

Всякая вещь
в природе
является либо
причиной,
направленной
на нас, либо
следствием,
идущим от нас.

М. Фичино

БИОСЕНСОРЫ

для детекции глюкозы в крови больных диабетом

УДК 577.152.1+543.94+543.55+543.068.8

Сахарный диабет считается одной из наиболее серьезных медико-социальных проблем настоящего времени. Рост заболеваемости им носит эпидемический характер, увеличивая в десятки раз риск тяжелых осложнений. Согласно сведениям Международной федерации диабета, 20 лет назад количество людей с диагнозом «сахарный диабет» в мире не превышало 30 млн. В 2017 г. число взрослых с обоими его типами на планете достигло 370 млн, а к 2025 г. эксперты предсказывают увеличение этой цифры на 49% (до 550 млн чел.). В Беларуси на 1 января 2017 г. на диспансерном учете находилось 303 922 пациента с сахарным диабетом (I типа – 5,7%, II типа – 93,5%, гестационным – 0,1%, другими специфическими типами – 0,7%) [1].

Разработка биосенсорных систем для определения глюкозы в крови

Сохраняющийся рост числа больных сахарным диабетом во всем мире и в Беларуси, распространенность этой патологии, ранняя инвалидизация определяют особую актуальность своевременных диагностики и коррекции нарушений углеводного

Резюме. В статье проанализирована актуальность своевременных диагностики и коррекции нарушений углеводного обмена в связи с общемировой проблемой роста заболеваемости сахарным диабетом. Представлен отечественный опыт создания биосенсорных технологий – новая портативная экспресс-система для анализа уровня глюкозы в крови пациентов, по точности измерений не уступающая зарубежным аналогам. Описаны основные компоненты антропометрических биосенсоров, методы и этапы совершенствования глюкометров.

Ключевые слова: биосенсор, диабет, глюкозооксидаза, *Penicillium*, определение глюкозы.

обмена. Первостепенное значение при этом приобретает разработка и активное внедрение передовых методов контроля уровня глюкозы в крови. Именно биосенсорные системы удовлетворяют требованиям, предъявляемым к устройствам для клинической диагностики, персонализированной терапии и индивидуального использования. Существуют как стационарные лабораторные анализаторы глюкозы, так и портативные системы, состоящие из прибора – глюкометра и тест-полосок и позволяющие производить замеры в домашних условиях.

ЭНЗИМОЛОГИЯ

Интерес к биосенсорным технологиям непрерывно растет. Разработку устройств, определяющих физиологические показатели организма человека, относят к числу «восходящих трендов глобальной научно-технологической сферы». Предполагается, что к 2018 г. мировой рынок биосенсоров достигнет 16,8 млрд долл. и более половины в нем займут системы для экспресс-диагностики состояния человека [2]. Совершенствование глюкометров и тест-полосок для установления концентрации глюкозы в крови продолжается в различных специализированных корпорациях, компаниях и фирмах, а также научно-исследовательских центрах мира, наиболее активно – в США, Японии и странах Западной Европы [3].

Функционально биосенсор состоит из двух основных частей: рецепторного элемента (биологический материал в иммобилизованном виде) и физико-химического преобразователя (служит для превращения биохимического сигнала в электрический). Сигнал биосенсора зависит от концентрации анализируемого вещества в измеряемом образце. Важнейшие качества таких приборов – высокая чувствительность и селективность, простота использования, скорость анализа, а также способность обнаруживать разнообразные компоненты и определять их концентрации.

Исследования в области амперометрических биосенсоров были инициированы американским профессором биохимиком Кларком, опубликовавшим в 1956 г. работу по кислородному электроду. Он и Лионс ввели понятие «ферментный электрод» [4]. Затем Апдайком и Хиксом был создан новый ферментный глюкозный электрод, оказавшийся несколько проще электрода Кларка и имевший лучшую операционную стабильность. Именно

эти труды заложили основы успешного развития и дальнейшей коммерциализации амперометрических биосенсоров. Гилболт и Лубрано в 1973 г. разработали ферментный электрод, основанный на амперометрической (анодной) детекции освобождающегося в результате реакции пероксида водорода. Первый коммерческий глюкозный биосенсор был выпущен в 1975 г. компанией Yellow Springs Instruments. В 1980-х биодатчики стали предметом внимания многих научно-исследовательских центров и предприятий – производителей приборов и анализаторов медицинского назначения [5]. Аналогичные работы не потеряли своей актуальности и в настоящее время.

