

МИНОБРНАУКИ РОССИИ

Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение
высшего образования
**«САРАТОВСКИЙ НАЦИОНАЛЬНЫЙ ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ
ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ ИМЕНИ Н.Г. ЧЕРНЫШЕВСКОГО»**

Кафедра оптики и биофотоники

**Разработка системы определения общего и аллерген-специфического IgE в сыворотке
крови с использованием**

микроструктурных волноводов

**АВТОРЕФЕРАТ БАКАЛАВРСКОЙ (МАГИСТЕРСКОЙ, ДИПЛОМНОЙ)
РАБОТЫ**

студентки 4 курса 4082 Группы

направления (специальности) 12.03.04 «Биотехнические системы и технологии»

код и наименование направления (специальности)

Института физики

наименование факультета, института, колледжа

Шумариной Дарьи Валерьевны

фамилия, имя, отчество

Научный руководитель

Профессор, д. ф-м. н.

В. В. Тучин

должность, уч. степень, уч. звание

подпись, дата

инициалы, фамилия

Зав. кафедрой

Профессор, д. ф-м. н.

В. В. Тучин

должность, уч. степень, уч. звание

подпись, дата

инициалы, фамилия

Саратов 2023 год

Введение

Совершенствование микро- и наносистемной техники и сенсорных технологий приводит к созданию и внедрению микроаналитических систем, позволяющих перейти на новый уровень миниатюризации оборудования и точности измерений, для целей биологии и медицины.

Такими сенсорами являются фотонно-кристаллические волноводы (ФКВ). Фотонные кристаллы – это оптические материалы, диэлектрическая проницаемость которых меняется с периодом, сравнимым с длиной волны света, и имеющие связанную с периодичностью кристалла запрещенную зону в спектре собственных электромагнитных состояний кристалла. Фотонно-кристаллический волновод с полой сердцевиной – это оптический волновод, структурная оболочка которого представляет собой двумерный фотонный кристалл. Такая структура формируется укладкой симметрично или асимметрично расположенных вокруг сердцевины (дефекта микроструктуры, соответствующего одному или нескольким стеклянным цилиндрам) стеклянных капилляров круглой или шестигранной формы, создающих периодическую двумерную решетку [1].

Такие волноводы можно использовать как биологические сенсоры для измерения интенсивности света, коэффициента поглощения и пропускания различных жидких и газообразных анизотропных и изотропных веществ.

Цель работы: рассмотреть микроструктурный волновод, как биосенсор для ряда жидкых веществ. Использовать биосенсор на основе микроструктурного волновода, как устройство определения общего и аллерген-специфического иммуноглобулина Е (IgE) в крови волонтёров, испытывающих аллергические реакции. Сравнить привычный метод анализа крови на общий и аллерген-специфический IgE-антител, метод иммуноферментного анализа (ИФА) с методом на основе использования микроструктурных волноводов.

Задачи:

- Изучить литературу по теме исследования.
- Рассмотреть спектры различных жидкостей с использованием микроструктурного волновода.
- Провести исследования методом ИФА с использованием крови человека на наличие в ней общего иммуноглобулина Е.
- Провести исследования биосенсора на основе микроструктурных волноводов по определению общего иммуноглобулина Е в крови человека.
- Сравнить полученные калибровочные кривые и полученные значения общего IgE вышеупомянутыми методами.
- Провести исследования по определению аллерген-специфический иммуноглобулина Е (спец-IgE) в крови человека методом ИФА.
- Провести исследования биосенсора на основе микроструктурных волноводов по определению спец иммуноглобулина Е в крови человека.
- Сравнить полученные калибровочные кривые и полученные значения спец IgE вышеупомянутыми методами.
- Провести предварительную диагностику на возможные аллергические реакции у волонтёров. Сделать вывод по полученным результатам исследования.

Актуальность исследования: на данный момент диагностика аллергии у людей важна, так как при повышенном уровне IgE-антител в крови наблюдается астма, сенная лихорадка и другие аллергические реакции. Поэтому анализ крови на общий и спец IgE играет важную роль на начальном этапе ослабления аллергии у человека. Метод на основе микроструктурных волноводов имеет некоторые преимущества по сравнению с методом ИФА:

- 1) Высокая чувствительность микроструктурного волокна позволяет более точно определять концентрации IgE-антител.

