



СОЛДАТКІН
Олексій Петрович —
академік НАН України,
завідувач відділу
біомолекулярної електроніки
Інституту молекулярної біології і
генетики НАН України

БІОСЕНСОРИ — АНАЛІТИЧНІ ПРИЛАДИ НОВОГО ПОКОЛІННЯ

Стенограма наукової доповіді на засіданні
Президії НАН України 18 грудня 2019 року

У доповіді розглянуто найважливіші результати наукових досліджень в установах НАН України, пов'язаних зі створенням сучасних біоаналітичних засобів, наведено приклади оригінальних розробок українських учених у цій галузі, проаналізовано основні тенденції подальшого розвитку сенсорних технологій.

Шановний Борисе Євгеновичу!

Шановні члени Президії НАН України! Шановні колеги!

Біосенсорика — це новітній перспективний науковий напрям сучасної аналітичної біохімії, спрямований на розроблення аналітичних засобів сучасної медицини, біотехнологій та охорони навколишнього природного середовища. Це завдання сьогодні є вкрай важливим як з наукової, так і з прикладної точки зору. Зазначений напрям виник і розвивається на стику кількох наук — біології, фізики, хімії, математики, інформатики, матеріалознавства, радіотехніки й електроніки, а отже, дослідження в цій сфері є міждисциплінарними і потребують поєднання зусиль і знань фахівців з усіх цих наукових галузей.

Біосенсор — це гібридний аналітичний прилад, який складається з біоселективного елемента і фізичного перетворювача, що трансформує біохімічний сигнал в електричний. Залежно від типу біоселективного елемента біосенсори поділяються на каталітичні і некаталітичні. До перших належать біосенсори на основі клітин, тканин та ферментів, а до некаталітичних (їх ще називають афінними) — сенсори на основі антитіл, рецепторів, нуклеїнових кислот, біоміметиків. Відповідно до типу фізичного перетворювача біосенсори поділяються на оптичні, акустичні, колориметричні, термічні, електрохімічні тощо.

З перелічених типів біосенсорів в Інституті молекулярної біології і генетики НАН України розробляють каталітичні на основі ферментів; афінні на основі антитіл, нуклеїнових кислот, біоміметиків; оптичні та електрохімічні.

Серед переваг біосенсорів слід відзначити їхню високу чутливість і селективність; швидкість аналізу та відсутність необхідності попередньої підготовки проби; простоту використання; досить широкий діапазон речовин, які можуть бути детектовані; можливість мініатюризації і високий рівень інтеграції; можливість створення мультисенсорів; придатність для використання в польових умовах; порівняно низьку собівартість за умови масового виробництва.

Аналіз світових фінансових інвестицій у розроблення біосенсорів за останню чверть століття переконливо свідчить про сталу позитивну динаміку розвитку цієї галузі (рис. 1). У 1996 р. капіталовкладення в розвиток біосенсоріки становили 500 млн дол. США, у 2000 р. — 3 млрд, у 2010 р. — 8,5 млрд, а в 2018 р. — 16,8 млрд дол. США. Останнім часом середньорічне зростання інвестицій у цей напрям становить порядку 10–15%. За прогнозами міжнародних експертів, у 2020 р. обсяг ринку біосенсорів очікується на рівні 20,8 млрд дол. США.

Сфера застосування біосенсорів дуже широка. Це і медична діагностика (лабораторні аналізи, контроль інтенсивної терапії, аналізи у домашніх умовах тощо), і моніторинг довкілля (визначення вмісту хімічних сполук, тестування якості води, повітря, аналіз токсичних і мутагенних матеріалів), і біотехнології (контроль процесу ферментації, визначення кінцевих продуктів ферментації тощо), і системи безпеки (криміналістика, детектування наркотичних, вибухових речовин), і харчова промисловість (контроль виробництва, якості, свіжості продукції), і індустріальне виробництво, і сільське господарство, і військова галузь.

Далі я дуже коротко розповім про окремі біосенсори, розроблені в установах НАН України.

