

08 Биосенсоры на основе графена для детектирования маркеров нейродегенеративной деменции

© Н.М. Шмидт¹, А.С. Усиков^{1,2}, С.В. Воробьев^{1,3,4}, А.Ю. Плеханов⁵, И.К. Терновых^{3,4}, А.Д. Роевков², М.В. Пузык⁶, Е.И. Шабунина¹, Е.В. Гуцина¹, С.П. Лебедев¹, А.А. Лебедев¹, А.Н. Смирнов¹, С.Ю. Приображенский¹, Е.М. Танклевская¹

¹ Физико-технический институт им. А.Ф. Иоффе РАН, Санкт-Петербург, Россия

² ООО «Группа компаний «Нитридные кристаллы», Санкт-Петербург, Россия

³ Национальный медицинский исследовательский центр им. В.А. Алмазова, Санкт-Петербург, Россия

⁴ Санкт-Петербургский государственный педиатрический медицинский университет, Санкт-Петербург, Россия

⁵ Научно-исследовательский институт гриппа им. А.А. Смородинцева, Санкт-Петербург, Россия

⁶ Российский государственный педагогический университет им. А.И. Герцена, Санкт-Петербург, Россия

E-mail: Natalia.Schmidt@mail.ioffe.ru

Поступило в Редакцию 26 августа 2024 г.

В окончательной редакции 26 августа 2024 г.

Принято к публикации 24 сентября 2024 г.

Комплексное исследование биосенсоров для детектирования маркеров β -амилоида и τ -протеина на основе пленок графена, полученных термическим разложением полуизолирующего SiC, показало возможность двукратного увеличения отклика биосенсоров без применения функционализации графена. Выяснено, что одной из причин низкой воспроизводимости результатов детектирования и снижения отклика биосенсоров является агрегация антител и белков в дефектных областях графена.

Ключевые слова: наноматериалы, графен, биосенсоры, болезнь Альцгеймера.

DOI: 10.61011/PJTF.2025.03.59813.20091

Болезнь Альцгеймера — прогрессирующее нейродегенеративное заболевание — сопровождается развитием когнитивных нарушений. В основе ее патогенеза лежит накопление аномальных белков β -амилоида и τ -протеина в ткани головного мозга. Число заболевших этой болезнью в мире с каждым годом растет, а возраст пациентов молодеет. До сих пор существуют лишь препараты, способные замедлить развитие болезни, но не излечить ее. Кроме того, не развиты методы диагностики заболевания на ранней стадии, доступные для массового применения. Потенциальные возможности решения этой проблемы заключаются в использовании биосенсоров на основе графена [1–3]. Однако в недавнем обзоре [2] показано, что клиническому применению таких биосенсоров препятствует низкая воспроизводимость параметров графена в биосенсорах, а также относительно слабая зависимость величины сигнала биосенсоров (сопротивления графена или потенциала Дирака) от концентрации детектируемых белков. Эти проблемы проявляются независимо от конструкции биосенсора (сопротивление или полевой транзистор). Исследования последних лет [2,3] показали, что широко используемая функционализация графена для закрепления антител также может быть источником этих проблем, так как изменяет адсорбционные свойства графена. Для графена, выращенного методом осаждения из паровой фазы (CVD-метод), было показано [1], что присоединение антител непосредственно к поверхности графена без функционализации (новая концепция) позволило увеличить сигнал биосенсоров.

В настоящей работе выяснялась эффективность применения новой концепции для детектирования β -амилоида (бета-белок) и τ -протеина (тау-белок) биосенсорами на основе графена, полученного термическим разложением карбида кремния. Этот графен отличается от графена, полученного CVD-методом, характером организации наноматериала. Дополнительно исследовалось влияние агрегации антител к β -амилоидам (антибета) и τ -протеинам (антитау), а также самих бета- и тау-белков на величину сигнала биосенсоров.

