

Биолюминесцентные ферментативные биотесты: от идеи до коммерциализации



**Кратасюк Валентина
Александровна**

профессор, д.б.н. (биофизика),
зав.кафедрой биофизики, научный
Института фундаментальной
биологии и биотехнологии СФУ,
в.н.с. Института биофизики СО РАН,
Почетный работник высшего
профессионального образования,
Courtesy Professor of University of Florida

Конкурс проектов прикладных научных исследований и инновационных разработок в интересах развития Красноярского края

Разработка моделей и механизмов отбора студентов специальных медицинских групп для занятия физической культурой или спортом на основе новых технологий оценки состояния здоровья их организма

- **Тема согласно перечню, приоритетных тем конкурса**

- **55.** Разработка моделей и механизмов включения студентов в занятия физической культурой и спортом

2. 2.1. Приоритетное направление

6. Средства и методы диагностики во всех отраслях медицины

2.2. Рынок Национальной технологической инициативы

- Хелснет (Рынок персонализированных медицинских услуг и лекарственных средств, обеспечивающих рост продолжительности жизни, а также получение новых эффективных средств профилактики и лечения различных заболеваний)

<https://nti2035.ru/markets/healthnet>

тов).

3 Область применения проекта.

• Предлагаемая **модель и механизмы определения групп здоровья студентов**, построенная на **новых технологиях в комплексе с уже существующими методами**, поможет более точно и качественно определять состояние здоровья организма. На основании созданного **паспорта здоровья студента** будут выданы рекомендации по определению студента в группу здоровья, а также для занятий в спортивных секциях.

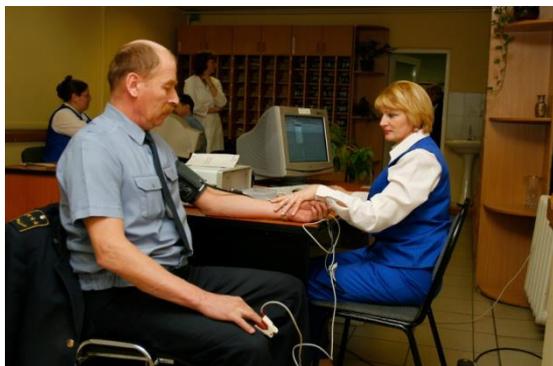
• (ФМБА Красноярского края), Министерство спорта Красноярского края, Главное управление по физической культуре и спорту г. Красноярска, федерации по видам спорта, региональные спортивные организации, лечебно-физкультурные диспансеры, центры спортивной медицины, врачи спортивных команд, спортивные школы, клубы, региональные и федеральные центры спортивной подготовки, фитнес-центры.

Под новую технологию будет разработан **аппаратно-программный комплекс** (портативный прибор, методические указания и набор реагентов).

Целью исследования является разработка механизмов отбора студентов специальных медицинских групп для занятия физической культурой или спортом на основе новых технологий оценки морфологических и биофизических показателей организма.



https://static.nevnov.ru/uploads/2017/04/21/orig-1492777840_mashinist_4_51b8559278a17ffb405f2884a670a4a7.jpg



<http://dcbirkutsk.ru/userfiles/npmo1.jpg>

ПЛАТФОРМЕННОЙ ТЕХНОЛОГИИ МУЛЬТИПЛЕКСНОГО БИОЛЮМИНЕСЦЕНТНОГО ТЕСТИРОВАНИЯ (BEST™)

Идея технологии,
(Кратасюк В.А., 1990)



Биолюминесцентные
тест-объекты



Принцип технологии

$$\text{NADH} + \text{FMN} \xrightarrow{\text{oxidoreductase R}} \text{NAD}^+ + \text{FMNH}_2$$

