

## ТЕОРИЯ И КОНСТРУИРОВАНИЕ

*И.А. Комаров, Е.Н. Рубцова, А.С. Лапашина, А.В. Головин, И.И. Бобринецкий*

### **Хеморезистивные сенсоры для определения тромбина на основе наноразмерных пленок углеродных нанотрубок на гибких подложках**

#### **Аннотация**

Представлены результаты по разработке конструкции селективного биологического сенсора на основе углеродных нанотрубок, химически модифицированных специфичными аптамерами. Сенсорный слой из пленки углеродных нанотрубок на гибкой полимерной подложке обеспечивает высокую чувствительность к определению целевых белков. Был исследован отклик сенсорных структур на целевой белок – тромбин и эталонный белок – альбумин. Показана возможность селективного определения тромбина после экспонирования сенсоров альбумином.

#### **Введение**

Определение безвредных биологических агентов в крови или физиологических жидкостях является одним из важных направлений в современной клинической диагностике. Тенденция, направленная на создание устройств персонального мониторинга состояния здоровья, предполагает необходимость использования для чувствительных элементов гибкого носителя. С другой стороны, применение гибкого носителя предполагает необходимость использования гибких проводящих материалов для создания чувствительной области и работы в качестве трансдюсера. В случае гибких носителей наиболее перспективно использование различных наноматериалов, в частности таких, как углеродные [1] или неуглеродные нанотрубки [2] и нанопровода [3], графен [4] и оксид графена и его композиты [5], наночастицы [6].

Одним из бурно развивающихся направлений в создании биологических сенсоров является модификация поверхности углеродных наноматериалов для иммобилизации на них биочувствительных элементов. Селективное определение заданного биологического агента можно реализовать различными методами, но на сегодняшний день наиболее перспективной является модификация поверхности наноматериалов антителами [7], [8], аптамерами [9], ферментами [10], ДНК [11] и т. д. С точки зрения повышения селективности биологических сенсоров, наиболее интересным классом чувствительных агентов являются аптамеры [12], [13], так как основным их свойством, в зависимости от структуры, является способность взаимодействовать с единственным биологическим агентом, что в перспективе позволит достигнуть почти 100%-й селективности.

В рассматриваемой работе предложена методика модификации углеродных нанотрубок аптамерами для создания биологических сенсоров, обладающих селективной чувствительностью к тромбину. Иммобилизация аптамеров производится через ковалентный механизм. Продемонстрирован преимуще-

ственный отклик сенсоров при экспонировании тромбином по отношению к альбумину (эталонный белок).

#### **Материалы и методы**

##### **Создание биосенсорных структур**

В качестве подложки использовали полиэтиленафталат (ПЭН) толщиной 125 мкм («DuPont Teijin»). Для создания заданного паттерна проводящих дорожек был использован раствор углеродных нанотрубок, наносимый методом центрифугирования (spin-coating) через маску. Для проведения операции spin-coating через маску были разработаны оригинальная методика и лабораторная установка собственной конструкции. Для ограничения области нанесения нанотрубок использовалась маска из маскировочного скотча («Tamiya»). В маске были проделаны П-образные отверстия шириной 1,5 мм. Процедура нанесения нанотрубок включала в себя осаждение раствора с помощью микродозатора (объем в каждое отверстие – 6 мкл) итеративно, 6 циклов с отжигом между нанесениями, при температуре 110 °С в течение 10 мин.

Для создания проводящих областей использовали 0,5 мг/мл раствор карбоксилированных углеродных нанотрубок («Sigma-Aldrich») в диметилацетамиде (ДМА). Использовались карбоксилированные углеродные нанотрубки 1...3 % ат. карбоксильных групп с диаметром трубок 0,5...1,5 нм.

После создания проводящей области на подложку помещали вторую маску, обеспечивающую формирование золотых контактов. Контакты толщиной 150 нм наносили методом магнетронного напыления.

