

# Графен как основа биологических сенсоров для определения маркеров нейродегенеративной деменции

С. В. Воробьев<sup>1,3</sup>, И. К. Терновых<sup>1</sup>, А. Ю. Плеханов<sup>5</sup>, А. А. Лебедев<sup>2</sup>, А. Н. Смирнов<sup>2</sup>, А. С. Усиков<sup>2</sup>, С. П. Лебедев<sup>2</sup>, М. В. Пузык<sup>6</sup>, А. Д. Роенков<sup>4</sup>

<sup>1</sup>ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр имени В. А. Алмазова» Минздрава России, Санкт-Петербург

<sup>2</sup>ФГБУН «Физико-технический институт имени А. Ф. Иоффе» РАН, Санкт-Петербург

<sup>3</sup>ФГБОУ ВО «Санкт-Петербургский государственный педиатрический медицинский университет» Минздрава России, Санкт-Петербург

<sup>4</sup>ООО «Группа компаний „Нитридные кристаллы“», Санкт-Петербург

<sup>5</sup>ФГБУ «Научно-исследовательский институт гриппа имени А. А. Смородинцева» Минздрава России, Санкт-Петербург

<sup>6</sup>ФГБОУ ВО «Российский государственный педагогический университет имени А. И. Герцена» Минпросвещения России, Санкт-Петербург

## РЕЗЮМЕ

**Цель исследования.** Оработка методики иммобилизации к поверхности графена антител белков, играющих значимую роль в патогенезе болезни Альцгеймера.

**Материалы и методы.** Методом сублимации поверхности подложек SiC получали графеновые пленки. Наличие монослоя графена подтверждали по спектрам при спектроскопии. Выполнялась оценка качества поверхности графена методом циклической вольтамперометрии. Далее проводили функционализацию аминогруппами методом, основанным на сорбции из раствора производных пирена и фенилнитрогруппами электрохимическим методом. Образцы графена выдерживали в растворах моноклональных антител к бета-амилоидному пептиду человека 1–42. Также препараты выдерживали в растворе вторичных антител, меченых ФИТЦ. Оценку результатов проводили с помощью флуоресцентной микроскопии. Дополнительно образцы выдерживали в растворе антител с пероксидазной меткой, которую выявляли при проведении хемилюминесценции.

**Результаты.** Для прикрепления специфических антител к поверхности графена большое значение имеет качество его поверхности. Оптимальной рабочей концентрацией антител к бета-амилоиду человека 1–42 в растворе для последующего изготовления биологических сенсоров является 15 мкг/мл. Ковалентная сшивка антител глutarовым альдегидом с аминогруппами на графене дает незначительный выигрыш в уровне флуоресценции по сравнению с нековалентной сорбцией на графене с нитрогруппами. Функционализация фенилнитрогруппами оптимальна для дальнейшей работы, связанной с выявлением специфических антигенов.

**Заключение.** Исследована методика иммобилизации на поверхности графена специфических антител к бета-амилоиду в концентрациях, выявляемых флуоресцентной микроскопией и хемилюминесценцией. На графене иммобилизуется количество антител, достаточное для создания биосенсора. Установлено, что функционализация фенилнитрогруппами позволяет создать оптимальные условия для прикрепления антител к поверхности графена, а также производить отмывку образующихся антител-антигенных комплексов для дальнейшего повторного использования графеновых биосенсоров.

**КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА:** болезнь Альцгеймера, нейродегенерация, биомаркер, графен, функционализация, амилоид.

**КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ.** Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

## Graphene as basis of biological sensors for determining markers of neurodegenerative dementia

S. V. Vorobev<sup>1,3</sup>, I. K. Ternovych<sup>1</sup>, A. Yu. Plekhanov<sup>5</sup>, A. A. Lebedev<sup>2</sup>, A. N. Smirnov<sup>2</sup>, A. S. Usikov<sup>2</sup>, S. P. Lebedev<sup>2</sup>, M. V. Puzyk<sup>6</sup>, A. D. Roenkov<sup>4</sup>

<sup>1</sup>Almazov National Medical Research Centre, Saint Petersburg, Russia

<sup>2</sup>Ioffe Institute, Saint Petersburg, Russia

<sup>3</sup>Saint-Petersburg State Pediatric Medical University, Saint Petersburg, Russia

<sup>4</sup>Nitride Crystals Group Ltd., Saint Petersburg, Russia

<sup>5</sup>Smorodintsev Research Institute of Influenza, Saint Petersburg, Russia

<sup>6</sup>Herzen State Pedagogical University of Russia, Saint Petersburg, Russia

## SUMMARY

**Objective.** To develop technique immobilizing antibodies graphene surface of proteins that play a significant role in pathogenesis Alzheimer's disease.

**Materials and methods.** Graphene films were obtained sublimation surface of SiC substrates. Presence graphene monolayer was confirmed spectroscopy spectra. Graphene surface quality was evaluated cyclic voltammetry. Functionalization by amino groups was carried out method based on sorption pyrene derivatives from a solution and phenylnitrogroups electrochemical method. Graphene was kept in solutions monoclonal antibodies to human beta-amyloid peptide 1–42. Preparations were also kept in solution secondary antibodies labeled with FITC. Results were evaluated fluorescence microscopy. Additionally, samples were kept in solution antibody with peroxidase label, which was detected chemiluminescence.