В составе биосенсоров применяются различные преобразователи. Их классифицируют по способу генерирования, последующей трансформации и интерпретации сигнала: амперо-, потенцио-, кондукто-, импедансо- и фотометрические. Наиболее распространены сенсоры первого типа [6–8]. Фирмы-производители постоянно вносят технические усовершенствования, позволяющие уменьшать объем пробы и сокращать время анализа. Отмечена тенденция к миниатюризации датчиков, а также созданию многоразовых имплантируемых биосенсоров.

В качестве преобразователя сигнала биосенсора используют электроды (платиновый, ртутный, серебряный, золотой и др.) и углеродные материалы – графитовые пасты (графит, сажа и углеродные волокна, стеклоглерод, пирографит). Их могут дополнительно модифицировать до введения биологического компонента полимерами, медиаторами электронного переноса, стабилизаторами и другими вспомогательными реагентами. Изменение состава поверхности может быть достигнуто в процессе

термообработки, в результате которой на ней образуются функциональные группы, способные в ряде случаев увеличивать каталитическую активность исходного материала без дополнительной модификации [9].

Присоединение к поверхности специфических электроактивных соединений позволяет создать селективные электродные материалы. Так, модификация полимерами (такими как циклодекстраны, органические красители, фторуглероды, гидрофильные полимеры) способствует получению более быстрого отклика сигнала тока. Ряд работ посвящен нанесению гидрофильных пленок, обеспечивающих защиту реагентного слоя от примесей и замедляющих скорость вымывания биополимера. Послойное нанесение реагентов, иммобилизованных в полимерных пленках, позволяет сохранять высокую скорость электронного переноса. В ряде случаев используется принцип разделения реагентных слоев по электродам в целях формирования поверхности с необходимым энергетическим уровнем [9, 10].

Основные компоненты биосенсоров

Ключевой индикатор тест-полоски – ферментный препарат. Основные ферменты, задействованные в биосенсорных системах для определения глюкозы, – глюкозодегидрогеназа и глюкозооксидаза.

Глюкозодегидрогеназа (КФ 1.1.99.10, КФ 1.1.1.47, КФ 1.1.1.22) относится к классу оксидоредуктаз и в качестве кофакторов может содержать НАД, НАДФ или ФАД [12]. С одной стороны, она не использует кислород как акцептор электронов, что является преимуществом при применении в биосенсорах, с другой, имеет широкую субстратную специфичность и может окислять моно- и дисахариды, что влияет на точность анализов.

Глюкозооксидаза (КФ 1.1.3.4) – ФАД-содержащий фермент того же класса; отличительные черты – высокие сродство к субстрату (глюкозе) и скорость реакции, что делает его более привлекательным для диагностики. Катализ реакции окисления глюкозы глюкозооксидазой включает перенос электронов от специфического субстрата к молекуле флавинадениндинуклеотида (ФАД) в активном центре фермента, а затем к акцептору электронов (рис. 1).

При создании тест-полосок возникает ряд проблем. Наиболее важная – сложность установления прямого контакта между активным центром фермента и электродом из-за большой удаленности молекул ФАД от поверхности белковой глобулы. Классическим подходом к решению этой задачи является использование медиаторов, в качестве которых выступают комплексы переходных металлов железа, кобальта, рутения, осмия и ванадия, такие как ферроцен, 1,10-фенантролин и их производные, тетратиафульвален и тетрацианохинодиметан, N-метил-феназин, бензохинон, гексацианоферрат калия и др. [9, 10]. Возможен и двухмедиаторный перенос. Большинство успешных и наиболее широко применяемых медиаторов принадлежат к железосодержащим комплексам, так как они соответствуют всем критериям эффективности: не реагируют с кислородом, стабильны в окисленной и восстановленной формах, имеют низкий редокс-потенциал, независимы от pH, высокочувствительны, показывают обратимую транспортную кинетику электронов и быстро реагируют с ферментом.

