

На правах рукописи

Орлов Алексей Владимирович

РАЗРАБОТКА МЕТОДОВ ИММУНОАНАЛИЗА С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ
МАГНИТНЫХ НАНОМАРКЕРОВ

Специальность 03.01.02 – «Биофизика»

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени
кандидата физико-математических наук

Москва 2013

Работа выполнена в Лаборатории биофотоники Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института общей физики им. А.М. Прохорова Российской академии наук (ИОФ РАН).

Научный руководитель: Никитин Петр Иванович, к.ф.-м.н., заведующий лабораторией биофотоники Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института общей физики им. А.М. Прохорова Российской академии наук

Официальные оппоненты: Морозов Виктор Николаевич, д. ф.-м. н., заведующий лабораторией наноструктур и нанотехнологий Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института теоретической и экспериментальной биофизики РАН

Еремин Сергей Александрович, д. х. н., руководитель группы иммунохимических методов анализа, кафедра химической энзимологии Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего профессионального образования Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова, химический факультет

Ведущая организация: Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова Российской академии наук

Защита диссертации состоится «__» _____ 20__ г. в __ часов на заседании диссертационного совета Д 501.001.96 в Федеральном государственном бюджетном образовательном учреждении высшего профессионального образования Московском государственном университете имени М.В. Ломоносова, биологический факультет, кафедра биофизики.

С диссертацией можно ознакомиться в научной библиотеке Московского государственного университета имени М.В.Ломоносова.

Автореферат разослан «__» _____ 20__ г.

Ученый секретарь
диссертационного совета,
доктор биологических наук

Страховская М.Г.

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность проблемы

В последние годы значительное внимание исследователей во всем мире уделяется разработке биофизических методов для высокочувствительной количественной регистрации биомолекул и их взаимодействий между собой. В частности, высокая востребованность со стороны таких отраслей, как фармацевтическая промышленность, медицинская диагностика, экологический мониторинг и др., диктует необходимость разработки точных и скоростных методов обнаружения белковых молекул в биологических образцах сложного состава (кровь, сыворотка, слюна, молоко и т.д.). Исследования в данном направлении требуют междисциплинарного подхода и чрезвычайно важны, поскольку их результаты могут использоваться для решения широкого круга научных и прикладных задач.

Одним из наиболее популярных методов детекции биомолекул является иммуноанализ. Традиционные количественные методы иммуноанализа, такие как иммуноферментный анализ, характеризуются длительным временем получения результата (не менее 2 ч). Относительно быстрые методы, позволяющие получить результат в течение 10 мин, например иммунохроматографический анализ, как правило, дают только качественную оценку в терминах "да/нет".

Перспективным подходом для увеличения чувствительности и сокращения времени иммуноанализа является использование магнитных наночастиц (МЧ) в качестве детектируемых меток. Одним из преимуществ таких меток является возможность их использования в непрозрачных или сильно рассеивающих средах, например, в сочетании с трехмерными твердыми фазами, где применение традиционных флуоресцентных и ферментных маркеров сильно ограничено.

Выбор метода детекции применяемых меток – один из факторов, оказывающих существенное влияние на эффективность иммуноанализа. Методы регистрации МЧ на основе гигантского магнитного сопротивления (ГМС), как правило, характеризуются невысоким соотношением сигнал/шум, требуют съемных электрических контактов со считывающим устройством и экономически неоправданны для однократных применений. Кроме того, ГМС-детекторы преимущественно используются в сочетании с магнитными кластерами, соизмеримыми по размеру с чувствительным элементом сенсора, что приводит к слабой зависимости сигналов от концентрации аналита и высокому неспецифическому связыванию. Одна из наиболее чувствительных методик регистрации МЧ, основанная на использовании криогенных сверхпроводящих квантовых интерференционных магнетометров, является достаточно дорогостоящей и труднодоступной для рутинного использования в медицинской диагностике и экологическом мониторинге. Таким образом,

разработка методов анализа, использующих магнитные частицы в качестве меток в сочетании методами регистрации таких меток, обеспечивающими высокую чувствительность, доступность и высокое отношение сигнал/шум, является перспективным направлением усовершенствования существующих подходов в иммуноанализе.

Одним из этапов разработки иммуноанализа является оптимизация его условий: выбор антител, способа их иммобилизации, времени инкубации и концентрации иммунореагентов, а также состава буферных и стабилизирующих растворов. Влияние каждого из этих параметров можно оценить с помощью меточных методов лишь на завершающей стадии иммуноанализа. Безметочные оптические методы могут значительно повысить эффективность разработки протокола иммуноанализа за счет количественного мониторинга в режиме реального времени взаимодействий между биомолекулами на каждой стадии анализа, а также сокращения времени и числа операций. Таким образом, развитие безметочных методик для изучения в реальном времени межмолекулярных взаимодействий также является актуальной задачей.

Цели и задачи работы

Цель работы состояла в разработке биофизических методов, основанных на использовании магнитных наночастиц в качестве детектируемых меток, для высокочувствительной количественной регистрации биомолекул и их взаимодействий между собой. Для достижения поставленной цели в работе решались следующие задачи:

- Разработка и верификация методики количественной оценки взаимодействия биомолекул между собой и с магнитными наночастицами путем мониторинга в режиме реального времени каждого этапа иммуноанализа с помощью спектрально-корреляционной интерферометрии.
- Изучение влияния магнитных наночастиц на предел детекции метода спектрально-корреляционной интерферометрии при их использовании для амплификации сигнала.
- Разработка метода детекции биомолекул, основанного на использовании непрозрачных объемных волоконных фильтров в качестве твердой фазы иммуноанализа в сочетании с использованием магнитных наномаркеров.
- Разработка метода детекции биомолекул, основанного на принципе иммунохроматографии с использованием МЧ в качестве меток в сочетании с методом регистрации нелинейных магнитных материалов на комбинаторных частотах.

Научная новизна и практическая значимость

Разработан метод регистрации биомолекул, обладающий оригинальным сочетанием аналитических характеристик: а) широким линейным диапазоном, составляющим более 3 порядков концентрации аналита; б) малой продолжительностью анализа; в) возможностью

анализировать образцы практически любого объема, причем чувствительность метода растет при увеличении объема образца; г) отсутствием пробоподготовки для биологических образцов сложного состава, например, цельного молока. Данные свойства метода продемонстрированы на примере детекции токсинов, продуцируемых бактериями Золотистого стафилококка. Новизна метода заключается в применении объемных волоконных фильтров в качестве твердой фазы анализа в сочетании с использованием магнитных наномаркеров, регистрируемых со всего объема фильтров методом детекции нелинейных магнетиков на комбинаторных частотах. Применение фильтров обеспечивает большую реакционную поверхность твердой фазы – 20 см^2 в объеме около 35 мкл, а также быструю иммунофильтрацию антигена непосредственно в ходе анализа. Применяемый подход для регистрации МЧ характеризуется высоким отношением сигнал/шум, поскольку окружающие диа- и парамагнитные материалы, такие как стекло, вода и пластик, не вносят вклад в детектируемый сигнал.

Разработан количественный метод иммунохроматографического анализа с использованием магнитных наномаркеров для регистрации в сыворотке крови человека онкомаркера – простатического специфического антигена (ПСА). Данный метод совмещает преимущества лабораторных методов и экспресс-тестов: он обладает высокой чувствительностью и позволяет получать количественные результаты при простоте использования и коротком времени получения результата.

Оба разработанных метода иммуноанализа могут найти практическое применение в области диагностики заболеваний, как в лабораторных, так и домашних условиях, а также для контроля пищевой продукции и в ветеринарии.

Разработана методика для количественного изучения взаимодействия биомолекул с целью мониторинга каждой стадии иммуноанализа. Методика основана на принципе спектрально-корреляционной интерферометрии с использованием в качестве сенсорных чипов стандартных микроскопных покровных стекол. Методика успешно испытана на примере изучения влияния пептидного фрагмента (65–76) С-концевого домена моноцитарного хемотаксического белка-1 (MCP-1) на взаимодействие MCP-1 с гепарином, а также для изучения обратимых конформационных изменений полимерных структур на поверхности стекла. Полученные результаты подтверждены независимыми методами: вискозиметрией, эллипсометрией, сканирующей электронной микроскопией, иммуноферментным анализом. Продемонстрирована возможность количественного мониторинга каждого этапа иммуноанализа с использованием магнитных наночастиц в качестве меток. Оригинальность разработанного подхода заключается в возможности регистрации в реальном времени взаимодействия между биомолекулами непосредственно на

стеклянной поверхности без нанесения дополнительных проводящих пленок. Разработанная методика может найти применение как для разработки новых методов иммуноанализа, так и для широкого круга приложений, требующих количественной оценки межмолекулярных взаимодействий.