По-перше, це *біосенсорні системи біомедичного призначення*. Так, співробітники Інституту молекулярної біології і генетики НАН України та Інституту фізики напівпровідників ім. В.Є. Лашкарьова НАН України створили мультисенсор на основі іон-селективних по-

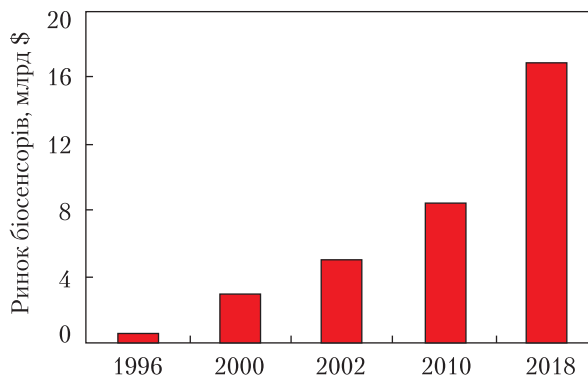


Рис. 1. Обсяги світових фінансових інвестицій у розвиток біосенсоріки



Рис. 2. Мультисенсор на основі ІСПТ для визначення функціональних порушень роботи нирок та якості процесу гемодіалізу

льових транзисторів (ІСПТ) для діагностики дисфункції нирок і контролю за процесом гемодіалізу. Розроблено конструкції, електронні схеми та програмні засоби і створено лабораторний прототип (рис. 2) для одночасного визначення концентрацій основних метаболітів (сечовина, креатинін, глюкоза) у сироватці та діалізаті крові людини. В основі роботи цього мультисенсора лежать реакції, які каталізуються такими ферментами, як уреаза, креатиніндаміназа та глюкозооксидаза, і супроводжуються накопиченням або поглинанням протонів, що зумовлює зміну рН. Показано,

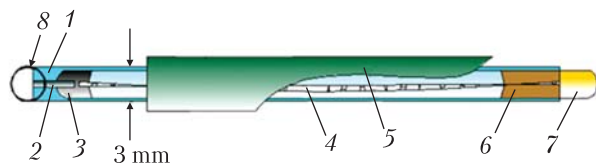


Рис. 3. Схема біосенсорної системи для аналізу концентрацій АТФ, глюкози та активності креатинкінази: 1 – скляна трубка; 2 – платиновий дріт; 3 – сплав Вуда; 4 – мідний дріт; 5 – захисне покриття; 6 – епоксидна смола; 7 – контактна площадка; 8 – чутлива зона біосенсора

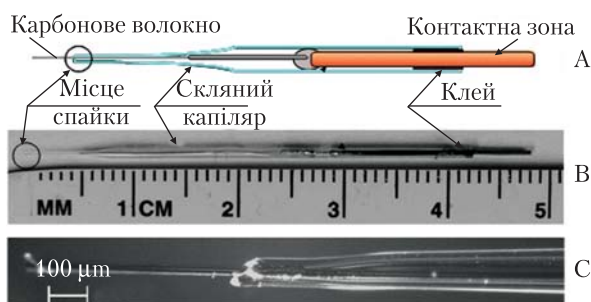


Рис. 4. Схема і розміри мікробіосенсора для *in vivo* аналізу деяких метаболітів та нейромедіаторів

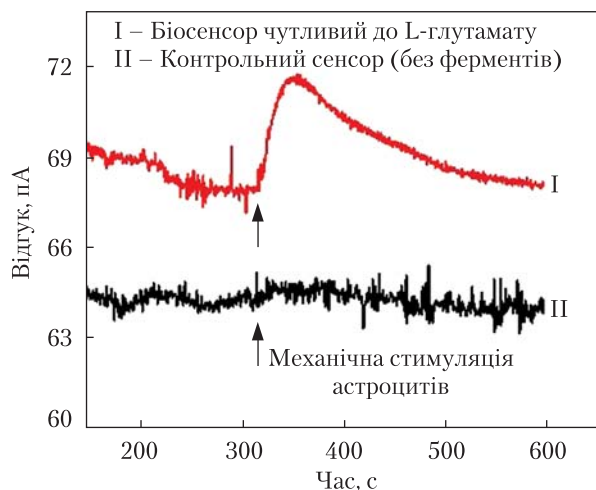


Рис. 5. Порівняння дії специфічного до L-глутамату мікробіосенсора на основі коїммобілізованих ГЛОД/АОД (I) і контрольного сенсора (II) в дослідженні *in vitro* на культурі клітин астроцитів

що кореляція даних, отриманих мультибіосенсорним і контрольними методами аналізу, характеризується коефіцієнтами – 0,98 для сечовини і 0,97 для креатиніну.

Науковці нашого Інституту спільно з колегами з Інституту електродинаміки НАН України розробили мультиферментну амперометричну біосенсорну систему для одночасного аналізу концентрацій АТФ, глюкози і активності креатинкінази. В основі роботи цього біосенсора лежать дві ферментативні реакції, в яких ферменти конкурують за глюкозу – субстрат глюкозооксидази. При цьому визначати можна як глюкозу, так і АТФ. Схему такого біосенсора наведено на рис. 3. Аналіз концентрацій АТФ, глюкози та активності креатинкінази у зразках сироватки крові, отриманих за допомогою розробленої біосенсорної системи і контрольних методів аналізу, засвідчив, що коефіцієнти кореляції становлять: 0,975 – для глюкози; 0,912 – для АТФ; 0,886 – для визначення активності креатинкінази.