**Results.** For attachment specific antibodies surface of graphene, quality its surface is great importance. Optimal working concentration of antibodies of human beta-amyloid 1–42 in solution for subsequent manufacture biological sensors is 15 micrograms per 1 ml. Covalent crosslinking antibodies with glutaraldehyde with amino groups on graphene gives a slight gain in the level fluorescence compared with non-covalent sorption on graphene with nitro groups. Functionalization phenylnitrogroups is optimal for further work related to the identification specific antigens.

**Conclusions.** The technique of immobilization on the graphene surface of specific antibodies to beta-amyloid in concentrations detected by fluorescence microscopy and chemiluminescence is investigated. Amount antibodies sufficient to create a biosensor is immobilized on graphene. It was found that functionalization of phenylnitrogroups allows creating optimal conditions for the attachment of antibodies to the graphene surface, as well as washing resulting antibody-antigenic complexes for further reuse of graphene biosensors.

**KEYWORDS:** Alzheimer's disease, neurodegeneration, biomarker, graphene, functionalization, amyloid.

**CONFLICT OF INTEREST.** The authors declare no conflict of interest.

## Введение

Болезнь Альцгеймера (БА) – прогрессирующее нейродегенеративное заболевание и ведущая причина деменции у пожилых людей [1]. Во всем мире около 50 миллионов человек страдают деменцией, которая в 50–70 % случаев связана с БА [2, 3]. Ожидается, что во всем мире численность населения в возрасте 65 лет и старше увеличится с 9,3 % в 2020 году до примерно 16,0 % в 2050-м [4]. В 2016 году в системе классификации глобального бремени болезней БА заняла четвертое место по частоте преждевременной смертности и шестое – по тяжести заболевания [5]. Значительные расходы, направленные на уход за пациентами, страдающими БА, приводят к физическим, психологическим и финансовым последствиям как для семей, так и для общества. В настоящей статье мы представляем исследование, направленное на разработку нового метода определения биомаркеров БА в рамках ее диагностики, основанное на синтезе достижений нейробиологии и нанотехнологий.

Точная верификация и мониторинг заболевания исходя из результатов только клинического обследования могут оказаться затруднительными даже для экспертов в области деменции [6], в связи с чем все более важную роль в определении БА стали играть биомаркеры. Они включены в современные исследовательские диагностические критерии БА и рекомендованы регулирующими органами для использования [7, 8]. Ликвор за счет своего прямого контакта с центральной нервной системой долгое время использовался для обнаружения и измерения биохимических изменений в головном мозге [9]. Например,  $\beta$ -амилоид 42 ( $A\beta_{42}$ ) отдельно и в соотношении с  $A\beta_{40}$  ( $A\beta_{42}/A\beta_{40}$ ) отражает накопление  $A\beta$ . Общий и фосфорилированный тау-белки (P-tau) свидетельствуют о развитии нейродегенерации. Так, в ряде работ с помощью иммуноферментного анализа (ИФА) было обнаружено заметное снижение уровня  $A\beta_{42}$  в ликворе при БА [10], при этом эти значения обратно коррелируют с его нагрузкой в кортикальных бляшках в биоптатах [11]. Идентификация гиперфосфорилированного тау-протеина, как основного компонента нейрофибриллярных клубков, привела к разработке методов анализа ликвора на P-tau. Хотя в тау-белке существует множество сайтов фосфорилирования, наиболее часто используемые анализы P-tau обнаруживают фосфорилирование по треонину 181 (P-tau181) [12]. Увеличение P-tau181 в ликворе постоянно наблюдается

при БА [13]. При этом обнаружено увеличение других вариантов фосфорилированного тау-протеина, в частности P-tau231 [14].

Среди маркеров нейродегенерации одними из наиболее перспективных являются легкие цепи нейрофиламентов (НФЛ). Поскольку уровень НФЛ увеличивается при многих заболеваниях нервной системы, он считается неспецифическим маркером нейронального повреждения. При этом нужно отметить, что высокие уровни НФЛ связаны с более быстрым прогрессированием БА и значительным уровнем атрофии головного мозга при большинстве нейродегенеративных заболеваний [15, 16]. НФЛ также можно измерить в плазме крови, где его уровень повышается на стадии деменции [17] при спорадической БА, а также при аутосомно-доминантной форме БА [16, 18].

Определение уровня накопления и его топическую локализацию в головном мозге биологических маркеров можно проводить с помощью позитронно-эмиссионной томографии (ПЭТ) со специфичными для них соединениями (лигандами, трейсерами). Однако повсеместное использование ликворных и ПЭТ-биомаркеров остается ограниченным из-за инвазивности люмбальной пункции с одной стороны, а также высокой стоимости и низкой доступности ПЭТ с другой стороны [19]. Это привело к растущему интересу изучения возможности определения биомаркеров в сыворотке крови, причем ряд недавних работ в этом направлении показали многообещающие результаты [20, 21].

Однако необходимо отметить, что в данной среде биомаркеры БА, отражающие ее течение, в частности  $\beta$ -амилоид и тау-протеин, находятся в весьма низких концентрациях, не позволяющих проводить их определение с достаточной надежностью с помощью рутинных методов лабораторной диагностики. Это предопределяет тот факт, что сегодня перед исследователями стоит задача разработки принципиально нового метода исследования, неинвазивного, простого в анализе, но обладающего достаточной чувствительностью и специфичностью, который можно применять на всех этапах оказания помощи. Одной из таких перспективных разработок в этом направлении является использование биосенсоров на основе графена. В ряде работ уже было показано, что чувствительность этого метода позволяет определять гораздо меньшие, по сравнению с ИФА, концентрации исследуемых веществ [22, 23]. С учетом этого

аспекта, а также проявляемой потенциально высокой специфичности графеновых сенсоров, разработка концепции их использования позволит детально изучить биохимические процессы, характеризующие патогенез БА, значимо улучшить диагностику заболевания, в том числе на ранних стадиях.