На примере детекции кардиомаркера сердечного тропонина I (сТнI) показано, что применение магнитных наночастиц в качестве меток приводит к усилению сигнала спектрально-корреляционной интерферометрии, причем использование магнитных наномаркеров приводит к увеличению чувствительности по сравнению с безметочной регистрацией примерно в 100 раз. Динамический диапазон составил около 3 порядков величины концентрации. Благодаря высокой чувствительности и широкому динамическому диапазону, разработанный метод может рассматриваться в качестве привлекательного инструмента с широкодоступными и низкокзатратными расходными материалами (одноразовыми сенсорными чипами) для проведения иммуноанализа в реальном времени в таких областях, как диагностика заболеваний, регистрация патогенов в продуктах питания, мониторинг окружающей среды.

Положения, выносимые на защиту

1. Разработан метод регистрации биомолекул с использованием магнитных наночастиц в качестве меток, которые регистрируются со всего объема твердой фазы по нелинейному перемагничиванию на комбинаторных частотах. Метод основан на применении в качестве твердой фазы непрозрачных объемных волоконных фильтров с развитой площадью реакционной поверхности. На примере определения непосредственно в цельном молоке стафилококковых токсинов, энтеротоксина А (СЭА) и токсина синдрома тканевого шока (ТСТШ):

а. Показано, что за счет концентрирования регистрируемых токсинов из анализируемой пробы на волоконной твердой фазе в процессе иммунофльтрации чувствительность метода растет с увеличением объема пробы. В результате, при времени анализа 2 ч и объеме пробы 30 мл достигнут предел детекции для ТСТШ – 4 пг/мл и для СЭА – 10 пг/мл.

б. Установлено, что иммунофльтрация в процессе инкубации иммунореагентов с волоконной твердой фазой во время анализа позволяет сократить время каждой инкубации до нескольких минут. В результате, при времени анализа 25 мин и объеме пробы 150 мкл предел детекции ТСТШ составил 0,1 нг/мл, СЭА – 0,3 нг/мл.

в. Показано, что использование волоконной твердой фазы с развитой площадью реакционной поверхности (20 см² при объеме около 35 мкл) обеспечивает широкий линейный диапазон разработанного метода. Так, продемонстрирована близкая к

линейной зависимости регистрируемых на комбинаторных частотах сигналов от изменения концентрации аналита в диапазоне изменения концентрации более чем на 3 порядка.

2. Разработан количественный экспресс-метод детекции онкомаркера – простатического специфического антигена (ПСА) – в сыворотке крови человека на основе иммунохроматографического анализа с использованием магнитных наномаркеров. Показано, что предел количественной детекции ПСА составляет 30 пг/мл, динамический диапазон – более 2 порядков величины концентраций.

3. Установлено, что магнитные наночастицы диаметром ~ 50 нм, используемые для амплификации сигнала при детекции сердечного тропонина I с помощью спектрально-корреляционной интерферометрии, вызывают улучшение предела детекции более чем в 100 раз по сравнению с безметочной регистрацией. Показано, что в результате такой амплификации достигается предел детекции сердечного тропонина I 0,1 нг/мл в динамическом диапазоне около 3 порядков величины концентрации.

4. На основе спектрально-корреляционной интерферометрии развита методика количественной оценки взаимодействия между биомолекулами и конформационных изменений биополимеров. Эффективность методики экспериментально продемонстрирована для исследования влияния пептидного фрагмента (65–76) С-концевого домена моноцитарного хемотаксического белка-1 (MCP-1) на взаимодействие MCP-1 с гепарином, а также для изучения обратимых изменений конформации сополимеров N,N-диметилакриламида и N-акрилоил-m-аминофенилборной кислоты, привитых на стеклянную поверхность. Показано, что результаты, полученные с помощью спектрально-корреляционной интерферометрии, находятся в хорошем соответствии с данными, полученными независимо методами вискозиметрии, эллипсометрии, иммуноферментного анализа, сканирующей электронной микроскопии.

Апробация результатов

Результаты работы были представлены на 13 российских и международных конференциях: 9th European Magnetic Sensors and Actuators Conference (Prague, Czech Republic, 1-4 July 2012), 9th International Conference on the Scientific and Clinical Applications of Magnetic Carriers – Minneapolis (Minnesota, U.S.A., 22-26 May 2012), XI Conference on Optical Chemical Sensors and Biosensors (Barcelona, Spain, 1-4 April 2012), III Международный Симпозиум «Актуальные проблемы биофотоники – 2011» (Санкт-Петербург – Нижний Новгород, 16-22 июля 2011), Московский международный симпозиум по магнетизму (Москва, 21-25 августа 2011), IV Международный конкурс научных работ молодых ученых в области нанотехнологий RUSNANOTECH 2011 (Москва, 26–28 октября 2011), 54-й научная

конференция МФТИ (Москва-Долгопрудный, 10-30 ноября 2011), 8th European Conference on “Magnetic Sensors and Actuators” (Bodrum, Turkey, 4-7 July 2010), III Международный конкурс научных работ молодых ученых в области нанотехнологий RUSNANOTECH 2011 (Москва, 1-3 ноября 2010), III Евразийский конгресс «Медицинская физика – 2010» (Москва, 21-25 июня 2010), 8th International Conference on the Scientific and Clinical Applications of Magnetic Carriers (Rostock, Germany, May 2010), 10th European Conference on Optical Chemical Sensors and Biosensors. EUROPT(R)ODE X (Prague, Czech Republic, 28-31 March 2010), 52-й научная конференция МФТИ (Москва-Долгопрудный, 27-30 ноября 2009).

Публикации

По теме диссертации опубликовано 5 работ в научных журналах из перечня ведущих рецензируемых изданий, рекомендованных ВАК, и 16 тезисов докладов в сборниках трудов конференций.

Структура и объем работ

Диссертация состоит из введения, основной части из пяти глав, заключения, списка цитируемой литературы, в который входит 157 источников. Работа изложена на 131 странице, содержит 49 рисунков и 5 таблиц.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

В первой главе представлен анализ литературных данных об основных методах изучения межмолекулярных взаимодействий и методах детекции, применяемых в иммуноанализе, а также методах регистрации магнитных частиц. Представлены сведения о традиционных методах, основных типах, форматах и количественных характеристиках иммуноанализа.

Во второй главе представлены результаты, посвященные разработке и верификации метода изучения взаимодействий между биомолекулами в режиме реального времени с помощью спектрально-корреляционной интерферометрии (СКИ). Подтверждена эффективность данного метода путем сравнения полученных с его помощью результатов с данными, полученными независимыми методами вискозиметрии, эллипсометрии, иммуноферментного анализа, сканирующей электронной микроскопии.

Приведено описание применяемой в работе биосенсорной системы, основанной на принципе СКИ, позволяющей использовать в качестве расходных сенсорных чипов доступные микроскопные покровные стекла без нанесения каких-либо пленок. Метод СКИ использует два интерферометра Фабри-Перо в оригинальной оптической схеме с применением излучения суперлюминисцентных диодов. База первого интерферометра (расстояние между зеркалами) периодически изменяется с помощью пьезоэлектрического преобразователя. Роль второго интерферометра и сенсорного чипа выполняет микроскопное

покрывное стекло с иммобилизованными на поверхности рецепторными молекулами. Такие стекла при толщине около 100 мкм являются приемлемыми интерферометрами Фабри-Перо при условии, что размер каждой отдельной зоны наблюдения составляет 2-8 мм. Метод СКИ использует интерференцию между опорным лучом, отраженным от нижней поверхности покрывного стекла, и зондирующим лучом, отраженным от верхней поверхности стекла с биораспознающими молекулами (рис. 1). В ходе исследуемой биохимической реакции на сенсорном чипе происходит присоединение биомолекул из раствора (лигандов) к рецепторным молекулам, что увеличивает оптический путь зондирующего луча, отраженного от границы “жидкость – биослой”. Результат интерференции двух лучей зависит от толщины биологического слоя, изменение которой в ходе реакции вычисляется по изменению фазы корреляционного сигнала при сканировании базы первого интерферометра. Такой принцип регистрации делает результат независимым от объемного показателя преломления образца и температурных дрейфов.

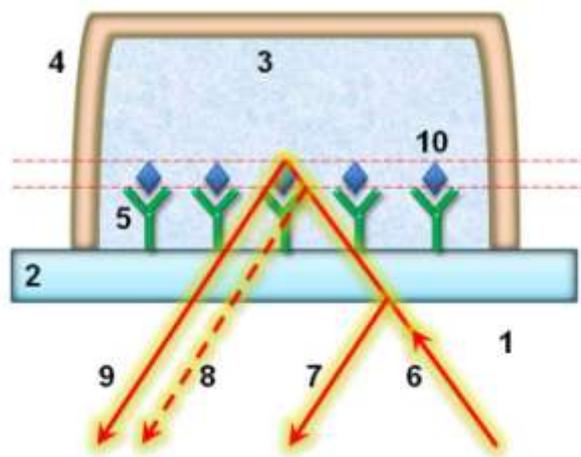


Рисунок 1. Принцип спектрально-корреляционной интерферометрии, применяемый для изучения взаимодействий между биомолекулами. Изменение оптической толщины биослоя регистрируется по спектру интерферирующих лучей, отраженных от сенсорного чипа: 1 – воздух; 2 – покрывное микроскопное стекло; 3 – исследуемый раствор; 4 – проточный сенсорный канал; 5 – рецепторные молекулы; 6 – падающий луч излучения суперлюминесцентного светодиода; 7, 9 – отраженные лучи; 8 – положение отраженного луча до биохимической реакции; 10 – регистрируемые биомолекулы.