2) Использование минимального количества исследуемого вещества.

Для проведения анализа с помощью микроструктурного волновода на один из аллергенов нужно примерно 10 мкл сыворотки крови волонтёра.

Структура ВКР

1. Введение	3
2. Обзор литературы	
2.1 Фотонные кристаллы в природе	5
2.2 Структура фотонных кристаллов	7
2.3 Структура фотонно-кристаллических волноводов (ФКВ)	10
2.4 Оптические свойства фотонных кристаллов	13
2.5 Оптические свойства микроструктурных волноводов	16
2.6 Производство микроструктурных волноводов	20
2.7 Биосенсоры на основе фотонных кристаллов	22
3. Основная часть	
3.1 Введение	
3.1.1 Рибофлавин-мононуклеотид	24
3.1.2 Глюкоза	27
3.1.3 Прогестерон	30
3.1.4 Железа (III) гидроксид декстран и цианокобаламиновая кислота	32
3.2 Аллергология	
3.2.1 Основы иммунологии с аллергологией	36
3.2.2 Основные свойства внутривенных иммуноглобулинов	41
3.2.3 Иммуноглобулин Е	42
3.2.4 Метод ИФА	44
3.2.5 Экспериментальные исследования по обнаружению общего IgE	44
3.2.5.1 Определение общего IgE методом ИФА	45
3.2.5.2 Определение общего IgE с использованием ФКВ	49
3.2.6 Экспериментальные исследования по обнаружению аллерген-специфического IgE в крови (спец-IgE)	52
3.2.6.1 Определение спец-IgE методом ИФА	52

3.2.6.2	Определение спец-IgE с использованием оптических волноводов	58
3.2.7	Выводы по общему и спец-IgE	63
4.	Заключение	64
5.	Список литературы	66

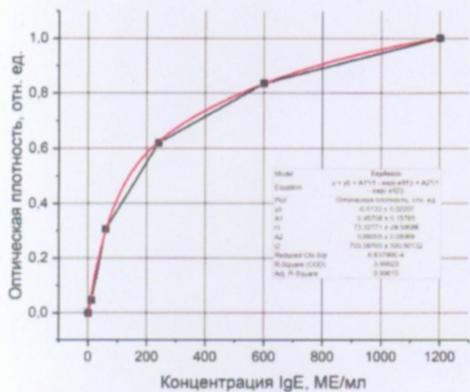
Эксперимент по обнаружению в крови общего и спец-IgE, методом ИФА

В соответствии с инструкциями [2,3] из наборов был проведен ИФА 3 тестовых образцов на общий и спец-IgE. Значения интенсивности проходящего света на длине волны 450 нм были использованы для построения калибровочных кривых. Значения оптической плотности были рассчитаны по формуле:

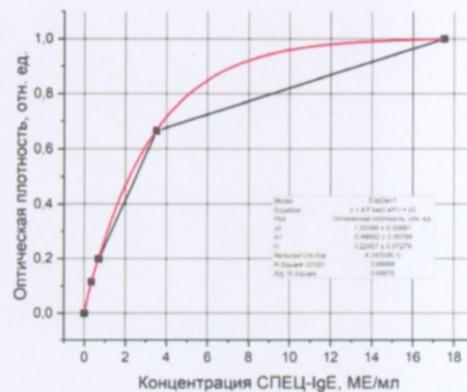
$$D = \log \frac{1}{T} = \log \frac{I_0}{I_{tr}},$$

где I_0 – интенсивность лампы, I_{tr} – интенсивность света, проходящего через исследуемую жидкость.

Калибровочные кривые были построены с использованием рассчитанных значений оптической плотности (рис. 1).



а



б

Рисунок 1. Зависимость оптической плотности проходящего света от концентрации общего IgE (а), спец-IgE (б), метод ИФА.

Используя экспоненциальную аппроксимацию калибровочной кривой, были рассчитаны значения оптической плотности для образцов крови волонтёров с значениями общего IgE и различными аллергенами, попадающие между калибровочными значениями.

