

УДК 621.3.084.2

МЕДИЦИНСКИЕ И БИОЛОГИЧЕСКИЕ ИЗМЕРЕНИЯ НА ОСНОВЕ МИКРО- И НАНОСЕНСОРОВ

П. Рольф

*Oxford BioHorizons Ltd.,
25 Brewer St., Maidstone, Kent, ME14 1RU, UK
Harbin Institute of Technology,
90 West Da-Zhi St., Harbin, Heilongjiang, 150001, China
Advanced Research Institute for Science and Engineering, Waseda University,
1-104 Totsukamachi, Shinjuku-ku, Tokyo, 169-8050, Japan
E-mail: PeterRolfe@aol.com*

Рассмотрено проектирование и использование микро- и наносенсоров, основанных на электрохимических, акустических, пьезоэлектрических и оптических принципах, для медицинской диагностики, ухода и наблюдения за пациентами и биологических исследований. Анализируются простые и сложные молекулярные соединения, физические параметры, в том числе электрические и магнитные свойства объектов.

Ключевые слова: биомедицинские измерения, микро- и наносенсоры, MEMS/NEMS, лаборатория на чипе, клеточная и тканевая инженерия, биомиметические сенсоры, нанооптика.

Введение. Наука и технология измерений играют важную роль в биомедицинских исследованиях и здравоохранении. Последние десятилетия наблюдается устойчивое развитие сенсоров для биомедицинских измерений, предназначенных для наблюдения за состоянием пациентов в стационарах, для выполнения фундаментальных исследований в лабораториях и даже для самостоятельного наблюдения дома [1]. Измерению подлежат различные величины: давление, сила вдоха, сила сердечных сокращений, потоки жидкостей, смещение органов, а также электрическое поле/заряд, магнитный поток и молекулярные соединения, такие как газы, ионы, белки, бактерии, вирусы и ДНК.

Фундаментальное исследование биологических систем включает детальный анализ биологических механизмов восприятия, отвечающих за зрение, слух, вкус, обоняние и осязание [2]. Эта область развивается во многом благодаря идеям, почерпнутым при изучении естественных систем восприятия [3], что ведёт к появлению новых направлений в так называемых биомимикрии и биомиметике [4].

Конфигурации сенсоров должны существенно варьироваться для обеспечения измерений непосредственно в месте исследования, будь то образцы крови или ткани, живые клетки или органы. По этой причине важным параметром сенсора является его физический размер как для уменьшения объёма необходимых образцов, так и для минимизации его влияния на окружающую биологическую среду. Это та область, где новые методы и технологии производства, такие как MEMS (микроэлектромеханические системы) и NEMS (наноэлектромеханические системы), играют решающую роль и где последние разработки сместили акценты изучения механизмов восприятия из микрообласти в наномир. Несмотря на это для создания полнофункционального сенсора требуется соответствующее комплектование (корпус, специальные соединители), что во многих случаях существенно увеличивает общий размер устройства.

Микросенсоры для мониторинга *in vivo*. Самое явное влияние микросенсоров прослеживается сейчас в медицинском уходе за пациентами в критическом состоянии, находящимися в отделении интенсивной терапии или кардиологии, а также при обширном

хирургическом вмешательстве [5, 6]. В таких условиях наблюдение будет более эффективно при постоянном мониторинге важных физиологических показателей. Во-первых, это нужно для оперативного фиксирования изменений в состоянии пациента и, во-вторых, для оценки результатов лечения, чтобы его можно было вовремя оптимизировать. Постоянный мониторинг ключевых параметров в реальном времени может достигаться путём помещения сенсоров в тело пациента (инвазивно) или прикрепления сенсоров на поверхности тела (не инвазивно). Устройство для инвазивных измерений показано на рис. 1. В этом случае микросенсор прикрепляется к гибкому полимерному катетеру и всё устройство помещается в артерию или вену, где оно может измерять один или несколько параметров и выдавать данные в режиме реального времени.

