

(19)



URZĄD
PATENTOWY
RZECZYPOSPOLITEJ
POLSKIEJ

(10)

PL 242318 B1

(12)

Opis patentowy

(21) Numer zgłoszenia: **434430**

(22) Data zgłoszenia: **2020.06.24**

(43) Data publikacji o zgłoszeniu: **2021.12.27 BUP 39/2021**

(45) Data publikacji o udzieleniu patentu: **2023.02.13 WUP 07/2023**

(51) MKP:

G01N 33/543 (2006.01)

G01N 33/74 (2006.01)

G01N 21/55 (2014.01)

(73) Uprawniony z patentu:

POLITECHNIKA POZNAŃSKA, Poznań, PL
UNIwersytet w Białymstoku,
Białystok, PL

(72) Twórca(-y) wynalazku:

EWA GORODKIEWICZ, Białystok, PL
ANNA SANKIEWICZ, Białystok, PL
BOGDAN WYRWAS, Poznań, PL
ZENON ŁUKASZEWSKI, Kamionki, PL

(74) Pełnomocnik:

Marcin Walkowiak, Dobra, PL

(54) Tytuł:

**Biosensor do oznaczania kortyzolu techniką powierzchniowego rezonansu plazmonów
w wersji Imaging**

PL 242318 B1

Opis wynalazku

Przedmiotem wynalazku jest biosensor do specyficznego oznaczania kortyzolu w płynach ustrojowych techniką powierzchniowego rezonansu plazmonów w wersji Imaging.

Kortyzol należy do grupy glukokortykosteroidów i jest naturalnym hormonem steroidowym produkowanym w warstwie pasmowej kory nadnerczy. We krwi w 90–95% występuje w formie związanej z białkami, gdzie w 80% związany jest z globulinami, w 10–15% z albuminami, a 5–10% stanowi kortyzol w postaci wolnej. [Hakamata Y, Komi S, Moriguchi Y, Izawa S, Motomura Y, Sato E, Mizukami S, Kim Y, Hanakawa T, Inoue Y, Tagaya H. Amygdala – *Centred functional connectivity affects daily cortisol concentrations: a putative link with anxiety*. Sci Rep. 2017;7(1):8313].

Nazywany jest hormonem stresu, a jego poziom w organizmie podlega dobowej regulacji. Rytm dobowy może zostać zaburzony w wyniku stresu, pracy w godzinach nocnych oraz choroby. [Lee DY, Kim E, Choi MH. *Technical and clinical aspects of cortisol as a biochemical marker of chronic stress*. BMB Rep. 2015;48(4):209–216].

Kortyzol ma ogromny wpływ na funkcjonowanie całego organizmu. Bardzo ważną funkcją kortyzolu jest regulacja gospodarki węglowodanowej. Wpływa na proces produkcji glukozy, powodując zwiększenie jej poziomu oraz obniżenie ilości zużywanej glukozy w przemianach metabolicznych. Kortyzol wykazuje kataboliczne działanie względem białek, powodując zmniejszenie ich syntezy we wszystkich komórkach ciała z wyjątkiem wątroby, w której następuje zwiększenie glukoneogeny, czyli konwersji aminokwasów do glukozy. W obecności kortyzolu komórki mięśniowe zmniejszają pobieranie i zużycie glukozy oraz zwiększają degradację białka; zaopatrując wątrobę w glukogenne aminokwasy. Kortyzol wpływa również na przemianę metaboliczną tłuszczu. Powoduje nasilenie lipolizy, czyli rozkładu tłuszczu zmagazynowanych w komórkach tkanki tłuszczowej. Kortyzol może zmieniać redystrybucję tkanki tłuszczowej. Przewlekłe wysokiego poziomu kortyzolu powoduje zcentralizowanie tkanki tłuszczowej na ciele (okolice tułowia szyi i karku) oraz wychudzenie kończyn górnych i dolnych. [Kamba A, Daimon M, Murakami H, et al. *Association between Higher Serum Cortisol Levels and Decreased Insulin Secretion in a General Population*. PLoS One. 2016; 11(11):e0166077, Christiansen JJ, Djurhuus CB, Gravholt CH, et al. *Effects of cortisol on carbohydrate, lipid, and protein metabolism: studies of acute cortisol withdrawal in adrenocortical failure*. J Clin Endocrinol Metab. 2007;92(9):3553–3559].