Ключевой этап создания тест-полосок – закрепление биологического компонента (фермента) на поверхности преобразователя сигнала. Эту стадию называют иммоби-

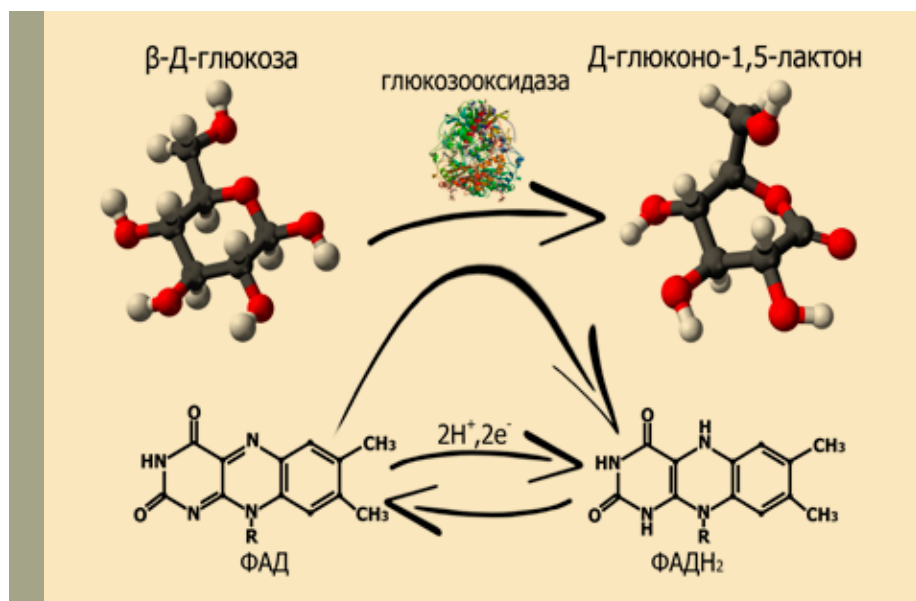


Рис. 1. Реакция окисления глюкозы, катализируемая глюкозооксидазой

лизацией, от ее успеха зависит сама возможность измерения сигнала, операционные характеристики биосенсора, чувствительность и селективность определения биологической мишени в матрицах сложного состава. Все методы иммобилизации разделяют на две группы: физическая (нековалентная) и ковалентная [12].

В случае нековалентной иммобилизации фермент удерживается на инертном носителе, или трансдьюсере, за счет электростатических, вандерваальсовых, ионных и водородных взаимодействий, которые достаточно слабы, но множественны и обеспечивают относительно прочное связывание биомолекулы. Преимущество подобного способа закрепления – отсутствие влияния носителя на активность фермента. Мягким способом нековалентной иммобилизации является «физический захват» биологического материала в формирующуюся полимерную матрицу. Некоторые продукты полимеризации, например

1-этил-3-(3-диметиламинопропил) карбодиимид гидрохлорида и N-гидроксилсукцинимид, обладают электропроводностью и электрохимической активностью, что можно использовать для генерирования сигнала биосенсора.

При ковалентном способе иммобилизации образуются прочные связи между функциональными группами носителя и биологическим компонентом, дополнительно препятствующие вымыванию фермента с датчика. Данный способ особенно необходим при конструировании приборов многоразового применения. В качестве сшивающих реагентов чаще всего используют глутаровый или цитракониевый альдегиды. Следующие по значимости бифункциональные агенты – пальмитоилхлорид и N-гидроксилсукцинимид. Они формируют более устойчивые связи, чем глутаровый альдегид, реагируют быстрее и не склонны к образованию олигомерных продуктов конденсации, и результаты иммобилизации более воспроизводимы.