Метод оценки



Остаточное свечение

$$CI \text{ или } T = I/I_k * 100\%$$

Если $80\% < T < 120\%$

→ разводим в 2, 4, 8 ... раз

BEST™

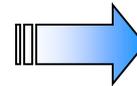
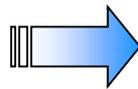
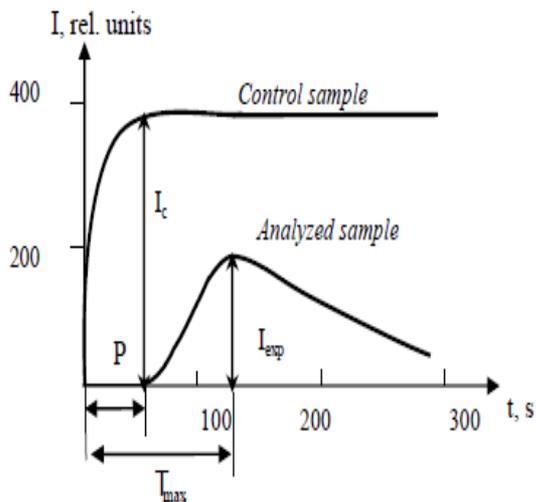
Биолуминесцентная ферментативная технология

- Уникальная коллекция светящихся бактерий – источник ферментов
- Обширный банк методов и многопрофильных биотестов
- Эксклюзивный производственный процесс

Скрининг-тест
(токсичность, стресс,
загрязнение,)

Быстрая система обнаружения

Идентификация
«причины»



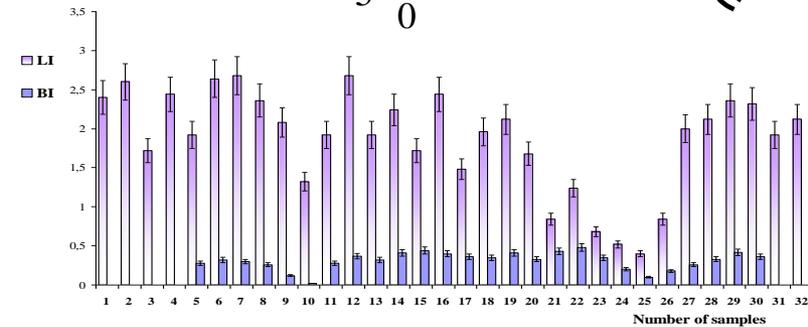
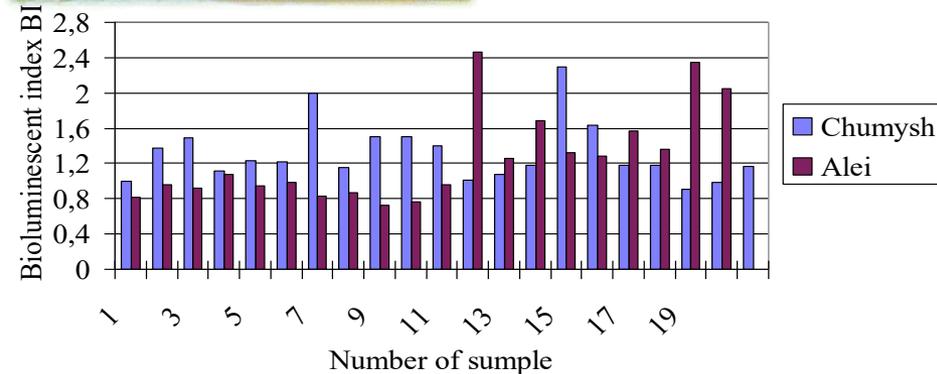
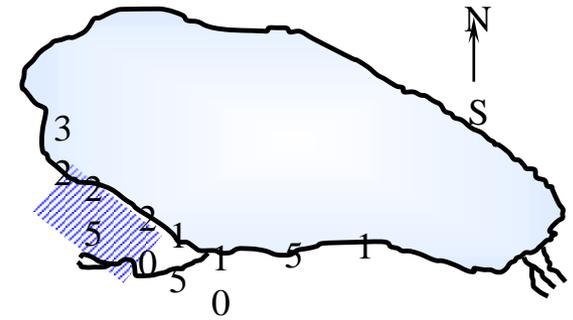
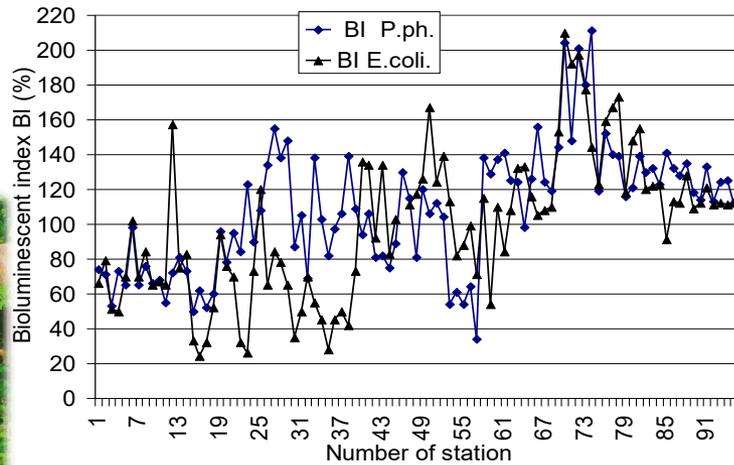
Возможности технологии

