

БАГАТОЕЛЕМЕНТНІ ІМУНОСЕНСОРИ НА ОСНОВІ ПОВЕРХНЕВОГО ПЛАЗМОННОГО РЕЗОНАНСУ ДЛЯ МОНІТОРИНГУ СИСТЕМИ КРОВООБІГУ

К. ф.-м. н. Р. В. Христосенко¹, к. ф.-м. н. К. В. Костюкевич¹, к. б. н. І. М. Колеснікова²,
чл.-кор. Е. В. Луговської², к. ф.-м. н. С. О. Костюкевич¹, к. ф.-м. н. А. В. Самойлов¹,
Ю. В. Ушенін¹, к. ф.-м. н. В. О. Лисюк¹, А. А. Коптюх¹

¹Інститут фізики напівпровідників ім. В. Є. Лашкарьова НАН України,

²Інститут біохімії ім. О. В. Палладіна НАН України

Україна, м. Київ

khrstosenko@ukr.net

Досліджено фізичні та технічні аспекти розробки імуносенсорних приладів з призмовим типом збудження поверхневого плазмонного резонансу (ППР) у плівці золота при скануванні кута падіння монохроматичного світла для достовірного детектування рівня фібриногену та його фрагментів у плазмі крові людини. Для лабораторного випробування методики розроблено чотирьохканальний сенсор типу «Плазмон», а для масового застосування запропоновано оригінальну сенсорну ППР-систему у дисковому форматі.

Ключові слова: поверхневий плазмонний резонанс, імуносенсор, фібриноген, розчинний фібрин, D-димер, ППР-диск.

Перші місця в структурі смертності населення від хвороб системи кровообігу займають ішемічна хвороба серця з її клінічними формами — інфарктом міокарду і нестабільною стенокардією, інсульти головного мозку та емболія легеневих артерій. Для своєчасного виявлення та лікування цих тяжких патологічних станів пропонується використовувати портативні, чутливі, швидкодіючі оптичні сенсори на основі поверхневого плазмонного резонансу (ППР) для прямого кількісного визначення у плазмі крові хворих білків-маркерів стану системи гемостазу — фібриногену, розчинного фібрину та D-димеру [1].

Поверхневі плаزمони (ПП) — це нормальні моди густини заряду, що існують на межі поділу між діелектриком та металом. Зв'язування ПП з електромагнітним полем збуджуючого світла відбувається за допомогою методу ослабленого повного відбивання із застосуванням призми або методу дифракційної ґратки та характеризується резонансною кривою ППР, форма та положення мінімуму якої є вкрай чутливими до зміни діелектричних властивостей досліджуваного середовища (аналіту) біля поверхні металу (золота). Для дослідження взаємодії біологічних молекул золоту поверхню модифікують тонким шаром специфічного чутливого матеріалу. Застосування імунної реакції «антитіло — антиген» (особливо на основі моноклональних антитіл — монАТ) дозволяє отримувати унікальні за специфічністю відгуки та виконувати аналізи складних біологічних сумішей — плазми крові, сечі, слини.

Цю роботу присвячено оптимізації малогабаритного комп'ютеризованого приладу типу «Плазмон», розробленого в Інституті фізики напівпровідників ім. В. Є. Лашкарьова НАНУ [2], для достовірного детектування рівня фібриногену та його фрагментів у плазмі крові людини. Принцип роботи приладу базується на збудженні ППР у плівці золота із застосуванням ретровідбиваючої призми (конфігурація Кречмана) і вимірюванні інтенсивності відбитого сигналу при механічній зміні кута падіння лазерного променя p -поляризованого світла. Проаналізовано вплив технології виготовлення золотого покриття, модифікації його поверхні та шумових ефектів на підвищення чутливості та стабільності роботи приладу. З метою підвищення чутливості методики при математичній обробці даних проведено комп'ютерне моделювання впливу степеня апроксимуючого полінома, діапазону кута сканування, приладового шуму і кількості експериментальних точок на величину абсолютної похибки і середньоквадратичне відхилення, оцінене за зсувом положення

мінімуму кривої ППР при варіюванні величини показника заломлення проби, з використанням формул Френеля і математичного формалізму матриць розсіювання Джонса.

