

Новые возможности оценки маркеров болезни Альцгеймера в сыворотке крови

*С. В. ВОРОБЬЕВ^{1,2,3}, А. Ю. ПЛЕХАНОВ⁴, И. К. ТЕРНОВЫХ^{1,2},
А. С. УСИКОВ^{2,5}, А. А. ЛЕБЕДЕВ², А. Н. СМИРНОВ², Н. М. ШМИДТ²,
М. С. ДУНАЕВСКИЙ², С. П. ЛЕБЕДЕВ²

¹ ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр им. В. А. Алмазова» Минздрава России, Санкт-Петербург, Россия

² ФГБУН «Физико-технический институт им. А.Ф. Иоффе» Минобрнауки России, Санкт-Петербург, Россия

³ ФГБОУ ВО «Санкт-Петербургский государственный педиатрический медицинский университет» Минздрава России, Санкт-Петербург, Россия

⁴ ФГБУ «Научно-исследовательский институт гриппа им. А. А. Смородинцева» Минздрава России, Санкт-Петербург, Россия

⁵ ООО Группа компаний «Нитридные кристаллы», Санкт-Петербург, Россия

Резюме

С учётом стабильного роста числа случаев болезни Альцгеймера, всё более остро встает вопрос повышения уровня её диагностики. Цель исследования: разработка нового метода верификации маркеров болезни Альцгеймера в сыворотке крови на основе графеновых сенсоров. Материалы и методы. Рост графена осуществлялся методом сублимации. На первом этапе эксперимента оценивали эффективность прикрепления антител к бета-амилоидному пептиду человека 1–42 и общему тау-протеину человека. На втором этапе проводили оценку способности сенсоров осуществлять анализ белков бета-амилоида 1–42 и общего тау-протеина. Результаты. Графен, функционализированный сульфогруппами от пиранина проявляет достаточную способность иммобилизовать антитела. Обработка глутаровым альдегидом графена, функционализированного аминогруппами, значительно повышает способность последнего к иммобилизации антител. Сенсоры проявляют высокую чувствительность при концентрациях белков в растворах от 10^{-10} до 10^{-15} г/мл. При небольших концентрациях антигена полученные калибровочные графики круто спадают и расходятся незначительно, что позволяет использовать эту область для определения неизвестной концентрации антигена. Концентрация белков в слепом опыте определена с погрешностью в 1,5 раза, то есть примерно в половину шага разведения. Более дробное разведение проб поможет достичь большей точности, что показывает принципиальную применимость использованного нами подхода. Заключение. Проведённые нами к настоящему моменту исследования позволили разработать медицинские и физико-химические аспекты действия сенсоров на основе графена для детекции низких концентраций белков бета-амилоида и тау-протеина в средах. Продемонстрирована принципиальная техническая работоспособность данной методики.

Ключевые слова: графен; биосенсор; болезнь Альцгеймера; бета-амилоид; тау-протеин; нейродегенерация; биомаркеры

Для цитирования: Воробьев С. В., Плеханов А. Ю., Терновых И. К., Усиков А. С., Лебедев А. А., Смирнов А. Н., Шмидт Н. М., Дунаевский М. С., Лебедев С. П. Новые возможности оценки маркеров болезни Альцгеймера в сыворотке крови. Антибиотики и химиотерапия. 2025; 70 (1–2): 20–28. doi: <https://doi.org/10.37489/0235-2990-2025-70-1-2-20-28>. EDN: KZBIMH.

New Possibilities for Evaluating Markers of Alzheimer's Disease in Blood Serum

*SERGEY V. VOROBEV^{1,2,3}, ANTON YU. PLEKHANOV, IVAN K. TERNOVYKH^{1,2},
ALEXANDER S. USIKOV^{2,5}, ALEXANDER A. LEBEDEV^{4,5}, ALEXANDER N. SMIRNOV²,
NATALIA M. SHMIDT², MIKHAIL S. DUNAEVSKIY², SERGEY P. LEBEDEV²

¹ Almazov National Medical Research Centre, Saint Petersburg, Russia

² Ioffe Institute, Saint Petersburg, Russia

³ Saint-Petersburg State Pediatric Medical University, Saint Petersburg, Russia

⁴ Smorodintsev Research Institute of Influenza, Saint Petersburg, Russia

⁵ Nitride Crystals Group Ltd., Saint Petersburg, Russia

Abstract

Given the steady increase in the number of cases of Alzheimer's disease, the issue of improving the level of its diagnosis is becoming more urgent. The aim of the study was to develop a new method for verifying markers of Alzheimer's disease in blood serum based on graphene sensors. Materials and methods. Graphene growth was carried out by sublimation. At the

*Адрес для корреспонденции:
E-mail: sergiognezdo@yandex.ru



*Correspondence to:
E-mail: sergiognezdo@yandex.ru



EDN: KZBIMH

first stage of the experiment, the effectiveness of antibody attachment to human beta-amyloid peptide 1–42 and human total tau protein was evaluated. At the second stage, the sensors' ability to analyze beta-amyloid 1–42 proteins and total tau protein was evaluated. **Results.** Graphene functionalized with sulfo groups from pyranine exhibits sufficient ability to immobilize antibodies. Treatment with glutaraldehyde of graphene functionalized by amino groups significantly increases the ability of the latter to immobilize antibodies. The sensors exhibit high sensitivity at protein concentrations in solutions from 10^{-10} to 10^{-15} g/ml. At low concentrations of antigen, the obtained calibration graphs steeply drop and slightly diverge, which makes it possible to use this area to determine an unknown concentration of antigen. The concentration of proteins in the blind experiment was determined with an error of 1.5 times, that is, about half the dilution step. A more fractional dilution of samples will help to achieve greater accuracy, which shows the fundamental applicability of the approach used. **Conclusion.** The research conducted to date has allowed the development of medical, as well as physicochemical aspects of the action of graphene-based sensors for detecting low concentrations of beta-amyloid and tau protein proteins in media. The fundamental technical efficiency of this technique has been demonstrated.

Keywords: graphene; biosensor; Alzheimer's disease; beta-amyloid; tau protein; neurodegeneration; biomarkers

For citation: Vorobev S. V., Plekhanov A. Yu., Ternovykh I. K., Usikov A. S., Lebedev A. A., Smirnov A. N., Shmidt N. M., Dunaevskiy M. S., Lebedev S. P. New possibilities for evaluating markers of alzheimer's disease in blood serum. *Antibiotiki i Khimioter = Antibiotics and Chemotherapy*. 2025; 70 (1–2): 20–28. doi: <https://doi.org/10.37489/0235-2990-2025-70-1-2-20-28>. EDN: KZBIMH.