После нанесения золотых контактов маски удаляли и производили покрытие лицевой стороны заготовки защитной полимерной пленкой со сформированным в ней отверстием для экспонирования диаметром 2 мм.

Трехмерная модель полученного сенсора и фотография реального прототипа показаны на рис. 1.

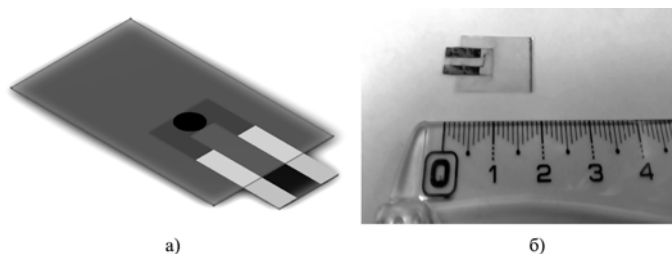


Рис. 1. Трехмерная модель биосенсора (а) и фотография реальной биосенсорной структуры (б)

Основной операцией создания биологического сенсора, определяющей его функциональность, является иммобилизация аптамера на поверхность транзьюсера; в качестве последнего в рассматриваемой работе использовали углеродные нанотрубки (рис. 2б). Иммобилизация аптамеров на структуры производилась по модифицированной методике с применением EDC и NHS. Для обеспечения возможности многократного использования сенсора требовалось применить ковалентную иммобилизацию. Для иммобилизации аптамеров был использован раствор аптамера (ТВА 5') с EDC [14], [15] без использования NHS. Концентрация EDC составила 5 ммоль, тромбинового аптамера – 0,5 ммоль. Объем капли раствора, наносимого в окно экспонирования, составлял 2 мкл. После нанесения раствора с аптамерами сенсорные структуры оставляли во влажной камере на 24 ч. Оценка концентрации функциональных групп на поверхности нанотрубки показала, что при концентрации аптамера в растворе 0,5 ммоль он будет в избытке в 10 раз по сравнению с EDC-активированными группами. Топография полученной пленки углеродных нанотрубок с иммобилизованными аптамерами представлена на рис. 2а.

Несмотря на то что в большинстве работ для иммобилизации аптамеров используется фосфатный буфер [16], [17], в рассматриваемой работе использовалась деионизованная вода, так как первые эксперименты показали неработоспособность сенсорных структур при иммобилизации из фосфатного буфера, предположительно из-за образования солей.

После завершения сборки сенсорных структур их собирали в специальную емкость для транспортировки.

### Измерение отклика сенсорных структур

Измерения проводились следующим образом: производилось подключение сенсоров к каналам измерителя, включение измерительного прибора ИПС-16 (ЗАО «ЭКСИС»), запуск программы управления, ввод или контроль напряжения на рабочем слое. Измерения сопротивления структур проводились до и после нанесения аптамера с целью контроля прохождения реакции.

Перед началом измерений с сенсоров снимали сигнал покоя в течение минимум 10 мин с целью понять, стабилизировались ли характеристики сенсоров. Далее на подложку в окно

экспонирования наносили каплю фосфатного буфера или дистиллированной воды объемом 5 мкл. После нанесения капли буфера/DI-воды сенсоры выдерживались в течение не менее 5 мин также для стабилизации сопротивления. Далее на структуры наносили каплю 0,5 мкл раствора тромбина/альбумина в DI-воде. Всего проводили 4 нанесения с повышением концентрации тромбина/альбумина (1, 5, 10, 20 мкмоль). В некоторых случаях проводились дополнительные нанесения большой капли буфера/DI-воды с целью набора статистики.

На рис. 3 и 4 представлен относительный отклик сенсорных структур на тромбин и альбумин при различных концентрациях этих белков в деионизованной воде.

