

**К. В. Костюкевич<sup>1</sup>, Р. В. Христосенко<sup>1</sup>,  
С. Д. Загородня<sup>2</sup>, С. О. Костюкевич<sup>1</sup>, А. А. Коптюх<sup>1</sup>,  
А. А. Крючин<sup>3</sup>, П. Ф. Олексенко<sup>1</sup>**

<sup>1</sup>Інститут фізики напівпровідників ім. В.Є. Лашкарьова НАН України  
Проспект Науки, 41, 03028 Київ, Україна  
e-mail: biosen@isp.kiev.ua

<sup>2</sup>Інститут мікробіології і вірусології ім. Д.К. Заболотного НАН України  
вул. Академіка Заболотного, 154, 03680 Київ, Україна

<sup>3</sup>Інститут проблем реєстрації інформації НАН України  
вул. М. Шпака, 2, 03113 Київ, Україна

## **Молекулярна діагностика на основі кутової спектроскопії поверхневих плазмонів**

*Роботу присвячено дослідженню фізичних і біохімічних аспектів розробки багатоканальних імуносенсорних приладів з призмовим типом збудження (конфігурація Кречмана) поверхневого плазмонного резонансу в плівці золота та механічному скануванні кута падіння монохроматичного світла для тестування населення на наявність вірусних і серцево-судинних захворювань при застосуванні специфічної молекулярної реакції антитіло-антиген. Розглянуто схеми іммобілізації білків на золотій поверхні сенсора для швидкого та достовірного виявлення рівня міоглобіну, фібриногену та антитіл до вірусу Епіштейна-Барр у буферному розчині, сироватці та плазмі крові.*

**Ключові слова:** *поверхневий плазмонний резонанс, антитіла, міоглобін, фібриноген, віруси, буферні розчини, плазма та сироватка крові.*

### **Вступ**

У 2019–2020 рр. світом поширилася пандемія нової, ще небаченої вірусної інфекції COVID-19 (Coronavirus disease, 2019), збудником якої став коронавірус SARS-CoV-2, резервуаром якого є колонії кажанів (летючих мишей) у Китаї. Віруси — це внутрішньоклітинні паразити. Завдяки наявності так званої «корони» на поверхні вірусу SARS-CoV-2 він легше потрапляє до клітин людини та призводить до їхнього швидкого руйнування (рис. 1).

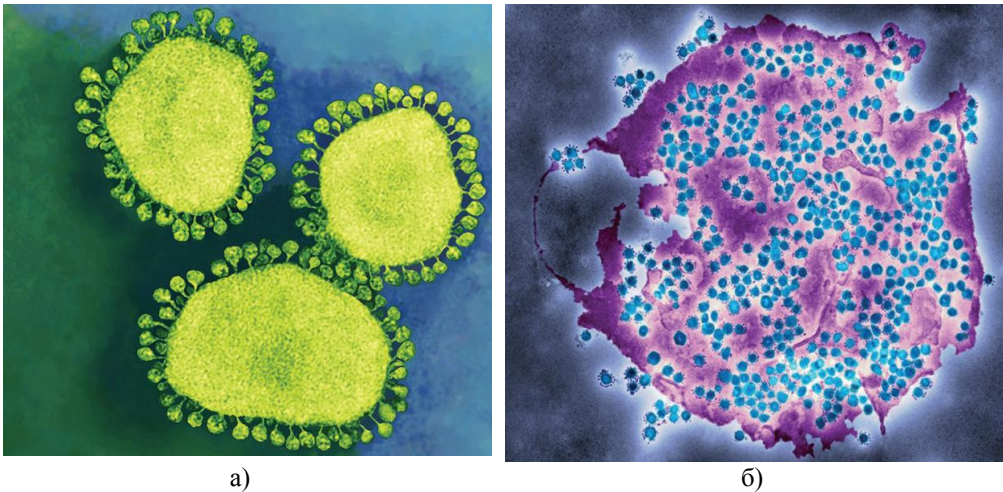


Рис. 1. Електроннограми коронавірусів SARS-CoV-2 (а) та клітини людини, що переповнена коронавірусами SARS-CoV-2 (б) [1]

Пандемія охопила 180 країн світу, коли захворіло (на початок вересня 2020 року) біля 30 мільйонів людей, помер майже 1 мільйон хворих. Поширення інфекції поставило під знак запитання розвиток світової цивілізації, поглибило економічну кризу та різко обмежило процеси глобалізації [1]. Найбільш тяжкі форми коронавірусної хвороби, які закінчуються смертю, спостерігаються у пацієнтів із серцево-судинною патологією. Тому сьогодні, як ніколи, виникає потреба у розробці портативних швидкодіючих біохімічних імуносенсорних приладів для вчасної діагностики та моніторингу ефективності лікування вірусних і серцево-судинних захворювань.

Найбільш перспективними приладами, які дають змогу отримати інформацію про взаємодію молекул у газовому та рідкому середовищах у реальному часі без застосування міток визнані сенсори показника заломлення на основі ефекту поверхневого плазмонного резонансу (ППР) [2–5]. Поверхневі плаزمони (ПП), або електромагнітні (ЕМ) хвилі ТМ-типу, являють собою зв'язану моду поверхневих коливань поляризованого газу вільних електронів і збуджуючого ЕМ-поля оптичного діапазону, локалізовану на поверхні тонкої напівпрозорої плівки металу. Згідно умови фазового синхронізму (закон збереження імпульсу в системі) збудження ПП відбувається за допомогою призми повного внутрішнього відбиття (ПВВ) чи дифракційної ґратки, а проявляється як різкий мінімум у спектрі відбиття (резонансна крива або спектр ППР) при зміні кута падіння, довжини хвилі, фази чи інтенсивності падаючого світла, що лінійно поляризоване в площині падіння. При цьому напруженість ЕМ-поля резонансно підсилюється на границі поділу метал-діелектрик (до 100 разів) і загасає, при віддаленні від неї в обидва боки, за експоненціальним законом на відстані порядку довжини хвилі. Таким чином, збудження ПП має резонансний характер і визначається тільки діелектричними властивостями металу, зазвичай золота (Au) чи срібла (Ag), та контактуючого з ним досліджуваного середовища (тобто має високу чутливість до (комплексного) показника заломлення середовища біля поверхні плівки металу).

Якщо поверхня чутливого елемента ППР контактує з прозорою біологічною рідиною (плазма та сироватка крові, слина, сеча), то появу тонкого адсорбованого шару молекул (з молекулярною масою більше 10000 дальтон (Да)) безпосередньо на поверхні металу можливо легко зафіксувати по зсуву мінімуму резонансної кривої. Формально такий зсув можна описати як збільшення показника заломлення середовища, що лінійно пов'язано з масою адсорбованих молекул [6]. Зауважимо, що плазма крові не містить клітинних елементів крові (еритроцитів, лейкоцитів, тромбоцитів), які відділяють від цільної крові центрифугуванням, а сироватка крові — це плазма крові без фібриногену. Для детектування певних молекул з біологічної рідини, металеву поверхню перетворювача ППР необхідно модифікувати чутливим шаром молекулярно-розпізнавальних елементів, які можуть бути біологічними (антитіла, антигени, ферменти, ДНК), біохімічними, хімічними, комбінацією цих елементів чи їхніми синтетичними аналогами [7, 8].