Обнаружены обратимые изменения толщины “полимерных щеток”: сополимеров N,N-диметилакриламида (DMAAm) и N-акрилоил-m-аминофенилборной (NAAPBA) кислоты, использованных в качестве модельных объектов для верификации метода СКИ. Установлено, что толщина таких полимеров, иммобилизованных на стеклянной поверхности, увеличивалась на 0,5-1 нм при смене состава водного окружения с деионизованной воды на бикарбонатный буфер, и вновь уменьшалась при обратной смене растворов (рис. 2Б). Данный эффект, видимо, вызван конформационными изменениями полимеров, являющихся слабыми полиэлектролитами. В деионизованной воде незаряженные молекулы принимают неупорядоченную конформацию клубков, в то время как в 0,1 М бикарбонатном буфере (рН

9,2) отрицательно заряженные остатки фенилборной кислоты, отталкиваясь друг от друга, вызывают “выпрямление” молекул полимера (рис. 2А). Схожее изменение гидродинамического радиуса данных сополимеров зарегистрировано с помощью независимого метода вискозиметрии. Показано, что углевод-специфичное взаимодействие остатков борной кислоты в составе DMAAm/NAAPBA сополимера с гликопротеином муцином вызвало дальнейшее увеличение толщины полимерных щеток на $1,5 \pm 0,3$ нм (рис. 2В). Установлено, что плотность иммобилизованного слоя муцина составила $150\text{--}200$ нг/см², что в несколько раз превышает плотность гидрофобной адсорбции муцина на полимерные покрытия.

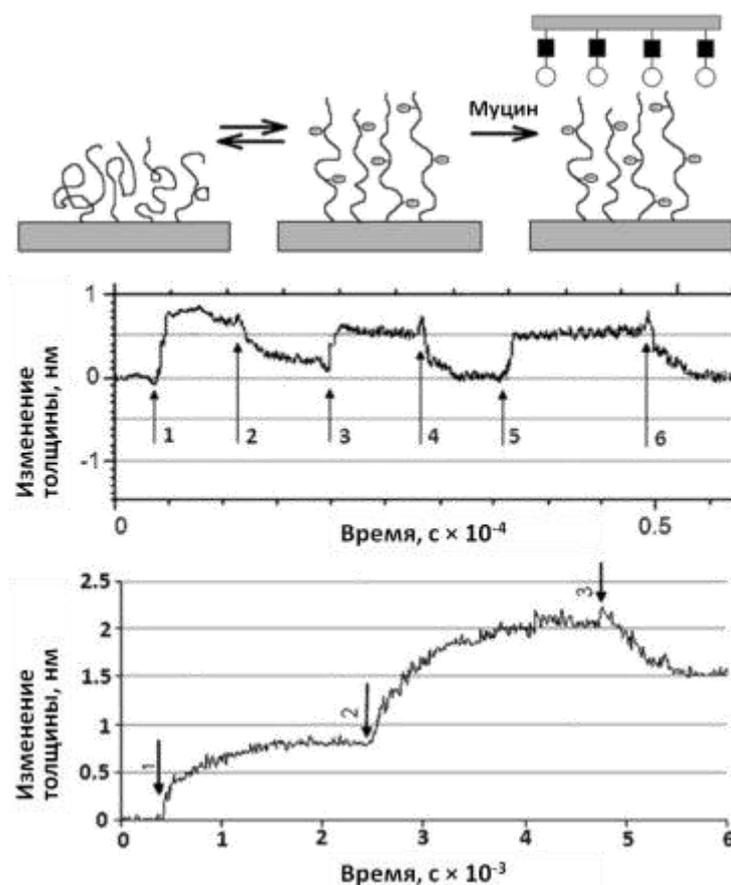


Рисунок 2. Регистрация конформационных изменений полимеров с помощью метода СКИ: а) – схема изменения конформации сополимеров, содержащих фенилборную кислоту, иммобилизованных на стеклянной поверхности, с изменением водного окружения и последующего связывания муцина; б) – сенсограмма, демонстрирующая обратимые изменения конформации полимера. Стрелками 1, 3, 5 указано введение бикарбонатного буфера рН 9,2. Стрелками 2, 4, 6 указано введение дистиллированной воды рН 5,5; в) – сенсограмма, демонстрирующая связывание полимера с муцином.

Показана возможность количественной регистрации взаимодействия между биомолекулами с помощью метода СКИ на примере изучения влияния пептидного фрагмента (65–76) С-концевого домена моноцитарного хемотаксического белка-1 (MCP-1) на взаимодействие MCP-1 с гепарином. В экспериментах обнаружено, что по мере увеличения концентрации MCP-1 наблюдается возрастание толщины молекулярного слоя

при связывании белка с гепарином, а также при связывании этого комплекса с моноклональными антителами мыши к МСР-1 человека (рис. 3, кривая 1). Кинетическая константа ассоциации 576 нМ МСР-1 с гепарином, рассчитанная с использованием величин начальных скоростей равна $0,18 \cdot 10^5 \text{ с}^{-1} \cdot \text{М}^{-1}$. Константа диссоциации связывания МСР-1 с гепарином составила 0,44 мкМ, что согласуется с данными по низкоаффинному связыванию ряда хемокинов с гликозаминогликанами. При добавлении пептида зарегистрированы очень низкие ответы на посадку практически всех концентраций МСР-1 и близкие по значениям небольшие ответы (около 0,15 нм) на нанесение антител (рис. 3, кривая 2). Таким образом, пептид препятствовал связыванию МСР-1 с гепарином.

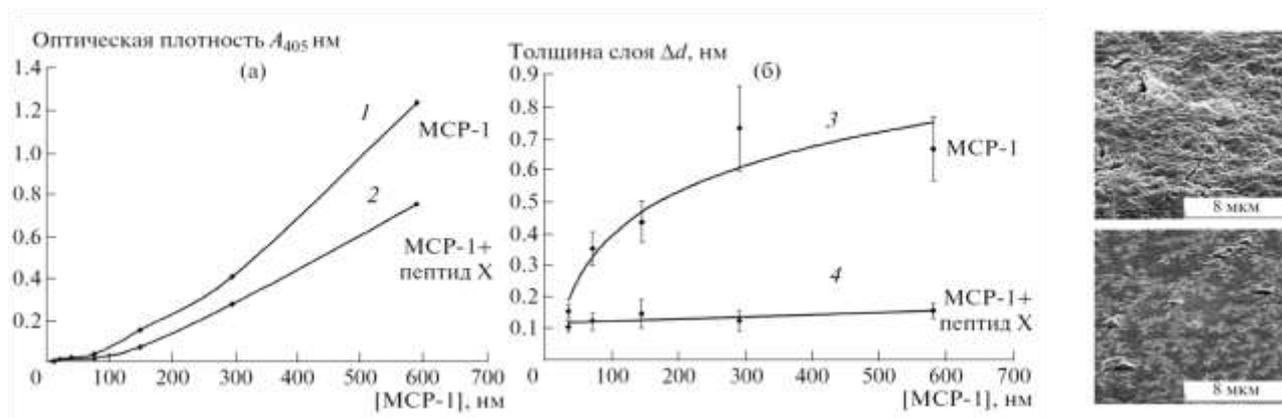


Рисунок 3. Ингибирующее влияние пептидного фрагмента МСР-1: а) – изменения в связывании МСР-1 с гепарином в зависимости от концентрации МСР-1 без пептида (1) и при добавлении пептида в концентрации 100 мкМ (2) по данным ИФА; б) – изменения в связывании МСР-1 с гепарином (по проявлению антителами) в зависимости от концентрации МСР-1 без пептида (3) и при добавлении пептида в концентрации 100 мкМ (4) по данным изменения толщины Δd антител, полученным с помощью СКИ. В – микрофотографии поверхностей стекла, демонстрирующие связывание МСР-1 с гепарином в отсутствие (сверху) и в присутствии (снизу) пептида, полученные с помощью сканирующего электронного микроскопа

Третья глава посвящена количественному мониторингу каждой стадии иммуноанализа с помощью метода СКИ и амплификации СКИ-сигнала за счет использования магнитных наночастиц.

