

БИОСЕНСОР ДЛЯ НЕИНВАЗИВНОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ ГЛЮКОЗЫ С УЛУЧШЕННЫМ КОЭФФИЦИЕНТОМ ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТИ

Д.В. Вохмянина, А.И. Королев, М.А. Мозильникова, Е.Е. Карякина

МГУ имени М.В. Ломоносова, Москва, Россия

Сахарный диабет – группа эндокринных заболеваний, связанных с нарушением усвоения глюкозы, развивающихся вследствие абсолютной или относительной недостаточности гормона инсулина. По данным ВОЗ от него страдают 422 миллиона человек, и их число постоянно растет [1]. В большинстве своих форм диабет неизлечим, однако, контролируя уровень глюкозы в крови, можно значительно отсрочить развитие его осложнений, таких как сердечно-сосудистые заболевания, почечная недостаточность, слепота и другие. Такой контроль подразумевает ежедневное многократное измерение концентрации глюкозы в крови, что сопряжено с риском заражения и является неудобным и болезненным для пациентов. Чтобы снизить риск и улучшить качество жизни больных диабетом ведутся постоянные разработки в области неинвазивной диагностики. Тем не менее, проблема неинвазивного определения концентрации глюкозы до сих пор не решена. Одним из наиболее перспективных решений казалось измерение глюкозы в крови через кожу при помощи спектроскопии в ближней инфракрасной области, но данный метод не позволяет достигнуть необходимой чувствительности [2]. Использование другого подхода – извлечение глюкозы из межклеточной жидкости при помощи обратного электрофореза [3] – не принесло коммерческого успеха ввиду большого количества ошибок и раздражения кожи при постоянном использовании таких приборов. В настоящее время интерес вызывает возможность мониторинга глюкозы в организме с использованием экскреторных жидкостей [4]. При этом основными требованиями, предъявляемыми к экскреторной жидкости, являются: I) содержание глюкозы, достаточное для определения ее концентрации любым надежным методом, и II) наличие корреляции между изменениями концентрации глюкозы в крови и исследуемой жидкости. В литературных данных встречается использование в качестве таких жидкостей слюны [5], слез [6] и конденсата выдыхаемого воздуха [7]. В данной работе была исследована возможность использования пота в целях неинвазивной диагностики сахарного диабета.

Биосенсоры широко используются в клинической диагностике для анализа крови, обладая такими достоинствами, как экспрессность, высокая селективность, невысокая стоимость и простота в эксплуатации. Но, несмотря на множество известных устройств на рынке, в связи с более низким содержанием глюкозы в экскреторных жидкостях по сравнению с кровью возникает проблема повышения чувствительности используемых биосенсоров.

Таким образом, важно создание новых высокочувствительных биосенсоров для определения концентраций глюкозы в крови и поте, а также оценка перспективности использования пота в целях неинвазивной диагностики.

В качестве основы для изготовления биосенсоров использовали планарные печатные структуры (ООО «РУСЕНС», Россия) (рис. 1). Все эксперименты проводили в дистиллированной воде. Используемые в работе неорганические соли (х.ч. и о.с.ч.) изготовлены фирмами «Рехим» (Россия) и «Sigma» (Германия). Изопропанол изготовлен компанией «Лаверна» (Россия). Стандартные образцы сыворотки крови произведены фирмой «Spinreact» (Испания).

Глюкозооксидазу (ЕС 1.1.3.4), ГОД из *Aspergillus niger* («Sigma», Германия) применяли в виде лиофилизованного белка с заявленной активностью 163,3 У/мг, для изготовления модельных растворов использовали глюкозу фирмы Merck (Германия). Для иммобилизации глюкозооксидазы (ГОД) использовали γ -аминопропилтриэтоксисилан (99 %) фирмы «Aldrich» (Германия).

Все потенциалы, представленные в работе, даны относительно хлоридсеребряного электрода сравнения.