Hormon ten odgrywa istotną rolę w gospodarce elektrolitowej, a zwłaszcza wapniowo-fosforanowej, zmniejszając ich wchłanianie w jelitach. Powoduje to obniżenie stężenia wapnia i fosforu we krwi, co w konsekwencji może prowadzić do zmniejszenia masy kostnej. [Mathis SL, Farley RS, Fuller DK, Jetton AE, Caputo JL. *The Relationship between Cortisol and Bone Mineral Density in Competitive Male Cyclists*. J Sports Med (Hindawi Publ Corp). 2013; 2013:896821].

Kortyzol jest kluczowym hormonem, jeśli chodzi o regulację układu odpornościowego. Zbyt wysoki, zbyt niski lub niezrównoważony jego poziom może prowadzić do różnych zaburzeń w funkcjonowaniu układu odpornościowego. Działa przeciwzapalnie i immunosupresyjnie. [Jefferies WM. *Cortisol and immunity*. Med Hypotheses. 1991; 34(3): 198–208. Bauer, ME. *Stress, glucocorticoids and ageing of the immune system*. Stress. 2005; 8(1):69–83].

Poziom kortyzolu wpływa na ośrodkowy układ nerwowy, którego funkcjonowanie jest zależne od czasu ekspozycji na działanie tego hormonu. Krótkotrwałe działanie, związane z ostrym ale krótkim stresem jest nawet korzystne, ponieważ może zwiększać wydajność mózgu. Przewlekły stres powoduje długotrwałe oddziaływanie tego hormonu na organizm, co może prowadzić do wielu problemów zdrowotnych w organizmie. [Justin B. Echouffo-Tcheugui, Sarah C. Conner, Jayandra J. Himali, Pauline Maillard, Charles S. DeCarli, Alexa S. Beiser, Ramachandran S. Vasan, Sudha Seshadri, *Circulating cortisol and cognitive and structural brain measures*. The Framingham Heart Study Neurology 2018, 91 (21) e1961–e1970].

Zmiany stężenia kortyzolu w płynach ustrojowych, zarówno zwiększone stężenie (hiperkortyzolemia) jak i zmniejszone (hipokortyzolemia) wywołują szereg niepożądanych objawów.

Pomiary kortyzolu stosuje się w diagnostyce in in. Choroby Addisona czyli pierwotnej niedoczynności kory nadnerczy, która jest spowodowana procesami autoimmunologicznymi i objawia się obniżonym poziomem kortyzolu. [Nieman, L.K., Chanco Turner, M.L. Addison's disease. Clinics in Dermatology, 2006; 24(4), 276–280. Brandão Neto, R. A., Carvalho, J. F. de. *Diagnosis and classification of Addison's disease (autoimmune adrenalitis)*. Autoimmunity Reviews, 2014; 13(4–5), 408–411].

Podwyższony poziom kortyzolu związany jest z zespołem Cushinga lub chorobą Cushinga. Wczesne rozpoznanie zespołu Cushinga ma kluczowe znaczenie, ponieważ długi czas trwania nierozpoznanej choroby charakteryzuje się znacznym wzrostem śmiertelności. [Nishioka H, Yamada S.J Cushing's Disease. Clin Med. 2019; 8(11), Buliman A., Tataranu L.G., Paun D.L., Mirica A., Dumitrache C. Cushing's disease: A multidisciplinary overview of the clinical features, diagnosis, and treatment. J. Med. Life. 2016; 9:12–18, Jarial K.D.S., Bhansali A., Mukherjee K.K., Pal R., Sharma A., Vashishtha R.K., Sukumar S.P, Sachdeva N., Walia R. *Utility of a Single Late-Night Plasma Cortisol and Acth for the Diagnosis of Cushing Syndrome*. Endocr. Pr. 2018; 24:156–162.]

Oznaczanie kortyzolu może pomóc we wczesnej diagnostyce gruczolaka przysadki mózgowej czy guza kory nadnerczy prowadzących do choroby Cushinga, a także w monitorowaniu funkcji osi podwzgórze-przysadka-nadnercza (HPA) po operacji guza przysadki [Vieira H, Brain C. *Cushing syndrome associated with an adrenal tumour*. BMJ Case Rep. 2012; 2012. pii: bcr2012006685, Marko NF, Gonugunta VA, Hamrahian AH, Usmani A, Mayberg MR, Weil RJ. *Use of morning serum cortisol level after transsphenoidal resection of pituitary adenoma to predict the need for long-term glucocorticoid supplementation* J Neurosurg. 2009; 111(3):540–4, Polovina TS, Kraljevic I, Solak M, et al. *Early Basal Cortisol Level as a Predictor of Hypothalamic-Pituitary-Adrenal (HPA) Axis Function After Pituitary Tumor Surgery* [publikacja online przed wydrukiem 15 maja 2019], Exp Clin Endocrinol Diabetes. 2019; 10.1055/a-0885-1568].