Основой исследованных биосенсоров является графеновый чип с двумя омическими контактами. Размер сенсорной площади (рабочей поверхности графена в чипе) составляет 1×1.5 mm. Вид чипа биосенсора, а также детали процессирования чипов и их монтажа на держатели представлены в работе [4]. Подробности получения пленок графена также приведены в [4]. Высокое качество пленок графена подтверждено методами спектроскопии комбинационного рассеяния света и атомно-силовой микроскопии (АСМ) [4]. Мы использовали также дополнительную отмывку поверхности графена с контролем ее топографии методами АСМ. Она позволяет восстановить значения среднеквадратичной шероховатости (RMS) поверхности графена до значений, близких к исходным, перед фотолитографией, и уменьшить в 2 раза разброс сопротивлений графеновых чипов.

Детектирование белков осуществлялось в фосфатно-солевых буферных растворах (PBS) при приложении к чипу постоянного сигнала 40 и 60 mV по изменению сопротивления графена в биосенсоре $(R - R_0)/R_0$, где

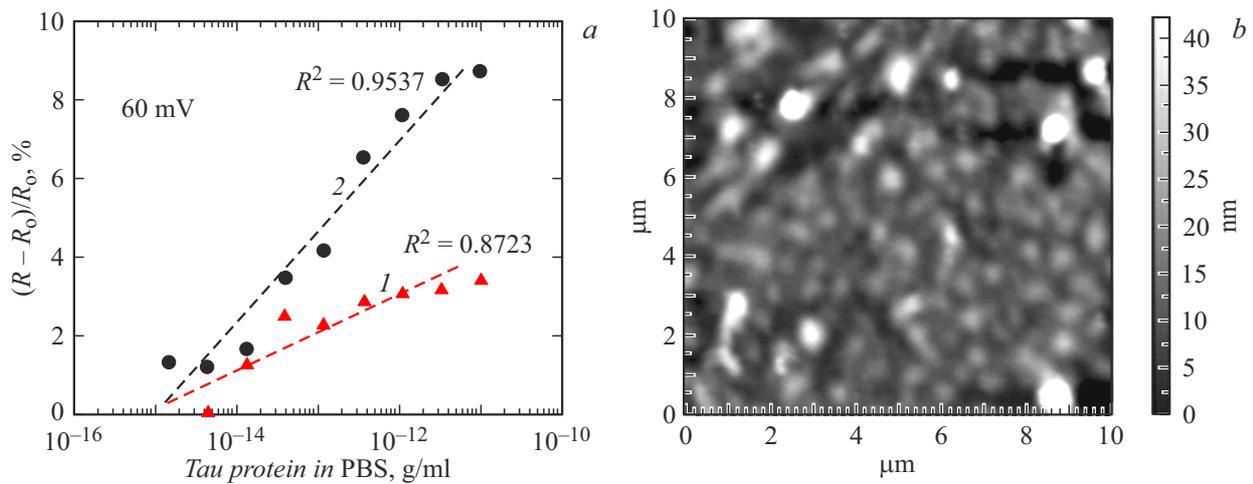


Рис. 1. Сравнение параметров двух сенсоров с разной обработкой поверхности графена: EG436-E4 — без функционализации, EG436-E2 — с функционализацией (электрохимическая обработка графена). *a* — зависимость отклика биосенсоров $(R - R_0)/R_0$ чипов с функционализацией (1) и без функционализации графена (2) от концентрации тау-белка. Штриховая линия — аппроксимация результатов логарифмической функции. Параметр R^2 указан на рисунке. *b* — АСМ-изображение топографии поверхности графена в поле $10 \times 10 \mu\text{m}$ чипа EG436-E2 после детектирования тау-белка в поле.