Введение

За последнее время в мире наблюдается устойчивая тенденция увеличения количества пациентов, страдающих нарушениями высших корковых функций. При этом только пациентов с деменцией зарегистрировано до 50 млн человек. В возрастной категории от 50 до 80 лет отмечается удвоение числа больных каждые пять лет [1]. В ряде стран ожидают увеличение числа пациентов к 2060 г. в два раза [2]. До 80% всех случаев деменции по данным ряда исследований обусловлены болезнью Альцгеймера [3, 4]. В этих условиях значимым является диагностика заболевания на ранних стадиях, до развития тяжёлых нарушений высших корковых функций. Именно в это время эффективность лечебных мероприятий наиболее высока, позволяя отсрочить наступление потери независимости больного. Такой подход способствует снижению нагрузки на медицинские и социальные службы, уменьшает прямые и косвенные расходы на ведение пациента.

Развитие медицинской науки безусловно улучшило качество диагностики. Однако выявление болезни Альцгеймера, особенно на ранних стадиях, остаётся сложной клинической задачей. Отчасти это обусловлено недооценкой симптомов заболевания со стороны самого пациента и его родственников, связывающих наблюдающиеся мнестические расстройства со старением. С другой стороны, отсутствие чётко очерченных патогномичных клинических проявлений, наличие коморбидной патологии, определённые пробелы, существующие в диагностических критериях, затрудняют верификацию заболевания [5]. Для решения этой задачи предложены различные методы инструментальной и лабораторной диагностики, позволяющие оценить содержание ряда специфических маркеров болезни Альцгеймера. Определённые перспективы имеют методы компьютерной нейровизуализации, в частности позитронно-эмиссионная томография (ПЭТ). С помощью использования специальных лигандов,

способных связываться с определёнными веществами, удаётся возможным установить топическую локализацию и уровень накопления таких маркеров болезни Альцгеймера, как бета-амилоид и тау-протеин. Для этих целей используется Питсбургская субстанция, флорбетапир (идентификация амилоидопатии), флотауципир (оценка таупатии) и ряд других субстанций [6–8]. Однако необходимо отметить, что ПЭТ-исследование является весьма дорогостоящим, требует наличия сложного технологического оборудования и назначение его в качестве скринингового метода является невозможным.

Другим методом исследования, является определение бета-амилоида и тау-протеина в цереброспинальной жидкости. В настоящее время получены данные, позволяющие говорить о наличии значимых корреляций между развитием заболевания, его прогрессированием и содержанием фракций бета-амилоида 1–40 и 1–42, их соотношения, а также фосфорилированного тау-протеина в ликворе у пациентов с болезнью Альцгеймера. Это позволило Национальному институту старения и Альцгеймеровской ассоциации (National Institute on Aging/Alzheimer's Association) разработать критерии стадии умеренных когнитивных нарушений при болезни Альцгеймера, основанные на оценки биомаркеров [9, 10].

В тоже время необходимость проведения люмбальной пункции в значительной степени ограничивает широкое применение данного метода. Далеко не все пациенты или их родственники дают своё согласие на её проведение. Кроме того, сама по себе пункция является инвазивным малым хирургическим вмешательством и требует госпитализации пациента. Всё это приводит к тому, что значительная часть больных, находящихся на амбулаторно-поликлиническом сопровождении, выпадает из горизонта данного обследования. Подобное состояние проблемы ведёт к необходимости применения такого метода, который смог бы эффективно определять биомар-

керы болезни Альцгеймера в доступных биологических субстратах, к которым, в частности, относится сыворотка крови.

Однако необходимо отметить, что как бета-амилоид, так и тау-протеин плохо проникают через гематоэнцефалический барьер в силу своих физико-химических свойств и обнаруживаются в крови в достаточно низких концентрациях, находящихся на грани возможностей лабораторных методов, применяемых в рутинной практике, например, иммуноферментного анализа. Использование в этих целях аналитических методов не представляется возможным вследствие их сложности и дороговизны.

Таким образом, на сегодняшний день имеется клиническая необходимость разработки метода лабораторной диагностики, способного проводить детекцию малых концентраций белка бета-амилоида и тау-протеина в сыворотке крови, что и послужило мотивом для нашего исследования.

Материал и методы

Предлагаемый метод основан на концепции графенового сенсора. Было установлено, что графен, являющийся аллотропной модификацией углерода, обладает рядом специфических физических свойств, среди которых в аспекте нашего исследования, наиболее интересна его высокая электропроводимость. Проведённые ранее исследования показали способность графена значимо реагировать изменением электрического сопротивления при осаждении на нём любых химических веществ [11, 12]. Причём для этого необходимы их крайне низкие концентрации, находящиеся на уровне 10^{-15} – 10^{-12} г. В то же время отклик графена отмечается на любые вещества, и для возможности практического применения разрабатываемых сенсоров необходимо придание им селективности. Для этого была отработана методика прикрепления к поверхности графеновой решётки специфических антител (АТ), которые при контакте с комплиментарными им антигенами (АГ) формировали АТ-АГ комплекс, что сопровождалось изменением электрического сопротивления.

Рост графена осуществлялся методом сублимации поверхности монокристаллического карбида кремния (SiC) [13]. Для роста использовалась технологическая установка сублимационной эпитаксии, в которой для достижения высоких температур (более 1500°C) применяется метод высокочастотного индуктивного нагрева. Контроль температуры графитовой ростовой ячейки осуществлялся при помощи оптического пирометра RAYTEK MR1SF с диапазоном измерений от 1000 до 3000°C и погрешностью во всём диапазоне $\pm 0,5\%$.

Формирование плёнок происходило при температуре $1730 \pm 15^{\circ}\text{C}$ в атмосфере особо чистого аргона (чистота 99,9999%) при давлении 740 ± 10 Торр. Продолжительность этапа роста составляла 5 мин. В качестве подложек применялись коммерческие высокоомные пластины 4H-SiC с ориентацией ростовой грани (0001) $\pm 0,25^{\circ}$ (Si-грань). Для возможности изготовления сенсорных структур и пропускания тока только через плёнку графена применялись высокоомные SiC пластины с сопротивлением более 10^9 Ом \times см.

Во время первого этапа экспериментов оценивали эффективность прикрепления специфических моноклональных мышинных антител к бета-амилоидному пептиду человека 1–42 (Cloud-Clone Corp., Китай) и поликлональных кроличьих антител к общему тау-протеину человека (Cloud-Clone Corp., Китай). Все сенсоры были разделены на две группы. В первой группе проводили функционализацию графена посредством

использования аминогрупп, фенил-нитрогрупп, а также карбонильных групп. Общий порядок действий был аналогичен на первом и втором этапах нашей работы и подробно описан в предыдущей публикации [14]. Часть сенсоров (вторая группа) предварительной функционализации не подвергалась. Иммунизация антител проходила непосредственно на поверхность графена при комнатной температуре в течение 2 ч из растворов, приготовленных на фосфатно-буферном физиологическом растворе (PBS) с концентрацией антител 10 мкг/мл с последующей отмывкой PBS (2 раза по 10 мин) и однократной промывкой дистиллированной водой (10 мин).