Роботу присвячено аналізу методик закріплення (іммобілізації) білків імунної пари (антитіло, антиген) на поверхні плівки золота для достовірного виявлення антитіл до вірусу Епштейна-Барр і рівня молекулярних маркерів серцево-судинних захворювань (міоглобіну та фібриногену) у буферному розчині, сироватці та плазмі крові, а також підвищенню чутливості, стабільності та продуктивності сенсора на основі кутової спектроскопії поверхневих плазмонів (ПП). В експериментах використано прилад типу «Плазмон» (Інститут фізики напівпровідників ім. В.Є. Лашкарьова НАНУ [9]) на основі ретровідбиваючої призми, який дозволяє вимірювати повний кутовий спектр ППР при механічному скануванні та абсолютному калібруванні кута падіння світла. Як чутливий елемент сенсора ППР (чипу) використовували плівки золота, що наносили на скляні підкладки (розміром  $20 \times 20 \times 1$  мм, з показником заломлення  $n = 1,61$ ) методом термічного випаровування у вакуумі (ВУП-4; залишковий тиск  $4 \times 10^{-4}$  Па, швидкість осадження  $40\text{--}50$  Å/с), застосовуючи для поліпшення адгезії тонкий шар хрому ( $\sim 3$  нм). Товщину плівки металу, яка становила порядку 50 нм, обирали за критеріями фізичних умов збудження ПП.

## Особливості імунної діагностики на основі ППР

Унікальна система захисту хребетних заснована на вироблені антитіл до чужорідних речовин (антигенів), що потрапляють до організму. Антитіла (як правило, IgG класу) або антигени використовують як чутливі шари імуносенсорів; вони з високою специфічністю зв'язуються з молекулами аналітами, відповідно антигенами або антитілами. Моноклональні антитіла (монАТ), на відміну від поліклональних, отримують з однієї клітини чи її нащадків (клону), що утворюються в процесі клітинного поділу цієї клітини. Усі молекули монАТ мають однакову спорідненість до зв'язувального антигену (афінність), тобто монАТ з високою афінністю «міцно» зв'язують антиген, а з низькою афінністю — формують комплекс з антигеном, який легко дисоціює. Усі молекули монАТ мають однакову специфічність, тобто, спрямовані проти однакових місць зв'язування (антигенних детермінант) на антигені, тоді як поліклональна сироватка містить антитіла до різних ділянок зв'язування з антигеном.

Процедура іммобілізації чутливого матеріалу є істотним моментом для одержання достовірних результатів досліджень і ефективної роботи перетворювача ППР. З одного боку, закріплення рецепторів не повинно впливати на структурні та оптичні характеристики плівки металу, що призводять до нестабільної роботи сенсора ППР у часі (під стабільністю ми розуміємо незмінність у часі основного параметра — кутового положення мінімуму резонансної кривої  $\theta_{ППР}$ ). З іншого боку — забезпечувати упорядковане орієнтоване розташування молекул-рецепторів у своєму природному, недеформованому взаємодію з металом стані, оскільки саме від цього залежить можливість і швидкість молекулярного зв'язування, а також амплітуда відгуку перетворювача. Відомо, що атоми сірки мають виняткову спорідненість до поверхні плівки золота, отже така властивість використовується у біосенсорній технології для створення моношарових плівок сірковмісної речовини з майже гексагональною упаковкою (застосовуючи метод самоорганізації молекулярних ансамблів з розчину) для захисту робочої поверхні сенсора, стабілізації властивостей плівки металу та її адаптації до адсорбції біологічних молекул.

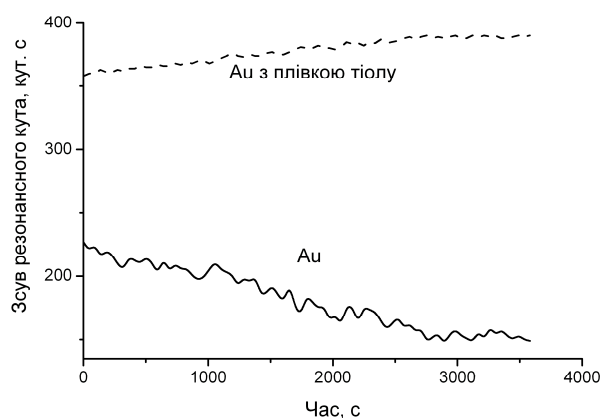


Рис. 2. Дрейф базової лінії приладу «Плазмон» у воді з часом для чутливого елемента ППР з вільною золотою поверхнею та поверхнею, модифікованою додекантіолом ( $\text{HS}(\text{CH}_2)_{11}\text{CH}_3$ )

Для формування самоорганізованих моношарів (СОМ) з контрольованим складом, структурою та товщиною використовують функціоналізовані меркаптани, зокрема аліфатичні тіоли ( $\text{HS}-(\text{CH}_2)_n\text{-X}$ ), завдяки простій технології одержання, стабільності та функціональній розмаїтості [10, 11]. Організація модифікуючого шару на поверхні благородного металу відбувається методом тривалої спонтанної хемосорбції з розчину, переважно в етанолі, з концентрацією  $(0,1-1,0) \times 10^{-3}$  М і складається з двох етапів. Спочатку відбувається взаємодія HS-групи та поверхневих атомів золота з утворенням тіолату золота. Потім йде наноструктурна перебудова зв'язаного моношару, керована гідрофобною взаємодією аліфатичних ланцюгів, що супроводжується реконструкцією поверхні металу. Таким чином, формується щільно упаковане молекулярне покриття, яке забезпечує значний бар'єр для переносу електронів та іонів, а також має високу кінетичну та термодинамічну стабільність. При цьому функціональні термінальні групи визначають фізико-хімічні властивості модифікованої металевої поверхні, вуглеводневі ланцюги за-

безпечують її просторове екранування на десятки ангстрем (довжина С-Н зв'язку  $\sim 1,1 \text{ \AA}$ ), що істотно не впливає на чутливість сенсора.

Враховуючи результати вимірювань дрейфу резонансного кута з часом у воді (рис. 2) показано, що формування самоорганізованих плівок додекантіолу ( $\text{HS}(\text{CH}_2)_{11}\text{CH}_3$ ), призводить до істотної стабілізації параметрів перетворювача ППР [12]. Дрейф нульової лінії зменшується приблизно з 90 кут.сек/год до значення менше 10 кут.сек/год.

## Детектування антитіл проти вірусу Епштейна-Барр у сироватці крові

Вірус Епштейна-Барр (ВЕБ, вірус герпеса 4-го типу) є одним із найбільш поширених і небезпечних вірусів людини, який отримав свою назву на честь англійського вірусолога професора Майкла Ентоні Епштейна (Michael Anthony Epstein) та його аспірантки Івонни Барр (Yvonne Barr), які описали його у 1964 році [13]. Клінічною формою первинного інфікування людини на ВЕБ є інфекційний мононуклеоз, що уражає лімфатичну та нервову системи [14, 15]. ВЕБ сприяє розвитку хронічної втоми, патологій шлунково-кишкового тракту, аутоімунних розладів і відіграє важливу роль у формуванні пухлинних клітин в організмі людини [16–21]. У більшості випадків хвороба протікає без симптомів, однак, як і інші герпесвіруси, ВЕБ активізується при імунодефіцитах різного генезу (ВІЛ-інфекції, онкологічних захворюваннях, під дією радіаційного фактору або стресу) і сам може бути причиною повного придушення імунітету [22–24].

Зазвичай для діагностики ВЕБ-інфекції використовують такі молекулярно-біологічні методи, як полімеразна ланцюгова реакція (ПЛР), метод імунофлуоресценції, а також метод імуноферментного аналізу (ІФА) — високочутливий, специфічний і найбільш доцільний для масштабних досліджень [25]. Ми використовували метод кутової спектроскопії ПП. З метою зниження впливу шумових ефектів і одержання достовірних результатів було розроблено прилад типу «Плазмон» з додатковим (контрольним) каналом, показання якого зчитуються паралельно з робочим (рис. 3). У цьому випадку, якщо під час тривалих вимірювань будуть відбуватися зміни показника заломлення аналіта, не пов'язані з адсорбцією або взаємодією молекул (наприклад, зміна температури), це приведе до зміни відгуку приладу і буде зафіксовано за допомогою референтного каналу.