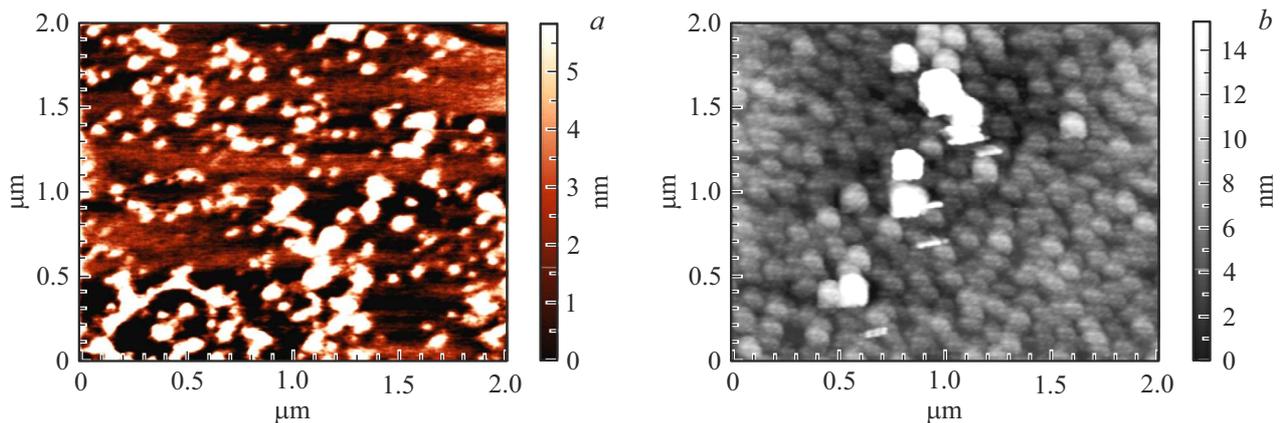


Рис. 2. АСМ-топография поверхности графена при агрегации бета-белка. *a* — в дефектных областях ячеистой структуры графена, возникших при формировании графена; *b* — в дефектах, возникших в ячеистой структуре графена при иммобилизации антител (антитау, темная область), и при образовании в этой области агрегатов иммунного комплекса антитело–тау-белок (яркие светлые образования).

R_0 — сопротивление чипа в чистом растворе PBS, R — сопротивление чипа в растворе PBS с разведенными тау- или бета-белками.

Исследование эффективности детектирования бета- и тау-белка проводилось на чипах, полученных из одной пластины. Графен на части чипов не подвергался никакой функционализации. На другой части чипов проводилась функционализация нескольких типов, как ковалентная, так и по π - π -механизму (соединение атомов путем бокового перекрытия негибридных p -атомных орбиталей), а также электрохимическая обработка графена (катодное восстановление и анодное окисление) в водном растворе NaClO_4 (0.1 mol/l). Детали реализации разных типов функционализации поверхности графена описаны в [5,6]. До и после функционализации про-

водился выборочный контроль состояния поверхности графена методами АСМ (микроскоп Ntegra AURA, НТ-МДТ, Россия). При этом на всех чипах (с функционализацией и без нее) иммобилизация антител антитау или антибета проводилась в одинаковых условиях из буферных растворов PBS, в том числе разбавленных. Антитела антитау и антибета, а также бета- и тау-белки предоставлены Центром Алмазова. Эксперименты по детектированию проводились в НИИ гриппа.

Исследования графена в чипах биосенсоров до и после функционализации показали сильные и невоспроизводимые изменения топографии поверхности графена после функционализации. Так, например, исходные значения RMS по данным АСМ увеличивались от 0.23 до 2–10 nm в поле сканирования $10 \times 10 \mu\text{m}$, причем эти изменения