Модификацию поверхности рабочих электродов электрокатализатором на основе берлинской лазури (БЛ) проводили методом химического межфазного синтеза согласно [8]. Таким образом, были получены сенсоры на пероксид водорода с коэффициентом чувствительности $0.27 \pm 0.01 \text{ А} \cdot \text{см}^{-2} \cdot \text{М}^{-1}$, линейный диапазон определяемых концентраций составил $5 \cdot 10^{-7} - 1 \cdot 10^{-3} \text{ М Н}_2 \text{ О}_2$. Для создания высокочувствительных биосенсоров для определения глюкозы нужно было провести иммобилизацию фермента ГОД на поверхности модифицированного БЛ электрода [9].

Иммобилизацию ГОД проводили следующим образом: готовили мембранообразующую смесь путем смешения раствора γ -аминопропилтриэтоксисилана в изопропанол и водного раствора фермента. Полученную смесь наносили на поверхность модифицированного БЛ электрода и, после испарения растворителя, получали тонкую пленку матрицы геля поли-(γ -аминопропилтриэтоксисилана) с иммобилизованным ферментом.

Образцы пота и крови для анализа отбирались у здоровых доноров в соответствии с требованиями этического комитета МНОЦ МГУ.

С 1996 года в нашей лаборатории разрабатываются биосенсоры на основе нового протокола иммобилизации ферментов из водно-органических смесей с высоким содержанием органического растворителя [9, 10]. Изучение гомогенной активности фермента ГОД в водно-органической смеси с высоким содержанием органического растворителя показало, что оптимальное содержание воды в смеси составляет 15_{об.}%. Также были определены оптимальные значения концентраций ГОД и нафтона: 1.5 мг/мл и 0.3_{об.}%, соответственно [10]. Так как в работе также изучалась смесь вода-изопропанол с высоким содержанием органического компонента, мы решили использовать установленное в [10] оптимальное содержание воды – 15_{об.}%. Концентрации фермента и γ -аминопропилтриэтоксисилана в мембранообразующей смеси были проварьированы в широких пределах (1 – 6 мг/мл и 0.5 – 2.5_{об.}%, соответственно) для достижения максимальной чувствительности биосенсора. Коэффициент чувствительности рассчитывали как тангенс угла наклона градуировочного графика – зависимости плотности тока на рабочем электроде биосенсора (мА) от концентрации модельного раствора глюкозы (М) в batch-режиме.

