



УДК 535.394:539.233;577.112:612.115

© 2009

П. Г. Гриценко, Е. В. Луговської, К. В. Костюкевич,
І. М. Колеснікова, С. О. Костюкевич, Л. М. Литвинова,
Н. Е. Луговська, О. П. Костюченко, А. Д. Замковий, Т. А. Кошель,
академік НАН України С. В. Комісаренко

Імуносенсори на основі поверхневого плазмонного резонансу для кількісного визначення розчинного фібрину та D-димеру людини

Розроблено два імуносенсори на основі поверхневого плазмонного резонансу для кількісного визначення розчинного фібрину та D-димеру людини. В цих імуносенсорах використано отримані нами фібринспецифічні та D-димерспецифічні моноклональні антитіла, які були іммобілізовані на п'ятишаровій амінопентаціанофератній плівці ($\text{Cu}_3[\text{Fe}(\text{CN})_5\text{NH}_3]_2$). Кінетичні дослідження показали, що чутливість розроблених імуносенсорів для розчинного фібрину та D-димеру становить 0,5 та 1,0 мкг/мл відповідно.

Останнім часом зростає інтерес щодо розробки портативних біохімічних сенсорних приладів, які дають змогу отримати інформацію про взаємодію молекул у газових та рідких середовищах. Робота найбільш чутливих сенсорних систем заснована на імунохімічних реакціях, які дають змогу отримувати унікальні за специфічністю та чутливістю відгуки [1, 2]. Антитіла або антигени використовують як чутливі шари імуносенсорів; вони з високою специфічністю зв'язуються з молекулами-аналітами, відповідно антигенами або антитілами.

Захворювання людини, такі як тромбоз глибоких вен, тромбоемболія легеневих артерій, ДВЗ-синдром (дисиміноване внутрішньосудинне згортання крові), ішемічна хвороба серця, ішемічний інсульт, онкологічні, супроводжуються активацією системи згортання крові або є її наслідком. В результаті активації системи згортання крові утворюється фермент тромбін, який перетворює фібриноген на фібрин дезАА, здатний до спонтанної полімеризації. При невеликих концентраціях тромбіну фібрин дезАА формує комплекси з фібриногеном, а далі розчинні олігомери фібрину. Такі комплекси та олігомери є так званим розчинним фібрином. При підвищених концентраціях тромбіну олігомери фібрину утворюють протофібрили і далі фібрили, які формують тривимірну сітку фібрину, що є каркасом будь-якого тромбу. Отже, поява розчинного фібрину в крові є найбільш раннім показником

та прямим індикатором активації системи згортання крові та загрози утворення тромбу. В організмі людини утворення фібрину та його розщеплення відбуваються практично одночасно і найбільш важливим молекулярним маркером цих паралельних процесів є D-димер, яких формується в результаті розщеплення плазміном фібрину, стабілізованого фактором XIIIa.

В умовах клінічної діагностики вказаних вище захворювань та моніторингу ефективності їх лікування важливе значення має застосування експрес-методів визначення концентрації розчинного фібрину та D-димеру в плазмі крові людини. Нами показано можливість вимірювання концентрації розчинного фібрину та D-димеру людини з використанням оптичного імуносенсора, в основу дії якого покладено оптичне збудження поверхневих плазмонів (ПП), тобто спостереження поверхневого плазмонного резонансу (ППР) у тонкій плівці золота [3]. Дослідження проведені на автоматизованому малогабаритному приладі “Плазмон-5”, що розроблено в Інституті фізики напівпровідників імені В. Є. Лашкарьова НАН України [4].

У приладі “Плазмон-5” реалізовано збудження ПП за допомогою скляної призми (кут 65° , показник заломлення 1,61) за схемою Кретчмана, коли збуджуючий лазерний промінь p -поляризованого світла ($\lambda = 670$ нм) падає на металеву плівку з боку призми і вимірюється кутова залежність коефіцієнта відбиття $R(\theta)$. Як вихідний сигнал приладу фіксується зсув резонансного кута $\Delta\theta_{\text{ППР}}$ у часі.