На основании рассчитанных значений были определены концентрации общего и спец-IgE в тестируемых образцах на различные аллергены и диагностирована степень реакции организма на них:

Таблица 1. Значения оптической плотности и соответствующие значения концентрации общего IgE в крови волонтёров.

Волонтёры №	1	2	3
Оптическая плотность, отн. ед	1,107	0,988	1,018
Концентрация IgE, МЕ/мл	912	413	485

Таблица 2. Значения оптической плотности и соответствующие ей концентрации СПЕЦ-IgE крови волонтёров на различные аллергены.

Исследуемая жидкость	Опт. плотность, отн. ед.	Концентрация СПЕЦ-IgE, МЕ/мл	RAST-Класс
Контрольная сыворотка	0,67	3,53	3
1 Волонтёр	D1 0,62	3,56	3
	E1 0,45	1,90	2
	E2 0,45	1,92	2
	Gx 0,45	1,89	2
	Tx 0,45	1,96	2
	W56 0,46	1,97	2

2 Волонтёр	D1	0,94	9,12	3
	E1	0,94	9,09	3
	E2	0,48	2,11	2
	Gx	0,49	2,18	2
	Tx	0,46	1,97	2
	W56	0,48	2,13	2
3 Волонтёр	D1	0,78	4,86	3
	E1	0,58	2,80	2
	E2	0,46	1,99	2
	Gx	0,94	8,96	3
	Tx	0,45	1,90	2
	W56	0,49	2,18	2

Эксперимент методом микроструктурных волноводов

На положение областей пропускания оптического излучения и фотонной запрещенной зоны полого ФКВ оказывает большое влияние показатель преломления среды, заполняющей пространство полой сердцевины и каналов оболочки. Чувствительность спектральных характеристик ФКВ к физическим параметрам среды (газа или жидкости), заполняющей его внутреннюю структуру, обуславливает перспективность применения волноводов в аналитических устройствах (биологических чипах и сенсорах), используемых в биологии и медицине.

Удобство этого метода заключается в том, что для эксперимента с использованием биосенсоров на основе микроструктурного волновода с полой сердцевиной требуется ≈ 30 мкл исследуемой жидкости, что в несколько раз меньше, чем при привычном методе ИФА. Кроме того, волноводно-оптические биосенсоры обладают высокой чувствительностью к показателю преломления, коэффициенту поглощения и рассеяния среды внутри полой сердцевины, что

позволяет определять небольшую разницу в концентрациях исследуемых образцов.

В этой работе проводится эксперимент по обнаружению IgE-антител в крови человека с использованием кривой калибровочных образцов различных концентраций IgE с использованием микроструктурного волновода.

1. Для соответствия показателям преломления ($\pm 0,01$) калибровочные образцы и растворы сыворотки крови с коньюгатом (3 тестовых образцов) были разбавлены дистиллированной водой.
2. 2 мкл (сыворотки крови)+ 6 мкл (буфер Р)+ 40 мкл(коньюгата)+ 60 мкл (дист. воды) – 1, 3380 (показатель преломления)
3. Смешали нужные растворы для каждой сыворотки крови, проинкубировали в термостате 30 мин при 37°C
4. Приготовили кюветы для каждой калибровочной пробы и трёх растворов сывороток крови.
5. Сняли спектры пропускания для каждого образца
6. Обработали в OriginPro, и получили спектр пропускания света (рис. 2).
7. Значения интенсивности проходящего света были взяты при длине волны 450 нм для построения калибровочной кривой. Калибровочная кривая была задана с использованием значений интенсивности света (рис. 3).
8. Используя экспоненциальную аппроксимацию калибровочной кривой, были рассчитаны значения интенсивности света для образцов с концентрациями между калибровочными значениями. На основании рассчитанных значений в тестируемых образцах были обнаружены концентрации IgE:

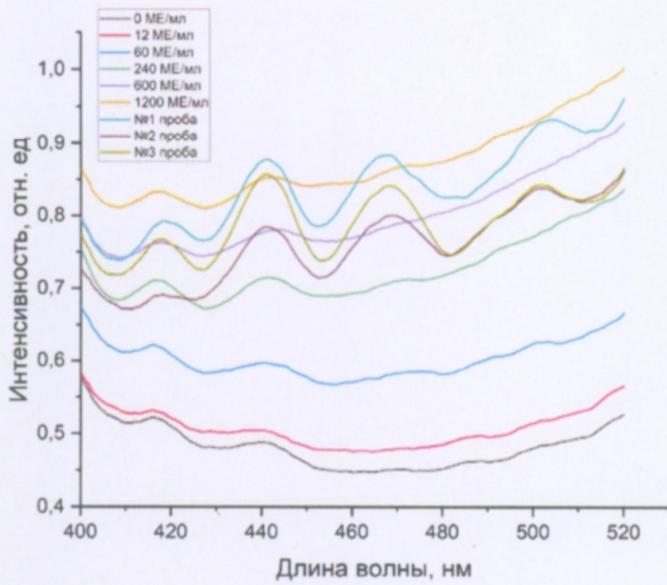


Рис. 2. Спектр пропускания исследуемых жидкостей через микроструктурный волновод в диапазоне 420-510 нм.

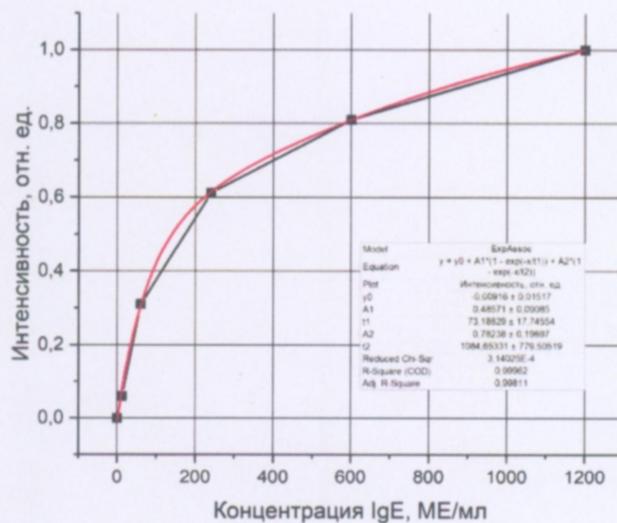


Рисунок 3. Зависимость интенсивности света от концентрации IgE метод мк-структурных волноводах.

Таблица 3. Значения интенсивности света и соответствующие значения концентрации общего IgE в крови волонтёров.

Волонтёры №	1	2	3
Интенсивность отн. Ед	0,230	0,208	0,209

Концентрация IgE, МЕ/мл	1117	472	506
-------------------------	------	-----	-----

Эксперимент по обнаружению в крови спец-IgE

Обнаружение в крови человека спец- IgE является одним из главных этапов по установке диагноза аллергии у пациента. Анализ на спец- IgE позволяет количественно определить концентрацию аллерген-специфического IgE в сыворотке крови.

В данном эксперименте использовалась та же сыворотка крови, что и в эксперименте по определению общего IgE в крови человека.

1. Т. к. показатели преломления совпали, разводить водой растворы не нужно.
2. Смешали растворы:
3. 20 мкл (калибровочная проба) + 40 мкл (био – антител)
4. 20 мкл (контрольная сыворотка) + 40 мкл (био – антител)
5. 20 мкл (исследуемая сыворотка) + 40 мкл (аллерген)
6. Для каждой исследуемой сыворотки крови с каждым имеющимся аллергеном
7. Инкубация проводилась по инструкции* с последующим внесением конъюгата (40 мкл) и снова инкубировалось
8. Был получен спектр пропускания света (рис. 4).
9. Значения интенсивности проходящего света были взяты при длине волны 450 нм для построения калибровочной кривой.
10. Калибровочная кривая была задана с использованием значений интенсивности света (рис. 5).
11. Используя экспоненциальную аппроксимацию калибровочной кривой были рассчитаны значения интенсивности света для образцов крови волонтёров с различными аллергенами, попадающие между калибровочными значениями.