**Цель настоящего исследования:** отработка методики прикрепления к поверхности графена антител белков, играющих значимую роль в патогенезе болезни Альцгеймера.

### Материалы и методы

Для реализации цели нами был выполнен эксперимент, направленный на отработку методики прикрепления к поверхности графена антител к бета-амилоиду 1–42 человека. Графеновые пленки получали методом сублимации поверхности полуизолирующих подложек SiC (0001)  $\pm$  0,25° размером 11 × 11 мм [24]. Процесс выращивания графена проводили в графитовом тигле, индуктивно нагреваемом высокочастотным генератором в атмосфере аргона (720–750 Торр) при температуре ~1750 °С. Присутствие монослоя графена на подложке SiC подтверждали по спектрам комбинационного рассеяния света при проведении спектроскопии, выполняемой на спектрометрической установке LabRam HR 800, оснащенной конфокальным микроскопом [25].

Качество поверхности полученной графеновой пленки оценивали методом циклической вольтамперометрии. Электрохимические исследования проводили на потенциостате-гальваностате ПИ-50-Pro, (Elins, Россия) в трехэлектродной ячейке в растворе 96%-ного этанола (концентрация фонового электролита – 0,1 М NH<sub>4</sub>BF<sub>4</sub>) при комнатной температуре. Рабочим электродом был графен / SiC-чип, электрод сравнения – насыщенный хлорид-серебряный электрод и вспомогательный электрод – платиновая пластина. 96%-ный этанол, содержащий 4% воды, выбран в качестве электролита для того, чтобы при проведении исследований можно было наблюдать поведение графенового материала в области окисления и восстановления воды.

Затем образцы графеновых подложек размером 5 × 5 мм с хорошим качеством поверхности функционализировали аминогруппами способом, основанным на сорбции из раствора производных пирена [26]. Для этого образцы графена выдерживали в 0,1%-ном водном растворе пиренметиламина (ПМА) в течение 30 минут при комнатной температуре с последующей промывкой в проточной воде (30 с). Для перевода аминогрупп на графене в непротонированное состояние графен с сорбированным на нем ПМА промывали в 1 М растворе NaOH (1 минута с последующим ополаскиванием проточной водопроводной водой в течение 30 с). Далее такой графен обрабатывали 25%-ным водным раствором глутарового альдегида (20 минут с последующим ополаскиванием проточной водопроводной водой в течение 30 с).

Часть образцов графена была функционализирована фенил-нитрогруппами электрохимическим методом

в два этапа при нанесении нитрофениловых групп (–C<sub>6</sub>H<sub>4</sub>NO<sub>2</sub>) и их последующем восстановлении до фениламинных групп (–C<sub>6</sub>H<sub>4</sub>NH<sub>2</sub>) с применением метода циклической вольтамперометрии (ЦВА). На первом этапе использовали следующий состав электролита: 100 мл ацетонитрила, 2 г тетрафторобората тетрабутиламмония, 25 мг 4-NPD (тетрафтороборат 4-нитрофенилдиазония). Электрохимическую функционализацию проводили на потенциостате-гальваностате Elins-P20X между поверхностью графена в чипе и безводным электролитом в стеклянной трехэлектродной ячейке, позволяющей продувать электролит и пространство над ним инертным газом аргоном высокой чистоты. Реакция присоединения нитрофениловых групп контролировалась по изменению тока при циклировании потенциала на рабочем электроде от 0 до –600 мВ и обратно. Второй этап функционализации включал восстановление присоединенных к графену нитрофениловых групп в фениламинные (–C<sub>6</sub>H<sub>4</sub>NH<sub>2</sub>) также методом ЦВА, но в водном растворе 0,1 М KCl и этилового спирта (9 : 1) также в трехэлектродной ячейке. Электродами были стандартный хлоридсеребряный электрод сравнения (Ag/AgCl) Эср-10101, поверхность графена в чипе была рабочим электродом (катодом), и контр-электрод – платиновая пластина. При этом процесс проходил при циклировании потенциала 3 раза на рабочем электроде от 0 до –1000 мВ и обратно.

Подготовленные таким образом образцы графена выдерживали при 37 °С в течение часа в растворах коммерческого препарата моноклональных мышинных антител к бета-амилоидному пептиду человека 1–42 (Cloud-Clone, Китай), приготовленных на фосфатно-солевом буфере, с различной концентрацией антител: 45, 15, 5 и 1,5 мкг/мл с последующим ополаскиванием проточной водопроводной водой в течение 30 с.

Избыточную сорбционную емкость графена исчерпывали вымачиванием в ультрапастеризованном молоке жирностью 1,5% («Молочный комбинат „Петмол“», СПб) на протяжении 20 минут с последующим ополаскиванием проточной водопроводной водой (30 с) [27].

Для выявления сорбированных на графене антител все препараты графена далее выдерживали в растворе вторичных меченых антител с достаточной концентрацией (поликлональные кроличьи антитела против IgG мыши, меченые ФИТЦ, 1 : 200 на молоке; Cloud-Clone, Китай) в течение 30 минут, при температуре 37 °С с последующим ополаскиванием проточной водопроводной водой (30 с).

Оценку результатов проводили с помощью флуоресцентной микроскопии с использованием микроскопа Olympus BX51 (ув. 10×).