Биосенсорные системы. Сделано в Беларуси

В нашей республике для обеспечения рациональной инсулинотерапии больных диабетом и осуществления самоконтроля за уровнем сахара в крови представлены импортные (Accu-Chek, BIONIME, Contour, Element, Finetest, GluNEO, IME-DC iDiA, On Call, ЭЛТА) и отечественные (ОАО «Минский НИИ радиоматериалов») тест-системы. Согласно табл. 1, основной принцип работы приборов – амперометрический. Диапазон измерения концентраций варьирует незначительно: минимальные значения – от 0,6 до 1,1 ммоль/л, максимальные – от 33,3 до 35 ммоль/л. Калибровку тест-полосок осуществляют по плазме, сыворотке или цельной крови. Сравнить результаты, полученные на разных приборах, некорректно. Если определять концентрацию глюкозы, итоги могут отличаться именно из-за того, что по-разному производится их калибровка.

Так, датчик с настройками по плазме крови немного завышает «ответ», но в инструкции к нему обычно указаны диапазоны и оценка величин измерений. Кодирование приборов происходит автоматически или с использованием кодирующей полоски, память – единственный показатель, который варьирует значительно (от 60 до 700 результатов).

До 2015 г. выпускалась отечественная анализаторная экспресс-система, состоящая из глюкометра ГМ-2 (завод «Измеритель», г. Новополоцк) и биоэлектродхимических тест-полосок «Глюкосен» (ОАО «Минский НИИ радиоматериалов»). Затем ГМ-2 был снят с производства, однако у больных сахарным диабетом находится около 3 тыс. приборов. НИИ радиоматериалов разработал новый глюкометр, по техническим характеристикам соответствующий импортным аналогам, – «ИРМА» (рис. 2). Его выпуск начал с марта 2016 г. Новая портативная система, состоящая из глюкометра



Рис. 2. Портативная биосенсорная система, выпускаемая ОАО «Минский НИИ радиоматериалов»

Наименование глюкометра (изготовитель)	Параметры					
	Диапазон измерений, ммоль/л	Метод измерения	Калибровка	Память, кол-во результатов	Габариты, мм	Кодирование
Accu-Chek Active (Швейцария)	0,6–33,3	Фотометрический	по плазме крови	500	97,8 × 46,8 × 19,1	автоматическое
BIONIME Rightest GS 100 (Швейцария)	0,6–33,3	Амперометрический	по плазме крови	150	95 × 44 × 13	автоматическое
BIONIME Rightest GS 300 (Швейцария)	0,6–33,3	Амперометрический	по плазме крови	300	85 × 58 × 22	автоматическое
BIONIME Rightest GS 500 (Швейцария)	0,6–33,3	Амперометрический	по плазме крови	150	95 × 44 × 13	автоматическое
Contour Plus (Германия)	0,6–33,3	Амперометрический	по плазме /сыворотке	480	77 × 57 × 19	автоматическое
Element (Южная Корея)	0,6–33,3	Амперометрический	по плазменному эквиваленту	365	82 × 55 × 18	автоматическое
Finetest (Южная Корея)	0,6–33,3	Амперометрический	по плазменному эквиваленту	200	85 × 56 × 20	автоматическое
Finetest Autocoding Premium (Южная Корея)	0,6–33,3	Амперометрический	по плазменному эквиваленту	365	56 × 88 × 21	автоматическое
GluNEO Lite (Южная Корея)	1,1–33,3	Амперометрический	по плазме крови	365	81 × 52 × 16	автоматическое
IME-DC iDiA (Южная Корея)	0,6–33,3	Амперометрический	по цельной крови или по плазме крови	700	90 × 52 × 15	без кодирования
On Call Plus (США)	1,1–33,3	Амперометрический	по плазме	300	108 × 32 × 17	кодирующий модуль
Сателлит Экспресс ПКГ 03 («Компания «ЭЛТА», Россия)	0,6–35	Амперометрический	по цельной крови	60	100 × 55 × 16	кодирующая полоска
«ИРМА» (Беларусь)	1,0–33,0	Амперометрический	по цельной крови	100	95 × 56 × 15	кодирующая полоска

Таблица 1. Сравнительная характеристика приборов для измерения уровня сахара в крови

«ИРМА» и тест-полосок «Глюкосен», по точности не уступает зарубежным. Тест-полоски изготавливают путем создания многослойных структур методом трафаретной печати на изолирующих подложках. Глюкозоопределяющая полоска состоит из двух электродов в виде проводящих «дорожек». Рабочий электрод содержит глюкозооксидазу в качестве основного индикаторного элемента и медиатор для усиления сигнала. Второй проводник выполняет одновременно две функции – вспомогательную и сравнения.