Получены сенсограммы, которые демонстрируют все этапы магнитного сэндвич-иммуноанализа при детекции 300 нг/мл раствора сТН1 на сенсорных чипах с эпоксилированной и биотинилированной поверхностями (рис. 4). Для анализа на чипе с эпоксилированной поверхностью использовались ковалентно иммобилизованные нативные антитела АТ1, биотинилированные детектирующие антитела АТ2 и МЧ, покрытые стрептавидином. Во избежание неспецифических сигналов из-за непосредственного связывания частиц со свободными молекулами биотина, на биотинилированной поверхности иммобилизовывались антитела АТ1 изотипа IgG2b, в качестве детектирующих применялись антитела АТ2 изотипа IgG1, а также использовался другой тип магнитных частиц,

специфично распознающих этот изотип антител АТ₂ (рис. 4). Установлено, что в сенсограммах, полученных на разных поверхностях при одинаковой концентрации антигена, отличия, проявляющиеся на этапах АГ и АТ₂, становятся еще более существенными на этапе МЧ. Так, из рис. 4 следует, что скорость связывания МЧ, конъюгированных со стрептавидином, выше скорости связывания МЧ, на поверхности которых находятся антитела к изотипу детектирующих антител. Это связано, во-первых, с различной эффективностью сорбции антител на сенсорный чип. Во-вторых, кинетическая константа ассоциации стрептавидина с биотином на несколько порядков выше, чем у моноклональных антител с антигеном. Это обеспечивает более сильное и быстрое связывание МЧ, покрытых стрептавидином, по сравнению с МЧ, покрытых антителами.

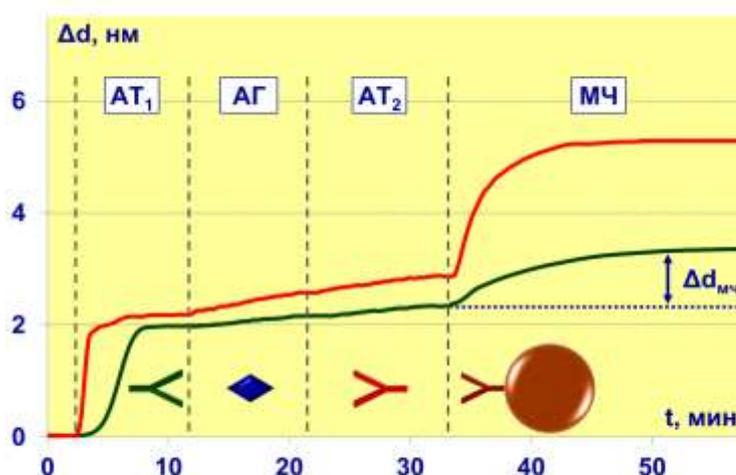


Рисунок 4. Сенсограммы, демонстрирующие все этапы магнитного иммуноанализа на биотинилированной (нижняя зеленая кривая) и эпоксилированной (верхняя красная кривая) поверхностях сенсорного чипа: АТ₁ – иммобилизация антител, АГ – связывание антигена (сТнI) с иммобилизованными антителами, АТ₂ – распознавание детектирующими антителами другого эпитопа антигена, МЧ – ассоциация магнитных наночастиц с детектирующими антителами.

Экспериментально установлены наблюдаемые кинетические константы ассоциации (табл. 1), оцененные для каждого этапа анализа при помощи сенсограмм, регистрируемых методом СКИ (рис. 4). Для обеих схем иммобилизации антител на этапе МЧ наблюдаемые кинетические константы ассоциации выше на 2-3 порядка, чем на предыдущих этапах, несмотря на то, что на каждом следующем шаге анализа этот параметр ниже истинного значения из-за диссоциации комплексов, образованных на предыдущем шаге. Столь хорошие кинетические характеристики связывания МЧ по сравнению с молекулами антител и антигенов по-видимому, связаны с поливалентностью МЧ. Несколько биораспознающих молекул, одновременно связанных с одной частицей, обеспечивают более высокую вероятность эффективного соударения МЧ с поверхностью сенсорного чипа.

Таблица 1. Наблюдаемая кинетическая константа ассоциации для каждого этапа магнитного иммуноанализа в зависимости от типа поверхности

Тип поверхности	Наблюдаемая кинетическая константа ассоциации, $M^{-1}s^{-1}$		
	Этап АГ	Этап АТ ₂	Этап МЧ
Эпоксированная	$(6,4 \pm 1,3) \times 10^5$	$(1,2 \pm 0,2) \times 10^5$	$(1,6 \pm 0,2) \times 10^8$
Биотинилированная	$(8,2 \pm 1,9) \times 10^5$	$(1,7 \pm 0,3) \times 10^5$	$(6,4 \pm 1,1) \times 10^7$

Полученные результаты позволяют оценивать кинетические характеристики взаимодействия биомолекул не только между собой, но и с магнитными частицами. Существенно больший прирост толщины биослоя на этапе пропускания МЧ по сравнению с этапами связывания антигена и детектирующих антител объясняется тем, что диаметр частиц (50 нм) существенно больше характерных размеров детектируемых биомолекул (10 нм).

Получены зависимости прироста биослоя на эпоксированной поверхности на этапах пропускания антигена и магнитных наночастиц от концентрации тропонина (рис. 5). По критерию 2σ определен предел детекции сТНІ: 20 нг/мл при безметочной регистрации и 0,1 нг/мл при использовании МЧ. Таким образом, полученные результаты демонстрируют, что использование МЧ вызывает амплификацию сигнала спектрально-корреляционной интерферометрии, что приводит к дополнительному улучшению предела детекции сердечного тропонина более чем в 100 раз.



Рисунок 5. Зависимости прироста биослоя на эпоксированной поверхности сенсорного чипа на этапах пропускания антигена (правая зеленая кривая) и магнитных наночастиц (левая красная кривая) при регистрации сердечного тропонина.

Четвертая глава посвящена разработке метода магнитного иммуноанализа (МИА) для определения стафилококковых токсинов в сложных средах практически любого объема. С помощью методики количественного наблюдения за всеми шагами реакции, разработанной в третьей главе, выбраны оптимальные для проведения иммуноанализа пары антител, обладающие наибольшим отношением специфического сигнала к

неспецифическому. Разработанный метод МИА основан на высокочувствительной регистрации магнитных наночастиц по их нелинейному намагничиванию, причем чувствительность метода растет при увеличении объема анализируемых образцов.

Представлен метод детектирования магнитных наночастиц, используемый для количественной детекции МЧ, применяемых в качестве маркеров биохимических реакций. Метод основан на регистрации нелинейного отклика суперпарамагнитных МЧ, помещенных в магнитное поле, генерируемое на двух частотах f_0 и f_1 . Сигнал, пропорциональный количеству магнитных частиц, регистрируется на комбинаторной частоте $f_i \pm 2f_0$ (рис. 6). Предел детекции МЧ такого метода при комнатной температуре составляет 3 нг магнитного материала Fe_3O_4 в объеме 0,1-0,5 мл, что совпадает с порогом детекции радиоактивного метода по сопутствующему γ -излучению. Линейный диапазон метода составляет 4-5 порядков величины. Данный метод регистрации характеризуется высоким отношением сигнал/шум, поскольку окружающие диа- и парамагнитные материалы, такие как стекло, вода и пластик, не вносят вклад в сигнал, даже если их количество в зоне регистрации на 8 порядков больше количества МЧ.

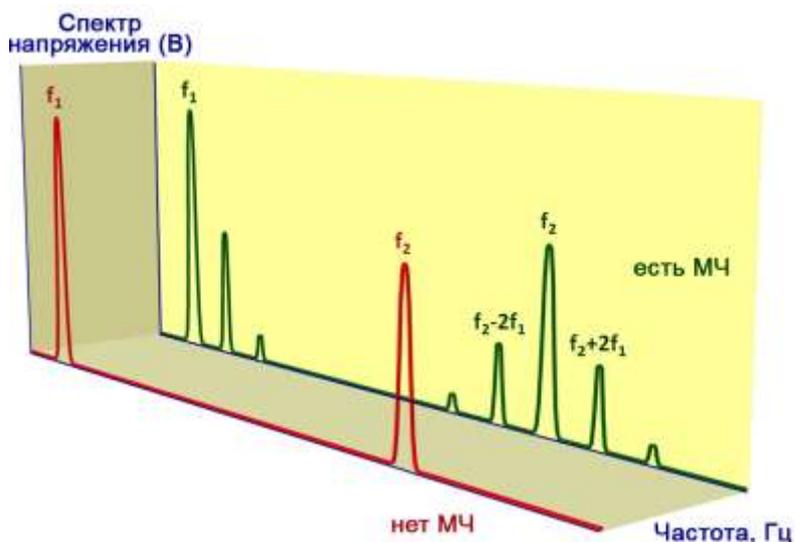


Рисунок 6. Метод детекции магнитных наночастиц на комбинаторных частотах.

