

Localization of Brodmann fields of human cerebral cortex projections on a scalp surface

N.N. Karkischenko, A.A. Vartanov, A.V. Vartanov, D.B. Chaivanov

In this paper we develop method of localizing projections of cortical areas on a scalp surface. Method uses co-planar stereotaxic atlas as a model of a human brain. Result is given in angular coordinates, which makes it invariant to the differences of a head size.

Key words: Brodman area, transcranial neurostimulation, neuronavigation

Сенсорный элемент на основе наночастиц золота для определения кардиомаркёров

А.А. Шумков, Е.В. Супрун, В.В. Шумянцева, А.И. Арчаков

Учреждение Российской академии медицинских наук Научно-исследовательский институт биомедицинской химии В.Н. Ореховича РАМН, Москва

Контактная информация: Андрей Алексеевич Шумков тел.: +7(499)-246-58-20; факс: +7(499)-245-08-57, sumkov@list.ru

Разработан метод определения кардиомаркёра тропонина I с помощью инверсионной вольтамперометрии (ИВА). Метод основан на регистрации сигнала золотых наночастиц (AuНЧ) на электродах с иммобилизованными антителами к тропонину I. Достоверный предел обнаружения тропонина I составил 3.46 нг/мл – 32 нг/мл (147 pM – 1.36 nM).

Ключевые слова: кардиомаркеры, инверсионная вольтамперометрия, золотые наночастицы, тропонин I, антитела.

Одной из основных причин смерти и инвалидности во всем мире продолжают оставаться болезни сердца. Некроз миокарда сопровождается появлением в крови специфичных биомаркёров – белков, высвобождающихся при разрушении миоцитов: миоглобина, сердечного тропонина и специфичных ферментов – креатинкиназы, лактатдегидрогеназы и др. [1]. В настоящее время биологические маркеры широко используются в кардиологии для диагностики острого коронарного синдрома, повреждения функции миокарда, а также для оценки прогноза

заболевания и развития осложнений. Однако, несмотря на это, не существует «идеального» кардиального маркера, который был бы высокочувствителен и информативен на ранних стадиях развития патологического процесса [2]. Тропонин I и T специфические маркёры повреждения ткани миокарда: их обнаружение в сыворотке крови является индикатором повреждения миокарда, и, следовательно, оба белка имеют большой потенциал в качестве определяемых сердечных биомаркёров [3, 4]. При инфаркте миокарда на 4-6 ч. количество тропонина I

начинает увеличиваться, и максимальная концентрация достигается через 12-24 ч [4]. Для селективного определения тропонина I использовали антитела (Ат) к данному белку. Тропонин T и I электронеактивные белки распределены в диапазоне потенциалов от -600 до +600 мВ, что делает невозможным прямое определение их в плазме крови по электрохимическим параметрам.

Цель исследования

Разработать методику определения тропонина I в плазме крови по регистрации сигнала AuНЧ на поверхности электрода с помощью ИВА.

Материалы и методы

Оборудование и реактивы

Электрохимические измерения были выполнены с использованием потенциостата «PGSTAT12 Autolab» (Eco Chemie, Utrecht, The Netherlands) с программным обеспечением «GPES». В работе использовались трехконтактные электроды, полученные методом трафаретной печати (ООО НПП «ЭЛКОМ», Москва), с графитовыми рабочим и вспомогательным электродами и хлорсеребряным электродом сравнения. Для измерения pH буфера использовался ионметр фирмы «Inolab». Спектрофотометрические измерения проводились с помощью спектрофотометра фирмы «Vari-an» – «Cary 100 Scan», с программным обеспечением «Cary WinUV». В работе пользовались следующие реактивы: Ат к тропонину I (17В), дидодецилдиметиламмоний бромид (ДДАБ) (Sigma), тетрахлорзолотая кислота (HAuCl₄) (Sigma), плазма крови здоровых доноров и доноров больных острым инфарктом миокарда (ОИМ)

с различной концентрацией [5]. AuНЧ получали путём электролиза из тетрахлорзолотой кислоты (HAuCl₄) при потенциале –500 мВ и временем электроосаждения 180 – 600 с.