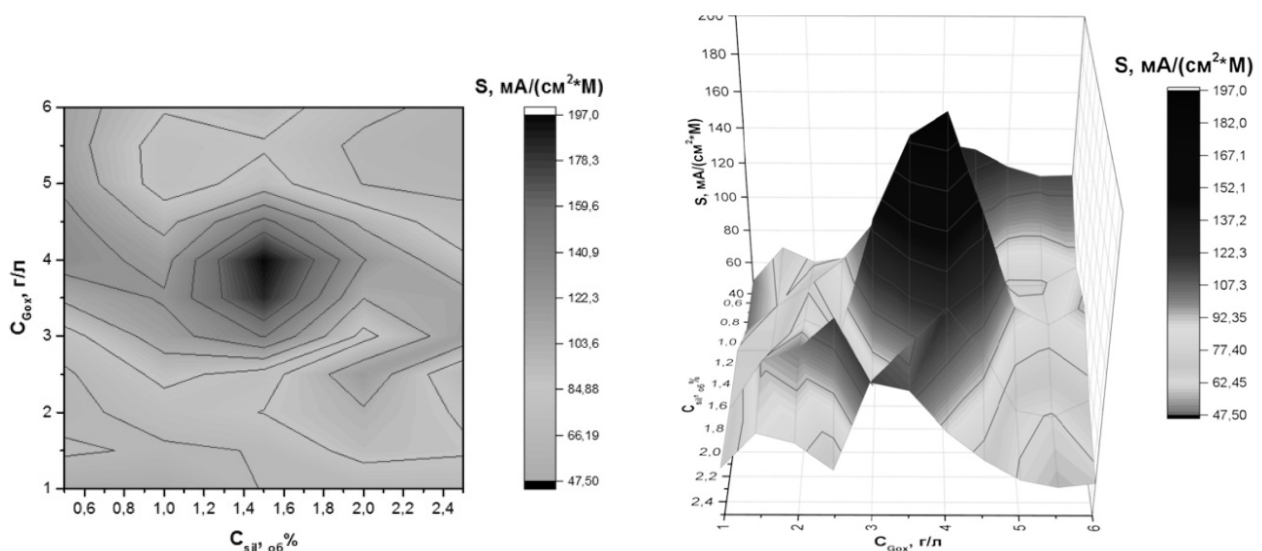


Рис. 1. Зависимость коэффициента чувствительности биосенсора от концентраций γ -аминопропилтриэтоксисилана и ГОД в мембранообразующей смеси ($n = 3, P = 0.95$).

На основе полученных данных построен 3D-график зависимости коэффициента чувствительности биосенсора от концентраций γ -аминопропилтриэтоксисилана и ГОД в мембранообразующей смеси (рис. 1).

Оптимальным для достижения максимальной чувствительности составом обладает мембранообразующая смесь с концентрацией фермента 4 мг/мл и концентрацией γ -аминопропилтриэтоксисилана 1.5_{об.}%. Это можно объяснить следующим образом: при низкой концентрации мономера образуется малое количество пор, в которые может быть иммобилизован фермент, в то же время слишком высокая его концентрация приводит к образованию слишком плотных мембран и затруднению иммобилизации фермента. Увеличение концентрации иммобилизованного фермента приводит к увеличению чувствительности биосенсора, но слишком высокая концентрация ГОД может приводить, с одной стороны, к образованию олигомерных структур с меньшей активностью, а с другой стороны – к образованию менее однородных мембран и вымыванию из них фермента.

Биосенсоры, полученные на основе оптимального состава мембранообразующей смеси, имеют высокий коэффициент чувствительности $0.23 \pm 0.04 \text{ A} \cdot \text{cm}^{-2} \cdot \text{M}^{-1}$, что в несколько раз превышает аналогичный параметр для биосенсоров на основе нафiona, разработанных ранее, измеренный в аналогичных условиях ($0.05 \pm 0.01 \text{ A} \cdot \text{cm}^{-2} \cdot \text{M}^{-1}$) [10], при сохранении высокой стабильности и воспроизводимости сенсоров.

Операционную стабильность биосенсоров измеряли в периодическом режиме с использованием раствора глюкозы, концентрация которой соответствовала верхнему пределу диапазона определяемых концентраций. За величину стабильности принимали время (в мин.), в течение которого амперометрический отклик биосенсора в присутствии 1 мМ раствора глюкозы сохранял более 95 % от первоначальной величины. Для биосенсора с оптимальным составом мембраны операционная стабильность составила 29 ± 6 минут, что позволяет использовать биосенсор для определения концентрации глюкозы в разбавленных образцах крови в лабораторном анализе.

Для проверки правильности определения глюкозы в крови при помощи разработанного биосенсора были проанализированы стандартные образцы сыворотки крови с известным, нормальным и патологическим содержанием ряда компонентов, включая глюкозу. Измерения проводились в режиме проточно-инжекционного анализа (ПИА). Перед измерением образцы были разбавлены в 100 раз фосфатным буферным раствором. Параллельно образцы были проанализированы на коммерческом анализаторе глюкозы и лактата Eco-Basic (Care Diagnostica, Германия). Полученные результаты анализа представлены в таблице 1.

Таблица 1. Определение глюкозы в стандартных образцах сыворотки крови

Стандарт	Измерено БС, мМ	Измерено Eco-Basic, мМ	Паспорт, мМ
Норма	4.7 ± 0.3	4.77 ± 0.05	5.4 ± 0.8
Патология	13.8 ± 0.4	13.9 ± 0.3	14 ± 2

Результаты определения глюкозы с помощью биосенсора (БС) и коммерческого анализатора совпадают в пределах погрешности с концентрацией, указанной в паспорте стандартов.