Для альтернативной оценки сорбции антител на графене далее те же образцы выдерживали в растворе третичных антител с пероксидазной меткой (козьи, противокроличьи антитела, меченые пероксидазой хрена [Sigma], 1 : 1000 на фосфатно-солевом буфере, 30 минут при комнатной температуре) с последующим ополаскиванием проточной водопроводной водой в течение 30 с. Пероксидазную метку на графене выявляли при помощи

раствора, содержащего люминол, усилитель хемилюминесценции и перекись водорода (BioRad). Для этого каплю (10 мкл) раствора наносили на графеновый чип. Хемилюминесценцию регистрировали прибором Chemidoc (BioRad).

### Результаты исследования и их обсуждение

Для прикрепления специфических антител к поверхности графена большое значение имеет характер его поверхности. Так, чем лучше структурное качество графеновой пленки, тем выше уровень сорбции на нем антител и однороднее их распределение по поверхности. Ранее проведенным исследованием было установлено влияние геометрии поверхности графена, в частности ширины и высоты его ступеней на эффективность контакта с химическими веществами, что, возможно, определяется ориентацией в пространстве макромолекул [28].

При функционализации проводилась вольтамперометрия методом циклирования (ЦВА) потенциала между графеном (рабочий электрод) и Pt-пластинкой (контрэлектрод), на фоне которой записывался ток на протяжении трех циклов сканирования. По характеру изменения тока можно было наблюдать, что основной процесс (присоединение функциональных групп) на поверхности графена фактически осуществлялся в течение первого цикла. Последующие циклы характеризовались заметным уменьшением протекающего тока, что свидетельствовало о завершении реакции на поверхности рабочего электрода. Вид типичных кривых ЦВА, которые многократно наблюдались на исследуемых чипах, представлен на *рисунке 1*.

После функционализации в ходе процесса закрепления антител к поверхности графена нами было установлено, что наибольший уровень флуоресцентного свечения отмечается при концентрации первичных моноклональных антител к бета-амилоиду 1–42 человека 15 мкг/мл. Уровень антител в 1,5 и 5,0 мкг/мл дает худшие результаты. В то же время увеличение содержания

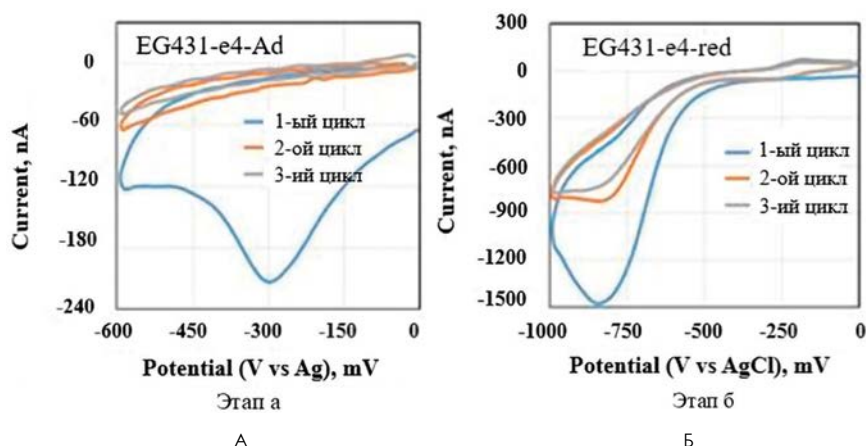


Рисунок 1. Циклические вольтамперограммы процесса функционализации поверхности графена в чипе EG431-E4-Ad. Исходное сопротивление чипа – 1,6 кОм. Скорость сканирования потенциала – 100 мВ/с. Обозначены циклы: А – нанесение нитрофениловых групп ( $-\text{C}_6\text{H}_4\text{NO}_2$ ). Сопротивление чипа по окончании процесса – 5,8 кОм; Б – восстановление присоединенных к графену нитрофениловых групп в фениламинные ( $-\text{C}_6\text{H}_4\text{NH}_2$ ). Сопротивление чипа – 2,5 кОм

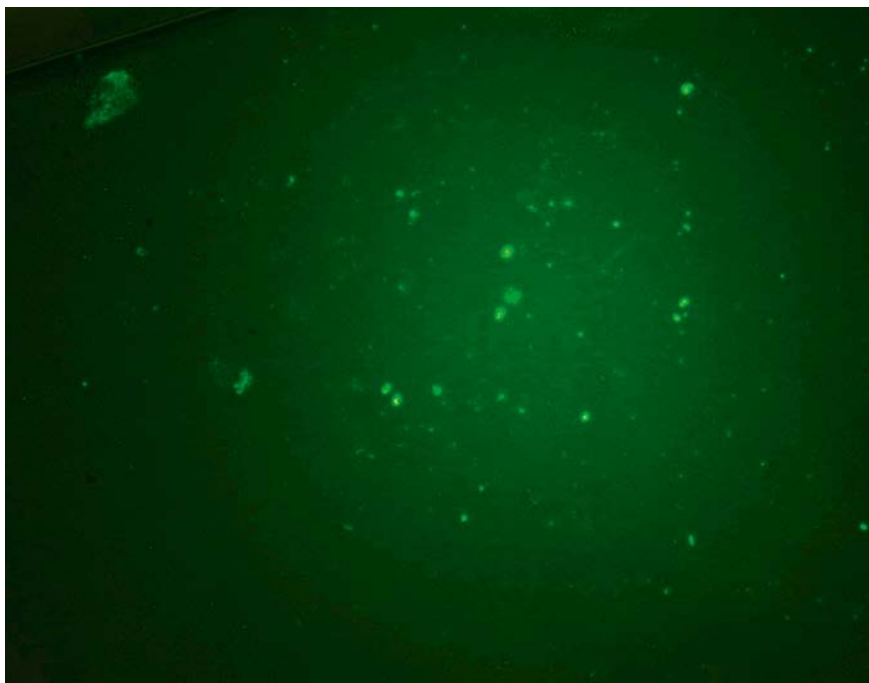


Рисунок 2. Флуоресценция антител на поверхности образца графена 5 × 5 мм (функционализация ПМА-глутаровый альдегид). Микрофотография, ув. 10×