Специфічний антиген (ВЕБ), що має високі показники чутливості та специфічності для визначення антитіл (IgG и IgM) у сироватці крові, накопичували і очищали в Інституті мікробіології і вірусології ім. Д.К. Заболотного НАН України [26]. Сироватки крові хворих донорів були люб'язно надані ТОВ «ДНК-лабораторія» м. Києва, а сироватки здорових донорів — станцією переливання крові м. Києва. Всі сироватки були протестовані на наявність антитіл до ВЕБ за допомогою референт-методів ПЛР та ІФА.

З метою отримання оптимальних умов для специфічної взаємодії білків на золотій поверхні чипу та збільшення площі чутливої поверхні сенсора, іммобілізацію білків ВЕБ здійснювали всередині захисно-орієнтуючого покриття (тривимірної структури полісахаридного гідрогелю – декстрану (Dextran 17000 (Sigma)),

який наносили на поверхню золотої плівки з розчину в 0,05 % цитратному буфері при рН (5,0–5,2) з концентрацією 2 мг/мол протягом 5 годин при температурі (20–25) °С. Після промивання цитратним буфером, розчин антигену в цитратному буфері залишали на поверхні при температурі (4–8) °С на 18–24 години. Для запобігання неспецифічній взаємодії після іммобілізації білків ВЕБ вільні місця блокували з використанням 1 % розчину молекул бичачого сироваткового альбуміну (БСА — мають форму еліпсу з розмірами 4×4×14 нм та молекулярною масою 69000 Да) у цитратному буфері протягом 1 години при температурі (20–25) °С. Далі чипи промивали цитратним буфером, сушили в потоці чистого повітря та зберігали при (4–8) °С у малих стерильних ємностях без доступу повітря [27, 28]. Реакцію взаємодії білків ВЕБ із сироваткою крові хворого на ВЕБ-інфекцію досліджували, застосовуючи оптимальне розведення сироваток з антитілами до ВЕБ 1:100 у цитратному буфері з рН 5,0÷5,5 за допомогою двоканального приладу типу «Плазмон» (рис. 4) [29]. Канал 1 застосовували безпосередньо для вимірювання рівня антитіл у сироватці, а канал 2 використали як контрольний для підвищення точності та достовірності вимірювань. З метою виключення неспецифічного зв'язування антитіл до ВЕБ спочатку в проточну кювету подавали негативну сироватку здорової людини. Відмивали матеріал, що не зв'язався, і пропускали сироватку крові хворого з ВЕБ-інфекцією. Врахування результатів взаємодії антиген-антитіло здійснювали шляхом кількісного визначення зсуву резонансного кута (у кутових секундах) у часі (секунди).

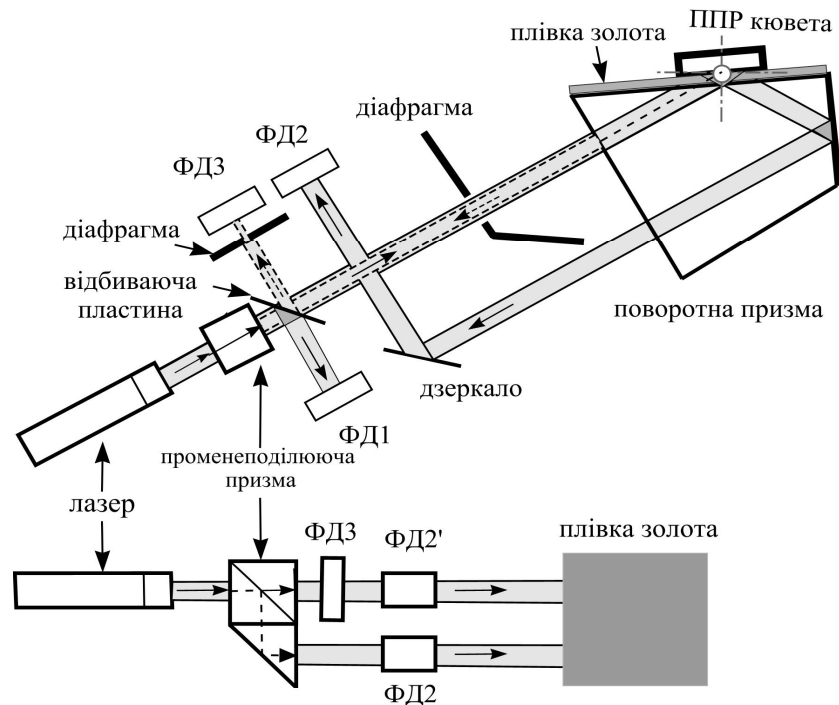


Рис. 3. Оптична схема двоканального приладу типу «Плазмон»

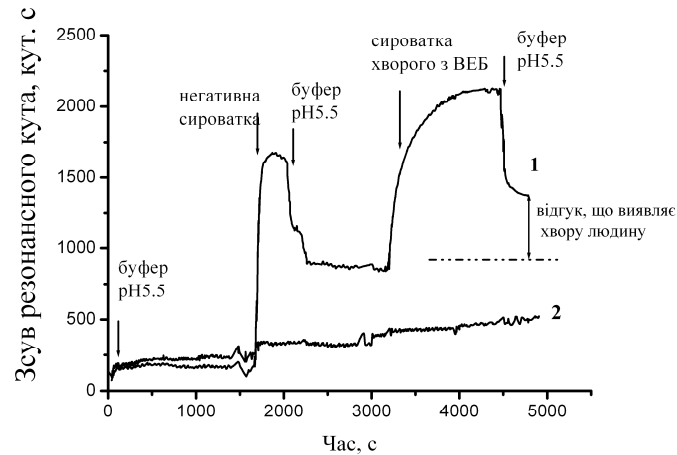


Рис. 4. Сенсограма взаємодії специфічного антигену (ВЕБ), закріпленого на золотій поверхні перетворювача ППР всередині захисно-орієнтуючої тривимірної гідрогелю – декстрану, з антитілами, що перебувають у сироватці крові людини: 1 — робочий канал; 2 — контрольний канал

Рутинні дослідження зводяться до такого. Із середнього значення для 25 негативних сироваток при трьох вимірюваннях на кожній розраховується так зване граничне значення (ГЗ). Сироватка вважається позитивною, якщо відхилення резонансного кута перевищує ГЗ на 10 %, а якщо відхилення нижче за ГЗ на 10 % — негативною. Отримані дані порівнювали з результатами ІФА. Відтворюваність результатів запропонованого методу становила 95 %.

## Діагностика серцево-судинних захворювань

Різне зниження якості життя людей пов'язано (викликано) з глобальним погіршенням екологічних умов завдяки техногенному забрудненню. Основною причиною смертності населення в індустріально розвинених країнах є захворювання систем дихання та кровообігу, до яких належать ішемічна хвороба серця з її клінічними формами — інфарктом міокарда та нестабільною стенокардією, ішемічний інсульт, деякі порушення обміну речовин, тромбоз глибоких вен (ТГВ), тромбоемболія легеневих артерій (ТЕЛА) та дисиміноване внутрішньосудинне згортання крові (ДВЗ-синдром). Щорічно у світі від серцево-судинних захворювань помирає 17 мільйонів людей, що становить більше, ніж сумарна кількість смертей від раку, туберкульозу та СНІД. Для діагностики і моніторингу ефективності лікування цих захворювань необхідне швидке та достовірне виявлення у сироватці та плазмі крові характерних молекулярних маркерів: міоглобіну, фібриногену, розчинного фібрину та *D*-димеру.