Дешевле ... Лучше ... Быстрее

	Цена одного теста	Время теста	Чувствительность	Условия хранения и использования	Пробоподготовка	Повторяемость результатов	Требования к персоналу
Биотесты	\$380 - \$3,240	до 7 дней	Стандартная	Культура живых организмов	Да	Низкая	Спецподготовка
BEST	Много меньше	3-20 мин	Дизайн под заказ	-30С до +50С	Нет	Очень высокая	Минимальная подготовка

- **Новая технология позволяет**
 - Тестировать широкий спектр «токсинов» – более 25000 веществ
 - Проводить экспресс-скрининг в чрезвычайных ситуациях
 - Проводить биотестирование образцов с высоким содержанием органики
 - Сохранять высокую чувствительность реагентов в течение многих лет
 - Использовать стандартное измерительное оборудование (биолюминометры)
 - Сконструировать портативный биосенсор

Биосенсоры для экологического мониторинга природных водных экосистем, промышленных стоков, качества воды и почвы

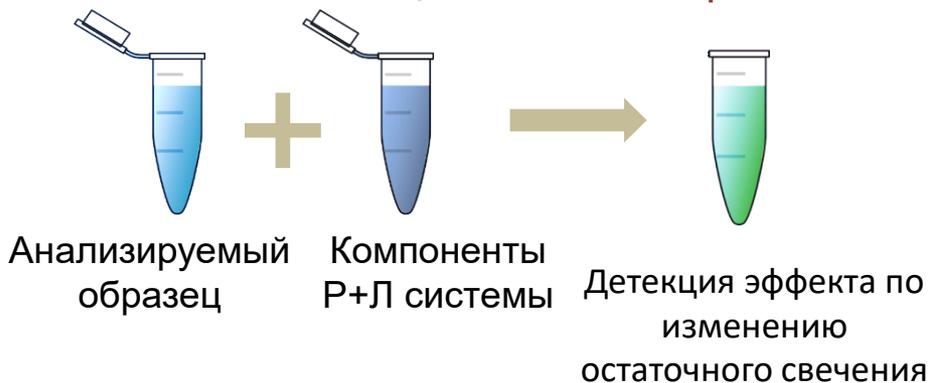


Биолюминесцентный метод анализа качества продуктов питания

Схема пробоподготовки супернатанта огурца



Биолюминесцентное тестирование



- Разработана методика проведения биолюминесцентного анализа плодовоовощной продукции
- Показано, что биферментная система Р+Л чувствительна к ряду токсикантов на уровне их ПДК :
 - тяжелые металлы Pb, Zn, Cu, Hg, Al и Cr,
 - пестициды α - и γ - ГХЦГ, 4,4-ДДЭ, 4,4-ДДТ, диазинон, циперметрин

Проект № 16-44-242126 поддержан РФФИ, Правительством Красноярского края Красноярского краевого фонда поддержки научной и научно-технической деятельности

Анализ токсичности почвы биолюминесцентным методом



Проба почвы в виде водной вытяжки добавляется в реакционную смесь.

Показателями токсичности являются:

- 1) Величина остаточного (от контроля) свечения ферментативной системы
- 2) Количество разведений пробы для достижения остаточного свечения 80% и более.