Результатом співробітництва нашого Інституту з Університетом Клода Бернара (Ліон, Франція) стало створення мікробіосенсорів для аналізу *in vivo* деяких метаболітів та нейромедіаторів. При цьому використовували мікробіосенсори з карбонового волокна або з платинового дроту (рис. 4) завтовшки 25 мкм, що зіставно з товщиною людської волосини. Тестування розробленого біферментного біосенсора на основі коїммобілізованих глутаматоксидази і аскорбатоксидази (ГЛОД/АОД) проводили як *in vitro* на культурі клітин, так і *in vivo*. На рис. 5 наведено відгук глутаматного сенсора на викид глутамату в культурі клітин астроцитів. Можна бачити, що контрольний сенсор, який не містив фермент, відгуку при цьому не давав, що свідчить про специфічність розробленого мікробіосенсора. Дослідження *in vivo* проводили на щурах, вивчаючи дію створених нами біосенсорів різної специфічності: на глюкозу, лактат, холін, ацетилхолін, L-глутамат, D-серин, АТФ. Діапазон визначення цих біосенсорів охоплював увесь спектр концентрацій відповідних аналітів у мозку щурів.

Крім того, в Інституті розроблено біосенсиори на основі поверхневого плазмонного резонансу для детектування Rh-позитивних лейкемій та виявлення резистентних форм туберкульозу. Такі сенсори дозволяють без застосування молекулярних міток у режимі реального часу виявляти і розрізняти нативні гени та різноманітні варіанти гібридних і мутованих генів, що викликають відповідну патологію.

Другим напрямом біосенсорики, який розвивається в НАН України, є створення *біосенсорних систем для контролю якості харчових продуктів*.

Разом з колегами з Інституту електродинаміки НАН України ми створили кондуктометричний мультибіосенсор для селективного визначення різних цукрів у харчових продуктах (рис. 6). Такі дисахариди, як сахароза, лактоза, мальтоза, розщеплюються відповідними ферментами до моносахаридів, але ці продукти не є електроактивними і їх не можна детектувати біосенсорними методами. Тому до системи вводили фермент мутаротазу, який перетворює α -D-глюкозу на β -D-глюкозу, а потім за допомогою глюкозооксидази β -D-глюкозу перетворювали на електроактивні продукти, що давало змогу кондуктометричним методом визначити концентрації вихідних цукрів.

У співпраці з Інститутом фізики напівпровідників ім. В.Є. Лашкарьова НАН України розроблено потенціометричний біосенсор для інгібіторного ферментного аналізу глікоалкалоїдів в овочах. Глікоалкалоїди — це природні нейротоксичні сполуки. Вони мають властивість інгібувати фермент бутирилхолінестеразу, завдяки чому можна визначити їх концентрацію (рис. 7). Цей процес відбувається в два етапи: спочатку сенсор дає відгук на субстрат (A_0), а потім вносять зразок, який містить токсичну речовину, що приводить до зниження відгуку до A_i . За величиною цього спаду можна встановити інгібувальну активність, а отже, і концентрацію глікоалкалоїдів. Порівняння з контрольним традиційним методом НРЛС засвідчило хорошу кореляцію ($R = 0,93$). Апробацію розробленого біосенсора було проведено при визначенні сумарного вмісту глікоалка-

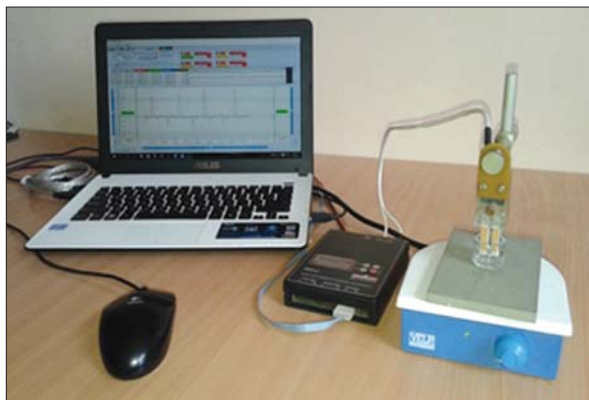


Рис. 6. Кондуктометричний мультибіосенсор для селективного визначення різних цукрів у харчових продуктах