Отечественные разработки

До 2004 г. выпуск тест-полосок «Глюкосен» основывался на использовании препарата «Глюкозооксидаза» предприятия «Львівдіалік» (г. Львов, Украина). После прекращения там массового производства этого ферментного средства ОАО «Минский НИИ радиоматериалов» обратилось в Институт микробиологии НАН Беларуси. В лаборатории ферментов института были отобраны высокоактивные продуценты глюкозооксидаз – *Penicillium adametzii* и *P. funiculosum*, разработа-

Препараты	Удельная активность, ед/мг белка	Глюкозо-оксидаза, моль	Активность фермента, ед/мл	$k_{\text{кат}}/\text{Км}$, $10^5 \text{ моль}^{-1} \text{ с}^{-1}$
Глюкозооксидаза <i>A. niger</i> (Roche, Франция) 10 мг/мл	130,5	$1,28 \cdot 10^{-4}$	2105,1	0,8
Глюкозооксидаза <i>A. niger</i> (Biozyme, США) 10 мг/мл	129,3	$1,28 \cdot 10^{-4}$	1594,9	0,9
Глюкозооксидаза <i>A. niger</i> (Fluka, США) 10 мг/мл	164,6	$5,07 \cdot 10^{-5}$	1455,6	1,1
Глюкозооксидаза <i>P. adametzii</i> (Беларусь)	95,2	$5,77 \cdot 10^{-5}$	1395,2	1,4
Глюкозооксидаза <i>P. funiculosum</i> (Беларусь)	120,6	$9,47 \cdot 10^{-5}$	1572,8	1,7

Таблица 2. Характеристика препаратов глюкозооксидаз

ны соответствующие технологии, организовано производство, проведена химическая модификация грибных димерных белков, получены модифицированные ферменты с повышенной термостабильностью, определена специфичность взаимодействия глюкозооксидаз с медиаторами различной природы, показана перспективность применения энзимов для создания биотопливных ячеек и тест-полосок разнообразных типов [12]. В последующем технология производства препарата «Глюкозооксидаза» была усовершенствована путем подбора химических соединений (модуляторов образования глюкозооксидазы гри-

бами-продуцентами), позволивших не только значительно повысить уровень продукции фермента, но и улучшить физико-химические свойства синтезируемого белка. Разработка сотрудников лаборатории вошла в топ-10 научных достижений 2016 г. Способы получения глюкозооксидаз защищены отечественными патентами.

Выбор грибов рода *Penicillium* в качестве продуцентов обусловлен тем, что глюкозооксидазы, синтезируемые ими, характеризуются более высокой эффективностью связывания глюкозы ($k_{\text{кат}}/\text{Км}$), чем аналогичные ферменты различных штаммов грибов рода *Aspergillus*. Так,