Плівки золота (завтовшки 45 нм) наносили на скляні підкладки (показник заломлення 1,61), які були покриті тонким шаром хрому (~ 1 нм) методом термічного випаровування у вакуумі та відпалювали при $t \sim 120$ °C [5]. Оптичний контакт підкладки з призмою досягали за допомогою імерсійної рідини — поліфінового ефіру, показник заломлення якого дорівнює 1,6.

При дослідженні молекулярних реакцій розчин проб послідовно надходив у кювету, що контактувала з поверхнею золотої плівки у проточному режимі за допомогою мікронасосу Г705 (насос розроблено в Інституті фізики напівпровідників імені В. Є. Лашкарьова НАН України). Отримані сигнали завжди порівнювали в однаковому розчині, оскільки зміни розчину призводять до змін показника заломлення, які викликають зсув резонансного кута.

Використання антитіл у біосенсорних технологіях дозволяє проводити вимірювання у складних біологічних сумішах, таких як сироватка або плазма крові. Особливо цікавими для створення біосенсорів є моноклональні антитіла (монАТ), які є гомогенними імуноглобулінами однакової специфічності та можуть зв'язуватися з високою спорідненістю з відповідною ділянкою (епітопом) на антигені [6]. Раніше нами було розроблено імуносенсор на основі явища ППР для кількісного визначення фібриногену з використанням монАТ II-3b [7].

У відділі молекулярної імунології Інституту біохімії імені О. В. Палладіна НАН України було отримано два унікальні монАТ — фібринспецифічне антитіло FbI-3C [8] та D-димерспецифічне III-3b [9]. Дані монАТ не реагують з фібриногеном, що надає можливість використовувати їх для кількісного визначення розчинного фібрину й D-димеру в плазмі крові людини.

Як відомо, взаємодія білків із золотою поверхнею часто приводить до розриву дисульфідних зв'язків [10], внаслідок чого в цих біомолекулах спостерігаються структурні і конформаційні зміни, а іноді і повна втрата їх біологічної активності. Тому важливою проблемою є розробка методики закріплення однієї з взаємодіючих молекул на поверхні сенсорного чипу із збереженням її нативного стану і доступною просторовою орієнтацією активних центрів.

Нами проведено роботу по з'ясуванню оптимального способу модифікації поверхні золота для запобігання денатурації монАТ та втрати їх функціональної активності. Зокрема, були випробувані такі способи модифікації золотої поверхні.

Перша методика модифікації золотої поверхні, яку ми застосували, детально описана у роботі [11]. Золоту поверхню обробляли розчином $4 \cdot 10^{-5}$ моль/л роданіду калію (KCNS). Далі в кювету вносили розчин білка А (20 мкг/мл) у 0,01 моль/л фосфатному буфері (ФБ) рН 7,3 з 0,14 моль/л NaCl. Після промивки у ФБ додавали розчин монАТ III-3b (20 мкг/мл). При наступній промивці чипу буфером вільні місця для зв'язування блокували розчином БСА (100 мкг/мл). Після промивки у ФБ з 0,05% твін-20 (ТФБ) до кювети вносили розчин D-димеру в ТФБ у різних концентраціях. Було встановлено, що мінімальна концентрація D-димеру, яку ще можна зафіксувати у даній системі модифікації золотої поверхні, становить ~ 5 мкг/мл.

Далі ми випробувували спосіб модифікації поверхні золота з використанням глутарового альдегіду та БСА. Для цього золоту поверхню обробляли розчином БСА (100 мкг/мл) у ФБ. Далі у кювету вносили 1% розчин глутарового альдегіду. Через 60 хв кювету промивали і додавали розчин монАТ III-3b (20 мкг/мл). Після адсорбції антитіл вливали розчин 0,2 моль/л гліцину для блокування вільних альдегідних груп і витримували протягом 30 хв, а після промивки ТФБ до кювети вносили розчин D-димеру у ТФБ в різних концентраціях. Було виявлено, що чутливість даного імуносенсора для D-димеру становила ≤ 10 мкг/мл.