Kortyzol można oznaczać w różnych płynach ustrojowych. Oznaczenia kortyzolu w osoczu czy surowicy najczęściej określają poziom całkowitego kortyzolu, a ich wyniki mogą wprowadzać w błąd u pacjentów ze zmienionym stężeniem białka w surowicy. Wolny kortyzol można mierzyć w moczu i ślinie. Do badań wykorzystuje się dobową zbiórkę moczu, co odzwierciedla stężenie wolnego kortyzolu we krwi w danym przedziale czasowym. [Gatti, R., Antonelli, G., Prearo, M., Spinella, P, Cappellin, E., & De Palo, E. F. *Cortisol assays and diagnostic laboratory procedures in human biological fluids*. Clinical Biochemistry, 2009; 42(12), 1205–1217].

Wykazano, że stężenia tego hormonu w ślinie dobrze korelują z poziomem wolnego kortyzolu w surowicy, w ten sposób czyniąc pomiar kortyzolu ze śliny alternatywną metodą oceny poziomu niezwiązanego kortyzolu we krwi. [Cadore E, Lhullier F, Brentano M, Silva E, Ambrosini M, Spinelli R, Silva R, Kruehl L. *Correlations between serum and salivary hormonal concentrations in response to resistance exercise*. J Sports Sci. 2008; 26(10): 1067–72].

Obecnie kortyzol jest zwykle oznaczany za pomocą testu immunoenzymatycznego (EIA) [B.A. Kalman, R.E. Grahn, *Measuring salivary cortisol in the behavioral neuroscience laboratory*, J. Undergrad. Neurosci. Educ., 2004; 2(2): A41-A49, W.S. Gozansky, J.S. Lynn, M.L. Laudenslager, W.M. Kohrt, *Salivary cortisol determined by enzyme immunoassay is preferable to serum total cortisol for assessment of dynamic hypothalamic–pituitary–adrenal axis activity*, Clin. Endocrinol. (Oxf), 2005; 63(3):336–341], testu immunoenzymatycznego (ELISA) [Findling JW, Fleseriu M, Newell-Price J, Petersenn S, Pivonello R, Kandra A, et al. *Late-night salivary cortisol may be valuable for assessing treatment response in patients with Cushing's disease: 12-month, Phase III pasireotide study*. Endocrine 2016; 54:516–23] i testu radioimmunologicznego (RIA) [Restituto P, Galofré JC, Gil MJ, et al. *Advantage of salivary cortisol measurements in the diagnosis of glucocorticoid related disorders*. ClinBiochem 2008;41:688–92, Aardal-Eriksson E, Karlberg BE, Holm AC. *Salivary cortisol – an alternative to serum cortisol determinations in dynamic function tests*. Clin Chem Lab Med. 1998;36(4):215–222], a także technik chromatograficznych połączonych ze spektrometrią mas (MS) lub tandemową spektrometrią mas MS/MS [H. Kataoka, E. Matsuura, and K. Mitani, *Determination of cortisol in human saliva by automated in-tube solid-phase microextraction coupled with liquid chromatography-mass spectrometry*, J. Pharm. Biomed. Anal., 2007; 44, (1): 160–165, Matsui F, Koh E, Yamamoto K, et al. *Liquid chromatography-tandem mass spectrometry (LC-MS/MS) assay for simultaneous measurement of salivary testosterone and cortisol in healthy men for utilization in the diagnosis of late-onset hypogonadism in males*. Endocr J. 2009; 56(9):1083–1093, U. Turpeinen, M. J. Välimäki, E. Härmäläinen, *Determination of salivary cortisol by liquid chromatography-tandem mass spectrometry*, Scand. J. Clin. Lab. Invest., 2009; 69(5):592–597].