**Міоглобін**, відомий як кардіомаркер [30, 31], — це глобулярний залізовмісний білок, що накопичує кисень у скелетних і серцевих м'язах. У разі відсутності ураження чи запалення м'язових тканин міоглобін не потрапляє у кров. Більш того, наявність міоглобіну у вільному стані в плазмі крові отруює організм людини і призводить до гострої ниркової недостатності та гіпоксії тканин. Молекула міог-

лобіну має компакту, приблизно сферичну форму (рис. 5) з розміром  $4,5 \times 3,5 \times 2,5$  нм та молекулярною масою 43000 Да.

Поліклональні сироватки та моноклональні антитіла миші проти міоглобіну людини були отримані в Інституті біохімії ім. О.В. Палладіна НАН України (М.Ф. Стародуб, Т.Л. Діброва) та додатково досліджені на специфічність із використанням приладу типу «Плазмон» [33].

Білок А *Staphylococcus aureus* широко застосовується в різних методиках молекулярної імунології (імуноферментній, імунофлуоресцентній, радіоімунологічній) як універсальний реагент, зв'язаний з ферментом, флуоресцентною міткою, радіоактивним ізотопом, завдяки властивій йому стереокомплементарності до Fc-фрагменту імуноглобулінів класу G людини та ссавців (IgG). Також відомо про застосування білка А *St. aureus*, який з одного боку зв'язується з Fc-фрагментом імуноглобулінів, що робить можливою їхню орієнтовану іммобілізацію, а з іншого — не денатурує при взаємодії із золотом, у методиках ППР [34, 35]. Тому ми застосували білок А як перехідний орієнтуючий шар для іммобілізації антитіл проти міоглобіну людини на поверхні плівки золота (рис. 6, 7) із використанням поліклональних сироваток миші проти міоглобіну людини, які розчиняли (у 10 разів) у ЗФР — забуферованому фізичному розчині (0,01 моль/л фосфатний буфер рН 7.3, що містить 0,14 моль/л NaCl). На рис. 6 наведена сенсограма адсорбції білка А на поверхню плівки золота, його зв'язування з поліклональною сироваткою проти міоглобіну людини та специфічної реакції зв'язування з міоглобіном людини у сироватці крові. Для спрощення технології у подальших дослідженнях для закріплення антитіл на поверхню плівки золота ми використовували кон'югат антитіл — суміш білка А та антитіл миші проти міоглобіну людини, яку витримували 2 години перед нанесенням. На рис. 7 наведена сенсограма адсорбції кон'югату антитіл на поверхню плівки золота та специфічної реакції зв'язування з міоглобіном людини у сироватці крові.

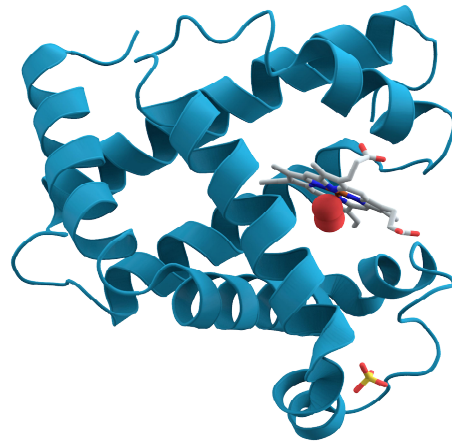
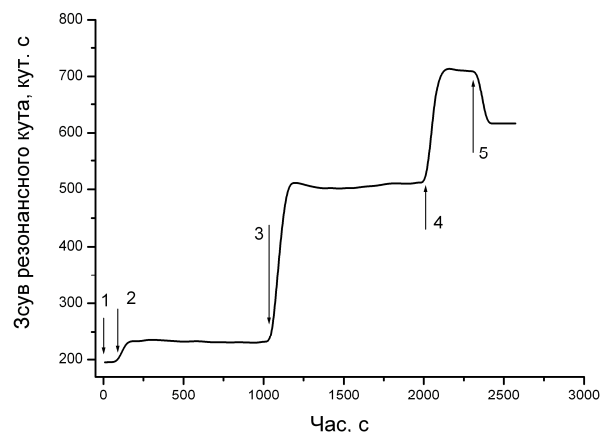


Рис. 5. Структура міоглобіну кита з розділенням 2.0 Å [32]

Рис. 6. Кінетична крива адсорбції білка А (2) і реакцій послідовного зв'язування з поліклональними антисироватками миші проти міоглобіну людини (3) та міоглобіном людини (4); 1, 5 — ЗФР рН 7.3





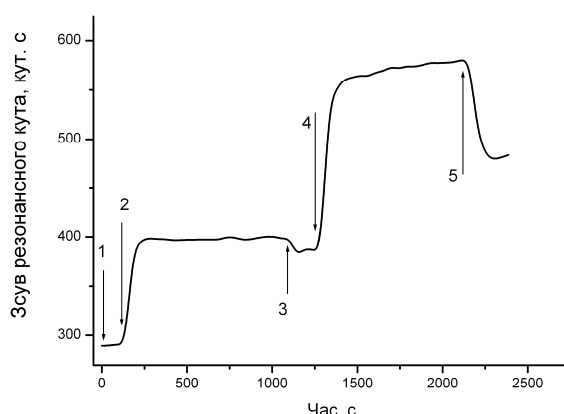


Рис. 7. Кінетична крива адсорбції кон'югату поліклональної антисироватки з білком А (2) та специфічної реакції зв'язування з міоглобіном людини (4); 1, 3, 5 — ЗФР рН 7.3

Для визначення рівня міоглобіну в умовах, що наближені до клінічної практики (застосування сироватки крові без розбавлення у фосфатному буфері — ЗФР рН 7.3), ми використали моноклональні антитіла (монАТ) миші проти міоглобіну людини, які мають більшу специфічність та афінність відносно поліклональних антитіл, і їхній кон'югат з білком А *St. aureus*. Схему тестування сироватки крові хворого на інфаркт демонструє сенсограма на рис. 8. Для запобігання неспецифічній сорбції білків сироватки крові ми використали молекули БСА, які блокують вільні місця на поверхні плівки золота. Для розриву специфічного зв'язку антитіло-антиген ми використовували 0,05 моль/л гліцин-НСІ буфер рН 2.2.

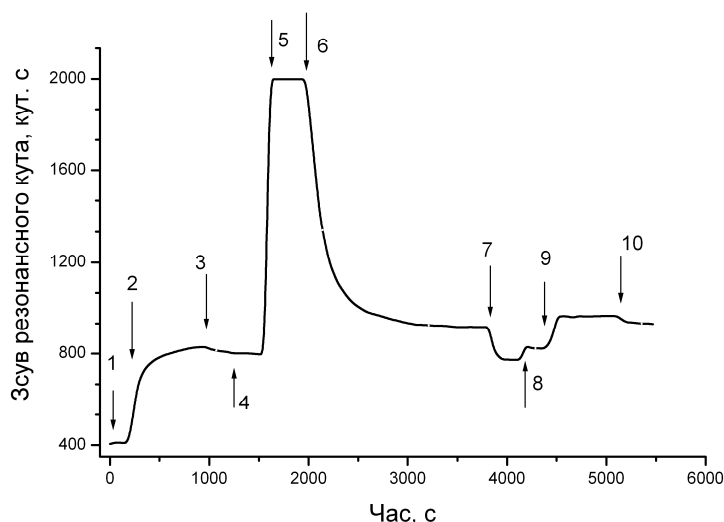


Рис. 8. Сенсограма зв'язування антитіл миші проти міоглобіну людини (кон'югат) з міоглобіном людини у сироватці крові хворого на інфаркт міокарду: 1 — ЗФР; 2 — кон'югат монАТ з білком А (100 мкг/мл у ЗФР); 3 — ЗФР; 4 — БСА (100 мкг/мл у ЗФР); 5 — сироватка хворого донора; 6 — ЗФР; 7 — буфер рН 2,2 (розрив специфічного зв'язку); 8 — ЗФР; 9 — міоглобін людини у ЗФР (200 мкг/мл); 10 — ЗФР