В качестве детектируемых токсинов выбраны стафилококковый энтеротоксин А (СЭА) и токсин синдрома тканевого шока (ТСТШ). Оригинальность подхода заключается в регистрации наномаркеров со всего объема непрозрачных волоконных объемных фильтров, используемых в качестве твердой фазы иммуноанализа. Волокна внутри фильтра переплетены и преимущественно ориентированы вдоль оси цилиндра. С помощью сканирующей электронной микроскопии показано, что диаметр отдельного волокна составляет 25 мкм (рис. 7а). Общая площадь реакционной поверхности составляет около 20 cm^2 при объеме фильтра около 35 мкл. В экспериментах использованы фильтры, имеющие

пористость 70%. Количество антител, иммобилизованных на одном фильтре, оцененное с помощью метода на основе использования бицинхониновой кислоты, составило 0,9 мкг. Сорбционная емкость фильтров, таким образом, составляет порядка 26 мкг на 1 мл или 45 нг на 1 см² твердой фазы. Фильтры размещаются внутри наконечников, совместимых со стандартными пипетками и системами автоматического дозирования реагентов, через которые последовательно пропускаются иммунореагенты (рис. 7б).

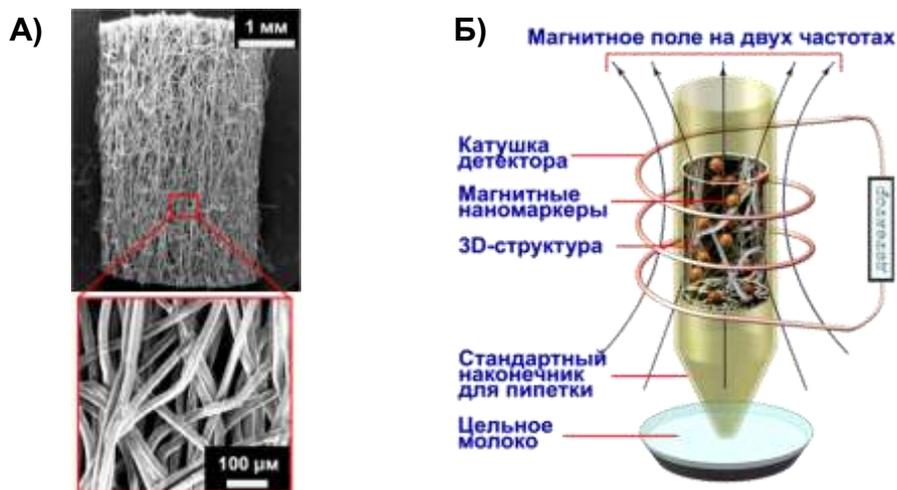


Рисунок 7. Разработанный магнитный иммуноанализ: а) - сканирующая электронная микрофотография поверхности волоконного фильтра, общий вид боковой поверхности фильтра (60x увеличение) и увеличенный фрагмент (500x увеличение); б) – в наконечник для пипетки помещается волоконный 3D фильтр; через него осуществляется иммунофльтрация пробы.; далее осуществляется детекция суперпарамагнитных наномаркеров по их нелинейному отклику в магнитном поле на комбинаторных частотах;.

Проведено определение токсинов СЭА и ТСТШ в двух форматах (рис. 8). В первом из них пропускание образца через твердую фазу осуществлялось циклами с помощью системы автоматического дозирования. Цикл дозирования включал в себя забор раствора с последующим его выпуском обратно в ту же емкость, при этом один цикл дозирования длился 30 сек. В этом формате образцы объемом 150 мкл дозировались в течение 7 мин через каждый из 12 наконечников. Данный формат магнитного иммуноанализа был назван экспресс-МИА. Характерное время анализа в этом формате - 25 мин.

Во втором формате образец в течение 90 мин прокачивался через фильтр с помощью автоматического перистальтического насоса, обеспечивающего прокачку реагентов в широком диапазоне скоростей от 0,3 мкл/мин до 30 мл/мин. При этом через каждый фильтр пропускается 30 мл образца. Суммарное время анализа составляет около 2 ч. Данный формат был назван концентрирующим МИА.

На последующих этапах, одинаковых для обоих форматов, пропускание реагентов через твердую фазу осуществлялось циклами, как описано выше, с помощью системы автоматического дозирования. Для демонстрации возможностей методики при пробах

различного объема в экспресс-МИА использовались пробы объемом 150 мкл (характерный объем пробы в традиционных иммуноанализах), а в концентрирующем МИА – 30 мл, т.е. объем, прокачиваемый через систему за 2 ч (характерное время современных количественных анализов). Подчеркнем, что возможности метода не ограничены приведенными величинами, и анализ может быть выполнен в широком диапазоне значений объема анализируемых образцов.

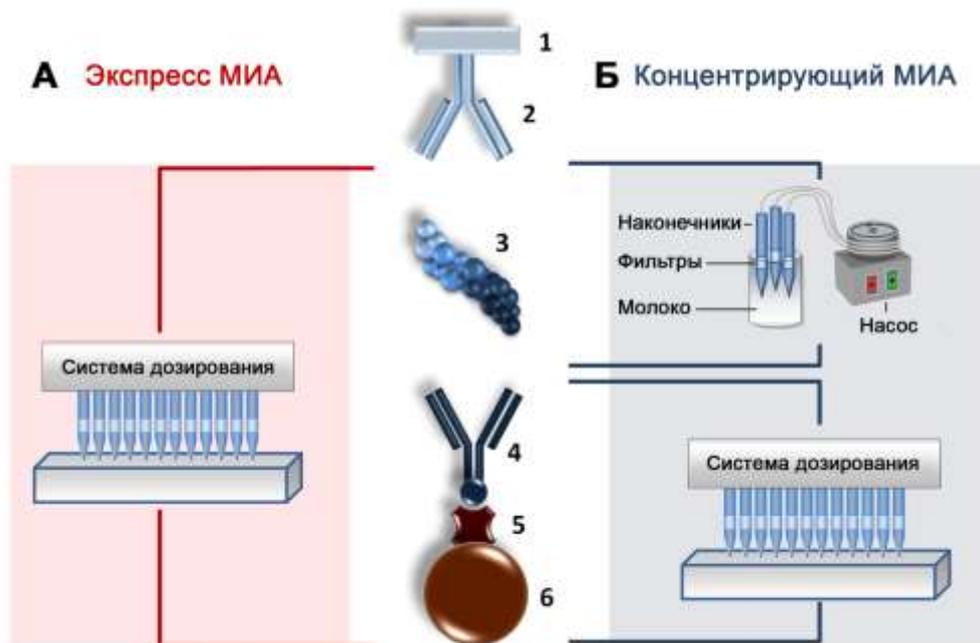


Рисунок 8. Схема и реализация магнитного иммуноанализа на волоконных фильтрах: а) – экспресс-МИА формат; б) – концентрирующий МИА формат; 1 – поверхность фильтра, 2- иммобилизованные антитела, 3 - антиген, 4 – биотинилированные вторые антитела, 5- стрептавидин, 6 – магнитная наночастица.

Полученные зависимости сигнала от концентрации токсинов для экспресс-МИА и концентрирующего МИА представлены на рис. 9. В формате экспресс-МИА минимально детектируемая концентрация, определенная по критерию 2σ , составила 0,3 нг/мл для СЭА и 0,1 нг/мл для ТСТШ. Таким образом, при использовании объемов пробы, типичных для современных иммуноанализов, разработанный метод не уступает по чувствительности существующим ИФА-тестам. При этом время анализа (25 мин) в 3-5 раз меньше. Существенное сокращение времени анализа происходит за счет целого ряда факторов. Площадь поверхности в используемых объемных фильтрах почти на порядок превышает площадь твердой фазы в стандартных ИФА-методах. Это позволяет сократить время инкубаций почти на два порядка при одинаковом объеме пробы. Дальнейшее сокращение времени инкубации достигается за счет применяемого режима дозирования иммунореагентов через объемные структуры, который обеспечивает активное турбулентное перемешивание и иммунофильтрацию вместо пассивной молекулярной диффузии в традиционных методах.