Do oznaczania kortyzolu w płynach ustrojowych stosowano immunosensory. Zazwyczaj były to immunosensory oparte na detekcji elektrochemicznej [Yamaguchi M, Matsuda Y, Sasaki S, et al. *Immunosensor with fluid control mechanism for salivary cortisol analysis*. Biosens Bioelectron. 2013; 41:186–191. Vabbina PK, Kaushik A, Pokhrel N, Bhansali S, Pala N. *Electrochemical cortisol immunosensors based on sonochemically synthesized zinc oxide 1D nanorods and 2D nanoflakes*. Biosens

Bioelectron. 2015; 63:124–130. Liu X, Hsu SPC, Liu WC, et al. Salivary Electrochemical Cortisol Biosensor Based on Tin Disulfide Nanoflakes. *Nanoscale Res Lett*. 2019; 14(1): 189], ale także z wykorzystaniem mikrowagi kwarcowej [Ito T., Aoki N., Kaneko S., Suzuki K *Highly sensitive and rapid sequential cortisol detection using twin sensor QCM*, *Anal. Methods*, 2014, 6, 7469–7474].

Alternatywną możliwością oznaczania białka w płynach ustrojowych jest zastosowanie biosensora i techniki powierzchniowego rezonansu plazmonów w wersji obrazowej (Imaging) (SPRi). Została ona przedstawiona m.in. w pracach: A. Sankiewicz, L. Romanowicz, P. Laudanski, B. Zelazowska-Rutkowska, B. Puzan, B. Cylik, E. Gorodkiewicz, *SPR imaging biosensor for determination of laminin-5 as a potential cancer marker in biological material*, *Anal Bioanal Chem*. 2016; 408: 5269–5276; A. Sankiewicz, Z. Lukaszewski, K. Trojanowska, E. Gorodkiewicz, *Determination of collagen type IV by Surface Plasmon Resonance Imaging using a specific biosensor*, *Anal Biochem*. 2016; 515: 40–46; A. Sankiewicz, A. Markowska, Z. Lukaszewski, B. Puzan, E. Gorodkiewicz, *Methods for 20S Immunoproteasome and 20S Constitutive Proteasome Determination Based on SPRi Biosensors*, *Cell Molec Bioengin*. 2017; 10: 174–185.40–46; A. Tokarzewicz, L. Romanowicz, I. Sveklo, E. Gorodkiewicz, *The development of a matrix metalloproteinase-1 biosensor based on the surface plasmon resonance imaging technique*, *Anal Methods*. 2016; 8:6428–6435; A. Tokarzewicz, L. Romanowicz, I. Sveklo, E. Matuszczak, A. Hermanowicz, E. Gorodkiewicz, *SPRi biosensors for quantitative determination of matrix metalloproteinase-2*, *Anal Methods*. 9(2017) 2407–2414; A. Sankiewicz, L. Romanowicz, M. Pyc, A. Hermanowicz, E. Gorodkiewicz, *SPR imaging biosensor for the quantitation of fibronectin concentration in blood samples*, *J Pharmac Biomed. Anal*. 150(2018)1–8; A. Tokarzewicz, L. Romanowicz, A. Sankiewicz, A. Hermanowicz, K. Sobolewski, E. Gorodkiewicz, *A New Analytical Method for Determination of Cathepsin L Based on the Surface Plasmon Resonance Imaging Biosensor*, *Int J Mol Sci.*; 20(2019)2166. Zastosowanie bioanalityczne SPRi przedstawiają m.in. publikacje: A. Sankiewicz, T. Guszcz, R. Mena-Hortelano, K. Zukowski, E. Gorodkiewicz, *Podoplanin serum and urine concentration in transitional bladder cancer*, *Cancer Biomark*. 2016; 16: 343–350; E. Matuszczak, M. Tylicka, A. Hermanowicz, W. Debek, A. Sankiewicz, E. Gorodkiewicz, *Application of SPR imaging biosensor for the measurement of 20S proteasomes in blood plasma of children with thermal injury*, *Annal Clin Lab Sci*. 2016; 46: 407–411; A. Tokarzewicz, T. Guszcz, A. Onopiuk, R. Kozłowski, E. Gorodkiewicz, *Utility of cystatin C as a potential bladder tumour biomarker confirmed by surface plasmon resonance technique*, *Indian J A Med Res*. 2018; 218: 46–50; E. Matuszczak, M. Tylicka, W. Debek, A. Sankiewicz, E. Gorodkiewicz, A. Hermanowicz, *Overexpression of ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase L1 (UCHL1) in serum of children after thermal injury*, *Adv Med Sci*. 2017; 62: 83–86; A. Weremijewicz, E. Matuszczak, A. Sankiewicz, M. Tylicka, M. Komarowska, A. Tokarzewicz et al., *Matrix metalloproteinase-2 and its correlation with basal membrane components laminin-5 and collagen type IV in paediatric burn patients measured with Surface Plasmon Resonance Imaging (SPRi) biosensors*, *Burns*, 2018; 44: 931–940; D. Toliczenko-Bernatowicz, E. Matuszczak, M. Tylicka, B. Szymańska, M. Komarowska, E. Gorodkiewicz, et al. *Over expression of ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase 1 (UCHL1) in boys with cryptorchidism*, *Plos One*, 2018; 13 : e0191806; E. Matuszczak, M. Tylicka, W. Debek, A. Sankiewicz, E. Gorodkiewicz, A. Hermanowicz, *Concentration of Proteasome in the Blood Plasma of Children with Acute Appendicitis, Before and After Surgery, and Its Correlation with CRP*, *World J Surg*. 2018; 42: 2259–2264; E. Matuszczak, M. Tylicka, W. Debek, A. Tokarzewicz, E. Gorodkiewicz, A. Hermanowicz, *Concentration of UHCL1 in the Serum of Children with Acute Appendicitis, Before and After Surgery, and Its Correlation with CRP and Prealbumin*, *J Investig Surg*. 2018; 31: 136–141; D. Toliczenko-Bernatowicz, E. Matuszczak, M. Tylicka, A. Sankiewicz, M. Komarowska, E. Gorodkiewicz, et al. *20S proteasome in the blood plasma of boys with cryptorchidism*, *J Endocrinol Investig*. 2018; 41: 1103–1106; E. Matuszczak, A. Sankiewicz, W. Debek, E. Gorodkiewicz, R. Milewski, A. Hermanowicz, *Immunoproteasome in the blood plasma of children with acute appendicitis, and its correlation with proteasome and UCHL1 measured by SPR imaging biosensors*, *Clin Exper Immun*. 2018; 191: 125–132; E. Matuszczak, M. Komarowska, M. Tylicka, W. Debek, E. Gorodkiewicz, A. Tokarzewicz, et al, *Determination of the concentration of cathepsin B by SPRi biosensor in children with appendicitis, and its correlation with proteasomes*, *Adv Clin Exp Med*. 2018; 27:1529–1534; R. Grzywa, E. Gorodkiewicz, E. Burchacka, A. Lesner, P. Laudanski, Z. Lukaszewski, M. Sienczyk, *Determination of cathepsin G in endometrial tissue using a surface plasmon resonance imaging biosensor with tailored phosphonic inhibitor*, *Eur J Obstetr Gynecol Reprod Biol*. 2014; 182: 38–42; P. Laudanski, E. Gorodkiewicz, B. Ramotowska, R. Charkiewicz, M. Kuzmicki, J. Szamatowicz, *Determination of cathepsins B, D and G concentration in eutopic proliferative endometrium*