в растворе антител к бета-амилоиду до 45 мкг/мл не демонстрирует значимого повышения количества их прикрепления к графену, по данным как флуоресцентной микроскопии, так и хемилюминесценции. Таким образом, оптимальной рабочей концентрацией антител к бета-амилоиду 1–42 человека в растворе, необходимой для последующего использования при изготовлении биологических сенсоров на основе графена, является 15 мкг/мл. На *рисунке 2* отображена фотография, полученная при флуоресцентной микроскопии изученных образцов. Светящиеся точки – места прикрепления к поверхности графена первичных антител к бета-амилоиду 1–42 после их реакции с комплементарными вторичными антителами, мечеными ФИТЦ.

На *рисунке 3* изображены фотографии, полученные при проведении хемилюминесценции. Светящиеся точки также соответствуют местам прикрепления первичных антител против бета-амилоида 1–42 на поверхности графена, выявляемых по пероксидазной метке на третичных антителах.

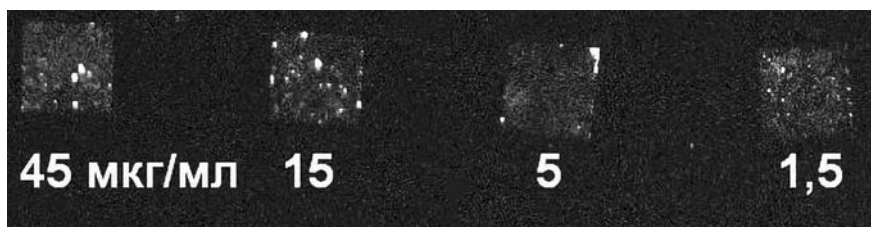


Рисунок 3. Результаты хемилюминесценции исследованных образцов. Указаны концентрации нанесенных антител к бета-амилоиду 1–42 при выдерживании графеновых подложек в базовом растворе: 45, 15, 5, 1,5 мкг/мл

Результаты наших исследований позволяют также говорить о том, что ковалентная сшивка антител глутаровым альдегидом с аминогруппами на графене дает лишь незначительный выигрыш в уровне флуоресценции по сравнению с нековалентной сорбцией на графене с нитрогруппами. Это может свидетельствовать о наличии в препарате первичных специфических антител паразитных аминогрупп, например в составе трис-буфера или БСА, конкурирующих с антителами за глутар-альдегидные группы на поверхности графена. В случае наличия трис-буфера препарат первичных антител можно диализовать в попытке увеличить уровень ковалентного связывания антител с графеном при помощи глутарового альдегида.

С другой стороны, сорбцию антител на фенилнитрогруппы на поверхности графена можно дополнительно увеличить за счет улучшения электростатической составляющей таковой путем замены физраствора водой при разбавлении антител. Таким образом, функционализация фенилнитрогруппами оптимальна для дальнейшей работы, связанной с выявлением специфических антигенов, комплиментарных используемым антителам. Кроме того, применение такого типа функционализации позволяет в последующем проводить отмывку комплексов «антитело – антиген» с поверхности графена химическим путем без нарушения структуры поверхности графена после использования биологических сенсоров. Это определяет возможность повторного использования чипов, изготовленных на основе исследованных функционализированных пленок графена, на практике [29]. Данный подход в значительной степени снижает финансовую стоимость создаваемого биологического сенсора и самого исследования, что облегчает внедрение разрабатываемого нами метода в клиническую практику не только на уровне специализированных центров, но и в амбулаторно-поликлинических условиях.

## Заключение

Биосенсоры на основе графена находят все более широкое применение для диагностики различных заболеваний. Принцип работы биосенсора основан, в частности, на распознавании антигенов, характерных для различных заболеваний специфическими антителами, иммобилизованными на графене. Для создания биосенсора с целью повышения связывающей способности графена в отношении антител на его поверхности создают функционально-активные группы. Данный процесс называют функционализацией графена. В настоящей работе показана принципиальная возможность создания биосенсоров на основе графена для выявления маркеров такого нейродегенеративного заболевания, как БА. Исследована методика иммобилизации на поверхности графена специфических антител к бета-амилоиду в концентрациях, выявляемых флуоресцентной микроскопией и хемилюминесценцией. Можно сделать вывод, что на графене в нашем случае иммобилизуется количество антител, достаточное для создания биосенсора. Мы также исследовали влияние таких условий, как способ функционализации и концентрация на адсорбцию антител к поверхности графена. Установлено, что функционализация фенилнитрогруппами позволяет создать оптимальные условия для прикрепления антител к поверхности графена, а также производить отмывку образующихся антител-антигенных

комплексов для дальнейшего повторного использования графеновых биосенсоров.