Найбільш оптимальним виявилось використання складних фероціанідів перехідних металів — модифікуючого покриття для орієнтованого закріплення антитіл на золотій поверхні ППР перетворювача. Даний метод розроблено у відділі функціональної оптоелектроніки Інституту фізики напівпровідників імені В. Є. Лашкарьова НАН України [12]. Він полягає у поступовому формуванні на поверхні золота неорганічної багат шарової плівки амінопентаціаноферату міді ($\text{Cu}_3[\text{Fe}(\text{CN})_5\text{NH}_3]_2$), плівка якого несе на своїй поверхні рівномірно розподілені активовані аміногрупи (NH_3^+), з якими можуть утворювати ковалентні зв'язки карбоксильні групи білків (у нашому випадку — моноклональних антитіл). Формування амінопентаціанофератних плівок проводили таким чином. Скляну пластинку з золотою плівкою занурювали в 1 ммоль розчин додекантіолу $\text{HS}(\text{CH}_2)_{11}\text{COOH}$ в етиловому спирті на 24 год з подальшим промиванням у чистому етанолі і сушінням у потоку чистого повітря. Формування плівки $\text{Cu}_3[\text{Fe}(\text{CN})_5\text{NH}_3]_2$ на поверхні тіолу проводили шляхом занурення пластинок спочатку на 10 хв у розчин $5 \cdot 10^{-4}$ моль/л сульфату міді (CuSO_4), а потім на 1 хв — у розчин $5 \cdot 10^{-4}$ моль/л амінопентаціаноферату натрію ($\text{Na}_3[\text{Fe}(\text{CN})_5\text{NH}_3]$). Таку процедуру повторювали п'ять разів. Ріст плівок амінопентаціаноферату міді з подальшою адсорбцією білка БСА було досліджено *in situ* за допомогою приладу "Плазмон-5" (рис. 1). Для порівняння було досліджено кінетику адсорбції БСА на чисту поверхню золота. Відгук на модифікованій поверхні втричі перевищував відгук на немодифікованій поверхні золота.

Нами досліджено кінетику взаємодії фібринспецифічних монАТ FhI-3C, іммобілізованих на амінопентаціанофератній плівці з фібрином дезААВВ людини, який був отриманий у лабораторії Інституту біохімії імені О. В. Палладіна НАН України за описаною раніше методикою [13]. Фібрин дезААВВ широко використовують для отримання препаратів розчинного фібрину. З метою гальмування полімеризації фібрину до розчинів фібрину дезААВВ додають різні інгібітори полімеризації — Gly-Pro-Arg-Pro пептид, фібриноген, плазму крові тощо. Для кінетичних досліджень ми розчиняли фібрин дезААВВ в у 0,01 моль/л фосфатному буфері рН 7,3 з 0,14 моль/л NaCl та 0,1% твін-20. 0,1% твін-20 гальмував полімеризацію фібрину дезААВВ, який залишався в розчиненому стані. Для виготовлення