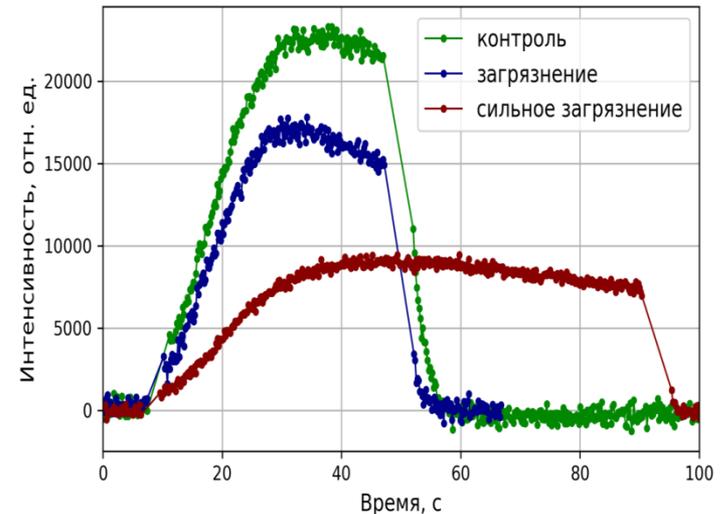
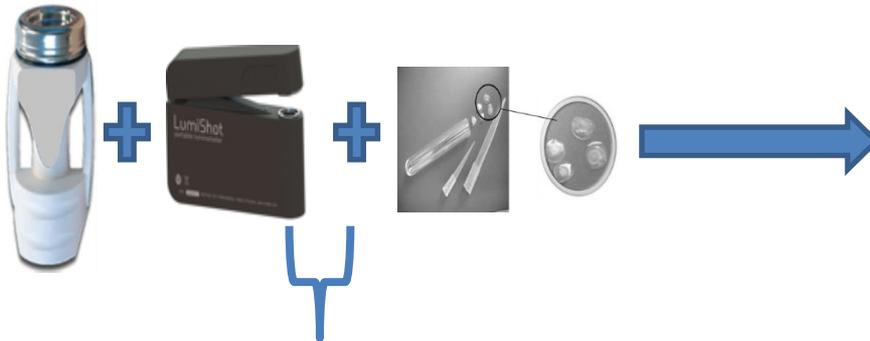
Ферментативный экспресс -биотест для мониторинга химического и биологического загрязнения водной и воздушной среды (СФУ + ИБФ)

Химический контроль в первую очередь должен проводиться в тех местах, в которых биотесты показали "тревогу".



Мобильная экологическая лаборатория

Стационарные посты отбора проб воздуха г. Красноярск



Инструменты мониторинга: Воздухозаборник + портативный люцинометр (LumiShot) + набор реагентов «Энзимолум»+ методики

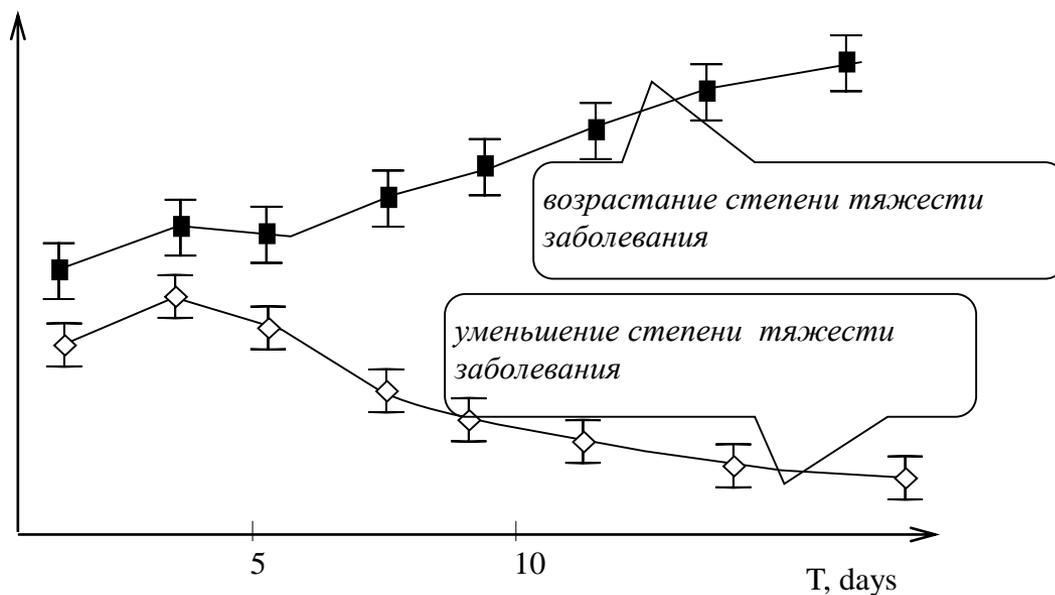
При превышении значений ПДК загрязняющих веществ в исследуемых пробах, уровень интенсивности свечения уменьшается, по сравнению с контрольным, что говорит о **потенциально негативном действии** загрязняющих веществ на