of women with endometriosis by the surface plasmon resonance imaging (SPRI) technique, Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol. 2013;169: 80–83.

Do oznaczania kortyzolu wykorzystano technikę powierzchniowego rezonansu plazmonów w wersji klasycznej [Frasconi, M., Mazzarino, M., Borte, F. & Mazzei, F. *Surface plasmon resonance immunosensor for cortisol and cortisone determination*. Anal. Bioanal. Chem. 394, 2151–2159 (2009)., Stevens RC, Soelberg SD, Near S, Furlong CE. *Detection of cortisol in saliva with a flow-filtered, portable surface plasmon resonance biosensor system*. Anal Chem. 2008; 80(17):6747–6751., Zhang L., Chen X., Wei W., Deng S., Xu C. Cui D, *An Automatic Miniature Surface Plasmon Resonance System for Cortisol Detection Procedia Technology*, 2017;27: 89–90, Tahara, Y., Huang, Z., Kiritoshi, T., Onodera, T., & Toko, K. *Development of Indirect Competitive Immuno-Assay Method Using SPR Detection for Rapid and Highly Sensitive Measurement of Salivary Cortisol Levels*. Frontiers in Bioengineering and Biotechnology, 2014; 2, 15., Chen, X., Cui, D., Zhang, L. *Surface plasmon resonance immunoassay for cortisol determination with a self-assembling denaturalised bovine serum albumin layer on surface plasmon resonance chip*. Micro & Nano Letters, 2016; 11(1):20–23] oraz technikę zlokalizowanego powierzchniowego rezonansu plazmonów [Jung, H., Jung, J., Kim, Y. et al. *Surface Plasmon Resonance Characteristics of Au Nanoparticles Layered Sensor Chip for Direct Detection of Stress Hormone Conjugated by Nanoparticles*. BioChip J 2018; 12: 249–256, J Jeon, S Uthaman , J Lee, H Hwang, G Kim, P J Yoo, BD Hammock, CS Kim, YS Park, IK Park, *In direct localized surface plasmon resonance (LSPR)-based nanosensors for highly sensitive and rapid detection of cortisol*. Sens. Actuators, B 2018; 266, 710–716].