12. На основании рассчитанных значений были определены концентрации спец-IgE в тестируемых образцах на различные аллергены и диагностирована степень реакции организма на них:

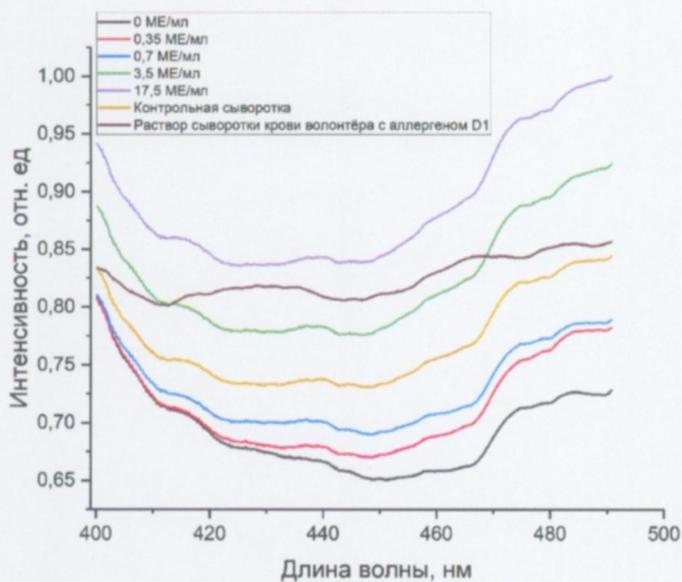


Рисунок 4. Спектр пропускания исследуемых жидкостей через микроструктурный волновод в диапазоне 420-510 нм.

13. Значения интенсивности проходящего света были взяты при длине волны 450 нм для построения калибровочной кривой. Калибровочная кривая была построена с использованием значений интенсивности света:

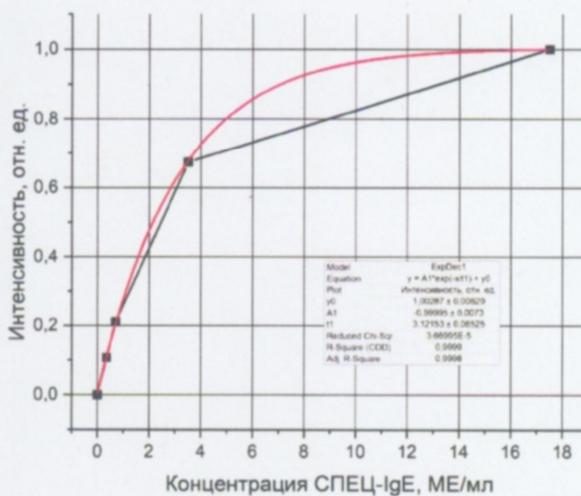


Рисунок 5. Зависимость интенсивности света от концентрации СПЕЦ-IgE, метод микроструктурных волноводов.

14. Используя экспоненциальную аппроксимацию калибровочной кривой, были получены значения интенсивности света. На основании рассчитанных значений были найдены концентрации СПЕЦ-IgE для каждой сыворотки крови волонтёров.

Таблица 4. Значения интенсивности света и соответствующие ей концентрации СПЕЦ-IgE крови волонтёров на различные аллергены.

Исследуемая жидкость		Интенсивность, отн. ед.	Концентрация СПЕЦ-IgE, МЕ/мл	RAST-Класс
Контрольная сыворотка		0,73	3,89	3
1 Волонтёр	D1	0,64	3,69	3
	E1	0,63	2,31	2
	E2	0,57	2,55	2
	Gx	0,56	2,31	2
	Tx	0,55	2,56	2
	W56	0,59	2,47	2
2 Волонтёр	D1	0,97	9,37	3
	E1	0,96	9,23	3
	E2	0,54	2,66	2
	Gx	0,56	2,65	2
	Tx	0,54	2,29	2
	W56	0,55	2,30	2
3 Волонтёр	D1	0,83	4,16	3
	E1	0,61	3,15	2
	E2	0,60	2,27	2
	Gx	0,96	9,27	3
	Tx	0,56	2,53	2
	W56	0,56	2,55	2

Вывод по общему и спец-IgE

На основе проведённых экспериментальных исследований по определению общего и спец-IgE можно сделать вывод, что анализ на общий IgE показал повышенную концентрацию IgE-антител у всех 3 волонтёров (норма до 130 МЕ/мл [2]). Максимальная концентрация у 1 волонтёра (1117 МЕ/мл), но у двух других значения также являются повышенными. Данный анализ даёт понять имеет ли определённый человек предрасположенность к аллергии и аллергическим реакциям.