Контроль степени эндотоксикоза при различных патологиях

(плазма и сыворотка крови, слюна, моча)

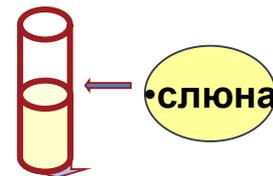


Эндотоксикоз



Модифицированная биолуминесцентная платформа опробована для тестирования слюны, мочи, пота у спортсменов для экспрессного определения работоспособности:

Оценка адаптации спортсмена к физическим нагрузкам в спорте, позволяющая за 1-10 минут отслеживать реакцию организма на уровень физической нагрузки и рассчитать индивидуальные тренировочные программы для профилактики перегрузок.



A NONINVASIVE AND QUALITATIVE BIOLUMINESCENT ASSAY FOR EXPRESS DIAGNOSTICS OF ATHLETES' RESPONSES TO PHYSICAL EXERTION Kratasyuk V.A., Stepanova L.V., Ranjan R., Sutormin O.S., Pande S., Zhukova G.V., Kolenchukova O.A., Miller O.M., Maznyak N.V. // Luminescence : the journal of biological and chemical luminescence. 2020.

СПОСОБ ОПРЕДЕЛЕНИЯ УРОВНЯ РАБОТОСПОСОБНОСТИ СПОРТСМЕНОВ Коленчукова О.А., Степанова Л. В., Выshedko A.M., Сутормин О.С., Кратасюк В.А., Монахова С.С., Виноградова Н.А.// Патент на изобретение 2752621 С1, 29.07.2021. Заявка № 2020106855 от 13.02.2020.

Экспересное билюминесцентное тестирование функционального состояния организма



физическая подготовленность



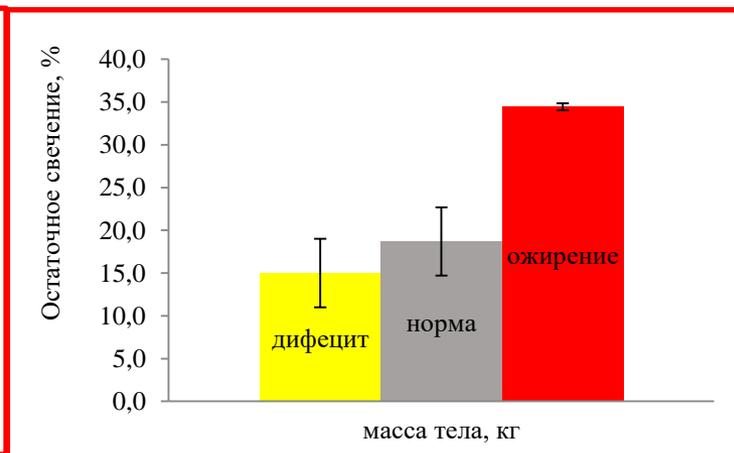
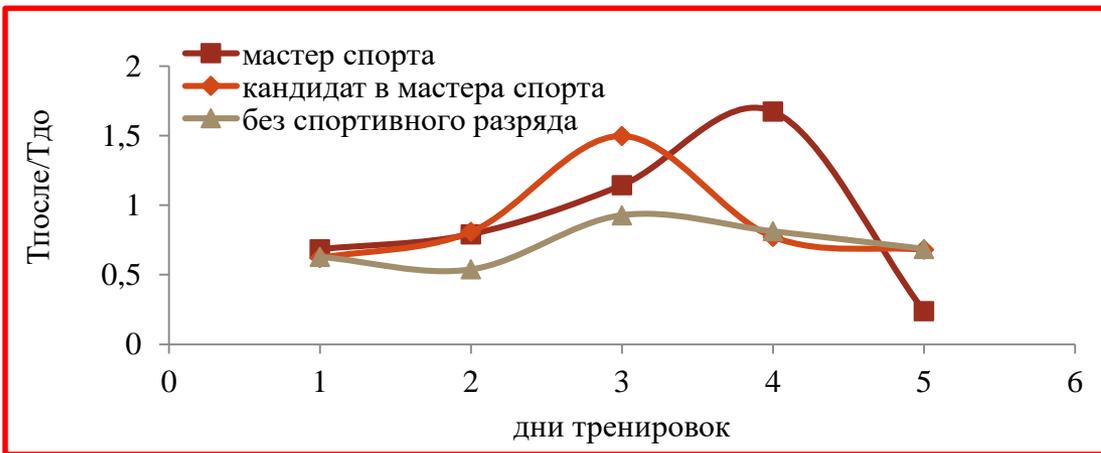
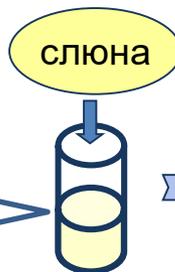
состояние организма