Biosensor wychwytuje wyłącznie oznaczaną substancję z roztworu, a aparatura SPRi reaguje na przyrost masy na powierzchni biosensora i przekształca go w sygnał analityczny. Rozwiązanie takie charakteryzuje prostota zarówno wykonania biosensora, jak i przeprowadzenia procesu pomiarowego. Biosensor SPRi daje możliwość jednoczesnego badania wielu próbek. Dlatego rozwiązanie to może konkurować z obecnie stosowanymi metodami oznaczania substancji biologicznie aktywnych. Według obecnego stanu techniki istnieją liczne biosensory SPRi umożliwiające oznaczanie stężenia substancji bioaktywnych. Takie biosensory ujawniają przykładowe opisy PL223400, PL210052, PL222548, P.417435 czy też P.422096. Dotychczas jednak nie opracowano biosensora SPRi na oznaczanie kortyzolu.

Jakkolwiek w stanie techniki z publikacji Richard C. Stevens i in.; „*Detection of Cortisol in Saliva with a Flow-Filtered, Portable Surface Plasmon Resonance Biosensor System*”; Analytical Chemistry; 2008; 80(17):6747–51 znane jest wykorzystanie mysich przeciwciał monoklonalnych specyficznie rozpoznających kortyzol w technice przepływowej SPR, wynalazek wykorzystuje odmienną technikę tj. matrycową SPRi, co wpływa też na konieczność uwzględnienia innych czynników.

Należy tu zwrócić szczególną uwagę, że w przepływowej SPR biosensor jest wytwarzany *in situ*, podczas gdy w rozwiązaniu według wynalazku biosensor jest wytwarzany *ex situ*. Jednocześnie w przepływowej wersji pomiar SPR (sensorgram) jest wykonywany w obecności roztworu, podczas gdy w matrycowej SPRi pomiar jest wykonywany po usunięciu roztworu, a wiązka monochromatycznego spolaryzowanego światła jest zamieniana na obraz. Techniki pomiarowe dają różne możliwości analityczne.

Przedewszystkim jednak rozwiązania zasadniczo różnią się konstrukcją biosensora. W rozwiązaniu opisanym w w/w publikacji linkerem jest mieszanina wytwarzana *in situ* podczas przepływu mieszaniny 2,5% roztworu trehalozy i 2,5% dekstranu, a przepuszczany następnie roztwór przeciwciała tworzy wytworzoną *in situ* warstwę receptorową. W rozwiązaniu według wynalazku linkerem jest cysteamina związana grupą tiolową ze złotym chipem. Następnie w procedurze NHS/EDS przeciwciało jest wiązane kowalencyjnie z linkerem.

Zapewnia to prostopadłe usytuowanie biosensora względem badanej próbki. Te czynności są wykonywane przed pomiarem. Ta zasadnicza różnica w budowie biosensora wyraźnie rzutuje na możliwości pomiarowe obu biosensorów.

Nadto biosensor opisany *ibidem* charakteryzuje się zakłóceniem pomiaru przez białka zawarte w ślinie. Dlatego próbka śliny przed właściwym pomiarem zostaje poddana dializie w warunkach przepływu z zastosowaniem wydrążonych włókien (*hollow fiber*). Zabieg ten umożliwia pomiar, co jednak jest okupione obniżeniem sygnału i przesunięciem LOD z 0,36 ng/mL do 1 ng/mL. W rozwiązaniu według wynalazku próbka nie wymaga wstępnej obróbki i jest kładzona bezpośrednio na biosensor (w stosownym rozcieńczeniu buforem).

Dodatkowo biosensor opisany w Anal. Chem. cechuje liniowość sygnału analitycznego w układzie półlogarytmicznym, w przypadku wynalazku mamy do czynienia z liniowością sygnału.

Przede wszystkim zaś rozwiązanie według wynalazku cechuje większa skala zastosowań: kortyzol może być oznaczany zarówno w ślinie jak i w surowicy krwi.