Приготовление иммуносенсоров

На рабочую поверхность печатного графитового электрода модифицированного AuНЧ, полученного в ходе электроосаждения, наносили 1 мкл 0.1М ДДАБ и высушивали в течение 15 мин. Затем на рабочую поверхность наносили 1 мкл раствора Ат к тропонину I (120 нг/мкл) и высушивали в течение 20 мин. Приготовленный иммуносенсор оставляли на ночь в холодильнике при температуре 4°C.

Определение тропонина I с помощью иммуносенсоров

На рабочую поверхность иммуносенсора наносили 1 мкл плазмы крови здоровых или больных доноров ОИМ. Связывание белка со специфическими Ат проводилось при 37 °С в течение 50 мин. в термостате. Электрод перед измерением сигнала помещали в электрохимическую ячейку с 1 мл ФБ (0.1М K₂HPO₄ + 50 mM NaCl), pH=7,4 на 30 мин. при 37° С.

Электрохимические измерения

Сенсорный элемент после 30-минутной отмывки при 37°C закрепляли в электрохимической ячейке. Фоновая кривая (а) снималась в диапазоне сканирования от – 600 мВ до 600 мВ, v = 50 мВ/с, затем подавали потенциал +1,2 В, 30 с и регистрировали сигнал (b) в этом же диапазоне потенциалов. Аналитическим сигналом нам служила высота катодного пика восстановления AuНЧ, рассчитываемая по получен-

ной ВАГ ($\Delta H = H_{\text{сигнал}} - H_{\text{фон}}$) с использованием программы GPES к потенциостату «Autolab».

Результаты и их обсуждение

Было исследовано влияние температуры и времени инкубации на интенсивность сигнала, получаемого от АНЧ. На рис. 1 показан график зависимости величины сигнала от температуры и времени инкубации.

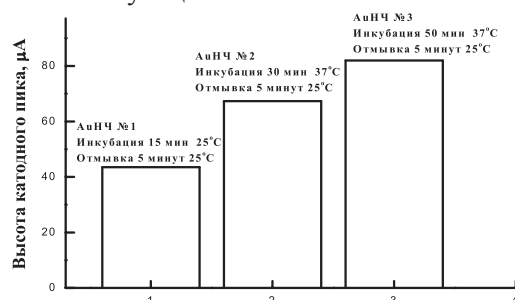


Рис. 1. Зависимость высоты катодного пика восстановления АНЧ с разным временем термообработки: 1) АНЧ №1 инкубация $t=15$ мин. 25°C отмывка $t=5$ мин. 25°C 2) АНЧ №2 инкубация $t=15$ мин. 37°C отмывка $t=5$ мин. 25°C 3) АНЧ №3 инкубация $t=45$ мин. 37°C отмывка $t=5$ мин. 25°C .

С увеличением температуры и времени инкубации электрохимический сигнал от АНЧ увеличивается. С целью установления оптимального времени электронанесения и объема ДДАБ был проведен следующий эксперимент: были взяты электроды с разным временем электронанесения (180 с и 600 с) и разным объемом ДДАБ (1 мкл и 2 мкл) (рис. 2).

Как видно из представленного рисунка, электрохимический сигнал, получаемый от АНЧ с 1 мкл, больше, чем для 2 мкл. Это связано с тем, что поверхностно-активные вещества снижают интенсивность сигнала АНЧ при измерении методом ИВА. Было рассчитано относительное стандартное отклонение (ОСО) для АНЧ с разным

временем электронанесения. Величина ОСО для АНЧ, полученных со временем электронанесения 180 с, составила 10%, а для 600 с – 15%. По этим данным были выбраны оптимальными условия получения электродов с АНЧ: время электролиза 180 с, время инкубации – 50 мин. при температуре 37°C , объем ДДАБ – 1 мкл.