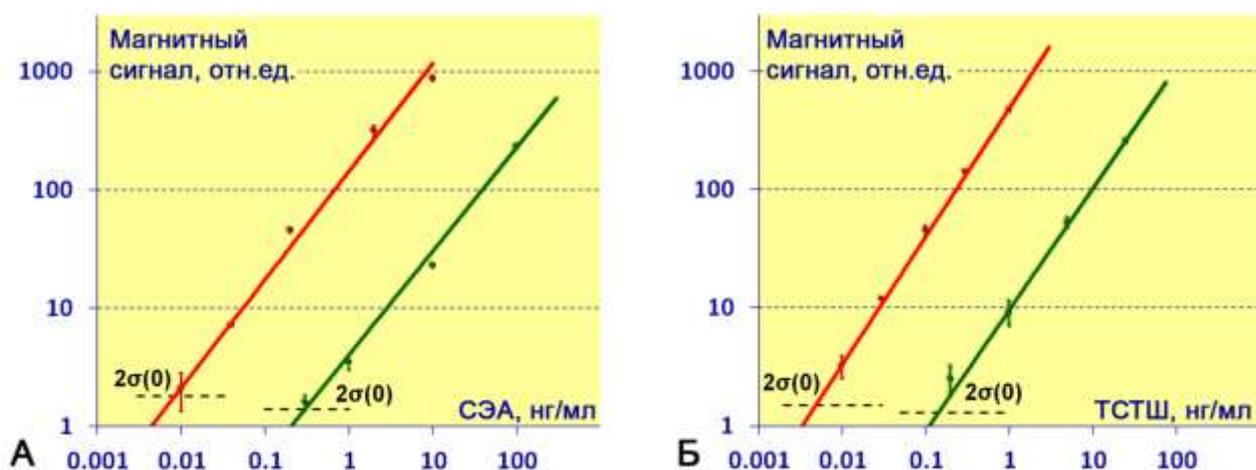


Рисунок 9. Калибровочные кривые определения стафилококковых токсинов в цельном молоке с помощью магнитного иммуноанализа: а) – стафилококковый энтеротоксин А; б) – токсин синдрома тканевого шока; красная левая линия – экспресс-МИА формат; зеленая правая линия – концентрирующий МИА формат

В формате концентрирующего МИА чувствительность составила 10 пг/мл для СЭА и 4 пг/мл для ТСТШ. Таким образом, разработанный иммуноанализ в концентрирующем формате, продолжительность которого не превышает времени наиболее быстрых ИФА-тестов, обеспечивает в 30 раз лучшую чувствительность. Значительное увеличение чувствительности происходит за счет концентрирования анализируемой пробы путем иммунофилтрации на твердой фазе непосредственно в процессе анализа проб большого объема. Таким образом, при увеличении объема пробы разработанный иммуноанализ позволяет регистрировать меньшие концентрации детектируемого вещества.

Разработанный метод обладает широким динамическим диапазоном (3-4 порядка), а также большим углом наклона зависимости сигнала от концентрации, который близок к значению 1,0 в логарифмическом масштабе. Сочетание данных факторов позволяет уверенно детектировать антиген в области как низких, так и высоких концентраций.

Установлено, что разработанный метод иммуноанализа не требует пробоподготовки, необходимой для большинства традиционных подходов, при анализе цельного молока. Для демонстрации этой особенности концентрирующий МИА был проведен для 4-х панелей образцов, различающихся по степени разбавления молока: цельное молоко, 2-х-кратное разведение, 4-х-кратное разведение и 20-кратное разведение в фосфатно-солевом буфере, по 6 образцов одинакового объема в каждой панели. На рис. 10 представлены зависимости предела детекции, вычисленного по критерию 2 σ , от кратности разбавления молока. Видно, что разбавление не оказывает значимого влияния на предел детекции. Показано, что эффективная чувствительность иммуноанализа по отношению к реальным образцам молока при разбавлении снижается. Так, даже 20-тикратное разбавление привело к увеличению

сигнала лишь на 27% для ТСТШ и на 35% для СЭА. Это значит, что эффективная чувствительность при этом упала примерно в 16 и 15 раз соответственно.

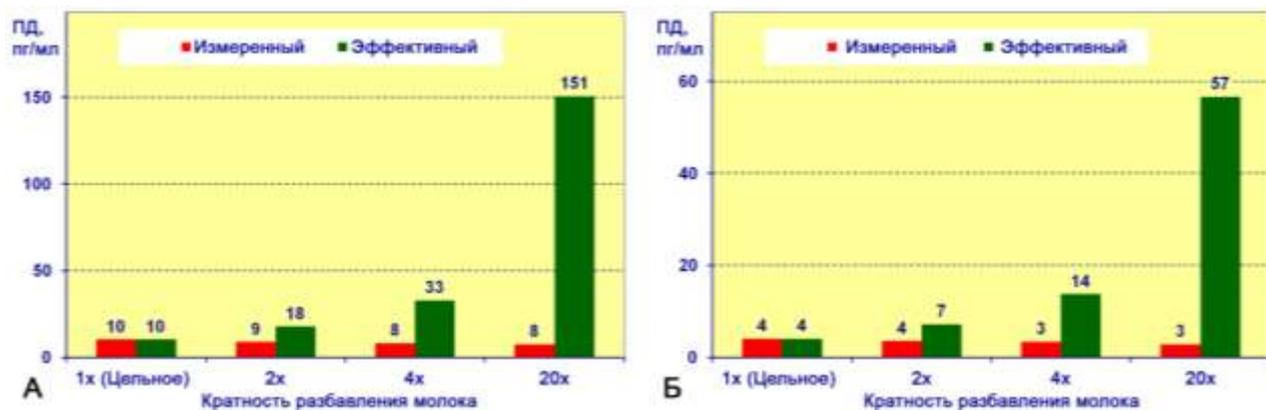


Рисунок 10. Зависимость измеренного и эффективного (по отношению к реальным образцам) пределов детекции от кратности разбавления молока: а) – стафилококковый энтеротоксин А; б) – токсин синдрома тканевого шока

Показано, что центрифугирование также не приводит к улучшению предела детекции. Для экстракта, полученного после центрифугирования, специфический сигнал уменьшался на 7% для ТСТШ и на 10% для СЭА, а снижения неспецифического сигнала практически не отмечалось. Это, по-видимому, связано с тем, что в удаленной в результате центрифугирования фракции молока присутствовала незначительная доля антигена пробы.

Показано, что чувствительность разработанного метода растет при увеличении объема анализируемой пробы. Исследована зависимость детектируемого сигнала от используемого объема аналита в формате концентрирующего МИА, для чего образцы прокачивались с помощью перистальтического насоса с различной скоростью в течение 15 мин. Концентрация токсина во всех образцах была одинаковой и составляла 1 нг/мл как в случае СЭА, так и для ТСТШ. В качестве контроля использовались такие же образцы, но не содержащие токсина. Типичная зависимость величины специфического сигнала от объема образца показана на рис. 11. Как видно из рисунка, использование больших объемов пробы приводит к дальнейшему повышению чувствительности предлагаемого метода. Этот эффект обусловлен иммунофильтрацией антигена на пористой структуре.

Установлено, что скорость нарастания специфического сигнала при увеличении объема пробы при детектировании обоих токсинов постепенно падает (рис. 11), поскольку при фиксированной концентрации и скорости прокачки антигена устанавливается равновесное связывание антигена, обусловленное кинетикой ассоциации и диссоциации комплекса антиген-антитело. При очень высоких скоростях прокачивания пробы сигнал зависит уже не столько от объема образца, сколько от времени взаимодействия

иммобилизованных антител с раствором. Как видно из рисунка, при относительно высокой скорости прокачки на уровне 1-3 мл/мин объем образца практически перестает влиять на результат анализа. Данная характерная особенность позволяет избежать погрешностей, обусловленных различными скоростями прокачивания при анализе разных образцов. Это может существенно снизить требования, предъявляемые к системе дозирования реагентов и стандартизации условий анализа в полевых условиях.

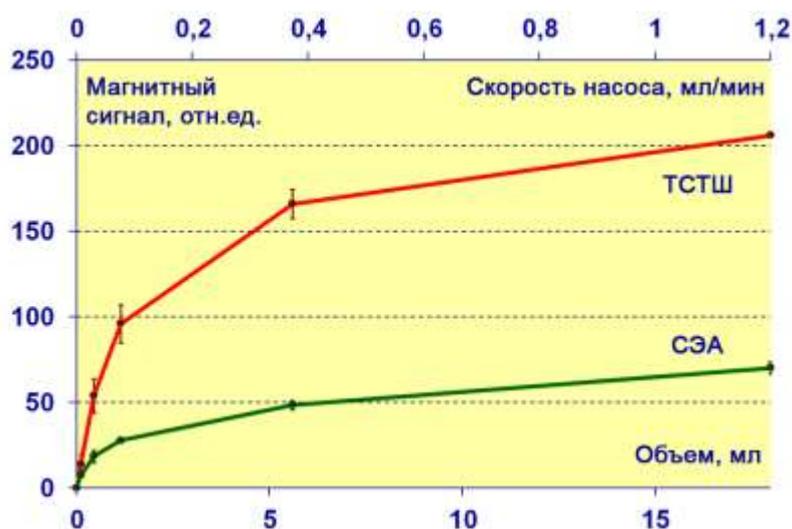


Рисунок 11. Зависимость сигналов от объемов образцов, пропущенных через фильтр за 15 мин с различными скоростями при детектировании 1 нг/мл СЭА и ТСТШ в цельном молоке

Пятая глава посвящена разработке иммунохроматографического экспресс-анализа для детекции онкомаркера – простатического специфического антигена – в сыворотке крови человека с использованием магнитных наномаркеров, детектируемых с помощью метода, описанного в четвертой главе.

На рис. 12 представлены фотографии ИХА тест-полосок, детектирующих ПСА с использованием магнитных частиц. Видно, что при увеличении концентрации ПСА интенсивность тестовой линии увеличивается, а контрольной – несколько уменьшается. Снижение интенсивности контрольной линии, объясняется тем, что при больших концентрациях значительная часть частиц остается на тестовой линии.