Чутливий елемент перетворювача виготовляли застосовуючи оптимальну технологію — тонкоплівкову структуру Cr (5 нм) / Au (47 нм) було нанесено методом термічного випаровування у вакуумі та проведено відпал у повітрі при температурі 120°C протягом 30 хвилин. Під час відпалу досягається згладжування дрібномасштабного рельєфу поверхні плівки золота, що дозволяє знизити інтенсивність розсіювання в умовах ППР, стабілізувати оптичні характеристики та сформувати на поверхні високовпорядкований захисний шар [3].

Розроблено спосіб орієнтованої іммобілізації антитіл на поверхні золота у нативному стані з використанням багаточислової плівки амінопентаціаноферрату міді ($\text{Cu}_3 [\text{Fe}(\text{CN})_5\text{NH}_3]_2$). Це дало можливість охарактеризувати монАТ, що виготовлені в Інституті біохімії ім. О. В. Палладіна НАНУ, для модельних білків досліджуваних маркерів у буфері отримати калібрувальні криві (чутливість 0,5 мкг/мл) та визначити рівень фібриногену у плазмі крові донорів.

Оптимальну чутливість приладу «Плазмон» продемонстровано на прикладі вимірювання різниці в показниках заломлення осушеного повітря (1,0003) та гелію (1,0000296) при використанні апроксимуючого полінома третього степеня в околиці резонансного кута ($\theta_{\text{ППР}} \pm 0,5^\circ$) і кількості експериментальних точок, яка дорівнює 100.

Розроблено чотириканальну модифікацію приладу типу «Плазмон» з послідовним опитуванням масиву фотодіодів та додатковим контрольним каналом для виключення шуму температурних флуктуацій. Також пропонується ППР-система у дисковому форматі [4], яка дозволяє замінити традиційні скляні габаритні призми на плоску сенсорну одиницю, що включає дві металізовані пилкоподібні ґратки поверхневого рельєфу та сенсорний простір між ними, вкритий шаром золота. Дифракційні ґратки з лінійно змінним параметром фокусують вхідне світло на сенсорному просторі під різними кутами падіння, а відбите світло передають на лінійку фотодетекторів. Сенсорні диски можна випускати серійно, використовуючи матеріали, технологію та обладнання для виготовлення компакт-дисків, що призведе до здешевлення проведення аналізів та відкриє перспективу створення переносних експрес-лабораторій для широкомасштабного застосування.

ВИКОРИСТАНІ ДЖЕРЕЛА

1. Луговской Э.В., Макогоненко Е.М., Комисаренко С.В. Молекулярные механизмы образования и разрушения фибрина.— Киев: Наукова думка, 2013.
2. Патент 97105153 UA. Спосіб детектування та визначення концентрації біомолекул та молекулярних комплексів та пристрій для його здійснення // Ю.М. Ширшов та ін.— 2002.— Бюл. № 5.
3. Патент u201605636 UA. Спосіб виготовлення робочого елемента перетворювача з призмивим типом збудження поверхневого плазмонного резонансу // С.О. Костюкевич, К.В. Костюкевич, Р.В. Христюсенко.— 2016.— Бюл. № 24.
4. Патент a201111725 UA. Багатоелементний перетворювач на основі поверхневого плазмонного резонансу у дисковому форматі // С.О. Костюкевич, К.В. Костюкевич.— 2013.— Бюл. № 21.

R. V. Khrystosenko, K. V. Kostyukevych, I. N. Kolesnikova, E. V. Lugovskoy, S. O. Kostyukevych, A. V. Samoylov, Yu. V. Ushenin, V. O. Lysiuk, A. A. Koptuykh

Multielement surface plasmon resonance immunosensors for monitoring of blood circulation system

The authors investigate physical and technical aspects of the development of immunosensor devices with surface plasmon resonance (SPR) excitation in the gold film by means of the glass prism with the scanning of the incidence angle of monochromatic light for reliable detection of fibrinogen and its fragments in the human blood serum. For laboratory testing of the developed methods, a four-channel «Plasmon» type device was designed, while for the mass application it is proposed to use an original SPR sensor system in disc format.

Keywords: surface plasmon resonance, immunosensor, fibrinogen, soluble fibrin, D-dimer, SPR-disk.