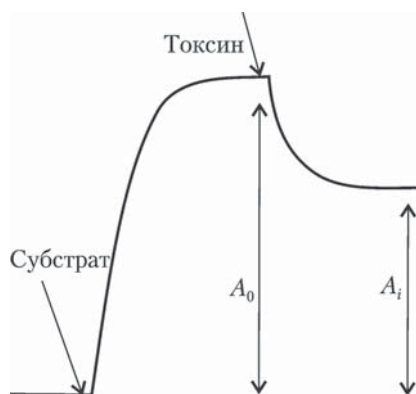


Рис. 7. Схема інгібіторного аналізу, що лежить в основі мультибіосенсора для селективного визначення різних цукрів у харчових продуктах

лоїдів у різних сортах картоплі французького походження. Загалом ми перевірили близько 60 французьких сортів картоплі і кілька десятків українських. Слід зазначити, що вітчизняні сорти виявилися кращими з точки зору допустимих концентрацій глікоалкалоїдів.

Спільно з фахівцями з Інституту мікробіології і вірусології ім. Д.К. Заболотного НАН України ми розробили кондуктометричний біосенсор для інгібіторного визначення афлатоксинів, зокрема найнебезпечнішого афлатоксину В1. Ці гепатоканцерогенні токсичні речовини є природними продуктами життєді-

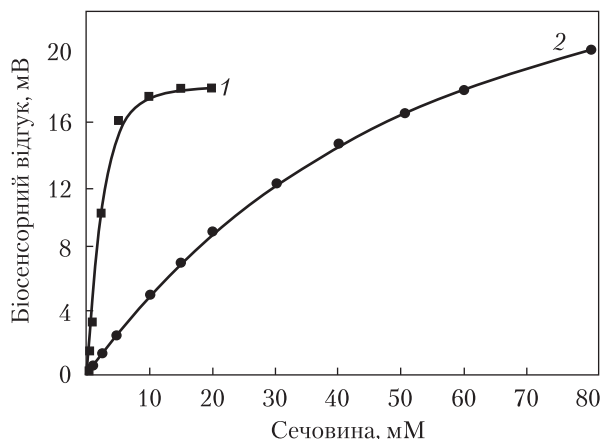


Рис. 8. Калібрувальні криві, отримані для біосенсора на основі уреазі з бобів сої (1) та рекомбінантної уреазі з *E. coli* (Oriental Yeast Co.) (2)

яльності різних видів грибів роду *Aspergillus*, що найчастіше вражають рис, кукурудзу, пшеницю, овес, горіхи та інші поширені культури. Для визначення мікотоксинів разом зі співробітниками Інституту хімії високомолекулярних сполук НАН України створено також оптичні сенсорні системи на основі смартфонів та «розумних» полімерів — біоміметиків. За їх допомогою з водних розчинів можна визначати афлатоксин В1 у діапазоні концентрацій 5–500 нг/мл, а інший мікотоксин зеараленон — у діапазоні 1–25 мкг/мл.

Третій напрям біосенсоріки, в якому працюють вчені нашої Академії, — це *біосенсорні системи для екологічного моніторингу*. Так, співробітниками Інституту молекулярної біології і генетики НАН України, Інституту електродинаміки НАН України та Інституту фізики напівпровідників ім. В.Є. Лашкарьова НАН України створено біосенсорні системи для визначення загальної токсичності стічних вод, природних водоймищ та концентрацій окремих розчинних токсичних речовин, таких як іони важких металів, органо-фосфорні пестициди, хлорофенол, формальдегід, карбаматні гербіциди, гіпохлорити тощо. Розроблено та виготовлено експериментальні зразки мультибіосенсорів на основі уніфікованих ІСПТ-

сенсорних елементів і планарних кондуктометричних гребінчастих золотих електродів, у тому числі механічні конструкції, електронні перетворювачі, інтерфейси та програмне забезпечення для цих приладів.

Крім того, вчені НАН України докладають значних зусиль для опрацювання нових підходів до поліпшення аналітичних характеристик біосенсорів: підвищення їх чутливості, селективності, розширення лінійного діапазону визначення, поліпшення відтворюваності у процесі виготовлення, підвищення стабільності роботи (зокрема, операційної стабільності та стабільності при зберіганні), скорочення часу аналізу та ін. Серед запропонованих підходів слід відзначити використання нанорозмірних матеріалів, застосування рекомбінантних ферментів, оптимізацію структури біоселективного елемента біосенсора та процедури біосенсорного аналізу. Завдяки досить швидкому прогресу в галузі синтезу наночастинок із заданими властивостями, такими як розмір частинок, їхня питома поверхня, пористість матеріалу, гідрофільність або гідрофобність, електропровідність чи інертність, поверхневий заряд, можливість модифікації різними функціональними групами тощо, відкриваються нові можливості для оптимізації біосенсорів.