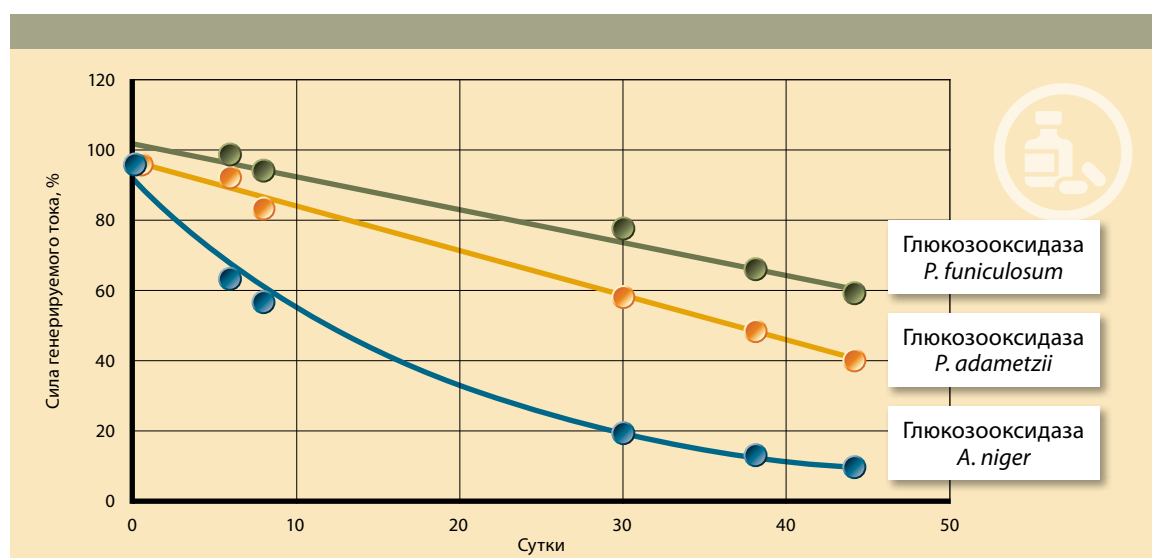


Рис. 3. Операционная стабильность глюкозооксидаз

ЭНЗИМОЛОГИЯ

сопоставление глюкозооксидаз фирм Roche, Biozyme, Fluka (продуценты штаммов *Aspergillus niger*) и ферментов, производимых в Институте микробиологии НАН Беларуси, показало: k_{cat} /Км у глюкозооксидаз грибов рода *Penicillium* в 1,3–2,1 раза выше, чем у коммерческих энзимов (табл. 2).

Сравнительный анализ операционной стабильности иммобилизованных на графитовых электродах глюкозооксидаз *P. funiculosum*, *P. adametzii* и *A. niger* (Fluka), проведенный в течение 45 суток в лаборатории химического факультета Литовского государственного университета, подтвердил преимущество ферментов грибов рода *Penicillium*. Так, после 10 суток стабильность *P. funiculosum* составляла 97%, *P. adametzii* – 86%, *A. niger* – 42%. Через 45 дней иммобилизованные глюкозооксидазы грибов рода *Penicillium* характеризовались в 4,2–6,4 раза большей операционной стабильностью по сравнению с ферментом *A. niger* (рис. 3) [13].

С 2005 г. в производстве тест-полосок «Глюкосен» начата замена импортных препаратов глюкозооксидазы белорусскими. Сейчас лаборатория ферментов Института микробиологии НАН Беларуси полностью обеспечивает потребность в таком препарате отечественного производителя тест-полосок – ОАО «Минский НИИ радиоматериалов». Также учеными совместно с НПС «Глюкосен» этого НИИ на основе бимедиаторной системы и модифицированных ферментов с повышенной термостабильностью разработана технология изготовления индикаторного слоя, что улучшило эксплуатационные характеристики датчиков (за счет расширения диапазона температуры хранения от –20 °С до +30 °С, увеличения сроков хранения до 12 месяцев, а также роста воспроизводимости и достоверности результатов). Способ получения индикаторного слоя защищен патентом Республики Беларусь. С 2013 г. технология внедрена в Минском НИИ

радиоматериалов. В этом же году данный проект стал победителем Республиканского конкурса инновационных проектов (2-е место).

Бесспорно, больные диабетом должны быть обеспечены качественной продукцией. Требования современного анализа – чувствительность, избирательность, дешевизна, простота и экспрессность. Чтобы удовлетворить их, коллектив авторов создает глюкозные тест-полоски нового поколения, основанные на использовании наноматериалов в составе биорецепторного элемента сенсора. Последний, произведенный с помощью нанотехнологий, гарантирует дальнейшее улучшение биоэлектрохимических тест-полосок «Глюкосен», а следовательно, и качество анализов, что повысит конкурентоспособность отечественной экспресс-системы по технологическим параметрам. 