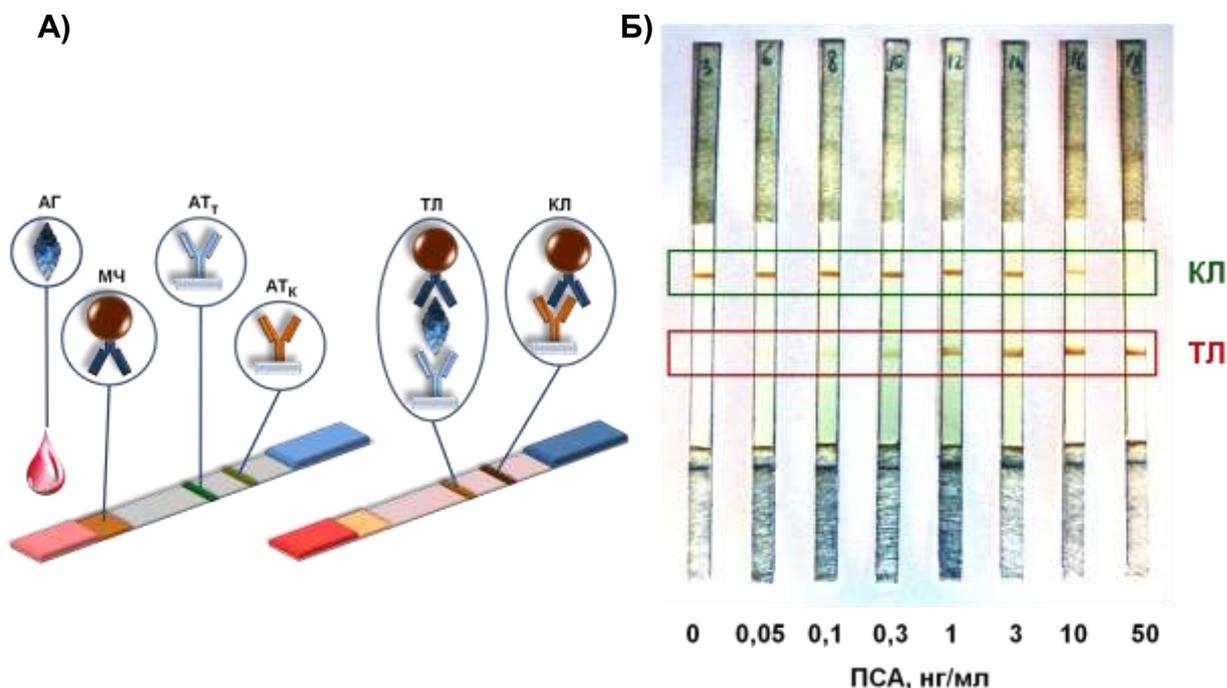


Рисунок 12. Иммунохроматографические тест-полоски с использованием магнитных наномаркеров: а) – схема тест-полоски до (слева) и после (справа) проведения анализа; АГ – детектируемый антиген, содержащийся в анализируемой пробе; МЧ – магнитные частицы, конъюгированные с детектирующими антителами; АТ_Т – тестовая линия, содержащая антитела к другому эпитопу антигена; АТ_К – контрольная линия, содержащая антитела, специфически распознающие антитела на магнитных частицах; ТЛ и КЛ – тестовая и контрольная линии, образованные в результате анализа; б) – фотография ИХА тест-полосок при определении ПСА в различных концентрациях.

С помощью сканирующей электронной микроскопии (СЭМ) получены микрофотографии иммунохроматографических мембран до и после анализа (рис. 13). Установлено, что в отсутствие антигена неспецифическое связывание МЧ с антителами, иммобилизованными на тестовой линии мембраны незначительно (рис. 13б). При этом на микрофотографии фрагмента тестовой линии ИХА-полоски после анализа образца, содержащего 50 нг/мл ПСА, можно обнаружить большое количество магнитных частиц размером около 200 нм, специфически связавшихся с мембраной (рис. 13в).

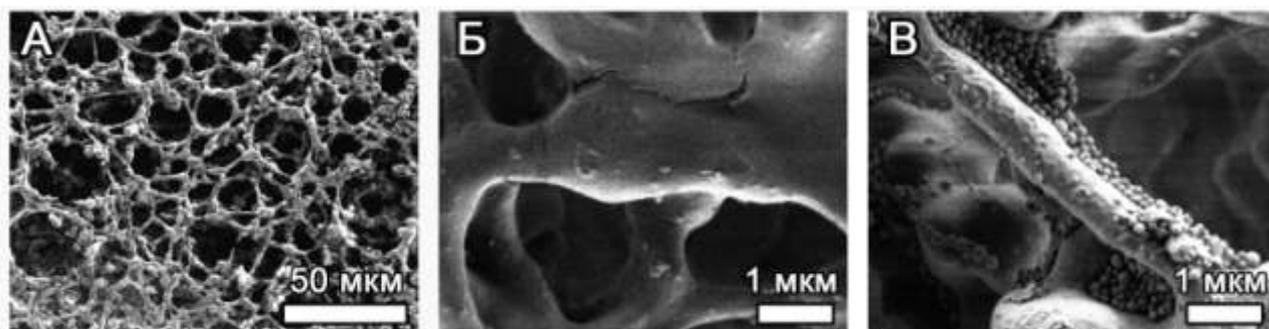


Рисунок 13. Микрофотографии иммунохроматографических мембран, полученные с помощью сканирующей электронной микроскопии: а) общий вид чистой мембраны до начала анализа; б) фрагмент тестовой линии после анализа образца, не содержащего ПСА; в) фрагмент тестовой линии после анализа образца, содержащего 50 нг/мл ПСА.

Количественные результаты получены за счет помещения ИХА тест-полосок в регистратор, основанный на детекции МЧ на комбинаторных частотах, и количественного измерения распределения МЧ вдоль полоски (рис. 14а). На рис. 14б представлена зависимость магнитного сигнала на тестовой линии от концентрации антигена ПСА. Минимально детектируемая концентрация ПСА в сыворотке крови человека составила 30 пг/мл в широком линейном диапазоне значений (более 2,5 порядков). Разработанный метод обладает высокой скоростью и предельной простотой использования, не требует привлечения высококвалифицированного персонала – то есть всеми преимуществами иммунохроматографии, и, в то же время, по чувствительности не уступает количественной регистрации ПСА с помощью гораздо более трудоемких и продолжительных иммуноферментных методов.

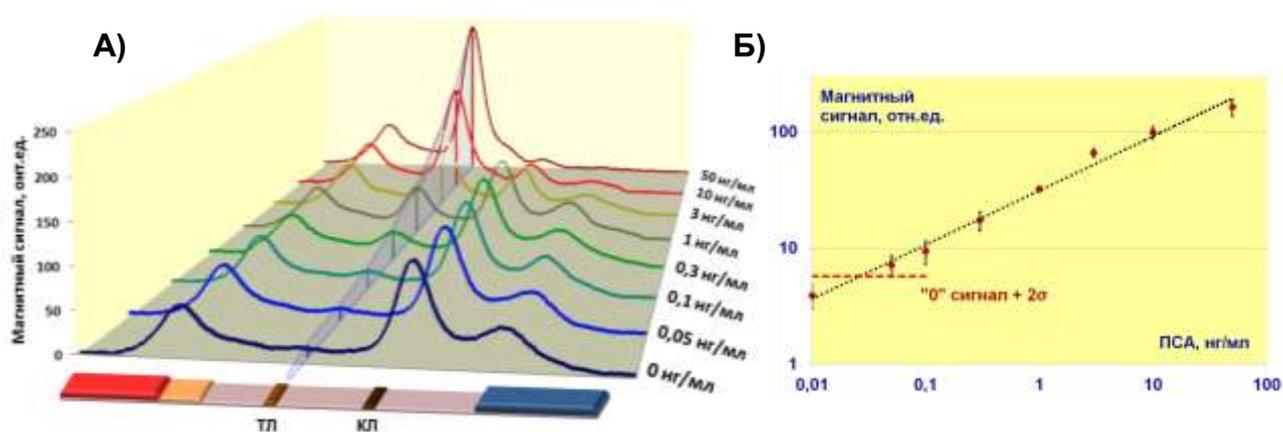


Рисунок 14. Разработанный количественный иммунохроматографический анализ для определения ПСА в сыворотке крови человека: а) – распределение магнитного сигнала вдоль ИХА тест-полосок; б) – зависимость магнитного сигнала на тестовой линии ИХА тест-полосок от концентрации ПСА.