психоэмоциональное нарушение

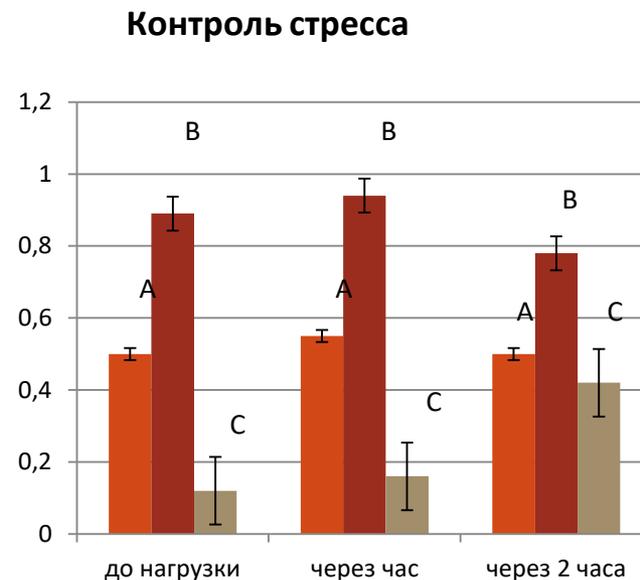


реакционная смесь из ферментов и субстратов



Биоломинесцентный комплексный тест для оценки стрессоустойчивости студентов (грант РФФИ)

Биологический паспорт здоровья на основе развернутых данных включающих: клинические, биоломинесцентные, хемилюминесцентные, антропометрические данные и психотесты для профилактики патологических состояний.



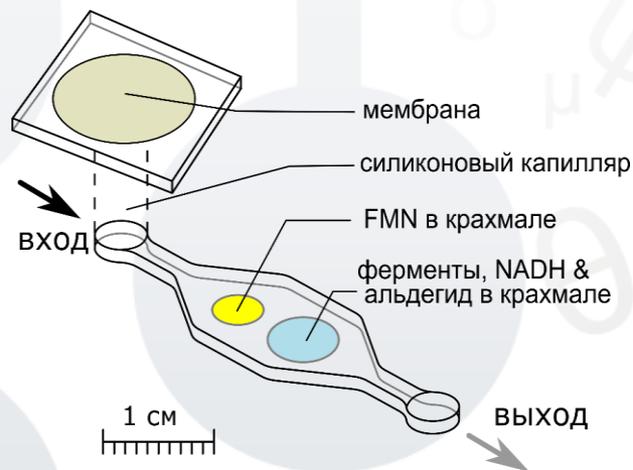
СПОСОБ ОПРЕДЕЛЕНИЯ УРОВНЯ СТРЕССОУСТОЙЧИВОСТИ ЧЕЛОВЕКА Кратасюк В.А., Жукова Г.В., Коленчукова О.А., Степанова Л.В., Сутормин О.С., Есимбекова Е.Н., Гульнов Д.В. Патент на изобретение RU 2665144 С1, 28.08.2018. Заявка № 2017106705 от 28.02.2017.

ПОКАЗАТЕЛИ ХЕМИ- И БИОЛЮМИНЕСЦЕНТНЫХ ТЕСТОВ БИОЛОГИЧЕСКИХ ЖИДКОСТЕЙ В ОЦЕНКЕ ФИЗИЧЕСКОГО ЗДОРОВЬЯ ЧЕЛОВЕКА Деревцова С.Н., Романенко А.А., Коленчукова О.А., Степанова Л.В., Николаев В.Г., Синдеева Л.В., Кратасюк В.А., Медведева Н.Н. //Клиническая лабораторная диагностика. 2020. Т. 65. № 9. С. 541-546.