На первом уровне оценки полученных данных проводилась флуоресцентная микроскопия с применением микроскопа Olympus BX51, $\times 10$. Для этого все подготовленные графеновые поверхности инкубировали в растворе вторичных меченых антител с достаточной концентрацией (для белка бета-амилоида 1–42 — в кроличьих антителах против IgG мыши, меченых ФИТЦ, 1: 200 (Cloud-Clone, Китай), для белка тау-протеина — в антителах морской свинки против IgG кролика, меченых ФИТЦ, 1: 200 (Cloud-Clone, Китай) в течение 30 м, при температуре 37°C , затем их ополаскивали проточной водопроводной водой в течение 30 с.

На втором уровне оценки прикрепления антител к поверхности графена изучаемые образцы исследовались хемолуминисценцией с помощью прибора Chemidoc (BioRad). Подробная методика также была описана ранее [14].

Третьим уровнем оценки фиксации материала и исследования поверхностей чипов «SiC/графен» являлась атомно-силовая (сканирующая зондовая) микроскопия (АСМ, СЗМ). Использовались сканирующие зондовые микроскопы NTegra-Aura (NTMDT, Россия) и металлизированные зонды HA_NC/Pt (NTMDT) и NSG10/Pt (TipsNano) с радиусом закругления острия $R=30$ нм. Для определения поверхностного потенциала использовался двухпроходный режим Кельвин-Зонд микроскопии (КЗМ). В первом проходе измерялся рельеф поверхности в полуконтактном режиме, при этом амплитуда колебаний составляла 20–30 нм. Во втором проходе зонд сканировал поверхность, двигаясь на постоянном расстоянии зонд–поверхность 20 нм, при этом измерялась амплитуда (с последующим её занулением) колебаний, вызванных периодическим изменением потенциала зонд–образец. Амплитуда прикладываемого переменного напряжения составляла $U_{ac}=1$ В. Частота переменного сигнала подбиралась близкой к значению механического резонанса кантилевера (в диапазоне от 100 до 300 кГц). Измерение рельефа поверхности позволяло оценить количество загрязнений на поверхности после функционализации. Измерение потенциала поверхности позволяло оценить долю покрытия поверхности двуслойным графеном и долю покрытия поверхности однослойным графеном.

На втором этапе работ проводили оценку способности подготовленных нами сенсоров осуществлять качественный и количественный анализ белков бета-амилоида 1–42 и общего тау-протеина в рабочих растворах. Для этого первоначально была проведена калибровка подготовленных нами сенсоров. В этих целях проводилась оценка отклика чипов, выражавшееся в изменении электрического сопротивления. Детектирование проводили из разбавленных с помощью PBS растворов белков с их концентрацией от 1×10^{-16} , до 1×10^{-9} г/мл. Во время эксперимента чипы опускались на 120 с в раствор для стабилизации всех переходных процессов с разной концентрацией белков, начиная с раствора с самой низкой концентрацией, при приложении к чипу постоянного сигнала сначала 40 мВ, затем 60 мВ и измерялся отклик чипа по формуле:

$$(R_0 - R) / R_0, \%$$

где R_0 — сопротивление чипа в чистом растворе PBS; R — сопротивление чипа в растворе PBS с разведённым белком.

Для оценки сопротивления использовали потенциостат-гальваностат ПИ-50-Pro (Elins, Россия) в трёхэлектродной ячейке с разделёнными пространствами рабочего элект-

трода — графен/SiC-чип, электрода сравнения — насыщенный хлоридсеребряный электрод (или серебряная проволока) и вспомогательного электрода — платиновая пластина. Образцы графена размером 1×1,5 мм монтировали в виде чипа (микросхемы) на держатель с токоведущими элементами и использовали в дальнейших экспериментах.

Результаты

Оценка методик прикрепления к поверхности графена антител. Первый этап заключался в иммобилизации на поверхности графена антител к бета-амилоиду 1–42 и общему тау-протеину. В ходе серии экспериментов установлено, что наиболее оптимальным является иммобилизация антител с их концентрацией в базовом растворе 15 мкг/мл. Именно в этих сенсорах отмечается наибольшая интенсивность свечения при проведении как флуоресцентной микроскопии, так и хемолюминисценции. При этом снижение уровня антител ухудшает результаты. В то же время увеличение содержания антител в растворе до 45 мкг/мл не даёт значимого повышения прикрепления антител к поверхности графена.

В качестве примера на рис. 1 изображены результаты оценки иммобилизации на поверхность графена, выполненные различными методами.

На поверхности всех образцов графена при проведении АСМ наблюдались характерные ступени шириной 200–300 нм. Шероховатость поверхности для всех образцов была 0,4–0,5 нм. Производные плоских ароматических углеводородов, таких как пирен, имеют значительное сродство к графену, поскольку за счёт π - π -стекинга способны закрепляться на поверхности графена всей плоскостью, подобно тому, как располагаются слои графена в составе графита [15]. Это обстоятельство даёт возможность использовать замещение пирена с различными функциональными группами для привнесения таких функциональных групп на поверхность графена.

Результаты визуальной оценки на флуоресцентном микроскопе в основном совпадают с оценкой, проведённой с помощью хемолюминисценции и АСМ и позволят объективизировать

