sci Transl Med.* 2017; 9(388): pii: eaag0538.
 43. Mauk M.G., Song J., Bau H.H., Liu C. Point-of-care molecular test for Zika infection. *Clin. Lab. Int.* 2017; 41: 25–7.
 44. Barbosa A.I., Reis N.M. A critical insight into the development pipeline of microfluidic immunoassay devices for the sensitive quantitation of protein biomarkers at the point of care. *Analyst.* 2017; P. 142(6): 858–82.
 45. Morbioli G.G., Mazzu-Nascimento T., Stockton A.M., Carrilho E. Technical aspects and challenges of colorimetric detection with microfluidic paper-based analytical devices (μ PADs) – a review. *Analytica Chimica Acta.* 2017; 970: 1–22.
 46. Mou L., Jiang X. Materials for microfluidic immunoassays: a review. *Adv. Healthc. Mater.* 2017; 6(15): 1601403.
 47. Dong T., Pires N.M.M. Immunodetection of salivary biomarkers by an optical microfluidic biosensor with polyethylenimine-modified polythiophene-C70 organic photodetectors. *Biosens. Bioelectron.* 2017; 94: 321–7.
 48. Pinto V., Sousa P., Catarino S.O., Correia-Neves M., Minas G. Microfluidic immunosensor for rapid and highly-sensitive salivary cortisol quantification. *Biosens Bioelectron.* 2017; 90: 308–13.
 49. Guo L., Wang Y., Zheng Y., et al. Study on the potential application of salivary inorganic anions in clinical diagnosis by capillary electrophoresis coupled with contactless conductivity detection. *J. Chromatogr. B. Analyt. Technol. Biomed. Life Sci.* 2016; 1014: 70–4.
 50. Zilberman Y., Sonkusale S.R. Microfluidic optoelectronic sensor for salivary diagnostics of stomach cancer. *Biosens. Bioelectron.* 2015; 67: 465–71.
 51. Oncescu V., O'Dell D., Erickson D. Smartphone based health accessory for colorimetric detection of biomarkers in sweat and saliva. *Lab. Chip.* 2013; 13(16): 3232–8.
 52. Carrio A., Sampedro C., Sanchez-Lopez J.L. et al. Automated low-cost smartphone-based lateral flow saliva test reader for drugs-of-abuse detection. *Sensors (Basel).* 2015; 15(11): 29569–93.
 53. Zhang D, Liu Q. Biosensors and bioelectronics on smartphone for portable biochemical detection. *Biosens. Bioelectron.* 2016; 75: 273–84.
 54. Jung Y., Kim J., Awofeso O. et al. Smartphone-based colorimetric analysis for detection of saliva alcohol concentration. *Appl. Opt.* 2015; 54(31): 9183–9.
 55. Roda A., Guardigli M., Calabria D. et al. A 3D-printed device for a smartphone-based chemiluminescence biosensor for lactate in oral fluid and sweat. *Analyst.* 2014; 139(24): 6494–501.
 56. Calabria D., Caliceti C., Zangheri M., et al. Smartphone-based enzymatic biosensor for oral fluid L-lactate detection in one minute using confined multilayer paper reflectometry. *Biosens. Bioelectron.* 2017; 94: 124–30.

Поступила 13.03.18

Принята к печати 13.04.18

©КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2018

УДК 616.12-008.331.1-092:612.67.06:612.015.3

Булгакова С.В., Гусякова О.А., Тренева Е.В., Захарова Н.О., Николаева А.В.

ВЛИЯНИЕ ЛИПИДНОГО ОБМЕНА НА ТЕМП СТАРЕНИЯ ПАЦИЕНТОВ С АРТЕРИАЛЬНОЙ ГИПЕРТОНИЕЙ

ФГБОУ ВО «Самарский государственный медицинский университет» Минздрава РФ, 443099, Самара, Россия

В настоящее время атеросклероз всё чаще позиционируется как естественный наследственно-детерминированный процесс, определяющий темп старения организма и продолжительность жизни. Цель исследования – изучить корреляционные взаимосвязи между показателями липидного профиля и темпом старения мужчин с артериальной гипертензией (АГ). Нами проведено одномоментное исследование 123 пациентов мужского пола (средний возраст $52,4 \pm 0,6$ года). Основную группу (I) составили пациенты с АГ II стадии высокого риска, контрольную (II) группу – 60 пациентов без клинико-инструментальных признаков сердечно-сосудистой патологии. Исследование липидного профиля осуществлялось на биохимическом автоанализаторе Hitastar 600 («Hitan GmbH», Германия) с изучением общего холестерина (ОХС), липопротеидов низкой плотности (ЛПНП), липопротеидов высокой плотности (ЛПВП), триглицеридов (ТГ), также проводился расчет коэффициента атерогенности (КА). Темп старения определялся на основании интегральной оценки биологического возраста (БВ) с использованием методики Киевского НИИ геронтологии. У пациентов с АГ прямая корреляционная зависимость умеренной силы между БВ и липидным обменом прослеживается с показателями ОХС ($r = 0,364$; $p = 0,003$), ЛПНП ($r = 0,359$; $p = 0,004$), ТГ ($r = 0,324$; $p = 0,010$) и КА ($r = 0,488$; $p < 0,001$). Обратная корреляционная связь отмечается с ЛПВП ($-0,446$; $p < 0,001$). У пациентов группы контроля прямая корреляционная зависимость умеренной силы БВ и липидного спектра отмечается также для атерогенных фракций липопротеидов и КА, обратная связь – для ЛПВП ($-0,623$; $p < 0,001$). На основании проведённого математического моделирования были составлены формулы для определения БВ рассмотренных групп пациентов с учётом показателей липидного профиля. Выполненный нами корреляционный анализ отражает вклад дислипидемии в развитие преждевременного старения организма, а математическое моделирование позволяет с помощью показателей липидного обмена проводить диагностику ускоренного старения пациентов.

Ключевые слова: липидный профиль; артериальная гипертензия; биологический возраст; ускоренное старение.

Для корреспонденции: Тренева Екатерина Вячеславовна, канд. мед. наук, ассистент кафедры гериатрии и возрастной эндокринологии; e-mail: eka1006@yandex.ru