Після закріплення на поверхні плівки золота кон'югату монАТ з білком А (2) та блокування вільних місць поверхні плівки золота за допомогою молекул БСА (4) в робочу кювету інжектували нерозведену сироватку крові (5) та спостерігали за інтенсивною адсорбцією великої кількості протеїнів на робочу поверхню перетворювача ППР. Далі слідувала тривала промивка поверхні ППР-чипу фосфатним буфером (6) до деякого постійного рівня, що більше не відмивався, який саме відповідав концентрації міоглобіну у досліджуваній сироватці крові хворого. Наявність імунного зв'язку ми підтвердили специфічним прийомом, коли зв'язок антиміоглобін-міоглобін було розірвано з використанням буфера рН 2.2 (7). На рис. 8 можна побачити, що після розриву специфічного зв'язку та подачі фосфатного буферу у кювету (8) значення зміщення резонансного кута співпадає з первинним положенням (4) до подачі сироватки. Для того, щоб оцінити концентрацію міоглобіну у досліджуваній сироватці крові після розриву специфічного зв'язку до робочої кювети ввели тестовий розчин міоглобіну у фосфатному буфері з відомою концентрацією 200  $\mu\text{г/мл}$ . Саме такий рівень міоглобіну ми визначили у хворого на інфаркт міокарду донора.

**Фібриноген** — це розчинний білок плазми крові (з молекулярною масою 340000 Да та розмірами порядку  $45 \times 4,5 \times 4,5$  нм) і центральний білок системи згортання крові, яка активується під впливом багатьох серцево-судинних захворювань, і за допомогою ферменту тромбіну перетворюється на нерозчинний полімер фібрин, що становить основу згустку крові [36]. По кінцях молекули фібриногену (рис. 9) знаходяться глобулярні структури, що мають назву  $\beta$ - та  $\gamma$ -вузлики (*D*-фрагменти фібриногену); ще одна маленька глобула (центральный вузлик) знаходиться всередині (*E*-фрагмент фібриногену). Концентрація фібриногену різко зростає при різних запальних процесах і у випадку загрози внутрішньосудинного тромбоутворення, а при деяких патологічних станах, наприклад, ДВЗ-синдромі, спостерігається зниження його концентрації. Концентрація розчинного фібрину різко підвищується при активуванні системи згортання крові та тромбоутворенні [37]. А по концентрації *D*-димеру (молекулярна маса 189000 Да), що перевищує порогові рівень 500 нг/мл у клінічній практиці всього світу діагностують ТГВ і ТЕЛА [38].

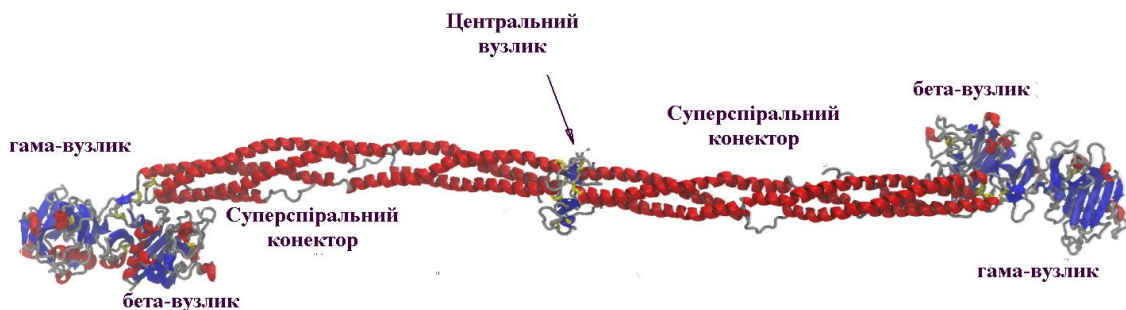


Рис. 9. Кристалічна структура фібриногену [39]

Моноклональні антитіла до різних ділянок (епітопів) на молекулі фібриногену були отримані у відділі молекулярної імунології Інституту біохімії ім. О.В. Пал-

ладіна НАН України (Е.В. Луговської, І.М. Колеснікова). З метою орієнтованої іммобілізації монАТ на золотій поверхні ППР-чипу та формування буферного шару заданої товщини ми запропонували використати процес самоорганізації в моношарах заміщених ціанофератів  $[\text{Fe}(\text{CN})_5\text{NH}_3]^{3-}$ , що зшиваються у тривимірну структуру іонами міді [40]. Такі структури несуть на своїй поверхні рівномірно розташовані активовані аміногрупи ( $\text{NH}_2^+$ ), з якими утворюють ковалентні зв'язки карбоксильні ( $\text{COOH}$ ) групи Fc фрагмента імуноглобуліну (IgG). Відбувається орієнтоване (місця специфічного зв'язування молекул направлені у розчин) закріплення антитіл без втрати їхніх функціональних можливостей. Ідею реалізовано з використанням неорганічної п'ятишарової плівки амінопентаціаноферату (II) міді  $(\text{Cu}_3[\text{Fe}(\text{CN})_5\text{NH}_3]_2)$ , яку методом пошарового осадження з водних розчинів ( $5 \cdot 10^{-4}$  моль/л сульфату міді ( $\text{CuSO}_4$ ) на 10 хвилин, амінопентаціаноферату натрію ( $\text{Na}_3[\text{Fe}(\text{CN})_5\text{NH}_3]$ ) на 1 хвилину), наносили на золоту поверхню ППР-чипу, яку попередньо модифікували тіолом (метод довільної адсорбції,  $1 \times 10^{-3}$  моль/л розчин  $\text{HS}(\text{CH}_2)_{15}\text{COOH}$  в етанолі, 24 години) (рис. 10) [41].

На рис. 11 продемонстровано, що використання цієї модифікації призводить до орієнтованого закріплення антитіл на поверхні ППР-сенсора та збільшує відгук на присутність фібриногену у пробі майже у два рази [42]. Крім того, отримані структури легко розчиняються у лужному середовищі молярної концентрації, що дозволяє відновити фізичний перетворювач ППР до початкового стану (тобто повернутися до чистої поверхні плівки золота) для багаторазового застосування без втрати ефективності його роботи. Чипи модифіковані неорганічною п'ятишаровою плівкою промивали забуферованим фізичним розчином (ЗФР — 0.01 моль/л рН 7.3 с 0,14 моль/л NaCl), сушили в потоці чистого повітря та зберігали при кімнатній температурі у малих стерильних ємностях без доступу повітря.