*Работа поддержана грантом РНФ № 22–12–00134.*

## Список литературы / References

1. Scheltens P., Blennow K., Breteler M. M., et al. Alzheimer's disease. *Lancet*. 2016. Vol. 388, No. 10043. P. 505–517. [https://doi.org/10.1016/s0140-6736\(15\)01124-1](https://doi.org/10.1016/s0140-6736(15)01124-1)
2. GBD 2016 Dementia Collaborators. Global, regional, and national burden of Alzheimer's disease and other dementias, 1990–2016: A systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2016. *Lancet Neurol*. 2019. Vol. 18, No. 1. P. 88–106. [https://doi.org/10.1016/s1474-4422\(18\)30403-4](https://doi.org/10.1016/s1474-4422(18)30403-4)
3. Niu H., Álvarez-Álvarez I., Guillén-Grima F., Aguinaga-Ontoso I. Prevalence and incidence of Alzheimer's disease in Europe: A meta-analysis. *Prevalencia e incidencia de la enfermedad de Alzheimer en Europa: Metaanálisis*. *Neurologia*. 2017. Vol. 32, No. 8. P. 523–532. <https://doi.org/10.1016/j.nrl.2016.02.016>
4. United Nations Department of Economic and Social Affairs, Population Division World Population Ageing 2020 Highlights: Living Arrangements of Older Persons. [(accessed on 4 April 2021)]. 2020 (ST/ESA/SER.A/451).
5. US Burden of Disease Collaborators, Mokdad A. H., Ballesteros K., et al. The State of US Health, 1990–2016: Burden of Diseases, Injuries, and Risk Factors Among US States. *JAMA*. 2018. Vol. 319, No. 14. P. 1444–1472. <https://doi.org/10.1001/jama.2018.0158>
6. Salloway S., Sperling R., Fox N. C., et al. Two phase 3 trials of bapineuzumab in mild-to-moderate Alzheimer's disease. *N. Engl. J. Med*. 2014. Vol. 370, No. 4. P. 322–333. <https://doi.org/10.1056/nejmoa1304839>
7. Dubois B., Feldman H. H., Jacova C., et al. Advancing research diagnostic criteria for Alzheimer's disease: the IWG-2 criteria. *Lancet Neurol*. 2014. Vol. 13, No. 6. P. 614–629. [https://doi.org/10.1016/S1474-4422\(14\)70090-0](https://doi.org/10.1016/S1474-4422(14)70090-0)
8. Jack C. R. Jr, Bennett D. A., Blennow K., et al. NIA-AA Research Framework: Toward a biological definition of Alzheimer's disease. *Alzheimers Dement*. 2018. Vol. 14, No. 4. P. 535–562. <https://doi.org/10.1016/j.jalz.2018.02.018>
9. Hampel H., Lista S., Khachaturian Z. S. Development of biomarkers to chart all Alzheimer's disease stages: The royal road to cutting the therapeutic Gordian Knot. *Alzheimers Dement*. 2012. Vol. 8, No. 4. P. 312–336. <https://doi.org/10.1016/j.jalz.2012.05.2116>
10. Blennow K., Hampel H. CSF markers for incipient Alzheimer's disease. *Lancet Neurol*. 2003. Vol. 2, No. 10. P. 605–613. [https://doi.org/10.1016/s1474-4422\(03\)00530-1](https://doi.org/10.1016/s1474-4422(03)00530-1)
11. Seppälä T. T., Nerg O., Koivisto A. M., et al. CSF biomarkers for Alzheimer disease correlate with cortical brain biopsy findings. *Neurology*. 2012. Vol. 78, No. 20. P. 1568–1575. <https://doi.org/10.1212/wnl.0b013e3182563bd0>
12. Portelius E., Hansson S. F., Tran A. J., et al. Characterization of tau in cerebrospinal fluid using mass spectrometry. *J. Proteome Res*. 2008. Vol. 7, No. 5. P. 2114–2120. <https://doi.org/10.1021/pr7008669>
13. Blennow K., Dubois B., Fagan A. M., et al. Clinical utility of cerebrospinal fluid biomarkers in the diagnosis of early Alzheimer's disease. *Alzheimers Dement*. 2015. Vol. 11, No. 1. P. 58–69. <https://doi.org/10.1016/j.jalz.2014.02.004>
14. Suárez-Calvet M., Karikari T. K., Ashton N. J., et al. Novel tau biomarkers phosphorylated at T181,