Микросенсоры разработаны для измерения большого количества физических и химических параметров. Измерение кровяного давления чрезвычайно важно в отделении реанимации, для чего повсеместно используются микросенсоры давления, основанные на полупроводниковых тензометрических датчиках. Такой мониторинг может осуществляться путём введения гибкого полимерного катетера в артерию на запястье. Катетер заполняется физиологическим раствором, а внешний датчик давления прикрепляется к катетеру. Или же микродатчик давления можно поместить напрямую в артерию, как показано на рис. 1. В данном случае в качестве чувствительного элемента используется полупроводниковый тензометрический датчик, а также интерферометрические оптоволоконные сенсоры на основе резонатора Фабри — Перо [7]. Последние пригодны и для измерения внутричерепного или внутригрудного (внутриплеврального) давления. Оценку дыхания некоторых пациентов целесообразно проводить, измеряя поток и объём вдыхаемого и выдыхаемого воздуха, для чего часто используются микроанемометры, основанные, например, на термомодуляции.

Самая активно изучаемая тема в области медицинских микросенсоров — это химические (или молекулярные) сенсоры [8]. К настоящему времени разработаны устройства для определения в крови концентрации газов (O_2 , CO_2), ионов (H^+ , K^+ , Na^+ , Ca^{++} , Cl^-), молекул, участвующих в метаболических процессах (глюкоза, лактат, урина, креатинин), препаратов, гормонов и микроорганизмов, связанных с инфекцией. Один из важных классов химических микросенсоров основан на электроанализе, в котором сила тока или разность потенциалов определяются концентрацией анализируемого вещества. Эти сенсоры могут быть изготовлены из микропроволочек (Au, Ag или Pt) диаметром от 1 до 20 мкм в амперометрических или потенциометрических электрохимических устройствах, заключённых в гибкий полимерный катетер. В обычном амперометрическом сенсоре рабочий электрод и опорный (на основе Ag/AgCl) комбинируются с буферным электролитом и покрываются полимерной мембраной (поливинилхлоридом, полиуретаном, силиконом, полистиролом). Свойства мембраны важны при контроле движения исследуемой молекулы к рабочему электроду, где её можно обнаружить, например, при реакции восстановления с помощью соответствующего электроотрицательного потенциала. Конструкция микросенсора этого типа должна обеспечивать диффузионно-ограниченный режим работы для

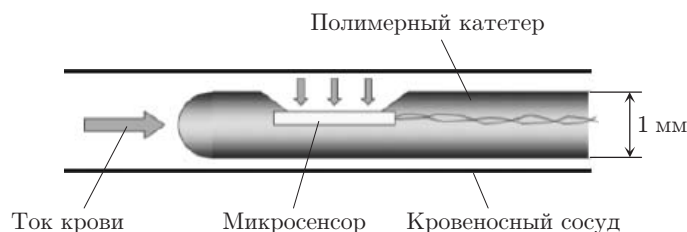


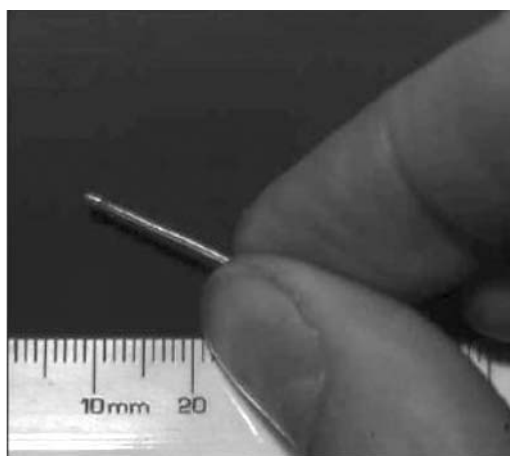
Рис. 1. Схема инвазивного микросенсора

установления предсказуемой связи между концентрацией исследуемого вещества и током сенсора. Это означает, что параметры диффузии мембраны должны быть постоянными и одним из факторов, влияющих на эти параметры, является адсорбция белков из крови или тканевой жидкости вокруг сенсора. Поэтому в последние два десятилетия проводились исследования по обработке поверхности мембран для контроля или противодействия адсорбции белков; один из самых успешных способов — это использование фосфолипидных материалов, имитирующих клеточные мембраны.