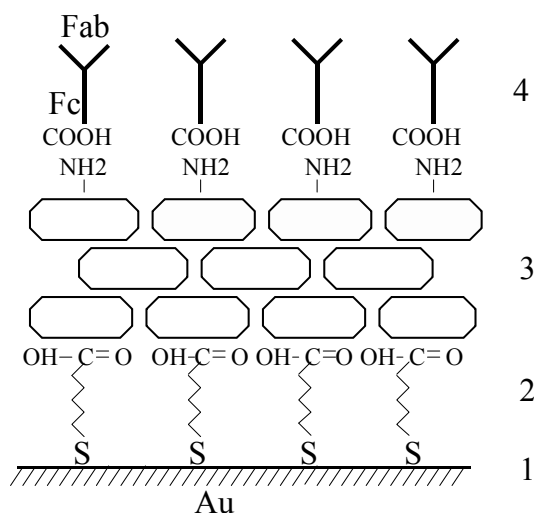


Рис. 10. Схема формування багатшарового покриття для сайт-орієнтованої іммобілізації антитіл (4): 1 — плівка золота; 2 — самоорганізований моношар алкантіолу  $\text{HS}(\text{CH}_2)_{15}\text{COOH}$ ; 3 — багатшарова плівка амінопентаціаноферату (II) міді  $(\text{Cu}_3[\text{Fe}(\text{CN})_5\text{NH}_3]_2)$ ; 4 — шар молекул білка (антитіла)

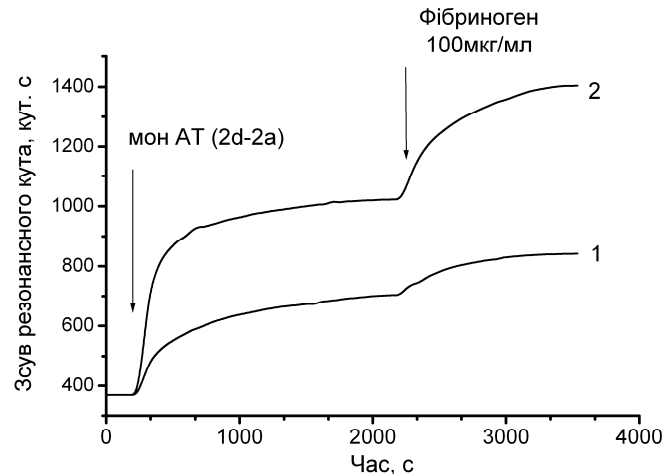


Рис. 11. Сенсограми реакції специфічного зв'язування антифібриноген-фібриноген людини на золотій поверхні перед (1) та після (2) застосування багаточарового орієнтуючого покриття

Далі модифіковані чипи використали для закріплення моноклональних антитіл до фібриногену монАТ(2d–2a) та дослідження кінетики зв'язування з ними модельних білків фібриногену при різних концентраціях. Для виключення неспецифічного зв'язування та полімеризації фібрину фібриноген розчиняли у ЗФР із додаванням 0,1 % детергенту Твін-20 (ЗФРТ). Для блокування вільних місць зв'язування використовували розчин БСА (100 мкг/мл) у ЗФРТ. Калібрувальну криву для визначення концентрації білку, який зв'язується з ППР-чипом сенсора, можливо побудувати на основі значень зсуву резонансного кута у насиченні або з використанням тангенса кута нахилу початкової ділянки кінетичної кривої ППР. Оскільки концентрація фібриногену у плазмі крові в нормі становить 2–4 мг/мл, то навіть при суттєвому її розведенні концентрація детектованого білку залишається досить високою, а вплив інших білків зменшується. Ми дослідили кінетичні концентраційні залежності взаємодії мАТ(2d–2a) з фібриногеном у ЗФРТ (рис. 12) та отримали калібрувальну криву з використанням тангенса кута нахилу ( $\alpha$ ) початкової ділянки кінетичної кривої ППР (рис. 13). Застосування розробленої діагностичної методики демонструє рис. 14, де наведено відгук сенсорного чипа на додавання двох різних проб плазми крові людини, що розведені у 300 разів.

У результаті використання калібрувальної кривої за п'ять хвилин нам вдалося встановити, що концентрації фібриногену у першого (3,8 мг/мл) та другого (3,2 мг/мл) донора знаходяться в межах норми. Концентрація фібриногену у плазмі крові людини в нормі і при патології змінюється від 1 до 15 мг/мл, розчинного фібрину — від 0,5 до 100 мкг/мл, а *D*-димеру — від 0,05 до 10 мкг/мл. При цьому для зменшення неспецифічного зв'язування необхідно розводити плазму крові мінімум у 10 разів. Нам не вдалося досягти необхідної чутливості імуносенсорів для визначення мінімальних діагностично визначних концентрацій розчинного фібрину та *D*-димеру фібриногену [43].

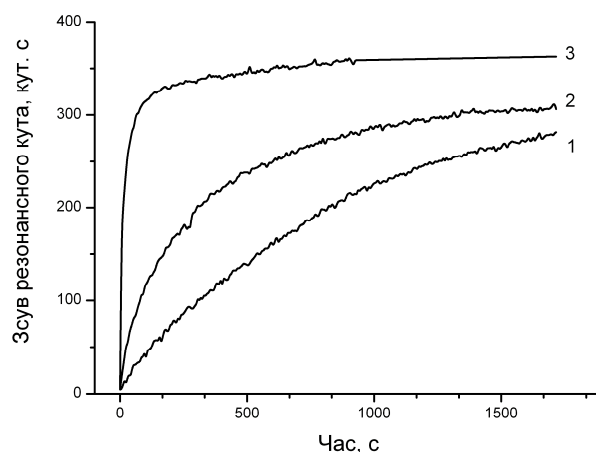


Рис. 12. Кінетичні концентраційні залежності специфічної взаємодії монАТ (2d–2a), що закріплені на модифікованій поверхні плівки золота, з фібриногеном розчинним у ЗФРТ:  
1 — 2 мкг/мл; 2 — 5 мкг/мл; 3 — 50 мкг/мл.

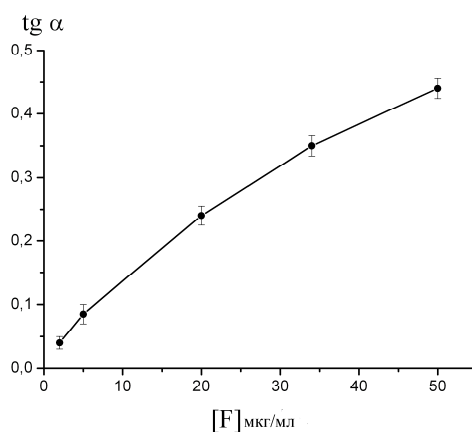


Рис. 13. Калібрувальна крива залежності тангенса кута нахилу ( $\alpha$ ) початкової ділянки кінетичної кривої ППР взаємодії фібриногену з мАТ (2d–2a) від концентрації фібриногену [F]

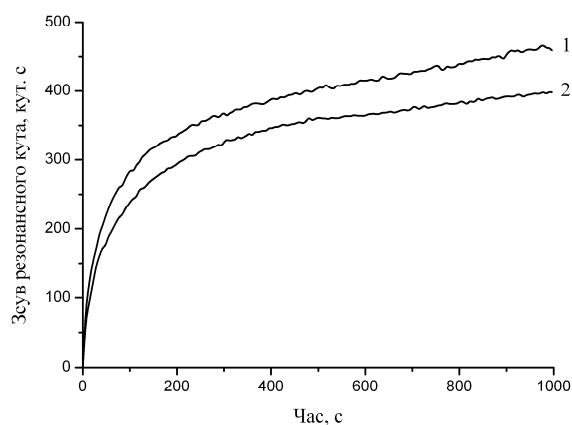


Рис. 14. Сенсограми взаємодії монАТ (2d–2a), що закріплені на модифікованій поверхні плівки золота, з фібриногеном у плазмі крові людини (розведення у 300 разів) для двох донорів (1, 2)