ВЫВОДЫ

- На основе метода спектрально-корреляционной интерферометрии разработана методика количественной оценки конформационных изменений биомолекул, их взаимодействия между собой и с магнитными наночастицами. Показано, что результаты, полученные с помощью спектрально-корреляционной интерферометрии, находятся в хорошем соответствии с данными, полученными независимо методами вискозиметрии, эллипсометрии, иммуноферментного анализа, сканирующей электронной микроскопии.
- Установлено, что использование магнитных наночастиц диаметром 50 нм вызывает более чем 100-кратное усиление сигнала спектрально-корреляционной интерферометрии, регистрируемого при детекции сердечного тропонина I.

- Разработан высокочувствительный метод количественной детекции стафилококковых токсинов в цельном молоке, основанный на использовании в качестве твердой фазы непрозрачных объемных волоконных фильтров с использованием магнитных наномаркеров, регистрируемых по нелинейному перемагничиванию на комбинаторных частотах. Показано, что чувствительность метода растет с увеличением объема анализируемого образца.
- Разработан экспресс-метод количественной детекции простатического специфического антигена в сыворотке крови человека, основанный на принципе иммунохроматографии с использованием МЧ в качестве меток, регистрируемых по нелинейному перемагничиванию на комбинаторных частотах.

СПИСОК ПУБЛИКАЦИЙ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

Список работ, опубликованных в перечне изданий, рекомендованных ВАК

1. A.V. Orlov, J.A. Khodakova, M.P. Nikitin, A.O. Shepelyakovskaya., F.A. Brovko, A.G. Laman, E.V. Grishin, P.I. Nikitin. Magnetic immunoassay for detection of staphylococcal toxins in complex media // *Analytical Chemistry*, 2013, 85(2), p. 1154-1163.

2. А.Г. Буренин, М.П. Никитин, А.В. Орлов, Т.И. Ксенович, П.И. Никитин. Детекция пиретроидов с помощью спектрально-корреляционной интерферометрии // *Прикладная биохимия и микробиология*, 2013, 49(3), с. 312-318.

3. Е.Г. Дирюгина, А.Г. Буренин, М.П. Никитин, А.В. Орлов, П.И. Никитин. Детекция в реальном времени аутоантител в сыворотке крови с помощью безметочной биосенсорной системы Пикоскоп // *Труды МФТИ*, 2012, 4(3), с. 11-17.

4. A.E. Ivanov, N. Solodukhina, M. Wahlgren, L. Nilsson, A.A. Vikhrov, M.P. Nikitin, A.V. Orlov, P.I. Nikitin, M.V. Kuzimenkova, V.P. Zubov. Reversible conformational transitions of a polymer brush containing boronic acid and its interaction with mucin glycoprotein // *Macromolecular Bioscience*, 2011, 11(2), p. 275-284.

5. Т.Л. Красникова, П.И. Никитин, Т.И. Ксенович, Б.Г. Горшков, А.В. Орлов, М.В. Сидорова, А.А. Азьмуко, Т.И. Арефьева, Е.Н. Мамочкина, Е.Е. Ефремов, Ж.Д. Беспалова. Влияние пептидного фрагмента (65–76) С-концевого домена моноцитарного хемотаксического белка-1 (MCP-1) на взаимодействие MCP-1 с гепарином // *Доклады Академии Наук*, 2011, 433(4), с. 559-562.

Список работ, опубликованных в виде тезисов конференций

6. P.I. Nikitin, J.A. Khodakova, M.P. Nikitin, A.V. Orlov. Biosensors Based on Magnetic Nanoparticles // *Proceedings of 9th European Magnetic Sensors and Actuators Conference (Prague, Czech Republic, 1-4 July 2012)*, p. MP05.

7. A.V. Orlov, Yu.A. Khodakova, M.P. Nikitin, P.I. Nikitin. Highly sensitive magnetic immunoassay compatible with high volume samples // Proceedings of the 9th International Conference on the Scientific and Clinical Applications of Magnetic Carriers – Minneapolis (Minnesota, U.S.A., 22-26 May 2012), p. 97.
8. P.I. Nikitin, E.G. Diryugina, A.G. Burenin, M.P. Nikitin, J.A. Khodakova, A.V. Orlov. Optical biosensors with low-cost consumables // Proceedings of XI Conference on Optical Chemical Sensors and Biosensors (Barcelona, Spain, 1-4 April 2012), p. 167.
9. A.V. Orlov, M.P. Nikitin, I.A. Sergachev, M.V. Valeiko, B.G. Gorshkov, P.I. Nikitin. Advanced label-free biosensors with low-cost consumables for nanobiotechnology research and in vitro diagnostics // Proceedings of III International Symposium «Topical problems of biophotonics–2011» (St. Petersburg – Nizhny Novgorod, Russia, 16-22 July 2011), p. 168-169.
10. A.V. Orlov, M.P. Nikitin, M.V. Yuriev, P.M. Vetoshko, P.I. Nikitin. Magnetic nanoparticles in biomedical research and in vitro diagnostics // Book of Abstracts of Moscow International Symposium on Magnetism (MISM) (Moscow, Russia, 21-25 August 2011), p. 326.
11. A.V. Orlov, P.I. Nikitin. Magnetic immunoassays – new method for biochemical analysis based on non-linear magnetization of magnetic nanolabels // Book of abstracts of IV International Competition for Scientific Papers in Nanotechnology for Young Researchers at RUSNANOTECH 2011 Forum (Moscow, Russia, 26–28 October 2011).
12. А.Г. Буренин, М.П. Никитин, А.В. Орлов, П.М. Ветошко, П.И. Никитин. Разработка методов многопараметрического иммуноанализа на планарных структурах с использованием суперпарамагнитных наномаркеров // Труды 54-й научной конференции МФТИ (Москва-Долгопрудный, 10-30 ноября 2011), с. 105-106.
13. Е.Г. Дирюгина, А.В. Орлов, М.П. Никитин, Б.Г. Горшков, П.И. Никитин. Амплификация сигналов при проведении иммуноанализа с помощью оптических биосенсорных систем "Пикоскоп" // Труды 54-й научной конференции МФТИ (Москва-Долгопрудный, 10-30 ноября 2011), с. 38 40.
14. P. Nikitin, A. Orlov, M. Nikitin, P. Vetoshko, B. Gorshkov. Immunoassays Based on Magnetic Nanolabels // Book of abstracts of the 8th European Conference on “Magnetic Sensors and Actuators” (Bodrum, Turkey, 4-7 July 2010), p. W3O.36.
15. A.V. Orlov, M.P. Nikitin, T.I. Ksenevich, P.M. Vetoshko, P.I. Nikitin. New methods of quantitative magnetic immunoassay and their optimization with a biosensing system Picoscope // Book of abstracts of III International Competition for Scientific Papers in Nanotechnology for Young Researchers at RUSNANOTECH 2010 Forum (Moscow, Russia, 1-3 November 2010).
16. М.П. Никитин, А.В. Орлов, И.А. Сергачёв, Т.И. Кseneвич, Б.Г. Горшков, П.И. Никитин. Оптические одномерные «Пикоскопы» - новые возможности для медицинских

исследований и биосенсорике // Сборник материалов III Евразийского конгресса «Медицинская физика – 2010» (Москва, 21-25 июня 2010), т. 4, с. 25-27.

17. А.В. Орлов, М.П. Никитин, Т.И. Ксенович, П.М. Ветошко, П.И. Никитин. Магнитный иммуноанализ - новый метод биохимической диагностики на основе магнитных наномаркеров // Сборник материалов III Евразийского конгресса «Медицинская физика – 2010» (Москва, 21-25 июня 2010), т. 4, с. 256-258.

18. A.V. Orlov, M.P. Nikitin, B.G. Gorshkov, P.I. Nikitin. Optimization of Immunoassays based on Magnetic Nanolabels by Optical Biosensor Picoscope™ // Proceedings of the 8th International Conference on the Scientific and Clinical Applications of Magnetic Carriers (Rostock, Germany, May 2010).

19. M.P. Nikitin, A.V. Orlov, E.G. Diryugina, B.G. Gorshkov, P.I. Nikitin. Investigation of Labels for Adaptation of Direct Optical Biosensor Picoscope™ for in vitro Diagnostics // Book of Abstracts of the 10th European Conference on Optical Chemical Sensors and Biosensors. EUROPT(R)ODE X (Prague, Czech Republic, 28-31 March 2010), p. 222.

20. A.V. Orlov, A.G. Burenin, M.P. Nikitin, A.I. Blinova, T.I. Ksenovich, B.G. Gorshkov, P.I. Nikitin. Combined Opto- Magnetic Biosensors // Book of Abstracts of the 10th European Conference on Optical Chemical Sensors and Biosensors. EUROPT(R)ODE X (Prague, Czech Republic, 28-31 March 2010), p. 96.

21. А.В. Орлов, Б.Г. Горшков, П.М. Ветошко, П.И. Никитин. Новые форматы магнитного иммуноанализа и их оптимизация с помощью приборов Пикоскоп. // Труды 52-й научной конференции МФТИ (Москва-Долгопрудный, 27-30 Ноября 2009), с. 46.