Из рис. 3 можно увидеть, что отклик на тромбин сильнее, чем на альбумин, примерно в 1,6 раза. При этом важно отметить, что при экспонировании тромбином наблюдается существенно более резкий рост, что позволяет предположить в этом эффект работы аптамеров, так как согласно теории именно они должны селективно вступать во взаимодействие с тромбином. С другой стороны, наличие сигнала от альбумина говорит о наличии в системе неспецифических взаимодействий. Можно предположить, что неспецифическое взаимодействие происходит за счет достаточно плотной сетки нанотрубок (рис. 1), в порах между которыми вполне могут помещаться одиночные молекулы альбумина. Также в пользу неспецифического характера взаимодействия говорит скорость реакции, которая в случае с альбумином примерно в 2 раза меньше. Хотя молекулярная масса тромбина (36 кДа) почти в 2 раза отличается от молекулярной массы альбумина (65...70 кДа), размер их молекул сопоставим и, согласно оценкам, составляет от 1,7 [18] до 3,5 нм для альбумина [19] и до 4 нм для тромбина [20], позволяя утверждать, что они с почти равной вероятностью могли бы проявлять неспецифический характер взаимодействия с сенсором, однако данные отклика говорят об обратном.

При этом специфичность взаимодействия можно оценить как интегральный параметр величины отклика сенсора и скорости реакции после введения аналита. По этим параметрам сенсор демонстрирует высокую чувствительность к тромбину по сравнению с альбумином.

Из рис. 4 можно оценить величину и скорость изменения отклика на различные концентрации тромбина. Так, можно отметить, что уже при концентрации тромбина в 5...10 мкмоль сенсор в целом входит в насыщение, тогда как при меньшей концентрации (1 мкмоль) разница в отклике хорошо заметна. При повышении концентрации тромбина в растворе до 20 мкмоль происходит снижение отклика, что, по всей видимости, связано с насыщением структуры и отсутствием свободных аптамеров для взаимодействия с тромбином. Косвенно об этом может также говорить уменьшение скорости отклика (более пологий график): молекулам тромбина требуется большее время, чтобы провзаимодействовать с аптамерами. С другой стороны, можно отметить, что скорость отклика на концентрацию 1 мкмоль примерно соответствует таковой для

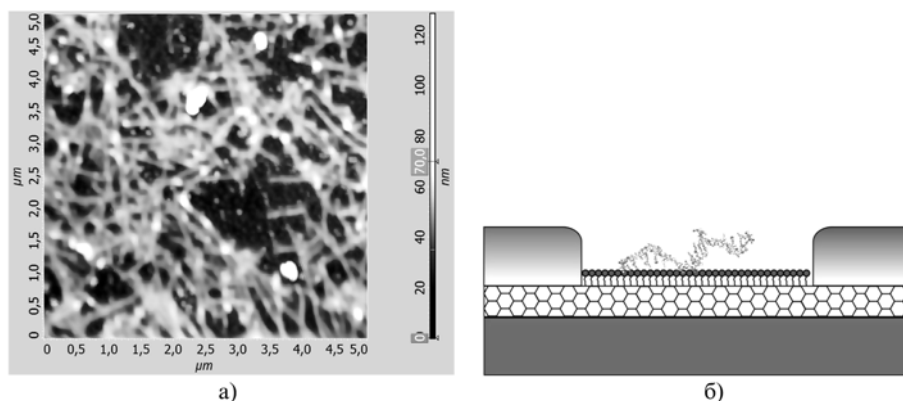


Рис. 2. Структура сенсорного слоя на основе углеродных нанотрубок:

- а) АСМ-изображение поверхности ПЭН, покрытой слоем углеродных нанотрубок толщиной 10 нм;
- б) схема иммобилизации аптамеров на поверхности функционализированных углеродных нанотрубок

20 мкмоль, однако в данном случае, вероятно, концентрация белка настолько мала, что требуется определенное время, чтобы белок достиг аптамеров.