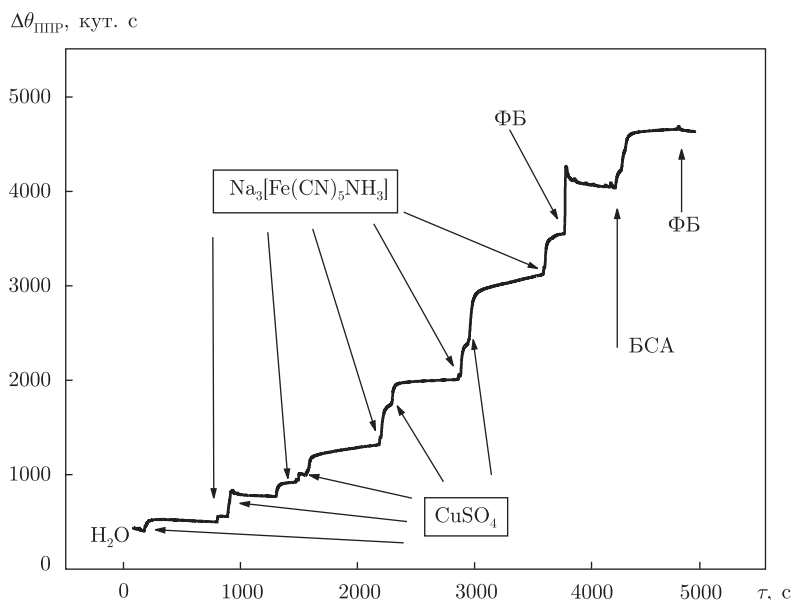


Рис. 1. Сенсорограма формування п'ятишарової плівки амінопентаціаноферату міді ($\text{Cu}_3[\text{Fe}(\text{CN})_5\text{NH}_3]_2$) на поверхні тіолату золота за рахунок повторюваності процедури послідовного внесення до кювети ППП сенсора водних розчинів сульфату міді (CuSO_4) та амінопентаціаноферату натрію ($\text{Na}_3[\text{Fe}(\text{CN})_5\text{NH}_3]$) з подальшою адсорбцією БСА (100 мкг/мл) у 0,01 моль/л фосфатному буфері рН 7,3 з 0,14 моль/л NaCl (ФБ)

імуносенсора на щойно сформовані амінопентаціанофератні плівки у проточну кювету вливали розчин монАТ Fnl-3C з концентрацією 50 мкг/мл у ФБ. Далі кювету промивали ТФБ, після чого вносили розчин БСА (100 мкг/мл) у ТФБ з метою блокування вільних місць зв'язування. На рис. 2 наведено типову сенсограму взаємодії монАТ Fnl-3C, що іммобілізовані на амінопентаціанофератній плівці, з фібрином дезААВВ у концентрації 2 мкг/мл. Калібрувальна крива для визначення концентрації білка, який зв'язується з чутливим елементом ППП сенсора, може бути побудована з кінетичних кривих адсорбції на підставі значень зсуву резонансного кута при насиченні, або з використанням значення тангенса кута нахилу початкової ділянки кінетичної кривої (рис. 2) [14]. Переважним є калібрування по тангенсу кута нахилу, оскільки це дає істотну перевагу у часі детектування досліджуваного білка. Встановлено, що мінімальна концентрація фібрину дезААВВ, яку можна зафіксувати за допомогою розробленого нами імуносенсора, становила 0,5 мкг/мл.

Концентрація розчинного фібрину в плазмі крові здорових донорів варіює від 0 до 3 мкг/мл. На сьогодні кількісне визначення розчинного фібрину в клінічній практиці має найбільше значення для діагностики ДВЗ-синдрому, при якому рівень розчинного фібрину може збільшуватись у десять і більше разів порівняно з нормою [15]. Таким чином, чутливість розробленого нами імуносенсора теоретично дозволяє кількісно визначати розчинний фібрин у плазмі крові за норми та при ДВЗ-синдромі. Наступним етапом нашої роботи буде дослідження зразків плазми крові здорових донорів та хворих на ДВЗ-синдром.