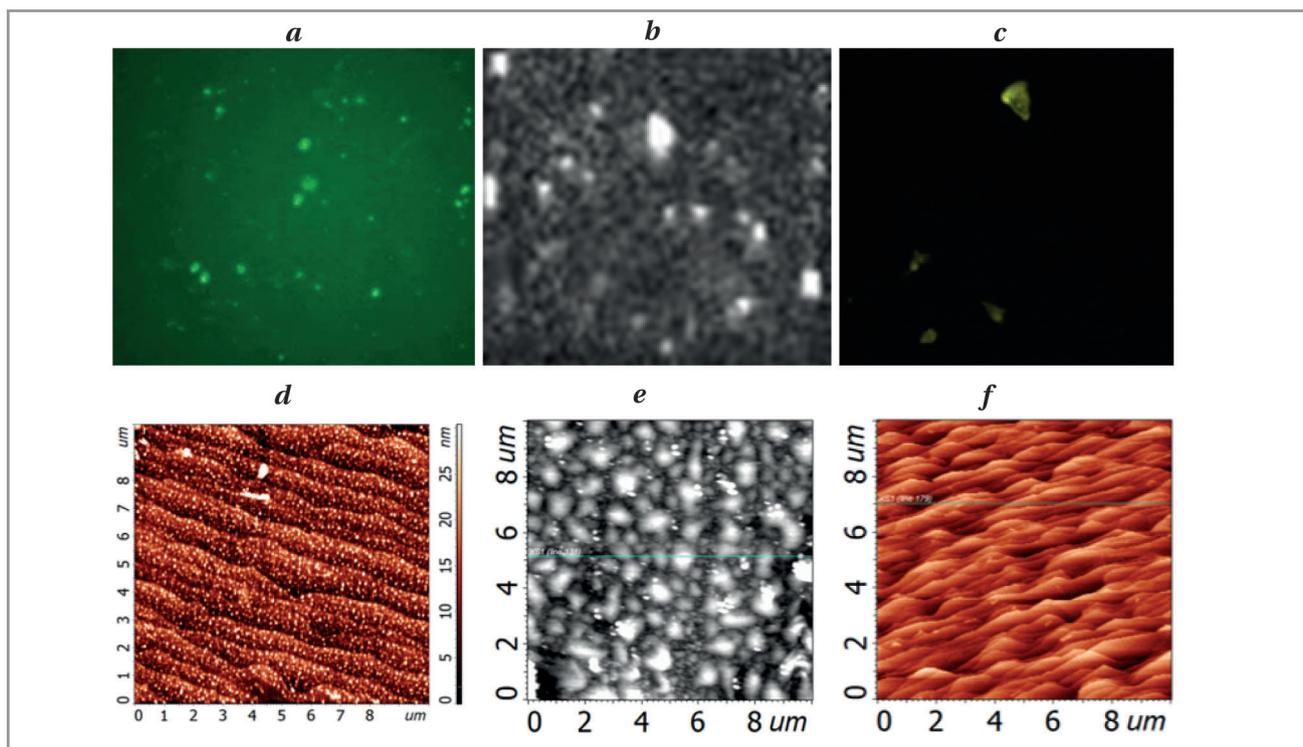


Рис. 1. Оценка иммобилизации антител к поверхности графена.

a — флуоресцентная микроскопия, свечение антител к бета-амилоиду 1–42, ув. $\times 10$; *b* — хемолюминисценция, свечение антител к бета-амилоиду 1–42; *c* — флуоресцентная микроскопия, свечение антител к общему тау-протеину; *d* — АСМ топография поверхности графена после иммобилизации антител к бета-амилоиду 1–42; *e* — АСМ топография поверхности графена после иммобилизации антител к общему тау-протеину; *f* — АСМ топография поверхности графена без иммобилизации антител.

Fig. 1. Evaluation of antibody immobilization to the graphene surface.

a — fluorescence microscopy, luminescence of antibodies to beta-amyloid 1–42, magnification $\times 10$; *b* — chemoluminescence, luminescence of antibodies to beta-amyloid 1–42; *c* — fluorescence microscopy, luminescence of antibodies to total tau protein; *d* — AFM topography of the graphene surface after immobilization of antibodies to beta-amyloid 1–42; *e* — AFM topography of the graphene surface after immobilization of antibodies to total tau protein; *f* — AFM topography of the graphene surface without antibody immobilization.

эффективную иммобилизацию использованных нами антител на поверхности графена.

Проведённое исследование показывает, что графен, функционализированный аминоклупами от пиренметиламина, имеет невысокое сродство к молекулам антител, являющихся по большей части катионными белками. В то же время графен, функционализированный сульфогруппами от пиранина проявляет более заметную способность иммобилизовать антитела, что видно по более высокому свечению образцов при их исследовании использованными нами методов оценки результатов. Кроме того, бифункциональная молекула глутарового диальдегида способна связывать как аминоклупы на поверхности графена, так и аминоклупы в составе молекулы антитела (с образованием оснований Шиффа), ковалентно «пришивая» таким образом антитела к графену, функционализированному аминоклупами [16]. Как видно из настоящего исследования по интенсивности флуоресценции при таком способе обработки на графене иммобилизуется ещё больше антител, чем при функционализации сульфогруппами.

Однако обработка глутаровым альдегидом накладывает дополнительные требования к составу раствора антител: он не должен содержать первичных и вторичных аминов, к каковым относятся, в частности, соли аммония и такой распространённый в иммунохимии буфер как трис оксиметил аминотетан, которые в противном случае будут конкурентно препятствовать иммобилизации антител. Также функционализация поверхности графена с широкими ступенями создаёт меньше мест с закреплёнными аминоклупами, что, в конечном итоге, приводит к иммобилизации меньшего количества антител. В таких условиях функционализация сульфогруппами образца с узкими ступенями даёт лучший результат.

Необходимо отметить, что функционализация сульфогруппами имеет и то преимущество (перед обработкой глутаровым альдегидом), что графен, в том числе в составе биосенсора, в этом случае может быть очищен от белковых молекул предложенным нами ранее способом [17, 18], и может быть использован повторно.

Таким образом, обработка глутаровым альдегидом графена, функционализированного аминоклупами, значительно повышает способность последнего к иммобилизации антител при условии отсутствия первичных и/или вторичных аминов в препарате антител.

Также данные (АСМ) показывают, что антитела в концентрации 10 мкг/мл сплошь покрывают поверхность нефункционализированного графена, по-видимому, не оставляя места для сорбции на графен других белков. Ранее мы при-

водили данные флуоресцентной микроскопии [14], показывающие, что на графене, функционализированном карбонильными группами, закрепляется значительно больше антител, чем на графене без функционализации. Следовательно, при функционализации речь, по-видимому, идёт об избыточном закреплении антител с образованием агрегатов. Кроме того, ввиду сплошного покрытия поверхности графена антителами, после закрепления антител нет необходимости выдерживания графена в растворе альбумина для исчерпания избыточных участков сорбции. Поэтому необходимость дополнительной химической обработки графена остаётся под вопросом.

Проведение калибровки графеновых сенсоров. После отработки методологии прикрепления антител к поверхности графена нами был проведён ряд экспериментов, направленных на установления отклика графеновых сенсоров при контакте с различными, заранее известными концентрациями белков бета-амилоида 1–42 и общего тау-протеина. Было установлено, что сенсоры демонстрируют высокую чувствительность при концентрациях белков в растворе от 10^{-10} до 10^{-15} г/мл. Необходимо отметить, что это значительно ниже возможности обычных методов диагностики, применяемых в рутинной клинической практике. Так, с использованием иммуноферментного анализа надёжно удаётся проводить детекцию при содержании вещества в концентрациях 10^{-6} – 10^{-9} г/мл [19]. Кроме того, нами обнаружено, что в области наименьших концентраций антигена полученные графики относительно круто ниспадают и расходятся незначительно, что позволяет использовать эту область как калибровочную для определения неизвестной концентрации антигена. В то же время при повышении концентрации антигена крутизна графика уменьшается и зависимость между концентрацией и величиной относительного сопротивления биосенсора уменьшается.

Во время эксперимента чипы опускались в растворы, с разной концентрацией определяемых нами белков, начиная с раствора с самой низкой концентрацией. В ходе работы они обязательно промывались в чистом буферном растворе PBS между инкубацией в пробах с разной концентрацией антигенов и после окончания эксперимента. Затем чипы высушивались и помещались в эппендорфы, продутые (заполненные) чистым инертным газом Ar. Было установлено, что при реакции как с белком бета-амилоида 1–42, так и общим тау-протеином на уровне низких концентраций отмечается линейная зависимость изменения сопротивления чипа R от концентрации белка в пробе. Однако морфология поверхности графена и особенности её обработки оказывают заметное влияние на величину отклика.

Вместе с тем, нам удалось получить устойчивые калибровочные кривые и добиться повторяемости результатов при проведении эксперимента с различными чипами. На рис. 2 представлен пример изменения сопротивления графеновых сенсоров в зависимости от используемого белка и его концентрации.