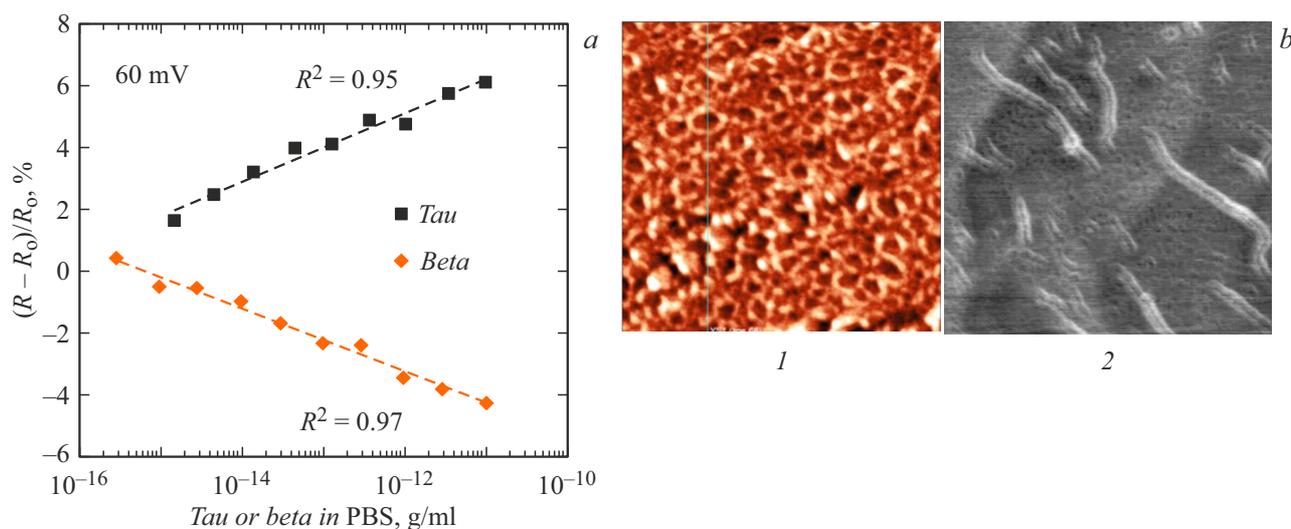


Рис. 3. *a* — концентрационные зависимости сигнала биосенсоров. Ромбы — зависимость сигнала биосенсора бета-белка (EG427-B4), квадраты — зависимость сигнала биосенсора тау-белка (EG436-B6). *b* — АСМ-изображения поверхности графена в тех же биосенсорах, что на части *a*. Приведены сканы изображений размером $2 \times 2 \mu\text{m}$, изменение контраста отражает изменение высоты от 0 до 5 nm. Представлены фрагменты топографии поверхностей графена с бета- (1) и тау-белком (2). Агрегаты бета-белка формируются между ступенями графена, закрепляясь в мелких дефектах ячеистой структуры поверхности. Тау-белок формирует агрегаты в виде бублика вокруг мелких дефектов ячеистой структуры.

могли сопровождаться как увеличением сопротивления графена в чипах биосенсоров в несколько раз, так и его уменьшением. При сильных изменениях RMS после функционализации наблюдается рост спектральной плотности низкочастотного шума (S_U) графеновых чипов на один-два порядка по сравнению с исходными значениями, что указывает на генерацию большого количества дефектов в графене.

На такие графеновые чипы и на чипы с графеном без функционализации в одинаковых условиях были нанесены антитела (антитау) и проведена иммунореакция антител с тау-белком. Оценка чувствительности биосенсоров на основе этих двух типов графеновых чипов проводилась по изменению сопротивления биосенсоров при последовательном увеличении концентрации тау-белка, разведенного в растворе PBS, от 10^{-15} до 10^{-10} g/ml. Концентрационные зависимости отклика биосенсоров ($R - R_0$)/ R_0 с функционализацией (треугольники) и без нее (кружки) приведены на рис. 1, *a*. Начальная детектируемая концентрация тау-белка для обоих типов биосенсоров (рис. 1, *a*) довольно низкая, на несколько порядков ниже предела обнаружения этих белков современными методами диагностики, такими как иммуноферментный анализ. Однако отклик биосенсора без функционализации графена достигает 8.7%, что почти в 2 раза выше, чем для биосенсора с электрохимической обработкой графена. Другие типы функционализации также показывали заметное снижение отклика чипов по сравнению с откликом чипа без функционализации. Следует отметить, что полученные нами результаты на графене, сформированном термическим разложением карбида кремния, не уступают приведенным в [1] данным

для CVD-графена с функционализацией и без нее. Для практического применения большая величина отклика и более резкий ход концентрационной зависимости для чипа без функционализации графена (кривая 2 на рис. 1, *a*) будут способствовать лучшему разрешению и точности определения промежуточных значений концентрации белков.

Изучение АСМ-топографии поверхности графена после нанесения антител и проведения иммунореакции на поверхности графена позволило выявить влияние агрегации антител и белков на величину сигнала биосенсоров. Для чипов биосенсоров с более слабой концентрационной зависимостью (кривая 1 на рис. 1, *a*), как правило, на топографии выявляются довольно крупные агрегаты, предположительно иммунного комплекса тау-белков (светлые области на рис. 1, *b*), отсутствовавшие на поверхности графена в чипе до экспериментов по детектированию белков. Агрегация иммунного комплекса тау- или бета-белков наблюдалась и на графене в чипах с более сильной концентрационной зависимостью, но при этом их размеры (латеральные и в высоту), как правило, были в 2–5 раз меньше. На процесс агрегации антител и белков влияет не только их высокая концентрация, но и особенности морфологии исходного графена, например крупные дефекты ячеистой структуры исходного графена (темные области на ступенях на рис. 2, *a*). Подобные дефекты могут возникать при нанесении (иммобилизации) антител антитау или антибета на поверхность графена из растворов PBS с высокой их концентрацией (10^{-5} g/ml) (рис. 2, *b*).