## Заключение

Разработана методика ковалентной иммобилизации аптамеров на поверхность углеродных нанотрубок, обеспечивающая отсутствие влияния на работоспособность сенсора солей, образующихся при использовании буферных растворов. На основе данной методики разработана конструкция биологического сенсора на гибкой подложке и сформированы чувствительные к тромбину сенсорные структуры. Получены данные по чувствительности сенсора: верхний предел обнаруживаемых концентраций при многократных измерениях составляет 15 мкмоль, он обусловлен насыщением аптамеров целевыми белками. Продemonстрирована селективность сенсора к тромбину, сигнал от которого отличается от сигнала от альбумина в 1,6 раза, а скорость реакции – в 2 раза. Время отклика составляет менее 1 мин.

Таким образом, разработаны подходы к созданию нового поколения биологических сенсоров, которые за счет гибкости возможно интегрировать в различные носимые системы мониторинга, в частности в «умную» одежду.

*Исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда (проект № 14-19-01308) и гранта Президента Российской Федерации № МК-9471.2016.8.*

## Список литературы:

1. Tilmaciu C.-M., Morris M.C. Carbon nanotube biosensors // *Front Chem.* 2015. Vol. 3. Article number 59.
2. Kumar A.M., Jung S., Ji T. Protein Biosensors Based on Polymer Nanowires, Carbon Nanotubes and Zinc Oxide Nanorods // *Sensors.* 2011. Vol. 11. PP. 5087-5111.
3. Li X., Zhao C., Liu X. A paper-based microfluidic biosensor integrating zinc oxide nanowires for electrochemical glucose detection // *Microsystems & Nanoengineering.* 2015. Vol. 1. Article number 15014.
4. Kim Y.H., Kim S.J., Kim Y.-J. et al. Self-Activated Transparent All-Graphene Gas Sensor with Endurance to Humidity and Mechanical Bending // *ACS Nano.* 2015. Vol. 9 (10). PP. 10453-10460.
5. Li F., Yub S., Thompson L., Yu A. Development of a Novel Nitrite Electrochemical Sensor by Stepwise in situ Formation of Palladium and Reduced Graphene Oxide Nanocomposites // *RSC Adv.* 2015. Vol. 5. PP. 40111-40116.

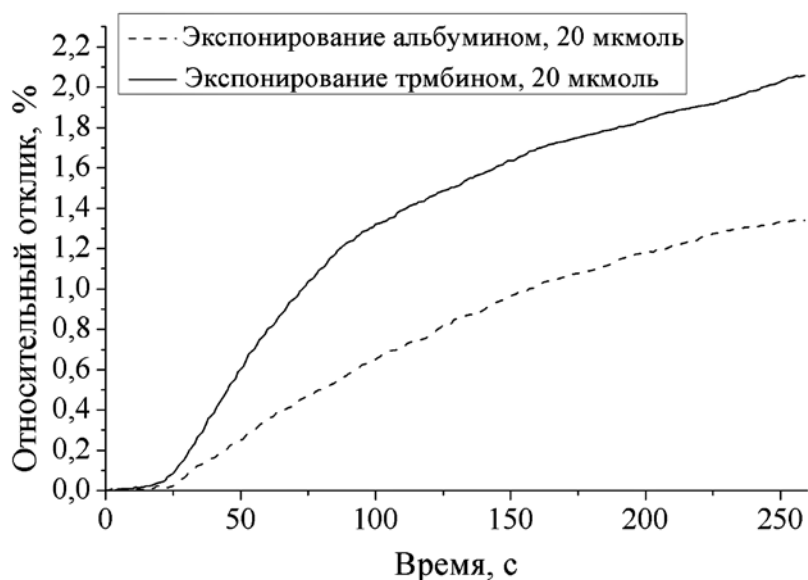


Рис. 3. Отклик сенсорной структуры C8\_2 на тромбин и альбумин при концентрации раствора 20 мкмоль