Статья поступила в редакцию 18.08.2017 г.

 <http://innosfera.by/2018/01/biosensors>

SUMMARY

Diabetes is one of the most widely distributed chronic maladies in the world. Nevertheless the disease should not be the reason depriving the patients of the mode of life habitual for healthy humans. To maintain normal life style it is essential to carry out regular self-control of glucose level in blood with the aid of bio-sensor's systems. Design of such devices is referred to the «ascendant trends» in the global scientific-technological sphere. New express-system matching the best foreign analogs in precision of measurements was developed in Belarus.

ЛИТЕРАТУРА

- 14 ноября – Всемирный день диабета. Пресс-релиз // <https://www.bsmu.by/allarticles/rubric1/article2004/>
- Зинов В.Г., Черченко О.В. Биосенсорные технологии: мировые драйверы развития направления // Экономика науки. 2016. Т. 2, №1. Р. 46–56.
- Евтюгин Г.А., Будников К.Г., Стойкова Е.Е. Основы биосенсорики. – Казань, 2007.
- Clark L.C., Lyons C. Jr. Electrode systems for continuous monitoring in cardiovascular surgery // Ann. New York Acad. Sci. 1962. Vol. 102. P. 29–45.
- Wang J. Glucose Biosensors: 40 Years of Advances and Challenges. Review // Electroanalysis. 2001. Vol. 13, N 12. P. 983–988.
- Calvo E.J. Amperometric enzyme electrodes // E.J. Calvo, C. Danilowicz // Journal of The Brazilian Chemical Society. 1997. Vol. 6. P. 563–574.
- Дзядевич С.В. Амперометрические биосенсоры. Современные технологии и коммерческие варианты анализаторов // Биополимеры и клетка. 2002. Т. 18, №5. С. 363–376.
- Calvo E.J., Danilowicz C. Amperometric enzyme electrodes // Journal of The Brazilian Chemical Society. 1997. Vol. 6. P. 563–574.
- Фрайден Дж. Современные датчики: справочник. – М., 2005.
- Chaubey A., Malhotra B.D. Mediated biosensor // Biosensors and Bioelectronics. 2002. Vol. 17. P. 441–456.
- Stefano F., Katsuhiko K., Koji S. Review of glucose oxidases and glucose dehydrogenases: a bird's eye view of glucose sensing enzymes // Journal of diabetes science and technology. 2011, N 5. P. 1068–1076.
- Семашко Т.В., Михайлова Р.В. Некоторые аспекты применения глюкозооксидаз *Penicillium adametzii* и *Penicillium funiculosum* // Перспективные ферментные препараты и биотехнологические процессы в технологиях продуктов питания и кормов / под ред. В.А. Полякова, Л.В. Римаревой. – М., 2016. С. 110–121.
- Ramanavicius A., Voronovic J., Semashko T., Mikhailova R. et al. Comparison of glucose oxidases from *Penicillium adametzii*, *Penicillium funiculosum* and *Aspergillus niger* in the design of amperometric glucose biosensors // Analytical Science. 2014. Vol. 30, N 12. P. 1143–1149.

Татьяна Семашко,

ведущий научный сотрудник лаборатории ферментов
Института микробиологии НАН Беларуси,
кандидат биологических наук;
tsemashko@mbio.bas-net.by

Анатолий Лобанок,

заведующий лабораторией ферментов
Института микробиологии НАН Беларуси, академик;
aglobanok@gmail.com

Александр Штыров,

первый заместитель директора – главный инженер
ОАО «Минский НИИ радиоматериалов»,
кандидат технических наук;
mniirm@mniirm.by

Елена Михаленок,

ведущий инженер-технолог
НПС «Глюкосен» ОАО «Минский НИИ радиоматериалов»;
D3699508@yandex.ru

Анастасия Бельская,

начальник НПС «Глюкосен»
ОАО «Минский НИИ радиоматериалов»;
conopelko@yandex.ru