Сравнение концентрационных зависимостей сигналов биосенсоров бета- и тау-белка (ромбы и квадраты на

рис. 3, а) выявило противоположный характер изменения сопротивления графена с ростом концентрации соответствующих белков, топография также отражает разный характер взаимодействия этих белков с графеном. Фрагменты 1 и 2 топографий этих двух поверхностей показаны на рис. 3, б. Наблюдается разная картина формирования агрегатов, хорошо выявляемая при разных концентрациях детектируемых белков (10^{-11} – 10^{-9} g/ml) или наносимых на графен антител (10^{-5} g/ml). Наблюдаемые особенности хорошо согласуются с известными фактами, полученными непосредственно при исследовании пораженных клеток головного мозга: τ -протеины заряжены положительно, а β -амилоиды — отрицательно [2]. Выявленные особенности взаимодействия антител и белков с графеном являются источниками, приводящими к невоспроизводимости результатов детектирования и снижению отклика биосенсоров, и нуждаются в дальнейшем более детальном изучении.

Показана эффективность применения графена, полученного термическим разложением карбида кремния, для детектирования тау- и бета-белков без специальной функционализации его поверхности для закрепления антител. Обнаружена агрегация антител и комплексов белков в крупных дефектах ячеистой структуры графена, возникающих как в процессе роста графена, так и при его взаимодействии с высокой концентрацией антител, что снижает воспроизводимость параметров графена и чувствительность биосенсоров.

Представляется, что детальное изучение процессов и механизмов взаимодействия бета- и тау-белков с графеном позволит разработать маркеры болезни Альцгеймера, пригодные для их массового применения в клинике.

Конфликт интересов

Авторы заявляют, что у них нет конфликта интересов.

Список литературы

- [1] S.S. Kwon, D. Kim, M. Yun, J.G. Son, S.H. Lee, *Biosens. Bioelectron.*, **192**, 113519 (2021). DOI: 10.1016/j.bios.2021.113519
- [2] M. Sun, C. Zhang, S. Lu, S. Mahmood, J. Wang, C. Sun, J. Pang, L. Han, H. Liu, *Adv. Funct. Mater.*, **34**, 2405471 (2024). DOI: 10.1002/adfm.202405471
- [3] J. Zhang, J. Zhu, F. Guo, J. Jiang, M. Xie, L. Hao, J. Chao, *Chem. Commun.*, **59**, 6869 (2023). DOI: 10.1039/d3cc01830j
- [4] A.A. Lebedev, S.Yu. Davydov, I.A. Eliseyev, A.D. Roenkov, O.V. Avdeev, S.P. Lebedev, Yu. Makarov, M. Puzyk, S. Klotchenko, A.S. Usikov, *Materials*, **14**, 590 (2021). DOI: 10.3390/ma14030590
- [5] V. Georgakilas, M. Otyepka, A.B. Bourlinos, V. Chandra, N. Kim, K.C. Kemp, P. Hobza, R. Zboril, K.S. Kim, *Chem. Rev.*, **112**, 6156 (2012). DOI: 10.1021/cr3000412
- [6] А.Ю. Плеханов, М.В. Пузык, А.С. Усиков, А.Д. Роенков, А.А. Лебедев, С.П. Лебедев, С.А. Клотченко, А.В. Васин, Ю.Н. Макаров, *Оптика и спектроскопия*, **130** (9), 1417 (2022). DOI: 10.21883/os.2022.09.53305.3628-22

[A.Yu. Plekhanov, M.V. Puzyk, A.S. Usikov, A.D. Roenkov, A.A. Lebedev, S.P. Lebedev, S.A. Klotchenko, A.V. Vasin, Yu.N. Makarov, *Opt. Spectrosc.*, **130** (9), 1141 (2022). DOI: 10.21883/EOS.2022.09.54835.3628-22].