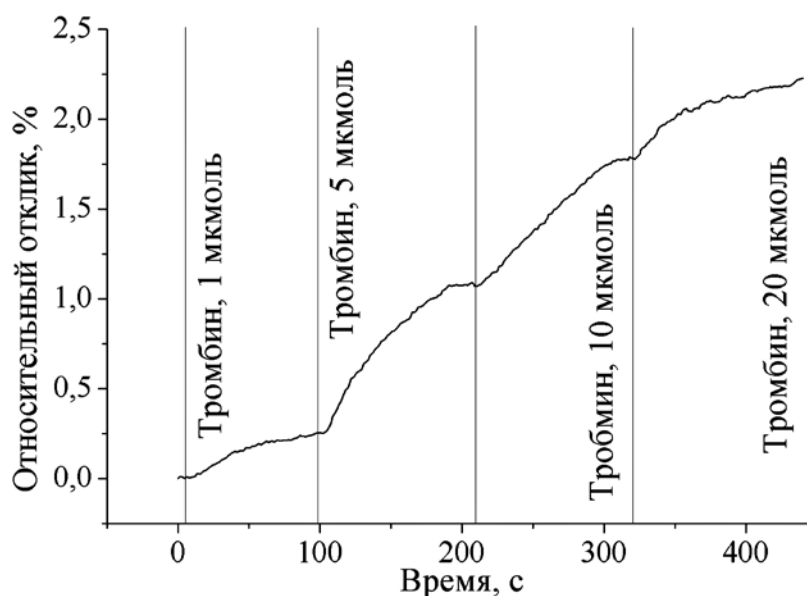


Рис. 4. Отклик сенсорной структуры C8\_7 на тромбин при концентрациях раствора от 1 до 20 мкмоль

6. *Hutter E., Maysinger D.* Gold-nanoparticle-based biosensors for detection of enzyme activity // *Trends in Pharmacological Sciences*. 2013. Vol. 34. PP. 497-507.
7. *Byrne B., Stack E., Gilmartin N., O'Kennedy R.J.* Antibody-Based Sensors: Principles, Problems and Potential for Detection of Pathogens and Associated Toxins // *Sensors*. 2009. Vol. 9. PP. 4407-4445.
8. *Sharma S., Byrne H., O'Kennedy R.J.* Antibodies and antibody-derived analytical biosensors // *Essays in Biochemistry*. 2016. Vol. 60. PP. 9-18.
9. *So H.-M., Won K., Kim Y.H. et al.* Single-Walled Carbon Nanotube Biosensors Using Aptamers as Molecular Recognition Elements // *J. Am. Chem. Soc.* 2005. Vol. 127. PP. 11906-11907.
10. *Nigam V.K., Shukla P.* Enzyme Based Biosensors for Detection of Environmental Pollutants // *J. Microbiol. Biotechnol.* 2015. Vol. 25 (11). PP. 1773-1781.
11. *Epstein J.R., Biran I., Walt D.R.* Fluorescence-based nucleic acid detection and microarrays // *Analytica Chimica Acta*. 2002. Vol. 469. PP. 3-36.
12. *Zhou W., Huang P.-J., Ding J., Liu J.* Aptamer-based biosensors for biomedical diagnostics // *Analyst*. 2014. Vol. 139. PP. 2627-2640.
13. *Jarczewska M., Gorski L., Malinowska E.* Electrochemical aptamer-based biosensors as potential tools for clinical diagnostics // *Anal. Methods*. 2016. Vol. 8. PP. 3861-3877.
14. *Sobhi D., Rao T.P., Rao K.S. et al.* A review of DNA functionalized/grafted carbon nanotubes and their characterization // *Sensors and Actuators B*. 2007. Vol. 122. PP. 672-682.
15. *Kim S.N., Rusling J.F., Papadimitrakopoulos F.* Carbon Nanotubes for Electronic and Electrochemical Detection of Biomolecules // *Adv. Mater.* 2007. Vol. 19 (20). PP. 3214-3228.
16. *Rohrbach F., Karadeniz H., Erdem A. et al.* Label-free impedimetric aptasensor for lysozyme detection based on carbon nanotube-modified screen-printed electrodes // *Analytical Biochemistry*. 2012. Vol. 421. PP. 454-459.
17. *Wang J., Lin Y.* Functionalized carbon nanotubes and nanofibers for biosensing applications // *Trends Anal. Chem.* 2008. Vol. 27 (7). PP. 619-626.
18. *Самсонова Ю.С., Приезжев А.В., Луговцов А.Е. и др.* Исследование взаимодействия молекул альбумина с наночастицами алмазов в водных растворах методом динамического рассеяния света // *Квантовая электроника*. 2012. Т. 42. № 6. С. 484-488.
19. *Erickson H.P.* Size and Shape of Protein Molecules at the Nanometer Level Determined by Sedimentation, Gel Filtration, and Electron Microscopy // *Biol. Proced. Online*. 2009. Vol. 11. PP. 32-51.
20. *Rinker S., Ke Y., Liu Y. et al.* Self-assembled DNA nanostructures for distance dependent multivalent ligand-protein binding // *Nature Nanotechnology*. 2008. Vol. 3 (7). PP. 418-422.