На модифіковані амінопентаціанофератом міді поверхні золота ми іммобілізували також D-димерспецифічні монАТ III-3b. Отримані чипи було використано для дослідження кінетики зв'язування монАТ III-3b з D-димером при різних концентраціях, розчиненого у ТФБ. Дослідження показали, що чутливість методу при застосуванні такої модифікації золотої поверхні для D-димеру становить 1 мкг/мл. Кількісне визначення D-димеру має найбільше

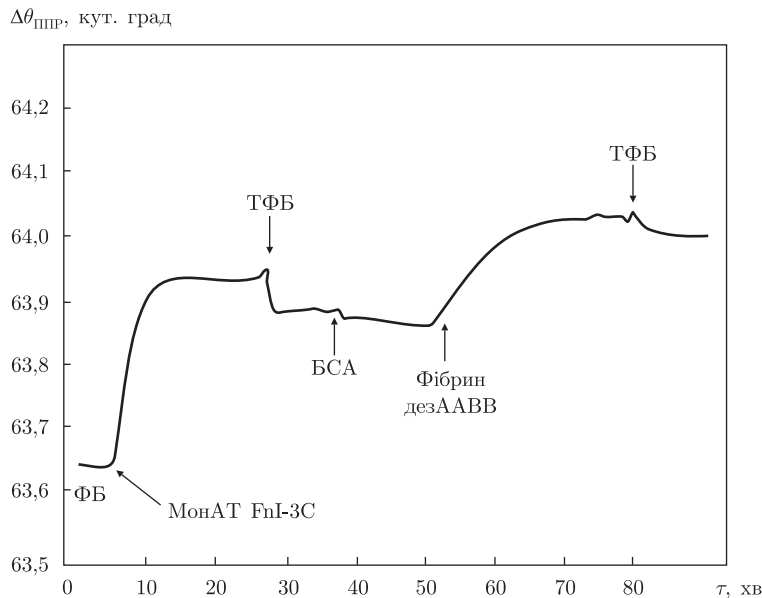


Рис. 2. Сенсорограма взаємодії моноклональних антитіл (монАТ) FhI-3C, що іммобілізовані на поверхні п'ятишарової плівки амінопентаціаноферату міді, з фібрином дезААВВ (2 мкг/мл), розчиненому в 0,01 моль/л фосфатному буфері рН 7,3 з 0,14 моль/л NaCl та 0,1% твін-20

значення для діагностики тромбозу глибоких вен та тромбоемболії легеневих артерій. Якщо концентрація D-димеру в плазмі крові не перевищує пороговий рівень норми 500 нг/мл, то це на 98–100% дозволяє виключити у пацієнта згадані вище патології. Чутливість створеного нами імуносенсора є недостатньою для використання його в діагностиці тромбозу глибоких вен та тромбоемболії легеневих артерій. Проте даний імуносенсор може бути використаний для діагностики ДВЗ-синдрому, при якому концентрації D-димеру в плазмі крові хворих можуть зростати до 10 мкг/мл та навіть вище. Планується проведення роботи по збільшенню чутливості розробленого імуносенсора.

Таким чином, було розроблено два імуносенсори на основі ППР з використанням фібринспецифічних монАТ FhI-3C та D-димерспецифічних монАТ III-3b, які дозволяють проводити кількісне визначення розчинного фібрину та D-димеру людини у розчині з чутливістю 0,5 та 1,0 мкг/мл відповідно.

1. *Биосенсоры: основы и приложения* / Под ред. Э. Тернера, И. Карубе, Дж. Уилсона. – Москва: Мир, 1992. – 616 с.
2. *Медянцева Э. П., Халдеева Е. В., Будников Г. К.* Иммуносенсоры в биологии и медицине: аналитические возможности, проблемы и перспективы // Журн. аналит. химии. – 2001. – **56**, № 10. – С. 1015–1031.
3. *Дмитрук М. Л., Маева О. И., Соснова М. В.* Оптичні сенсори на основі поверхневого плазмонного резонансу // Оптоелектроника и полупроводник. техника. – 2006. – **41**. – С. 29–45.
4. *Пат. 46018* Україна, МПК G 01N^o 21/55. Спосіб детектування та визначення концентрації біомолекул і молекулярних комплексів та пристрій для його здійснення / Ю. М. Ширшов, Є. Ф. Венгер, А. В. Прохорович та ін.; Заявл. 22.10.1997. – Опубл. 15.05.2002. – Бюл. № 5.
5. *Snopok B. A., Kostyukevich E. V., Lysenko S. I. et al.* Optical biosensors based on the surface plasmon resonance phenomenon: optimization of the metal layer parameters // Semiconductor Phys., Quantum Electron. and Optoelectron. – 2001. – **4**, No 1. – P. 56–69.
6. *Луговской Э. В., Комисаренко С. В.* Моноклональные антитела как инструмент исследования полимеризации фибрина // Биоорган. химия. – 2000. – **26**, № 12. – С. 883–891.