Istotą wynalazku jest biosensor do specyficznego kortyzolu w płynach ustrojowych (osocze lub surowica krwi, mocz, ślina). Opracowany biosensor wykorzystuje monoklonalne mysie przeciwciało specyficzne wobec kortyzolu jako receptor i spełnia warunki analityczne pod względem zakresu pomiarowego, specyficzności, precyzji i dokładności pomiaru. Biosensor według wynalazku zawiera płytkę szklaną pokrytą warstwą złota oraz siatkę polimeru tworzącą pęk miejsc aktywnych zawierających warstwę receptorową. Warstwę receptorową tworzy wymienione wyżej przeciwciało zimmobilizowane na powierzchni złota wiązaniem kowalencyjnym za pośrednictwem linkera – cysteaminy.

Biosensor do specyficznego oznaczania stężenia kortyzolu w płynach ustrojowych w przykładzie realizacji został przedstawiony na rysunku, na którym fig. 1 i 2 przedstawiają schemat biosensora, a fig. 3 pokazuje krzywą kalibracyjną kortyzolu – zmienność liniową sygnału w zależności od stężenia kortyzolu.

Biosensor, jak pokazano na fig. 2, składa się z płytki szklanej 1 typu BK7 pokrytej warstwą 50 nm złota 3 na podłożu 1 nm chromu 2 oraz siatki polimeru 4 tworzącą pęk miejsc aktywnych zawierających warstwę receptorową. Warstwa receptorowa składa się z linkera – cysteaminy 5 oraz monoklonalnego mysiego antyciała specyficznego wobec kortyzolu 6 połączonego kowalencyjnie z linkerem. Warstwa receptorowa specyficznie wyłapuje kortyzol 7 z badanego roztworu.

Biosensor jest specyficzny w tym sensie, że wychwytyje tylko marker kortyzol spośród setek innych substancji obecnych w płynach ustrojowych. Biosensor współpracujący z pomiarem SPRi zapewnia pomiary w zakresie stężeń dostosowanym do poziomu występującego w krwi i innych płynach ustrojowych. Odpowiedź biosensora jest liniowa (fig. 2), co jest istotne dla dokładnego wyznaczenia wyniku. Biosensor zapewnia dobrą precyzję i dokładność pomiaru.

Biosensor w przykładzie działania został wykorzystany do oznaczania kortyzolu w serii próbek śliny pacjentów przed zabiegiem endodontycznym oraz osób bez chorób w jamie ustnej. 3 μ L próbka rozcieńczonej śliny jest nanoszona na jedno z aktywnych miejsc biosensora. Po upływie 10 min próbka jest 6-krotnie przemywana buforem HBS-ES oraz wodą. Mierzy się sygnał SPRi. Stężenie kortyzolu odczytuje się z krzywej kalibracyjnej.

Z serii próbek śliny pacjentów przed zabiegiem endodontycznym (rozcieńczonych 2-krotnie) otrzymano następujące wyniki:

Próbka 1	sygnał SPRi	1380,3	wynik	2,6 ng/mL
Próbka 2	sygnał SPRi	2874,6	wynik	9,8 ng/mL
Próbka 3	sygnał SPRi	4448,6	wynik	17,4 ng/mL
Próbka 4	sygnał SPRi	2356,7	wynik	7,3 ng/mL
Próbka 5	sygnał SPRi	5057,0	wynik	20,3 ng/mL
Próbka 6	sygnał SPRi	4889,1	wynik	19,5 ng/mL
Próbka 7	sygnał SPRi	2995,8	wynik	10,4 ng/mL
Próbka 8	sygnał SPRi	1801,7	wynik	4,6 ng/mL
Próbka 9	sygnał SPRi	4316,4	wynik	16,7 ng/mL

Z serii próbek śliny osób bez chorób w jamie ustnej (nie rozcieńczanych) otrzymano następujące wyniki:

Próbka 1	sygnał SPRi	1752,5	wynik	2,2 ng/mL
Próbka 2	sygnał SPRi	1649,4	wynik	1,9 ng/mL
Próbka 3	sygnał SPRi	1410,4	wynik	1,4 ng/mL
Próbka 4	sygnał SPRi	1968,3	wynik	2,7 ng/mL
Próbka 5	sygnał SPRi	2266,1	wynik	3,4 ng/mL
Próbka 6	sygnał SPRi	2451,8	wynik	3,9 ng/mL
Próbka 7	sygnał SPRi	1674,2	wynik	2,0 ng/mL
Próbka 8	sygnał SPRi	2992,5	wynik	5,2 ng/mL
Próbka 9	sygnał SPRi	2838,5	wynik	4,8 ng/mL

Zastrzeżenie patentowe

1. Biosensor do specyficznego oznaczania stężenia kortyzolu w płynach ustrojowych techniką powierzchniowego rezonansu plazmonów w wersji Imaging, który zawiera płytkę szklaną pokrytą warstwą złota na podłożu z chromu oraz siatkę polimeru tworzącą pęk miejsc aktywnych zawierających warstwę receptorową, **znamienny tym**, że warstwę receptorową stanowi monoklonalne mysie przeciwciało specyficzne wobec kortyzolu (6) połączone kowalencyjnie z linkerem, w postaci cysteaminy (5), łączącym receptor z warstwą złota (3) na podłożu z chromu (2) pokrywającą płytkę szklaną (1).