- T217 or T231 rise in the initial stages of the preclinical Alzheimer's continuum when only subtle changes in A $\beta$  pathology are detected. *EMBO Mol Med*. 2020. Vol. 12, No. 12. P. 12921. <https://doi.org/10.15252/emmm.202012921>
15. Khalil M., Teunissen C.E., Otto M., et al. Neurofilaments as biomarkers in neurological disorders. *Nat Rev Neurol*. 2018. Vol. 14 No. 10. P. 577–589. <https://doi.org/10.1038/s41582-018-0058-z>
  16. Preische O., Schultz S.A., Apel A., et al. Serum neurofilament dynamics predicts neurodegeneration and clinical progression in presymptomatic Alzheimer's disease. *Nat Med*. 2019. Vol. 25, No. 2. P. 277–283. <https://doi.org/10.1038/s41591-018-0304-3>
  17. Mattsson N., Cullen N.C., Andreasson U., et al. Association Between Longitudinal Plasma Neurofilament Light and Neurodegeneration in Patients with Alzheimer Disease. *JAMA Neurol*. 2019. Vol. 76, No. 7. P. 791–799. <https://doi.org/10.1001/jamaneurol.2019.0765>
  18. Quiroz Y.T., Zetterberg H., Reiman E.M., et al. Plasma neurofilament light chain in the presenilin 1 E280A autosomal dominant Alzheimer's disease kindred: A cross-sectional and longitudinal cohort study. *Lancet Neurol*. 2020. Vol. 19, No. 6. P. 513–521. [https://doi.org/10.1016/s1474-4422\(20\)30137-x](https://doi.org/10.1016/s1474-4422(20)30137-x)
  19. Duits F.H., Martinez-Lage P., Paquet C., et al. Performance and complications of lumbar puncture in memory clinics: Results of the multicenter lumbar puncture feasibility study. *Alzheimers Dement*. 2016. Vol. 12, No. 2. P. 154–163. <https://doi.org/10.1016/j.jalz.2015.08.003>
  20. Palmqvist S., Janelidze S., Stomrud E., et al. Performance of Fully Automated Plasma Assays as Screening Tests for Alzheimer Disease-Related  $\beta$ -Amyloid Status. *JAMA Neurol*. 2019. Vol. 76, No. 9. P. 1060–1069. <https://doi.org/10.1001/jamaneurol.2019.1632>
  21. Schindler S.E., Bollinger J.G., Ovad V., et al. High-precision plasma  $\beta$ -amyloid 42/40 predicts current and future brain amyloidosis. *Neurology*. 2019. Vol. 93, No. 17. P. 1647–e1659. <https://doi.org/10.1212/wnl.00000000000008081>
  22. Demeritte T., Nellore B.P., Kanchanapally R., et al. Hybrid Graphene Oxide Based Plasmonic-Magnetic Multifunctional Nanoplatfor for Selective Separation and Label-Free Identification of Alzheimer's Disease Biomarkers. *ACS Appl Mater Interfaces*. 2015. Vol. 7, No. 24. P. 13693–13700. <https://doi.org/10.1021/acsami.5b03619>
  23. Sun L., Zhong Y., Gui J., et al. A hydrogel biosensor for high selective and sensitive detection of amyloid-beta oligomers. *Int. J. Nanomedicine*. 2018. Vol. 13. P. 843–856. <https://doi.org/10.2147/ijn.s152163>
  24. Лебедев А.А., Лебедев С.П., Новиков С.Н., и др. Сверхчувствительный газовый сенсор на основе графена. *Журнал технической физики*. 2016. Т. 86, вып. 3. С. 135. <https://doi.org/10.1134/s1063784216030130>
  - Lebedev A.A., Lebedev S.P., Novikov S.N., et al. Supersensitive graphene-based gas sensor. *Technical Physics*. 2016; 86 (3): 135 (In Russ). <https://doi.org/10.1134/s1063784216030130>
  25. Давыдов В.Ю., Усачев Д.Ю., Лебедев С.П. и др. Исследование кристаллической и электронной структуры графеновых пленок, выращенных на 6H-SiC (0001). *Физика и техника полупроводников*. 2017. Т. 51, вып. 8. С. 1116–1124. <https://doi.org/10.21883/ftp.2017.08.44800.8559>
  - Davydov V. Yu., Usachyov D. Yu., Lebedev S. P., et al. Study of the crystal and electronic structure of graphene films grown on 6h-SiC (0001). *Semiconductors*. 2017; 51 (8): 1116–1124 (In Russ). <https://doi.org/10.21883/ftp.2017.08.44800.8559>
  26. Torrente-Rodríguez R.M., Lukas H., Tu J., et al. SARS-CoV-2 RapidPlex: A Graphene-Based Multiplexed Telemedicine Platform for Rapid and Low-Cost COVID-19 Diagnosis and Monitoring. *Matter*. 2020. Vol. 3, No. 6. P. 1981–1998. <https://doi.org/10.1016/j.matt.2020.09.027>
  27. Plekhanov A. Yu. Immunoreplica from the gel surface: Rapid and sensitive blot plus intact gel. *Analytical Biochemistry*. 1996. Vol. 239, No. 1. P. 110–111. <https://doi.org/10.1006/abio.1996.0298>
  28. Усиков А.С., Лебедев С.П., Роевков А.Д. и др. Исследование чувствительной способности графена для применений в качестве биосенсоров. *Письма в Журнал технической физики*. 2020. Т. 46, № 10. С. 3–6. <https://doi.org/10.21883/jptf.2020.10.49421.18250>
  - Usikov A. S., Lebedev S. P., Roenkov A. D., et al. Investigation of graphene's sensing ability for applications as biosensors. *Technical Physics Letters*. 2020; 46 (10): 3–6 (In Russ). DOI: 10.21883/jptf.2020.10.49421.18250
  29. Плеханов А.Ю., Пузык М.В., Усиков А.С. и др. Хемилюминесценция функционализированной поверхности графена. *Оптика и спектроскопия*. 2022. Т. 130, № 9. С. 1417–1422. <https://doi.org/10.21883/os.2022.09.53305.3628-22>
  - Plekhanov A. Yu., Puzyk M. V., Usikov A. S., et al. Chemiluminescence of a functionalized graphene surface. *Optics and Spectroscopy*. 2022; 130 (9): 1417–1422 (In Russ). <https://doi.org/10.21883/os.2022.09.53305.3628-22>

Статья поступила / Received 08.11.23  
Получена после рецензирования / Revised 14.11.23  
Принята к публикации / Accepted 22.11.23

## Сведения об авторах

**Воробьев Сергей Владимирович**, д.м.н., г.н.с. НИЛ неврологии и нейрореабилитации, проф. кафедры неврологии с клиникой<sup>1</sup>, проф. кафедры клинической лабораторной диагностики<sup>3</sup>.  
ORCID: 0000-0002-4830-907x