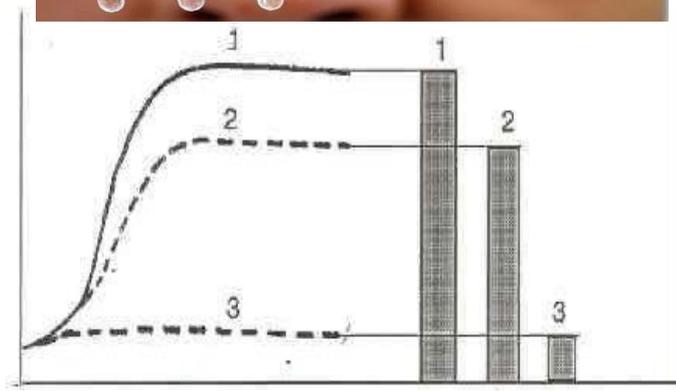
Лабораторный комплекс «Энзимолюм»:



- Прибор-люминометр «ЛЮМИШОТ»
- Многокомпонентный иммобилизованный реагент «ЭНЗИМОЛЮМ»
- Биолуминесцентные ферментативные биотесты токсичности



РЖД: Разработка новых экспрессных методов для предрейсовых осмотров. Персонафицированный паспорт человека на основе фундаментальных представлений о физиологически здоровом человеке и перехода его в тревожное состояние.



Методологическая разработка позволит эффективно управлять подготовкой работников, прогнозировать успешность профессиональной деятельности, а также выявлять наличие признаков нетрудоспособности (острых и/или обострения хронических заболеваний) и наличие психотравмирующих ситуаций и других факторов, ухудшающих работоспособность

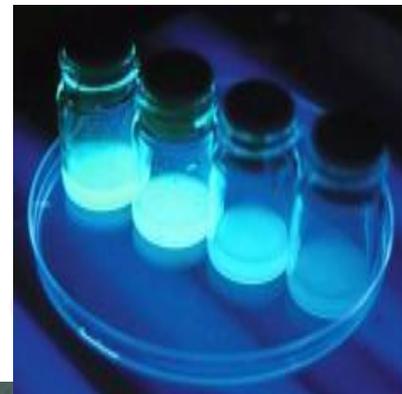


<https://thumbs.dreamstime.com/z/управление-человеческих-ресурсов-hr-рекрутство-руководство-и-teambuilding-113918070.jpg>

Лабораторный комплекс «Энзимолюм»:



- Новые экспрессные методы для оценки состояния студентов
- Портативный прибор-люминометр
- Многокомпонентный иммобилизованный реагент «ЭНЗИМОЛЮМ» в КЮВЕТЕ



Задачи

- Поиск прогностических критериев для определения группы здоровья организма, на их основе разработка объективных методов диагностики с целью создания интегральной тест-системы оценки функционального состояния организма человека
- Анализ качественных характеристик слюны у студентов относящихся к первой, второй и третьей группам здоровья. Сопоставление с традиционными методами определения групп здоровья студентов (анкетирование, антропометрия)
- Расширить методологию определения групп физического здоровья человека за счет применения биофизических методов исследования.
- Внедрить разработанную методологию определения групп физического здоровья студентов с использованием морфологических и биофизических методов исследования.
- Провести статистический анализ полученных результатов исследований и выявить систему параметров - критериев риска в оценке здоровья
- Разработать прогностическую тест-систему для выявления отклонений в оценке здоровья студентов и соответствия определенной группе здоровья.