Ідея створення багатоканального імуносенсора на основі приладу типу «Плазмон» для молекулярної діагностики хвороб людини полягала у тому, щоб розширити лазерний промінь у горизонтальній площині та здійснити вимірювання кривої ППР по кожному з чотирьох каналів (детектування антитіл проти вірусу Епштейна-Барр, міоглобіну та фібриногену з введенням додаткового опорного каналу порівняння) за рахунок використання масиву фотодіодів з послідовним опитуванням. Скляна поворотна призма ( $n = 1,51$ , базовий кут  $50^\circ$ , площа робочої поверхні  $15 \times 27 \text{ мм}^2$ ) забезпечує зміну кута падіння розширеного променя  $p$ -поляризованого світла ( $\lambda = 0,65 \text{ мкм}$ ) у діапазоні  $46 \div 57^\circ$ . Світло, яке відбивається від чутливої поверхні сенсорів фіксується за допомогою масиву з 32 фотодіодів, що дозволяє послідовно виміряти повну криву ППР на кожному з 32 каналів, витрачаючи 1,6 секунди на одне вимірювання. Дану модифікацію приладу типу «Плазмон» було розроблено для лабораторних вимірювань [44]. Підвищення продуктивності методу ППР для широкомасштабної молекулярної діагностики хвороб людини полягає в досягненні високого ступеня паралелізації проведення аналізів з високою пропускну здатністю, мініатюризації та зменшенні собівартості приладу в цілому. З цього приводу, запропоновано конструкцію багатоеlementного сенсора з призмним типом збудження ППР за схемою Кречмана та оптичною розгорткою по куту у дисковому форматі на основі полімерного інтегрованого чипа та голографічних ґраток для вводу-виводу світла [45].

## Висновки

Роботу присвячено аналізу методик іммобілізації білків імунної пари (антитіло, антиген) на поверхні плівки золота для достовірного виявлення антитіл проти вірусу Епштейна-Барр (ВЕБ) і рівня молекулярних маркерів серцево-судинних захворювань (міоглобіну та фібриногену) у буферному розчині, сироватці та плазмі крові, а також підвищенню чутливості, стабільності та продуктивності сенсора на основі кутової спектроскопії поверхневих плазмонів (конфігурація Кречмана).

Показана доцільність використання моношарових плівок додекантіолу ( $(\text{HS}(\text{CH}_2)_{11}\text{CH}_3)$ ), що отримані методом самоорганізації молекулярних ансамблів з розчину, для захисту робочої поверхні сенсору, стабілізації властивостей плівки металу та її адаптації до адсорбції біологічних молекул. З метою підвищення швидкості молекулярного зв'язування, а також амплітуди відгуку сенсору за рахунок збільшення площі чутливої поверхні розглянуто наступні методики орієнтованого закріплення молекул-рецепторів у своєму природному, недеформованому взаємодію з металом стані. Іммобілізацію білків ВЕБ здійснювали всередині тривимірної структури полісахаридного гідрогелю – декстрану та досліджували взаємодію з сироваткою крові хворого на ВЕБ-інфекцію при розведенні 1:100 у цитратному буфері. Для орієнтованого закріплення антитіл миші проти міоглобіну людини застосували кон'югат з білком А та провели виміри у сироватці крові без розведення. Розроблено спосіб формування неорганічної п'ятишарової плівки амінопентаціаноферату (II) міді ( $\text{Cu}_3[\text{Fe}(\text{CN})_5\text{NH}_3]_2$ ), що отримана методом шарового осадження з водних розчинів, для орієнтованої іммобілізації антитіл проти фібриногену людини. Це дало можливість для модельних білків у фосфатному буфері зняти концентраційні характеристики, отримати калібрувальну криву з ви-

користанням тангенса кута нахилу початкової ділянки кінетичної кривої ППР (гранична чутливість 0,5 мкг/мл) та визначити рівень фібриногену у плазмі крові при розведенні у 300 разів.

Розроблена чотириканальна модифікація приладу типу «Плазмон» з послідовним опитуванням фотодіодів та використанням опорного каналу порівняння для виключення шуму температурних флуктуацій. Для широкомасштабного тестування населення ми запропонували конструкцію сенсора у дисковому форматі на основі призмової схеми збудження ППР у конфігурації Кретчмана з оптичною розгорткою по куту, де у якості сенсорної одиниці використали плоский чип з інтегрованими ґратками для вводу-виводу світла.

1. Комісаренко С.В. Світова коронавірусна криза. Київ: ЛАТ&К, 2020. 120 с.
2. Kostyukevych K.V., Khrystosenko R.V., Shirshov Yu.M., Kostyukevych S.A., Samoylov A.V., Kalchenko V.I. Multi-element gas sensor based on surface plasmon resonance: recognition of alcohols by using calixarene films. *Semiconductor Physics, Quantum Electronics and Optoelectronics*. 2011. **14**. No. 3. P. 313–320.
3. Khrystosenko R.V. Optimization of the surface plasmon resonance minimum detection algorithm for improvement of method sensitivity. *Semiconductor Physics, Quantum Electronics and Optoelectronics*. 2015. **18**. No. 3. P. 279–285.
4. Kostyukevych K.V. Transducer based on surface plasmon resonance with thermal modification of metal layer properties. *Semiconductor Physics, Quantum Electronics and Optoelectronics*. 2016. **19**. No. 3. P. 255–266.
5. Костюкевич С.О., Коптюх А.А., Костюкевич К.В., Лисюк В.О., Погода В.І., Христосенко Р.В., Самойлов А.В., Ушенін Ю.В., Суровцева О.Р., Крючин А.А. Удосконалення сенсорів з призмовим типом збудження поверхневого плазмонного резонансу на полімерній основі. *Реєстрація, зберігання і оброб. даних*. 2019. Т. 21. № 3. С. 3–19. <https://doi.org/10.35681/1560-9189.2019.21.3.183437>.
6. Vörös J. The density and refractive index of adsorbing protein layers. *Biophysical Journal*. 2004. **87**. P. 553–561.
7. Homola J. Surface plasmon resonance sensors for detection of chemical and biological species. *Chem. Rev.* 2008. **108**. P. 462–493.
8. Linman M.J., Abbas A., Cheng Q. Interface design and multiplexed analysis with surface plasmon resonance (SPR) spectroscopy and SPR imaging. *Analyst*. 2010. **135**. P. 2759–2767.
9. Патент 46018, Україна. Спосіб детектування та визначення концентрації біомолекул та молекулярних комплексів та пристрій для його здійснення / Ширшов Ю.М. та ін. 1997. Бюл. № 5 (2002).
10. Ulman A. An introduction to ultrathin organic films: from Langmuir-Blodgett to self-assembly. San Diego, CA.: Academic Press. 1991. 352 p.
11. Christopher Love J., Estroff L.A., Kriebel J.K., Nuzzo R.G., Whitesides G.M. Self-assembled monolayers of thiolates on metals as a form of nanotechnology. *Chem. Rev.* 2005. **105**. P. 1103–1169.
12. Lysenko S.I., Snopok B.A., Sterligov V.A., Kostyukevich E.V., Shirshov Yu.M. Light scattering by molecular-organized films on the surface of polycrystalline gold. *Optics and Spectroscopy*. 2001. **90**. No. 4. P. 606–616.
13. Junker A.K. Epstein-Barr Virus. *Pediatrics in Review*. 2005. **26**. No. 3. P. 79–84.
14. Godstall S.E., Kirchner J.T. Infectious mononucleosis. Complexities of common syndrome. *Postgrad Med*. 2000. **107**. No. 7. P. 175–186.
15. Крамарев С.О., Виговська О.В., Камінська Т.М. та ін. Інфекційний мононуклеоз Епштейна-Барр вірусної етіології у дітей: клінічні прояви, лікування із застосуванням ліпосомальних препаратів інтерферону. *Клінічна імунологія, алергологія, інфектологія*. 2009. **8**. С. 57–60.
16. Khanna R., Burrows S.R. Immune regulation in Epstein-Barr virus-associated diseases. *Microbiol. Revs.* 1995. **9**. P. 387–405.