Концентрацию глюкозы в разбавленных образцах крови определяли методом градуировочного графика. Для подтверждения правильности полученных результатов проводили анализ тех же образцов с помощью анализатора глюкозы Eco-Basic. Корреляция концентраций глюкозы, измеренных с помощью биосенсора и Eco-Basic в образцах крови, представлена на рис. 2.

Рассчитанный коэффициент Пирсона оказался равен 0.92, что значительно выше критического значения (0.48). Это свидетельствует о том, что в показаниях прибора и биосенсора нет значимого различия. Таким образом, можно сделать вывод о том, что биосенсоры пригодны для измерения концентрации глюкозы как в сыворотке, так и в цельной крови.

Определение глюкозы в крови сопряжено с травматизмом и возможностью заражения. Поэтому необходимо исследовать другие биологические жидкости, в которых концентрация глюкозы может коррелировать с концентрацией глюкозы в крови. С этой точки зрения интерес вызывает пот, поскольку известно, что изменения концентрации другого важного метаболита – лактата в крови и поте коррелируют [11]. Так как концентрация глюкозы в поте, в отличие от крови, не является индикатором здоровья человека, необходимо было определить, существует ли корреляция между изменениями концентрации глюкозы в крови и в поте. Для этого необходимо было добиться изменения концентрации глюкозы в крови и проследить, как при этом меняется концентрация глюкозы в поте. Наличие положительной корреляции между изменениями глюкозы в поте и крови позволило бы рассматривать пот как неинвазивную альтернативу крови при мониторинге концентрации глюкозы в организме пациентов, больных сахарным диабетом.

Для искусственного изменения концентрации глюкозы в крови можно использовать стандартный глюкозотолерантный тест: при этом определение концентрации глюкозы в крови и поте проводят дважды – натощак и через час после приема донором 75 грамм глюкозы, растворенной в стакане воды, перорально. Такие измерения были проведены у 4 здоровых доноров. Анализ пота проводили аналогично анализу крови, но с разбавлением образцов в 10 раз. Наблюдалось увеличение концентрации глюкозы после глюкозной нагрузки, как в крови, так и в поте. Абсолютной корреляции между концентрациями глюкозы в крови и поте не обнаружено, что, возможно, связано с индивидуальными физиологическими особенностями организма. Однако была найдена зависимость между изменениями концентрации глюкозы в капиллярной крови и поте (рис. 3), что позволяет перейти к неинвазивному определению глюкозы в поте после минимальной калибровки для устранения влияния индивидуальных особенностей организма. Коэффициент корреляции Пирсона для этих величин составил 0.96.

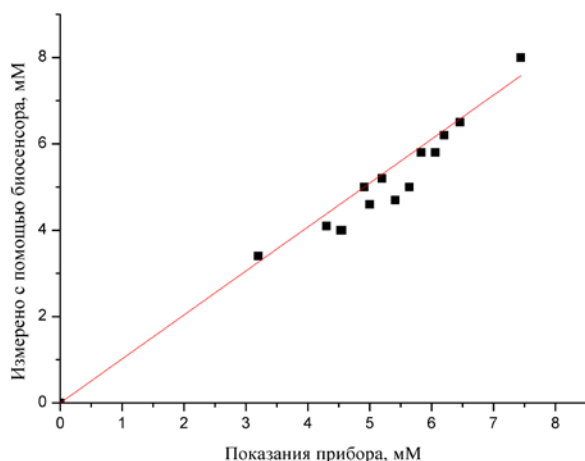


Рис. 2. Корреляция между концентрациями глюкозы в образцах крови, измеренными при помощи ECo-Basic и биосенсора ($n = 14$, $P = 0.95$).