У наших роботах ми використовуємо наноматеріали різної природи: нано- і мікро-розмірні цеоліти; вуглецеві наноматеріали (одношарові і багатошарові нанотрубки, наоалмази, графен), наночастинки благородних металів (золото, платина, срібло), каліксарени, нанорозмірні плівки (поліфенілендіамін, Nafion та ін.). Наприклад, було показано, що застосування наночастинок природного цеоліту кліноптилоліту приводить до поліпшення аналітичних характеристик уреазного кондуктометричного біосенсора, а модифікація наночастинками золота комплементарних олігонуклеотидів — до селективного підвищення (у понад 1000 разів!) чутливості ДНК-сенсора. З метою оптимізації аналітичних характеристик біосенсорів ми використовували й додаткові полімерні мембрани, які дають змогу нівелювати вплив концентрації буфера на роботу

потенціометричних та кондуктометричних сенсорів. Крім того, застосування додаткових мембран поліпшує чутливість, стабільність і відтворюваність сигналів. Для досягнення потрібних характеристик біосенсорів використовувалися також рекомбінантні ферменти. Так, уреазний біосенсор на основі ферменту уреазу з бобів сої був високочутливим, але мав дуже вузький діапазон визначення. Завдяки застосуванню рекомбінантної уреазу, отриманої з *E. coli* (Oriental Yeast Co.), з однією заміною амінокислоти в активному центрі ферменту нам вдалося значно розширити діапазон біосенсорного визначення (рис. 8).

Отже, по-перше, в результаті проведених досліджень розроблено низку моно- і мультибіосенсорів для визначення концентрацій основних метаболітів у сироватці та діалізаті крові людини; діагностики окремих форм лейкозу та резистентних штамів *Mycobacterium tuberculosis* на основі афінних взаємодій одноланцюгових молекул ДНК; аналізу низки метаболітів і нейромедіаторів у мозку ссавців; інгібіторного визначення фосфорорганічних пестицидів, фенолів, іонів важких металів, стероїдних глікоалкалоїдів, гіпохлориту та інших токсикантів у харчових продуктах і зразках навколишнього середовища. По-друге, створено низку лабораторних прототипів розроблених нами біосенсорів та апробовано їх при аналізі реальних зразків, проведено верифікацію з використанням традиційних методів аналізу. Зазначені прототипи зараз проходять стадію метрології. Всі одержані результати опубліковано у рейтингових фахових журналах, а також отримано близько 20 патентів України.

Дуже коротко зупинюся на основних тенденціях подальшого розвитку перспективних сенсорних технологій в ІМБГ НАН України. На нашу думку, це:

- розширення переліку аналітів і розроблення мультисенсорів та сенсорних масивів, а та-

кож математичного апарату аналізу масивів даних;

- розроблення ДНК-сенсорів, що уможливило експресний аналіз генетичних і ракових захворювань, визначення мікробних та вірусних інфекцій;

- створення нових технологій синтезу надмолекулярних структур (біоміметиків), що імітують активність біологічних молекул, але відрізняються від них більшою стабільністю та можливістю використання в агресивних середовищах;

- створення «розумних біосенсорних систем» із заданими аналітичними характеристиками (з використанням різноманітних наноматеріалів, рекомбінантних біоселективних молекул, біоміметиків та ін.).

Разом з тим, слабкою ланкою залишається впровадження нових розробок, оскільки це потребує значних фінансових інвестицій, набагато більших, ніж на етапі розроблення. До того ж в Україні практично немає державних систем впровадження інноваційних продуктів.

Насамкінець хочу зазначити, що всі дослідження, про які я сьогодні говорив, виконувалися за фінансової підтримки НАН України в рамках бюджетного фінансування та за програмами «Сенсорні системи для медико-екологічних і промислово-технологічних потреб: метрологічне забезпечення та дослідна експлуатація» і «Розумні» сенсорні прилади нового покоління на основі сучасних матеріалів та технологій» (керівник програми — академік НАН України Г.В. Єльська, керівник робочої групи — професор С.В. Дзядевич). Крім того, ми виконували 3 проекти 7-ї рамкової програми ЄС; кілька проектів НАТО і УНТЦ, а також отримали білатеральні гранти з ученими Франції, Греції та Індії.

Дякую за увагу!

За матеріалами засідання підготувала О.О. Мележик