17. Kawa K. Epstein-Barr virus-associated diseases in humans. *Int. J. Hematol.* 2000. **71**. No. 2. P. 108–117.
18. Чупрынова М.Ю., Потрахова Е.А. Роль вируса Эпштейна-Барр в патологии органов желудочно-кишечного тракта. *Детские инфекции.* 2013. **12**. № 2. С. 27–30.
19. Завіднюк Н.Г. Актуальні проблеми Епштейна-Барр вірусної інфекції. *Інфекційні хвороби.* 2015. **4**. С. 79–86.
20. Дуда О.К., Колесник Р.О., Окружнов М.В., Бойко В.О. Клінічні форми хронічної Епштейна-Барр вірусної інфекції: питання сучасної діагностики та лікування. *Актуальна інфектологія.* 2015. **1**. С. 15–20.
21. Лядова Т.И., Волобуева О.В., Гололобова О.В., Шепилева Н.В. Типы иммунного ответа при различных формах Эпштейна-Барр-вирусной инфекции. *Международный медицинский журнал.* 2017. **23**. № 1. С. 70–76.
22. Murray P.G., Young L.S. The role of the Epstein-Barr Virus in human disease. *Front. Biosci.* 2002. **2**. No. 3. P. 519–540.
23. Thompson M.P., Kurzrock R. Epstein-Barr Virus and cancer. *Clinical Cancer Research.* 2004. **10**. No. 3. P. 803–813.
24. Kutok J.L., Fang F. Spectrum of Epstein-Barr virus-associated diseases. *Annu. Rev. Mech. Dis.* 2006. **4**. No. 1. P. 375–404.
25. Егоров А.М., Осипов А.П., Дзантиев Б.Б. Теория и практика иммуноферментного анализа. Москва: Высшая школа, 1991. 288 с.
26. Христосенко Р.В., Нестерова Н.В., Костюкевич Е.В., Загородняя С.Д., Баранова Г.В., Головань А.В., Ушенин Ю.В., Самойлов А.В., Костюкевич С.А. Иммуносенсор на основе поверхностного плазмонного резонанса для определения антител против вируса Эпштейна-Барр. *Оптоэлектроника и полупроводниковая техника.* 2011. **46**. С. 92–99.
27. Nesterova N.V., Nosach L.M., Zagorodnya S.D., Povnitsa O.Y., Boltovets P.M., Baranova G.V., Golovan A.V. Elaboration of optical immunosensors based on the surface plasmon resonance for detecting specific antibodies and antigens of Epstein-Barr virus and human adenovirus. *Microbiology J.* 2008. **70**. No. 6. P. 67–73.
28. Khrystosenko R. V. Optimization of surface plasmon resonance based biosensor for clinical diagnosis of the Epstein-Barr herpes virus disease. *Semiconductor Physics, Quantum Electronics and Optoelectronics.* 2016. **19**. No. 1. P. 84–89.
29. Патент на корисну модель 51125, Україна. Імуносенсорна тест-система на основі поверхневого плазмонного резонансу для виявлення антитіл проти вірусу Епштейна-Барр / Нестерова Н.В., Загородняя С.Д., Баранова Г.В., Головань А.В., Ушенин Ю.В., Христосенко Р.В. 2009. Бюл. № 13 (2010).
30. Roden L.D., Myszka D.G. Global analysis of a macromolecular interaction measured on BIAcore. *Biochemical and biophysical research communications.* 1996. **225**, No.3. P. 1073–1077.
31. Weng S., Li X., Niu M., Ge B., Yu H.-Z. Blu-ray technology-based quantitative assays for cardiac markers: from disc activation to multiplex detection. *Anal. Chem.* 2016. **88**. P. 6889–6896.
32. Takano T. Structure of deoxymyoglobin from sperm whale. *Journal of Molecular Biology.* 1977. **110**. No. 3. P. 569–584.
33. Starodub N.F., Dibrova T.L., Shirshov Yu.M., Kostyukevych K.V. Development of the myoglobin sensor based on the surface plasmon resonance. *Ukrainskyi Biokhimichnyi Zhurnal.* 1999. **71**. No. 2. P. 33–37.
34. Rachkov A.E., Bakhmachuk A.O., Gorbatiuk O.B., Matsishin M.J., Khristosenko R.V., Ushenin Yu.V., Soldatkin A.P. SPR investigations of the formation of intermediate layer of the immunosensor bioselective element based on the recombinant Staphylococcal protein A. *Biopolymers and Cell.* 2015. **31**. No. 4. P.301–308.
35. Bakhmachuk A., Gorbatiuk O., Rachkov A., Dons'koi B., Khristosenko R., Ushenin Y., Peshkova V., Soldatkin A. Surface Plasmon Resonance Investigations of Bioselective Element Based on the Recombinant Protein A for Immunoglobulin Detection. *Nanoscale Research Letters.* 2017. **12**. P. 112.
36. Луговской Э.В., Макогоненко Е.М., Комисаренко С.В. Молекулярные механизмы образования и разрушения фибрина. Киев: Наук. думка, 2013. 230 с.
37. Гриценко П.Г., Луговської Е.В., Костюкевич К.В., Колеснікова І.М., Костюкевич С.О., Литвинова Л.М., Луговська Н.Е., Костюченко О.П., Замковий А.Д., Кошель Т.А., Комисаренко С.В. Імуносенсори на основі поверхневого плазмонного резонансу для кількісного визначення



розчинного фібрину та D-димеру людини. *Доповіді Національної академії наук України*. 2009. **1**. С. 155–160.

38. Kostyukevych K.V., Snopok B.A., Zinio S.A., Shirshov Yu.M., Kolesnikova I.N., Lugovskoi E.N. New opto-electronic system based on the surface plasmon resonance phenomenon: application to the concentration determination of DD-fragment of fibrinogen. *Proc. of SPIE*. 1998. **3414**. P. 290–301.

39. Литвинов Р.И. Конформационные превращения белковых молекул при механической деформации *in vitro* и *in silico* (на примере фибриногена). Доклад 23 сентября 2013 г., Казань.

40. Патент 37078, Україна. Біологічний оптоелектронний перетворювач, що контролює стереохімічне закріплення активних молекул / Гольцов Ю.Г., Матковська Л.О., Снопок Б.А., Костюкевич К.В., Ширшов Ю.М., Венгер Є.Ф. 2000. Бюл. № 3 (2001).

41. Snopok B.A., Goltsov Yu.G., Kostyukevich E.V., Matkovskaja L.A., Shirshov Yu.M., Venger E.F. Self-assembled multilayer super-structures as immobilization support for bioreceptors. *Sensors and Actuators B*. 2003. **95**. P. 336–343.

42. Kostyukevych K.V., Shirshov Yu.M. Optical sensor based on the surface plasmon resonance phenomenon in a thin gold film. *Pros. SPIE*. 2002. **5123**. P. 24–31.

43. Костюкевич Е.В., Христосенко Р.В., Ушенин Ю.В., Самолов А.В., Костюкевич С.А. Иммуносенсор поверхностного плазмонного резонанса с повышенной чувствительностью и стабильностью для детектирования фибриногена, растворимого фибрина и D-димера в плазме крови человека. *Оптоэлектроника и полупроводниковая техника*. 2012. **47**. С. 70–76.

44. Kostyukevych S.O., Kostyukevych K.V., Khrystosenko R.V., Lysiuk V.O., Koptuykh A.A., Moscalenko N.L. Multielement surface plasmon resonance immunosensor for monitoring of blood circulation system. *Optical Engineering*. 2017. **56**(12). 121907(1–8).

45. Патент 103662, Україна. Багатоелементний перетворювач на основі поверхневого плазмонного резонансу у дисковому форматі / Костюкевич С.О., Костюкевич К.В. 2011. Бюл. № 21 (2013).

Надійшла до редакції 07.10.2020