Методы

Биолюминесцентные

Платформенная
технология
ферментативного
биолюминесцентного
биотестирования

Иммуноферментные

будут определены
иммуноглобулины
(sIgA), цитокины
(воспалительные и
противовоспалительные),
и гормоны стресса
(кортизол)

Хемилюминесцентные

Активность
антиоксидантного
статуса будет
определена с помощью
H₂O₂-люминол
зависимой
хемилюминесценции

Антропометрическое

оценка физического
здоровья: индекс массы
тела для выявления
фактов отклонения
массы тела от нормы,
индекс полового
диморфизма для
диагностики инверсии
пола

Математическая

и
статистическая
обработка
результатов
исследований

Анкетирование

определение
групп здоровья
I, II, III

Этапы

1. Подбор исследуемых групп. Подбор студентов каждой группы здоровья в количестве не менее 50 человек (ИФКСиТ, ФМБА, ИФБиБТ(кафедра биофизики))
2. Сбор данных обследуемых. Заболевания, группа, антропометрические данные.(ФМБА)
3. Постановка эксперимента: предоставление групп; установка времени и места проведения; (ИФКСиТ)
4. Проведение эксперимента, сбор слюны (ИФКСиТ, ИФБиБТ(кафедра биофизики))
5. Качественный анализ состава слюны - включают биolumинесцентные, хемилуминесцентные, иммуноферментные методы (ИФБиБТ(кафедра биофизики))
6. Анализ полученных данных. Математическая и статистическая обработка результатов(ИТиСУ)
7. Разработка биотеста на основе биolumинесцентной методики. Модификация люминометра Люмишот- и реагента «Энзимолум» для осуществления теста; (ИФБиБТ(кафедра биофизики))

План работы

Этап I: Теоретические и экспериментальные исследования поставленных перед НИР задач. Выбор направления исследований. Изучение факторов, влияющих на параметры слюны, подбор условий, обеспечивающих максимальную чувствительность и воспроизводимость исследований.

1. Анализ научно-технической литературы, нормативно-технической документации и других материалов, относящихся к разрабатываемой теме. Разработка и обоснование экспериментальных и методических подходов для решения задач.

2. Обоснование выбора анализируемого образца биологической жидкости (слюна). Обоснование выбора групп студентов находящихся в разных группах здоровья.

3. Разработка лабораторной методики забора проб слюны, пробоподготовки, условий транспортировки и хранения проб до и во время проведения анализа без потери в ней информативных показателей.

4. Разработка и адаптация комплекса диагностических исследований, с использованием биолюминесцентного, хемилюминесцентного, иммуноферментного методов.

5. Изучение и выбор условий проведения анализа, обеспечивающих наибольшую чувствительность и воспроизводимость результатов.

6. Изучение факторов (антропометрические показатели, заболевание т.д.), влияющих на результат анализа.

Этап II: Обоснование применения слюны для выявления функционального состояния организма

1. Определение метаболического состава слюны, активности ферментов, иммунологических показателей слюны, а также интегрального биолюминесцентного показателя слюны в норме.
2. Анализ изменения биомаркеров в слюны и выявление наиболее информативных биомаркеров в слюне студентов из разных групп здоровья потенциально применимых для разработки интегрального биотеста на основе многомерного статистического анализа.
4. Разработка биотеста на основе биолюминесцентной методики. Модификация люминометра Люмишот- и реагента «Энзимолюм» для осуществления теста; анализ недостатков и преимуществ разработанного биотеста; оценка перспективы включения биотеста для мониторинга функционального состояния организма; разработка рекомендации по использованию биотеста на приборе Люмишот с использованием реагента «Энзимолюм».
5. Разработка регламента определения группы здоровья организма, оценка перспектив и ограничений использования методики и разработка методических рекомендаций по ее использованию. Написание статьи.

Информация о научных изданиях, в которых предполагается опубликовать результаты проекта

- 1. Sports Medicine (Web of Science Core Collection (Q1), Scopus (Q1));
- 2. Journal of Sport and Health Science (Web of Science Core Collection (Q1), Scopus (Q1))
- 3. Medicine and Science in Sports and Exercise (Web of Science Core Collection (Q1), Scopus (Q1)),
- 4. Scientific Reports (Web of Science Core Collection (Q1), Scopus (Q1)),
- 5. Clinica Chimica Acta (Web of Science Core Collection (Q1), Scopus (Q2));
- 6. Journal of Personalized Medicine (Web of Science Core Collection (Q1), Scopus (Q1))
- 7. Journal of Science and Medicine in Sport (Web of Science Core Collection (Q1), Scopus (Q1)),
- 8. European Journal of Sport Science (Web of Science Core Collection (Q1), Scopus (Q1)),

Билюминесцентные ферментативные биотесты: от идеи до коммерциализации