Экспериментальные исследования по определению аллерген-специфического IgE у волонтёров показал, что очень высокой (выше 17,5 МЕ/мл) аллергической реакции на биотинилированные аллергены, такие как: D1 – клещ домашней пыли, E1 – эпидермис кошки, E2 – эпидермис собаки, Gx – смесь пыльцы злаков, Tx – смесь пыльцы деревьев, нет ни у кого. Высокая (от 3,5 до 17,5 МЕ/мл) аллергическая реакция наблюдается у 1 волонтёра на D1, у 2 волонтёра на D1 и E1, у 3 волонтёра на D1 и Gx. Средняя (от 0,7 до 3,5 МЕ/мл) аллергическая реакция у 1 волонтёра на E1, E2, Gx, Tx, W56, у 2 волонтёра на E2, Gx, Tx, W56, у 3 волонтёра на E1, E2, Tx, W56. Низкой (от 0,35 до 0,7 МЕ/мл) аллергической реакции нет ни у кого из волонтёров.

Таблица 5. Определение степени аллергической реакции [3].

RAST – Класс	Единицы, МЕ/мл	
	Нижний предел	Верхний предел
0 – неопределяемый	-	< 0,35
1 – низкий	0,35	0,7
2 – средний	0,7	3,5
3 – высокий	3,5	17,5
4 – очень высокий	17,5	-

Заключение

В заключение можно сказать, что диагностика аллергии у людей важна, так как при повышенном уровне в крови IgE-антител наблюдается астма, сенная лихорадка и другие аллергические реакции. Поэтому анализ крови на общий и спец-IgE играет важную роль на начальном этапе определения аллергии у человека. Привычным методом определения является иммуноферментный анализ, но представленный метод микроструктурных волноводов как биосенсоров не уступает ИФА и имеет некоторые преимущества:

1. Высокая чувствительность микроструктурных волноводов позволяет более точно определять концентрацию IgE-антител.
2. Требуется минимальное количество исследуемого вещества. Для проведения анализа с помощью микроструктурного волновода на один из аллергенов нужно примерно 10 мкл сыворотки крови волонтёра.

В итоге выше проведённых экспериментальных исследований видно, что у всех 3-х волонтёров высокая аллергическая реакция на клеща домашней пыли, и средняя аллергическая реакция на другие основные биотинилированные аллергены, что совпадает с результатами анализов, полученных из медицинского учреждения.

Были произведены корректировки в методике проведения исследований на общий и спец-IgE методом биосенсоров на основе ФКВ, так как для его проведения нужно меньшее количество исследуемого вещества.

Микроструктурные волноводы были рассмотрены как биосенсоры для таких жидкостей, как рибофлавин-мононуклеотид, глюкоза, прогестерон, железа (III) гидроксид декстран и цианокобаламиновая кислота и как метод определения общего и аллерген-специфического иммуноглобулина Е (IgE) в крови волонтёров, испытывающих аллергические реакции. Поставленные задачи выполнены и цель достигнута.

Список литературы

1. Определение концентрации глюкозы в биологических жидкостях при помощи фотонно-кристаллических волноводов / А.А.Занишевская, Малинин А.В., Ю.С. Скибина, В.В. Тучин, М.В. Чайников, В.И. Белоглазов, И.Ю. Силохин, А.М.Ермакова // Оптика и спектроскопия, 2013, том 115, №2, с.266-271
2. Инструкция по применению набора реагентов для иммуноферментного определения общего IgE в сыворотке крови ХЕМА
3. Инструкция по применению набора реагентов для иммуноферментного определения аллерген-специфического IgE в сыворотке крови ХЕМА

15.06.2023г.

Сусл