Тестовое определение концентрации белков в рабочих растворах. После калибровки наших сенсоров мы провели тестовое определение белков в рабочих растворах. При этом сами пробы были «ослеплены», то есть специалисты, непосредственно проводившие анализ проб на качественный и количественный анализ, не знали в какой именно протеин и в какой концентрации содержится в представленном растворе.

Пример определения неизвестной концентрации бета-амилоидного пептида 1-42 представлен на рис. 3. Ввиду незначительности рабочей (калибровочной) области концентраций, характерной для используемых нами биосенсоров, мы пришли к необходимости измерить сопротивление в серии разбавлений раствора с неизвестной концентрацией. При этом мы исходили из того, что концентрация этого маркера болезни Альцгеймера в крови как здоровых, так и больных пациентов лежит в довольно узких пределах от 10^{-12} до 10^{-11} г/мл [20–24], что сужает пределы серии разведений раствора с неизвестной концентрацией. В слепом эксперименте раствор, концентрация которого была известна только тому, кто его приготовил, был последовательно разведён в 200, 600, 2000 и 6000 раз. Измерение сопротивлений в электроиммунологическом опыте для этой серии разведений производили так же, как описано выше. Измеренные сопротивления относили к сопротивлению наибольшего из разведений.

На рис. 3 видно, что график *c*, отражающий зависимость относительного сопротивления биосенсора от разведения пробы с неизвестной концентрацией антигена, в области наибольших разведений совпадает с калибровочными графиками *a*, *b*, расходясь с ними при меньших разведениях. Следовательно, в двух точках, соответствующих наибольшему разведению, концентрация определена как $3 \times 10^{-16} \times 6000 = 1,8 \times 10^{-12}$ и $10^{-15} \times 2000 = 2 \times 10^{-12}$. Концентрация бета-амилоидного пептида, измеренная по окончании опыта, составляла 3×10^{-12} г/мл. Таким образом, концентрация в данном случае определена с погрешностью в 1,5 раза, то есть примерно половина шага разведения. Следовательно, при более дробном разведении как калибровочных растворов, так и определяемой пробы можно достичь большей точности, что показывает принципиальную применимость использованного нами подхода для оценки концентрации рассматриваемого маркера болезни Альцгеймера.

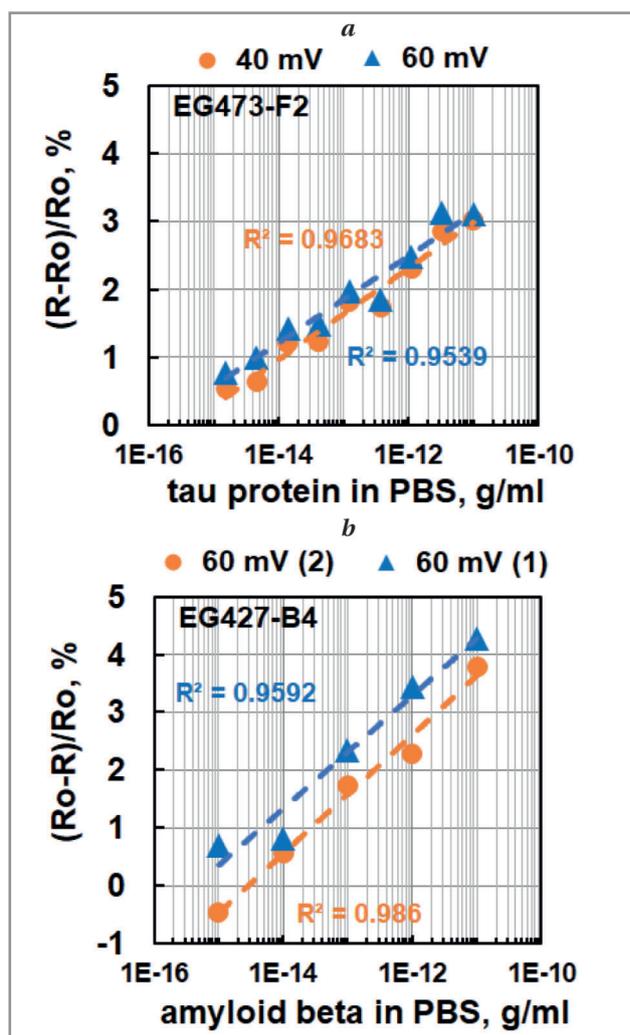


Рис. 2. Изменение сопротивления сенсоров $(R-R_0)/R_0$ в зависимости от концентрации β -амилоида 1–42 (a) и π -протеина (b), разведенных в PBS.

Примечание. R — сопротивление чипа в растворе PBS с разведённым белком; R_0 — сопротивление чипов в чистом (без разведения белков) PBS. Beta — бета-амилоид 1–42, tau — общий тау-протеин. По оси абсцисс — концентрации белков в растворе от 10^{-16} до 10^{-10} . По оси ординат — отклик чипа.

Fig. 2. Change in sensor resistance $(R-R_0)/R_0$ depending on the concentration of β -amyloid 1–42 (a) and π -protein (b) diluted in PBS.

Note. R — resistance of the chip in a PBS solution with diluted protein; R_0 — resistance of the chips in pure (without dilution of proteins) PBS. Beta — beta-amyloid 1–42, tau is total tau protein. The abscissa axis shows protein concentrations in the solution from 10^{-16} to 10^{-10} . The ordinate axis shows the chip response.

Обсуждение

Проведённым нами исследованием доказана принципиальная работоспособность выбранной концепции графеновых сенсоров. Установлено, что посредством определённых методик удаётся надёжно зафиксировать на поверхности материала антитела как к белку бета-амилоиду 1–42, так и тау-протеину. Однако следует отметить и не-

которые очевидные сложности, связанные с применением использованного методологического подхода. Во-первых, узость рабочего диапазона измерений и его отнесённость в область чрезвычайно малых концентраций (порядка сотен тысяч молекул антигена на миллилитр). При таких значениях концентраций можно ожидать значительного влияния неспецифических факторов на результат эксперимента. Вероятно, речь идёт о фундаментальном свойстве графеновых биосенсоров вообще. Также установлено, что при функционализации графена пиренметиламином и глутаровым альдегидом характер обсуждаемых кривых меняется незначительно [25]. По нашим предварительным данным, смещение рабочего диапазона измерений графенового биосенсора возможно путём ковалентного закрепления антител у самой поверхности графена в пределах проводящего электронного облака. Дальнейшие эксперименты покажут осуществимость этой идеи.

Во-вторых, в настоящей работе измерения проводились в однокомпонентных растворах антигенов. При определении этих антигенов в крови на результаты измерений могут влиять другие белки, концентрация которых на несколько порядков выше, чем концентрация маркеров болезни Альцгеймера. Указанное затруднение представляется преодолимым ввиду крайне высокой специфичности реакции антиген-антитело.