Rysunki

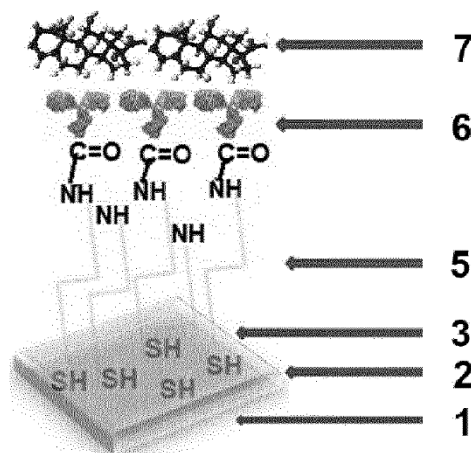


fig. 1

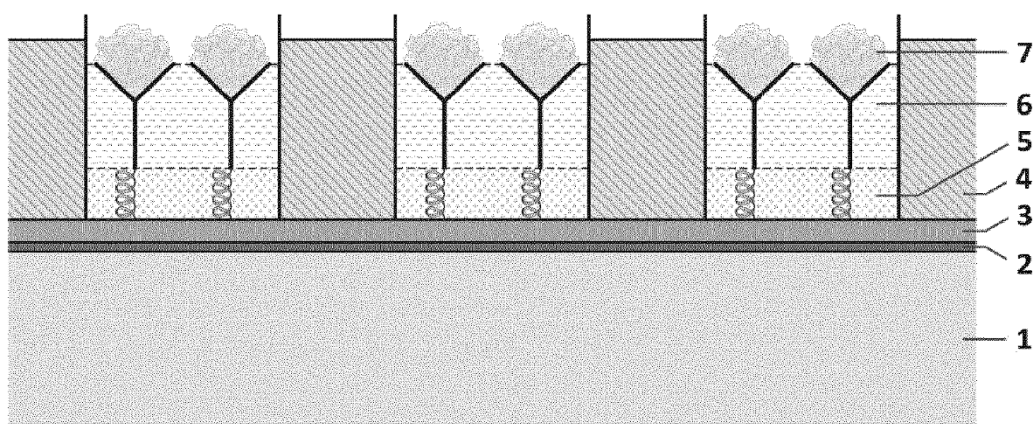


fig. 2

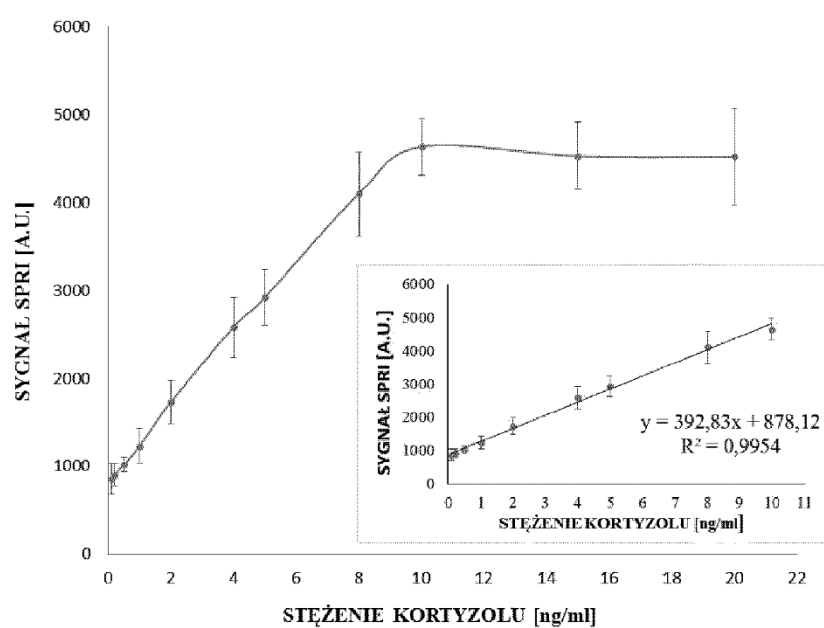


fig. 3