

## 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  $\gamma$ -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  $\gamma$ -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-( $\gamma$ -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<sub>об.</sub>%. Также были определены оптимальные значения концентраций ГОД и нафина: 1.5 мг/мл и 0.3<sub>об.</sub>%, 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<sub>об.</sub>%. Концентрации фермента и  $\gamma$ -аминопропилтриэтоксисилана в мембранообразующей смеси были проварьированы в широких пределах (1 – 6 мг/мл и 0.5 – 2.5<sub>об.</sub>%, 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.

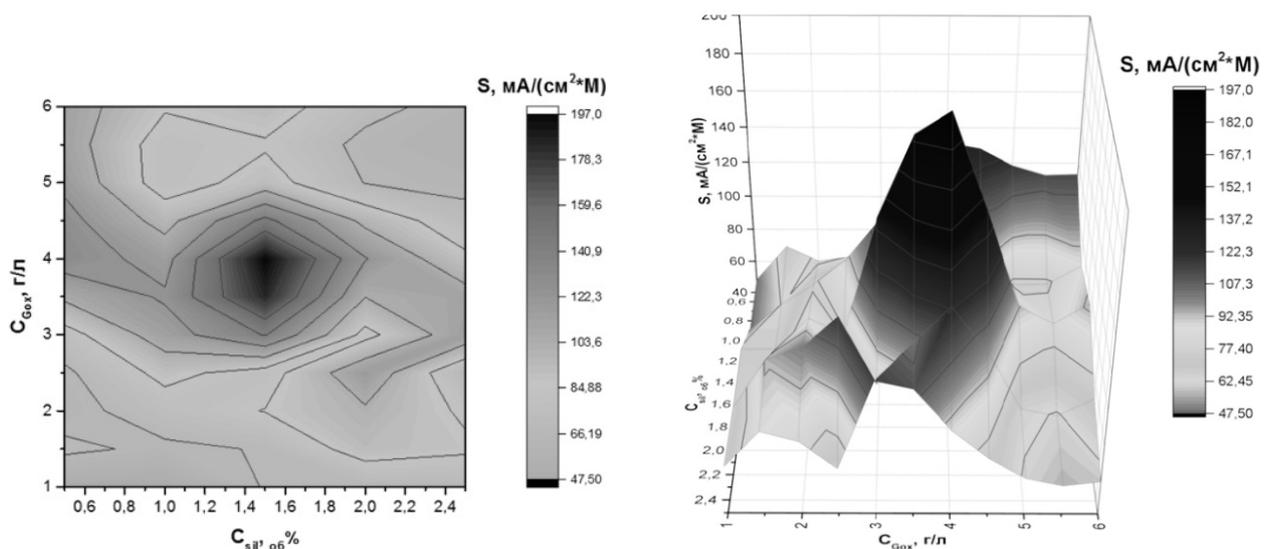


Рис. 1. Зависимость коэффициента чувствительности биосенсора от концентраций  $\gamma$ -аминопропилтриэтоксисилана и ГОД в мембранообразующей смеси ( $n = 3, P = 0.95$ ).

На основе полученных данных построен 3D-график зависимости коэффициента чувствительности биосенсора от концентраций  $\gamma$ -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  $\gamma$ -аминопропилтриэтоксисилана 1.5<sub>об.</sub>%. 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  $29 \pm 6$  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	$4.7 \pm 0.3$	$4.77 \pm 0.05$	$5.4 \pm 0.8$
Патология	$13.8 \pm 0.4$	$13.9 \pm 0.3$	$14 \pm 2$

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.

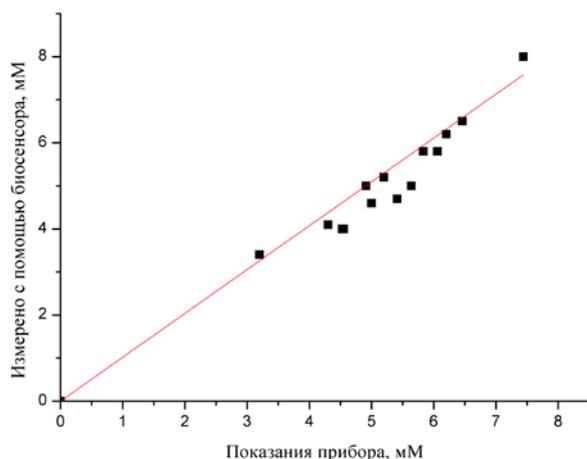


Рис. 2. Корреляция между концентрациями глюкозы в образцах крови, измеренными при помощи ECo-Basic и биосенсора ( $n = 14$ ,  $P = 0.95$ ).

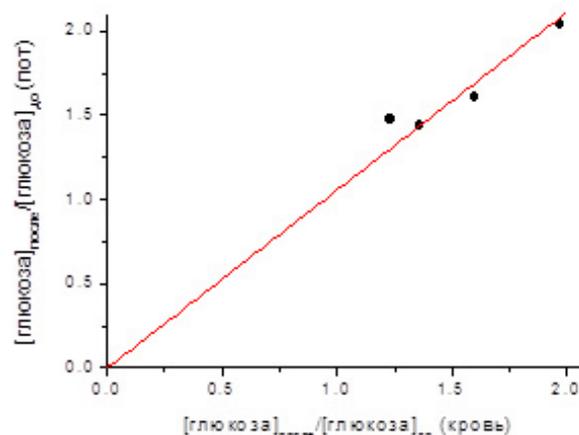


Рис. 3. Корреляция между изменением концентрации глюкозы в крови и поте доноров после глюкозотолерантного теста ( $n = 4$ ,  $P = 0.95$ ).

Таким образом, разработан биосенсор на глюкозу на основе электродов, модифицированных берлинской лазурью с иммобилизованной в мембрану поли ( $\gamma$ -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.