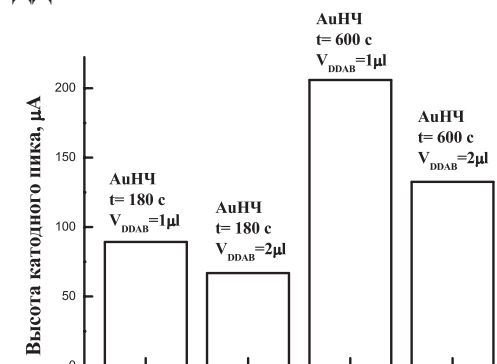


Рис. 2. Зависимость высоты катодного пика восстановления АНЧ при различных модификациях электродов АНЧ, полученных в ходе электролиза.

Метод инверсионной вольтамперометрии основан на катодном электрохимическом растворении определяемого вещества после предварительного концентрирования. Избирательное связывание тропонина I обеспечивалось с помощью Ат, иммобилизованных на электрод. На рис. 3 показан график зависимости концентрации тропонина I для

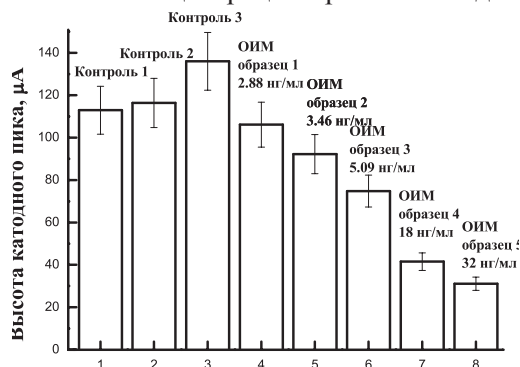


Рис. 3. Концентрационная зависимость тропонина I для здоровых доноров и доноров с ОИМ.

здоровых доноров и доноров больных ОИМ. Как видно из представленного рисунка, образцы плазмы крови больных доноров ОИМ и образцы плазмы крови здоровых доноров достоверно различаются между собой, также наблюдается концентрационная зависимость: чем больше белка в плазме крови, тем интенсивность сигнала, получаемая от АНЧ, меньше.

Заключение

Были разработаны условия получения нанопокртия АНЧ и электрохимический метод определения электроактивного белка на примере тропонина I. Интенсивность сигнала АНЧ, регистрируемая методом ИВА, зависит от концентрации тропонина I в плазме крови. Диапазон достоверно определяемых концентраций тропонина I составляет 3,46 – 32 нг/мл (0.14 pM – 134 pM).

Sensing device based on gold nanoparticles for detection of cardiac biomarkers

A.A. Shumkov, E.V. Suprun, V.V. Shumyantseva, A.I. Archakov

We developed electrochemical method for the determination of cardiac markers troponin I in blood plasma. This approach based on registration of gold nanoparticles on the electrode surface by means of cathodic stripping voltammetry. Electrode surface was modified with antibodies to cardiac troponin I. Sensitivity of proposed method corresponds to 3.46 ng / ml - 32 ng / ml (147 pM – 1.36 nM).

Key words: cardiac markers, stripping voltammetry, gold nanoparticles, troponin I, antibodies.

Список литературы

1. Будников Г.К. Химический анализ в медицинской диагностике // М. – Наука. 2010.
2. Дементьева И.И. и др. Сердечный белок, связывающий жирные кислоты, в оценке повреждений миокарда в кардиологии и кардиохирургии // Врач скорой помощи, 2010. 1. Р. 53-58.
3. Mahmarian J.J. The troponin conundrum: clarification through stress myocardial perfusion SPECT// J Nucl Cardiol. 2007. 14(1). Р. 6-8.
4. McDonnell B. et al. Cardiac biomarkers and the case for point-of-care testing// Clin Biochem. 2009. 42(7-8). Р. 549-61.
5. Suprun E. et al. Electrochemical nanobiosensor for express diagnosis of acute myocardial infarction in undiluted plasma// Biosens Bioelectron. 2010. 25(7). Р. 1694-8.