Необходимо отметить, что показанная в нашем эксперименте чувствительность графеновых биосенсоров к исчезающе малым концентрациям антигена, вероятно, позволяет использовать для первичного скрининга болезни Альцгеймера такие биологические жидкости, как слюнная жидкость. Она имеет значительно более простой состав, чем сыворотка крови, что благоприятно при использовании биосенсоров с рабочим диапазоном измерений в области экстремально низких концентраций. Известно, что концентрация маркеров болезни Альцгеймера в этих жидкостях подвержена более значительным колебаниям, чем в крови [26–28]. Однако и в этом случае можно ожидать хорошую диагностическую ценность отрицательного результата (если биосенсор не обнаружит даже 10–15 г/мл искомого антигена).

Проведённая калибровка изготовленных биосенсоров продемонстрировала прямую зависимость между степенью изменения электрического сопротивления образцов и концентрациями белков в рабочих растворах, комплиментарных зафиксированным на поверхности графена АТ. Это позволило провести как качественный, так и количественный анализ содержания белков

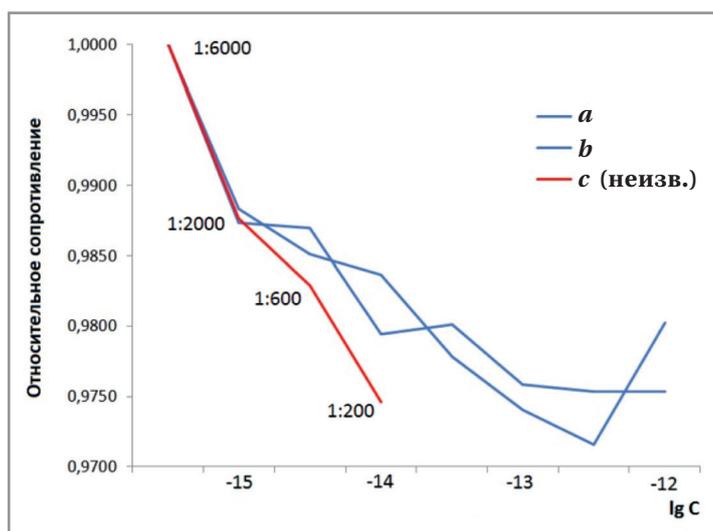


Рис. 3. Определение неизвестной концентрации антигена (бета-амилоидного пептида 1–42) при помощи графенового биосенсора способом совмещения кривых.

Примечание. *a, b* — калибровочные кривые; *c* — разведения пробы антигена с неизвестной концентрацией. 1:200, 1:600, 1:2000, 1:6000 — разведения пробы антигена с неизвестной концентрацией.

Fig. 3. Determination of an unknown antigen concentration (beta-amyloid peptide 1–42) using a graphene biosensor by curve matching.

Note. *a, b* — calibration curves; *c* — dilutions of an antigen sample with an unknown concentration. 1:200, 1:600, 1:2000, 1:6000 — dilutions of an antigen sample with an unknown concentration.

в ослеплённых образцах растворов. В ходе эксперимента были получены удовлетворительные результаты, демонстрирующие возможность определения концентраций бета-амилоида и таупротейна. В тоже время, установлен ряд факторов, влияющих на конечный результат и затрудняющий интерпретацию полученных данных. К ним относится необходимость улучшения однородности морфологии поверхности плёнок графена, выращенных на подложках SiC, исключение попадания посторонних веществ при нанесении контактов, резке пластин на отдельные чипы; стандартизация и точное следование протоколам поможет решить эту проблему. Также необходимы дополнительные исследования изменения сопротивления чипов при иммобилизации на чистый графен антител и гомологичных им белков, разведённые в растворах PBS. Кроме того, обязательным является изучение влияния осаждения на поверхности графена альбумина после иммобилизации антител. Необходимо исследовать его влияние на отклик чипа. Кроме того, важным является проведение дополнительных исследований с растворами, содержащими несколько белков. Комплексный анализ данных, полученных в этих экспериментах, позволит выбрать наиболее оптимальный вариант подготовки графеновых

сенсоров, улучшить повторяемость результатов, и снизит показатель рассеивания получаемых показателей. Данная работа может стать одной из основных задач нового планируемого исследования, в рамках которого будет изготовлен графеновый биосенсор, отвечающий требованиям практической медицины.

Дополнительная информация

Финансирование. Работа поддержана грантом РНФ № 22-12-00134.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Вклад авторов. Воробьев С. В., Плеханов А. Ю., Усиков А. С., Лебедев А. А. — разработка концепции и дизайна, обоснование рукописи и проверка

критически важного интеллектуального содержания, окончательное утверждение для публикации рукописи; Терновых И. К., Дунаевский М. С., Лебедев С. П., Шмидт Н. М. — сбор и обработка материала; Смирнов А. Н., Шмидт Н. М., Терновых И. К., Усиков А. С., Лебедев А. А. — статистическая обработка, набор, анализ и интерпретация данных; Воробьев С. В., Плеханов А. Ю., Лебедев С. П., Дунаевский М. Ю. — написание текста; Воробьев С. В., Плеханов А. Ю. — редактирование текста.

Financing. The work was supported Russian Science Foundation grant № 22-12-00134.

Conflict of interests. The authors declare the absence of conflict of interests.