**Терновых Иван Константинович**, ассистент кафедры неврологии с клиникой ИМО<sup>1</sup>. ORCID: 0000-0002-0074-4021

**Плеханов Антон Юрьевич**, к.б.н., м.н.с.<sup>5</sup>. E-mail: ayplekhanov@mail.ru.  
ORCID: 0000-0002-2459-4849

**Лебедев Александр Александрович**, д.ф.-м.н., проф., рук. отделения твердотельной электроники<sup>2</sup>. ORCID: 0000-0003-0829-5053

**Смирнов Александр Николаевич**, к.ф.-м.н., с.н.с.<sup>2</sup>.  
ORCID: 0000-0001-9709-5138

**Усиков Александр Сергеевич**, к.ф.-м.н., в.н.с.<sup>2</sup>.  
ORCID: 0000-0002-5320-3632

**Лебедев Сергей Павлович**, к.ф.-м.н., н.с.<sup>2</sup>.  
ORCID: 0000-0002-5078-1322

**Пузык Михаил Владимирович**, к.х.н., доцент, доцент кафедры неорганической химии факультета химии<sup>6</sup>. ORCID: 0000-0001-5608-8345

**Роевков Александр Дмитриевич**, ведущий инженер-технолог<sup>6</sup>.

<sup>1</sup>ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр имени В.А. Алмазова» Минздрава России, Санкт-Петербург

<sup>2</sup>ФГБУН «Физико-технический институт имени А.Ф. Иоффе» РАН, Санкт-Петербург

<sup>3</sup>ФГБОУ ВО «Санкт-Петербургский государственный педиатрический медицинский университет» Минздрава России, Санкт-Петербург

<sup>4</sup>ООО «Группа компаний «Нитридные кристаллы»», Санкт-Петербург

<sup>5</sup>ФГБУ «Научно-исследовательский институт гриппа имени А.А. Смородинцева» Минздрава России, Санкт-Петербург

<sup>6</sup>ФГБОУ ВО «Российский государственный педагогический университет имени А.И. Герцена» Минпросвещения России, Санкт-Петербург

**Автор для переписки:** Воробьев Сергей Владимирович.  
E-mail: sergiognezdzo@yandex.ru

**Для цитирования:** Воробьев С.В., Терновых И.К., Плеханов А.Ю., Лебедев А.А., Смирнов А.Н., Усиков А.С., Лебедев С.П., Пузык М.В., Роевков А.Д. Графен как основа биологических сенсоров для определения маркеров нейродегенеративной деменции. *Медицинский алфавит*. 2023; (33): 28–33. <https://doi.org/10.33667/2078-5631-2023-33-28-33>

## About authors

**Vorobev Sergey V.**, DM Sci (habil.), chief researcher at Neurology and Neurorehabilitation Research Laboratory, professor at Dept of Neurology with clinic<sup>1</sup>, professor at Dept of Clinical Laboratory Diagnostics<sup>3</sup>.  
ORCID: 0000-0002-4830-907x

**Ternovyykh Ivan K.**, DM, assistant at Neurology and Psychiatry Dept with the clinic of Institute of Medical Education<sup>1</sup>. ORCID: 0000-0002-0074-4021

**Plekhanov Anton Yu.**, PhD Bio, junior researcher<sup>5</sup>.  
ORCID: 0000-0002-2459-4849

**Lebedev Aleksandr A.**, DSci Physics and Mathematics, professor, head of Solid-State Electronics Dept<sup>2</sup>. ORCID: 0000-0003-0829-5053

**Smirnov Aleksandr N.**, PhD Physics and Mathematics, senior researcher<sup>2</sup>.  
ORCID: 0000-0001-9709-5138

**Usikov Aleksandr S.**, PhD Physics and Mathematics, leading researcher<sup>2</sup>.  
ORCID: 0000-0002-5320-3632

**Lebedev Sergey P.**, PhD Physics and Mathematics, researcher<sup>2</sup>.  
ORCID: 0000-0002-5078-1322

**Puzyk Mihail V.**, PhD Chemistry, associate professor, associate professor at Dept of Inorganic Chemistry of the Faculty of Chemistry<sup>6</sup>. ORCID: 0000-0001-5608-8345

**Roenkov Aleksandr D.**, leading process engineer<sup>6</sup>.

<sup>1</sup>Almazov National Medical Research Centre, Saint Petersburg, Russia

<sup>2</sup>Ioffe Institute, Saint Petersburg, Russia

<sup>3</sup>Saint-Petersburg State Pediatric Medical University, Saint Petersburg, Russia

<sup>4</sup>Nitride Crystals Group Ltd., Saint Petersburg, Russia

<sup>5</sup>Smorodintsev Research Institute of Influenza, Saint Petersburg, Russia

<sup>6</sup>Herzen State Pedagogical University of Russia, Saint Petersburg, Russia

**Corresponding author:** Vorobev Sergey V. E-mail: sergiognezdzo@yandex.ru

**For citation:** Vorobev S.V., Ternovyykh I.K., Plekhanov A. Yu., Lebedev A.A., Smirnov A.N., Usikov A.S., Lebedev S.P., Puzyk M.V., Roenkov A. D. Graphene as basis of biological sensors for determining markers of neurodegenerative dementia. *Medical alphabet*. 2023; (33): 28–33. <https://doi.org/10.33667/2078-5631-2023-33-28-33>