7. Ширшов Ю. М., Костюкевич Е. В., Луговской Э. В. и др. Иммуносенсор на основе поверхностного плазмонного резонанса для экспресс-анализа уровня фибриногена в плазме крови человека // Доп. НАН України. – 2003. – № 7. – С. 167–170.
8. Колеснікова І. М., Луговська Н. Е., Луговської Е. В. та ін. Моноклональні антитіла, специфічні до фібрину людини // Там само. – 2006. – № 9. – С. 181–185.
9. Lugovskoy E. V., Kolesnikova I. N., Gritsenko P. G. et al. A neoantigenic determinant in the D-dimer fragment of fibrin // Thromb. Res. – 2002. – **107**, No 3/4. – P. 151–156.
10. Jung Ch., Dannenberger O., Xu Y. et al. Self-assembled monolayers from organosulfur compounds: a comparison between sulfides, disulfides, and thiols // Langmuir. – 1998. – **14**. – P. 1103–1107.
11. Болтовец П. Н., Снопок Б. А., Ширшов Ю. М., Дяченко Н. С. Организованные белковые слои для оптоэлектронных биосенсорных систем: ориентированная иммобилизация протеинов на модифицированной поверхности золота // Доп. НАН України. – 2001. – № 11. – С. 137–144.
12. Snopok B. A., Goltsov Yu. G., Kostyukevich E. V. et al. Self-assembled multilayer super-structures as immobilization support for bioreceptors // Sensors and Actuators B. – 2003. – **95**. – P. 336–343.
13. Belitser V. A., Varetskaja T. V., Malneva G. V. Fibrinogen-fibrin interaction // Biochim. Biophys. Acta. – 1968. – **154**. – P. 376–380.
14. Lofas S., Malmqvist M., Ronnberg I., Stenberg E. Bioanalysis with surface plasmon resonance // Sensors and Actuators B. – 1991. – **5**. – P. 79–84.
15. Dempfle C. E. The use of soluble fibrin in evaluating the acute and chronic hypercoagulable state // Thromb. Haemost. – 1999. – **82**, No 2. – P. 673–683.

*Інститут біохімії ім. О. В. Палладіна
НАН України, Київ*

Надійшло до редакції 26.05.2008

**P. G. Gritsenko, E. V. Lugovskoy, K. V. Kostioukevich, I. N. Kolesnikova,
S. A. Kostioukevich, L. M. Litvinova, N. E. Lugovskaya, E. P. Kostuchenko,
A. D. Zamkovi, T. A. Koshel, Academician of the NAS of Ukraine
S. V. Komisarenko**

Immunosensors based on the surface plasmon resonance for human soluble fibrin and D-dimer quantification

Two immunosensors based on the surface plasmon resonance effect for human soluble fibrin and D-dimer quantification have been elaborated. In these immune sensors, fibrin-specific and D-dimer-specific monoclonal antibodies immobilized on the aminopentacyanoferratic film (Cu₃[Fe(CN)₅NH₃]₂) have been used. Kinetic investigations showed that the sensitivities of immune sensors elaborated for soluble fibrin and D-dimer were 0.5 and 1 μg/ml, respectively.