Литература/References

- Pérez Palmer N., Trejo Ortega B., Joshi P. Cognitive Impairment in Older Adults: Epidemiology, Diagnosis, and Treatment. *Psychiatr Clin North Am.* 2022; 45 (4): 639–661. doi: 10.1016/j.psc.2022.07.010.
- 2023 Alzheimer's disease facts and figures. *Alzheimers Dement.* 2023; 19 (4): 1598–1695. doi: 10.1002/alz.13016.
- Ткачева О. Н., Чердак М. А., Мхитарян Э. А. Обследование пациентов с когнитивными нарушениями. *РМЖ.* 2017; 25: 1880–1883. [Tkacheva O. N., Cherdak M. A., Mkhitaryan E. A. Examination of patients with cognitive impairments. *RMJ.* 2017; 25: 1880–1883. (in Russian)]
- Weller J., Budson A. Current understanding of Alzheimer's disease diagnosis and treatment. *F1000Res.* 2018; 7: F1000FacultyRev-1161. doi: 10.12688/f1000research.14506.1.
- Dubois B., von Arnim C. A. E., Burnie N., Bozeat S., Cummings J. Biomarkers in Alzheimer's disease: role in early and differential diagnosis and recognition of atypical variants. *Alzheimers Res Ther.* 2023; 15 (1): 175. doi: 10.1186/s13195-023-01314-6.
- Meier S. R., Sehlin D., Roshanbin S., Falk V. L., Saito T., Saido T. C. et al. 11C-PiB and 124I-antibody PET provide differing estimates of brain amyloid- β after therapeutic intervention. *J Nucl Med.* 2022; 63 (2): 302–309. doi: 10.2967/jnumed.121.262083.
- Matsuda H., Okita K., Motoi Y., Mizuno T., Ikeda M., Sanjo N. et al. Clinical impact of amyloid PET using 18F-florbetapir in patients with cognitive impairment and suspected Alzheimer's disease: a multicenter study. *Ann Nucl Med.* 2022; 36 (12): 1039–1049. doi: 10.1007/s12149-022-01792-y.
- Groot C., Villeneuve S., Smith R., Hansson O., Ossenkoppele R., Tau P. E. T. Imaging in Neurodegenerative Disorders. *J Nucl Med.* 2022; 63 (1): 20–26. doi: 10.2967/jnumed.121.263196.
- McKhann G. M., Knopman D. S., Chertkow H., Hyman B. T., Jack C. R. Jr., Kawas C. H. et al. The diagnosis of dementia due to Alzheimer's disease: recommendations from the National Institute on Aging-Alzheimer's Association workgroups on diagnostic guidelines for Alzheimer's disease. *Alzheimers Dement.* 2011; 7 (3): 263–269. doi: 10.1016/j.jalz.2011.03.005.
- Коберская Н. Н. Болезнь Альцгеймера: новые критерии диагностики и терапевтические аспекты в зависимости от стадии болезни. *Медицинский Совет.* 2017; 10: 18–24. doi: https://doi.org/10.21518/2079-701x-2017-10-18-24. [Koberskaya N. N. Alzheimer's Disease: New Diagnostic Criteria and Therapeutic Aspects Depending on the Stage of the Disease. *Medical Council.* 2017; 10: 18–24. doi: https://doi.org/10.21518/2079-701x-2017-10-18-24. (in Russian)]
- Bai Y., Xu T., Zhang X. Graphene-Based Biosensors for Detection of Biomarkers. *Micromachines (Basel).* 2020; 11 (1): 60. doi: 10.3390/mi11010060.
- Tufail S., Sherwani M. A., Shamim Z., Abdullah, Goh K. W., Alomary M. N. et al. 2D nanostructures: Potential in diagnosis and treatment of Alzheimer's disease. *Biomed Pharmacother.* 2024; 170: 116070. doi: 10.1016/j.biopha.2023.116070.
- Лебедев А. А., Лебедев С. П., Новиков С. Н., Давыдов В. Ю., Смирнов А. Н., Литвин Д. П., и др. Сверхчувствительный газовый сенсор на основе графена. *Журнал технической физики.* 2016; 86 (3): 135–139. doi: https://doi.org/10.1134/S1063784216030130. [Lebedev A. A., Lebedev S. P., Novikov S. N., Davydov V. Y., Smirnov A. N., Litvin D. P., et al. Supersensitive graphene-based gas sensor. *Technical Physics.* 2016; 86 (3): 135–139. doi: https://doi.org/10.1134/S1063784216030130. (in Russian)]
- Воробьев С. В., Терновых И. К., Плеханов А. Ю., Лебедев А. А., Смирнов А. Н., Усиков А. С., и др. Графен как основа биологических сенсоров для определения маркеров нейродегенеративной деменции. *Медицинский алфавит.* 2023; 33: 28–33. doi: https://doi.org/10.33667/2078-5631-2023-33-28-33. [Vorobev S. V., Ter-novykh I. K., Plekhanov A. Yu., Lebedev A. A., Smirnov A. N., Usikov A. S. et al. Graphene as basis of biological sensors for determining markers of neurodegenerative dementia. *Medical Alphabet.* 2023; 33: 28–33. doi: https://doi.org/10.33667/2078-5631-2023-33-28-33. (in Russian)]
- Xu Y., Bai H., Lu G., Li C., Shi G. Flexible graphene films via the filtration of water-soluble noncovalent functionalized graphene sheets. *JACS.* 2008; 130 (18): 5856–5857. doi: 10.1021/ja800745y.
- Rong G. X., Lv Z. X., Pan Z. J., Zhang S. L., Deng P. Covalent immobilization of cellulase onto amino and graphene oxide functionalized magnetic Fe₂O₃/Fe₃O₄@SiO₂ nanocomposites. *J Nanosci Nanotechnol.* 2021; 21 (9): 4749–4757. doi: 10.1166/jnn.2021.19127.
- Плеханов А. Ю., Пузык М. В., Усиков А. С., Роенков А. Д., Лебедев А. А., Лебедев С. П., и др. Хемилюминесценция функционализированной поверхности графена. Оптика и спектроскопия. 2022; 130 (9): 1417–1422. doi: https://doi.org/10.21883/OS.2022.09.53305.3628-22. [Plekhanov A. Yu., Puzyk M. V., Usikov A. S., Roenkov A. D., Lebedev A. A., Lebedev S. P. et al. Chemiluminescence of a Functionalized Graphene Surface. *Optics and Spectroscopy.* 2022; 130 (9): 1417–1422. doi: https://doi.org/10.21883/OS.2022.09.53305.3628-22. (in Russian)]
- Патент Р. Ф. на изобретение № 2022128732/2022. Плеханов А. Ю., Пузык М. В., Усиков А. С., Роенков А. Д., Лебедев А. А., Лебедев С. П., и др. Способ восстановления способности графена связывать белки. [Patent Rus N 2022128732/2022. Plekhanov A. Yu., Puzyk M. V., Usikov A. S., Roenkov A. D., Lebedev A. A., Lebedev S. P. et al. A method for restoring graphene's ability to bind proteins. (in Russian)]
- Бородин Е. А. ИФА и ПЦР — современные методы клинической лабораторной диагностики. *Поликлиника.* 2012; 2: 16–22. [Borodin E. A. ELISA and PCR — modern methods of clinical laboratory diagnostics. *Polyclinic.* 2012; 2: 16–22. (in Russian)]
- Arranz J., Zhu N., Rubio-Guerra S., Rodríguez-Baz Í., Ferrer R., Cartona-Iragui M. et al. Diagnostic performance of plasma pTau217, pTau181, A β 1-42 and A β 1-40 in the LUMIPULSE automated platform for the detection of Alzheimer disease. *Alzheimers Res Ther.* 2024; 16 (1): 139. doi: 10.1186/s13195-024-01513-9.
- Dai Y., Molazemhosseini A., Liu C. C. In vitro quantified determination of β -amyloid 42 peptides, a biomarker of neuro-degenerative disorders, in PBS and human serum using a simple, cost-effective thin gold film biosensor. *Biosensors (Basel).* 2017; 7 (3): 29. doi: 10.3390/bios7030029.
- Rosén A., Gennser M., Oscarsson N., Kvarnström A., Sandström G., Seeman-Lodding H. et al. Protein tau concentration in blood increases after SCUBA diving: an observational study. *Eur J Appl Physiol.* 2022; 122 (4): 993–1005. doi: 10.1007/s00421-022-04892-9.
- Janelidze S., Bali D., Ashton N. J., Barthélemy N. R., Vanbrabant J., Stoops E. et al. Head-to-head comparison of 10 plasma phospho-tau assays in prodromal Alzheimer's disease. *Brain.* 2023; 146 (4): 1592–1601. doi: 10.1093/brain/awac333.
- Zecca C., Pasculli G., Tortelli R., Dell'Abate M. T., Capozzo R., Barulli M. R. et al. The role of age on beta-amyloid1-42 plasma levels in healthy

subjects. *Front Aging Neurosci.* 2021; 13: 698571. doi: 10.3389/fnagi.2021.698571.