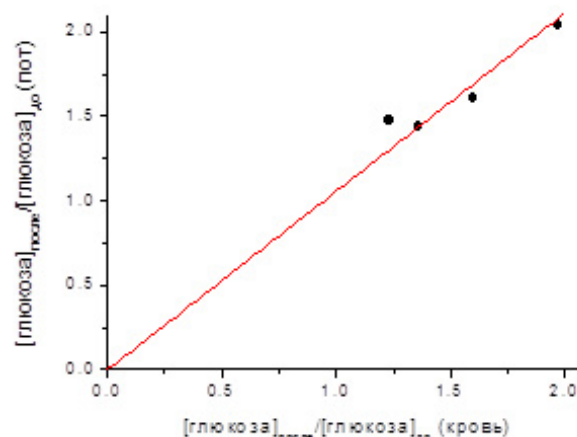


Рис. 3. Корреляция между изменением концентрации глюкозы в крови и поте доноров после глюкозотолерантного теста ($n = 4$, $P = 0.95$).

Таким образом, разработан биосенсор на глюкозу на основе электродов, модифицированных берлинской лазурью с иммобилизованной в мембрану поли (γ -аминопропилтриэтоксисилана) глюкозооксидазой. Биосенсор отличается повышением коэффициента чувствительности в 4–5 раз по сравнению с аналогом. Показана применимость биосенсора для лабораторного анализа образцов крови. Выявлена корреляция между изменениями концентрации глюкозы в крови и поте, что открывает перспективу использования пота в неинвазивной диагностике сахарного диабета.

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФ (грант 16–13–00010).

ЛИТЕРАТУРА

1. ВОЗ. Глобальный доклад по диабету. 2016.
2. Yadav J., Rani A., Singh V., Murari B.M. Prospects and limitations of non-invasive blood glucose monitoring using near-infrared spectroscopy // *Biomed. Signal Proces.* 18 (2015) P. 214–227.
3. Vashist S.K. Non-invasive glucose monitoring technology in diabetes management: A review // *Analytica Chimica Acta* 750 (2012) P. 16–27.
4. Srinivasan V., Pamula V.K., Pollack M.G., Fair R.B. Clinical diagnostics on human whole blood, plasma, serum, urine, saliva, sweat, and tears on a digital microfluidic platform // *Proceedings of MicroTAS.* October 5–9, 2003, Squaw Valley, California, USA. P. 1287–1290.
5. Mascarenhas P., Fatela B., Barahona I. Effect of Diabetes Mellitus Type 2 on Salivary Glucose – A Systematic Review and Meta-Analysis of Observational Studies // *PLOS ONE* 9 (7) (2014) P. 1–15.
6. Baca J.T., Finegold D.N., Asher S.A. Tear glucose analysis for the noninvasive detection and monitoring of diabetes mellitus // *The Ocular Surface* 5(4) (2007) P. 280–293.
7. Karyakin A.A., Nikulina S.V., Vokhmyanina D.V. et al Non-invasive monitoring of diabetes through analysis of the exhaled breath condensate (aerosol) // *Electrochemistry Communications* 83 (2017) P. 81–84.
8. Borisova A.V., Karyakina E.E., Cosnier S., Karyakin A.A. Current-Free Deposition of Prussian Blue with Organic Polymers: Towards Improved Stability and Mass Production of the Advanced Hydrogen Peroxide Transducer // *Electroanalysis* 21 (2009) P. 409–414.
9. Karyakin A.A., Karyakina E.E., Gorton L. et. al. Improvement of electrochemical biosensors using enzyme immobilization from water-organic mixtures with a high content of organic solvent // *Anal. Chem.* 68 (1996) P. 4335–4341.
10. Karyakin A.A., Kotelnikova E.A., Lukachova L.V., Karyakina E.E., Wang J. Optimal environment for glucose oxidase in perfluorosulfonated ionomer membranes: Improvement of first-generation biosensors // *Anal. Chem.* 74 (2002) P. 1597–1603.
11. Sakharov D.A., Shkurnikov M.U., Vagin M. Yu, Yashina E.I., Karyakin A.A., Tonevitsky A.G. Relationship between lactate concentrations in active muscle sweat and whole blood // *Bull. Experim. Biol. Med.* 150 (2010) P. 83–85.