Иван Александрович Комаров,  
 канд. техн. наук, ведущий инженер,  
 научно-образовательный центр «Зондовая  
 микроскопия и нанотехнологии»,  
 Екатерина Николаевна Рубцова,  
 студент,  
 ФГАОУ ВО «Национальный  
 исследовательский университет «МИЭТ»,  
 г. Москва, г. Зеленоград,  
 Анна Сергеевна Лапашина,  
 студент,  
 Андрей Викторович Головин,  
 д-р хим. наук, ст. преподаватель,  
 факультет биоинженерии и биоинформатики,  
 ФГБОУ ВО «МГУ им. М.В. Ломоносова»,  
 г. Москва,  
 Иван Иванович Бобринецкий,  
 д-р тех. наук, профессор,  
 кафедра квантовой физики,  
 ФГАОУ ВО «Национальный  
 исследовательский университет «МИЭТ»,  
 г. Москва, г. Зеленоград,  
 e-mail: master\_kom@mail.ru

**С.В. Фролов, А.Ю. Потлов, С.В. Синдеев**

## **Выбор модели потоконаправляющего стента на основе использования когерентной оптической томографии и математического моделирования гемодинамики**

### **Аннотация**

Представлен метод повышения эффективности операций по установке потоконаправляющих стентов в церебральные артерии с аневризмой на основе совместного использования математического моделирования гемодинамики и компрессионной эластографии. Разработаны и протестированы подходы к определению модуля Юнга и коэффициента Пуассона для фантома стенки церебральной артерии на основе данных эндоскопической оптической когерентной томографии. Работоспособность предложенного метода проверена на модели аневризмы внутренней сонной артерии с использованием математической модели гемодинамики, учитывающей механические свойства стенки церебральной артерии.

### **Введение**

Выбор модели потоконаправляющего стента при лечении аневризм головного мозга представляет собой нетривиальную задачу из-за сложности прогнозирования изменений кровотока в пораженной церебральной артерии, вызванных конфигурацией стента [1]. Для решения этой проблемы перспективным является использование методов математического моделирования гемодинамики, позволяющих предварительно оценить в ходе планирования эндоваскулярной операции возможные

гемодинамические изменения для доступного набора стентов и определить подходящую модель [2]. Однако в большинстве работ по оценке эффективности потоконаправляющих стентов механические свойства стенки церебрального сосуда не учитываются [3] (т. е. стенка моделируется жесткой), что может существенно повлиять на расчет гемодинамических параметров в аневризме [4]. Для повышения точности моделирования гемодинамики необходимы актуальные сведения о величине модуля Юнга и коэффициента Пуассона для стенки церебральной артерии, которые могут быть определены *in vivo* с