25. Смирнов А. Н., Плеханов А. Ю., Пузык М. В., Воробьев С. В., Усиков А. С., Дунаевский М. С., и др. Особенности функционализации графена в биосенсорах. Международная конференция «Наноуглерод и алмаз»; Июль 1–5, 2024; Санкт-Петербург. СПб.: Медиапэпир, 2024; P5-4-25. Доступно по: <https://ncd2024.ioffe.ru>. Ссылка активна на 28.08.2024. [Smirnov A. N., Plekhanov A. Yu., Puzyk M. V., Vorobev S. V., Usikov A. S., Dunaevskiy M. S. et al. Features of graphene functionalization in biosensors. International conference «Nanocarbon and Diamond»; 2024 July 1–5; St. Petersburg, SPb.: Mediapapir, 2024; P5-4-25. Dostupno po: <https://ncd2024.ioffe.ru>. Ssylka aktivna na 28.08.2024. (in Russian)]
26. McGeer P. L., Guo J. P., Lee M., Kennedy K., McGeer E. G. Alzheimer's Disease Can Be Spared by Nonsteroidal Anti-Inflammatory Drugs. *J Alzheimers Dis.* 2018; 62 (3): 1219–1222. doi: 10.3233/JAD-170706.

Информация об авторах

Воробьев Сергей Владимирович — д. м. н., главный научный сотрудник НИЛ неврологии и нейрореабилитации; профессор кафедры неврологии с клиникой НМИЦ им. В. А. Алмазова; профессор кафедры клинической лабораторной диагностики СПбГПМУ, Санкт-Петербург, Россия. ORCID ID: 0000-0002-4830-907X

Плеханов Антон Юрьевич — к. б. н., младший научный сотрудник лаборатории системной вирусологии НИИ гриппа им. А. А. Смородинцева, Санкт-Петербург, Россия. ORCID ID: 0000-0002-2459-4849

Терновых Иван Константинович — ассистент кафедры неврологии с клиникой НМИЦ им. В. А. Алмазова, ФГБУН «Физико-технический институт им. А. Ф. Иоффе» Минобрнауки России, Санкт-Петербург, Россия. ORCID ID: 0000-0002-0074-4021

Усиков Александр Сергеевич — к. ф.-м. н., ФГБУН «Физико-технический институт им. А. Ф. Иоффе» Минобрнауки России; ООО Группа компаний «Нитридные кристаллы», Санкт-Петербург, Россия. ORCID ID: 0000-0002-5320-3632

Лебедев Александр Александрович — д. ф.-м. н., профессор, руководитель отделения твердотельной электроники ФГБУН «Физико-технический институт им. А. Ф. Иоффе» Минобрнауки России, Санкт-Петербург, Россия. ORCID ID: 0000-0003-0829-5053

Смирнов Александр Николаевич — к. ф.-м. н., старший научный сотрудник ФГБУН «Физико-технический институт им. А. Ф. Иоффе» Минобрнауки России, Санкт-Петербург, Россия. ORCID ID: 0000-0001-9709-5138

Шмидт Наталия Михайловна — д. ф.-м. н., главный научный сотрудник ФГБУН «Физико-технический институт им. А. Ф. Иоффе» Минобрнауки России, Санкт-Петербург, Россия. ORCID ID: 0000-0003-3585-5116

Дунаевский Михаил Сергеевич — к. ф.-м. н., заместитель руководителя отделения физики твердого тела ФГБУН «Физико-технический институт им. А. Ф. Иоффе» Минобрнауки России, Санкт-Петербург, Россия. ORCID ID: 0000-0001-6038-223X

Лебедев Сергей Павлович — к. ф.-м. н., научный сотрудник ФГБУН «Физико-технический институт им. А. Ф. Иоффе» Минобрнауки России, Санкт-Петербург, Россия. ORCID ID: 0000-0002-5078-1322

27. Tvarijonaviciute A., Zamora C., Ceron J. J., Bravo-Cantero A. F., Pardo-Marin L., Valverde S., Lopez-Jornet P. Salivary biomarkers in Alzheimer's disease. *Clin. Oral Investig.* 2020; 24 (10): 3437–3444. doi: 10.1007/s00784-020-03214-7.
28. Pekeles H., Qureshi H. Y., Paudel H. K., Schipper H. M., Gornistky M., Chertkow H. Development and validation of a salivary tau biomarker in Alzheimer's disease. *Alzheimers Dement (Amst).* 2018; 11: 53–60. doi: 10.1016/j.dadm.2018.03.003.

Поступила / Received 28.08.2024
Принята в печать / Accepted 30.09.2024

About the authors

Sergey V. Vorobyev — D. Sc. in Medicine, Chief Researcher at the Laboratory of Neurology and Neurorehabilitation, Professor at the Department of Neurology with a Clinical Base, Almazov National Medical Research Centre; Professor at the Department of Clinical Laboratory Diagnostics, Saint-Petersburg State Pediatric Medical University, Saint Petersburg, Russia. ORCID ID: 0000-0002-4830-907X

Anton Yu. Plekhanov — Ph. D. in Biology, Junior Researcher at the Laboratory of Systems Virology, Smorodintsev Research Institute of Influenza, Saint Petersburg, Russia. ORCID ID: 0000-0002-2459-4849

Ivan K. Ternovyykh — Assistant at the Department of Neurology with a Clinical Base, Almazov National Medical Research Centre, Ioffe Physical-Technical Institute of the Russian Academy of Sciences, Saint Petersburg, Russia. ORCID ID: 0000-0002-0074-4021

Alexander S. Usikov — Ph. D. in Physics and Mathematics, Ioffe Physical-Technical Institute of the Russian Academy of Sciences; Nitride Crystals Group Ltd., Saint Petersburg, Russia. ORCID ID: 0000-0002-5320-3632

Alexander A. Lebedev — D. Sc. in Physics and Mathematics, Professor, Head of the Solid-State Electronics Department, Ioffe Physical-Technical Institute of the Russian Academy of Sciences, Saint Petersburg, Russia. ORCID ID: 0000-0003-0829-5053

Alexander N. Smirnov — Ph. D. in Physics and Mathematics, Senior Researcher, Ioffe Physical-Technical Institute of the Russian Academy of Sciences, Saint Petersburg, Russia. ORCID ID: 0000-0001-9709-5138

Natalia M. Shmidt — D. Sc. in Physics and Mathematics, Chief Researcher, Ioffe Physical-Technical Institute of the Russian Academy of Sciences, Saint Petersburg, Russia. ORCID ID: 0000-0003-3585-5116

Mikhail S. Dunaevskiy — Ph. D. in Physics and Mathematics, Deputy Head of the Solid State Physics Department, Ioffe Physical-Technical Institute of the Russian Academy of Sciences, Saint Petersburg, Russia. ORCID ID: 0000-0001-6038-223X

Sergey P. Lebedev — Ph. D. in Physics and Mathematics, Research Fellow, Ioffe Physical-Technical Institute of the Russian Academy of Sciences, St. Petersburg, Russia. ORCID ID: 0000-0002-5078-1322