Потенциометрические микросенсоры применяются в основном для измерения ионов, таких как H^+ , K^+ , Ca^{++} и Na^+ . В этих так называемых ионоселективных электродах (ISE) разница потенциалов на ионоселективной мембране используется как основа измерения концентрации ионов. Мембраны обычно изготавливаются из стекла, но популярны также и полимерные мембраны с носителями ионов, например валиномицин для K^+ . Сенсор может быть выполнен в стеклянной трубке, окружающей опорный электрод $Ag/AgCl$; другой опорный электрод должен быть расположен вне трубки, чтобы можно было измерить разницу потенциалов. На практике стеклянная конструкция обладает рядом недостатков, в частности хрупкостью. Для решения этой проблемы в альтернативных разработках применяются полимерные мембраны, содержащие соответствующие носители ионов. Микропроволочка защищена от раствора ионоселективной мембраной. Такая конструкция называется «селективный ионный защищённый проволочный электрод», или CWISE. Ещё один вариант — использование микросхем на полевых транзисторах для измерения разности потенциалов. Это химически чувствительные полевые транзисторы (ChemFET), применяющиеся для ионов (например, pH) или при наличии ферментов для сложных молекул типа глюкозы.

Оптические сенсоры очень важны для клинического мониторинга. Их конструкция часто использует стеклянное или полимерное оптоволокно, которое в сочетании с хромофорами или флюорофорами позволяет определять свойства широкого спектра объектов, включая газы и ионы [9]. Инвазивный микросенсор показан на рис. 2. Хотя этот сенсор можно сконструировать на основе амперометрических принципов, как рассмотрено выше, в данном случае применяются оптические принципы. Полученный оптический сенсор (см. рис. 2) содержит флюорофор в специальном отсеке с мембраной, проницаемой для исследуемого вещества. Таким образом одно или два оптоволокна могут подводить возбуждающее

Флюоресцентное поглощение



© P. Rolfe

Рис. 2. Интраартериальный микросенсор (справа), основанный на флюоресцентном поглощении (слева)

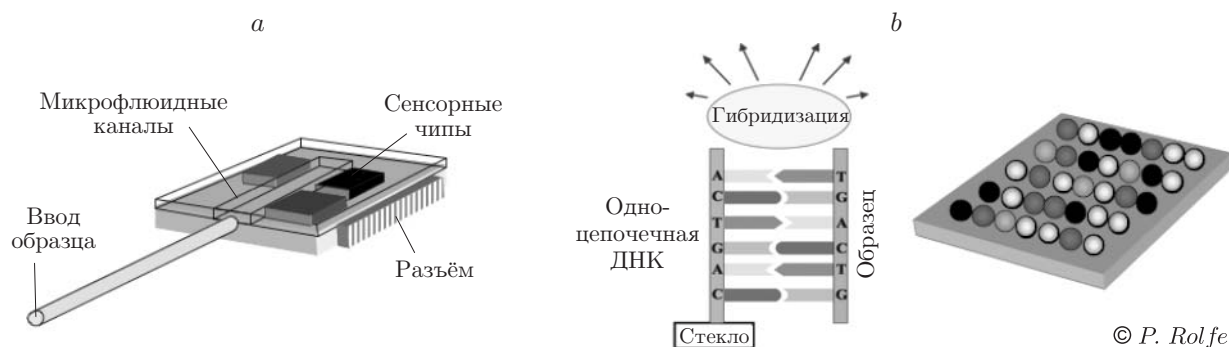
излучение и принимать эмиссионное. Флюорофор выбирается так, чтобы флюоресценция подавлялась анализируемым веществом, например кислородом. Тогда для подсчёта концентрации вещества используется соотношение Штерна — Фольмера [Q].

Значимость микросенсорного мониторинга в медицине существенна при внутриутробном наблюдении за плодом до и во время рождения, в интенсивной терапии недоношенных младенцев, в детской и взрослой реанимации.

Сенсорные микросборки и матрицы. Наряду с существующими микросенсорами в клиническом мониторинге в режиме реального времени активно ведутся работы по созданию мультисенсоров, сочетающих в себе микро- и наносенсоры для комплексного анализа биологических образцов, таких как кровь, моча, ткани и клетки. Одним из наиболее важных направлений исследования является создание так называемой «лаборатории на чипе» [10] в разных формах, благодаря которой анализы (для их проведения раньше требовалось громоздкое лабораторное оборудование) теперь могут быть выполнены с помощью простых переносных инструментов. Взятые у пациента или подготовленные в лаборатории образцы анализируются с помощью пробоотборной камеры, это может быть микрофлюидная или нанофлюидная сенсорная сборка. Интенсивное развитие MEMS- и NEMS-технологий способствует созданию компактных аналитических платформ с чрезвычайно широкими измерительными возможностями.

Анализ образцов крови может быть сделан пациенту на месте с помощью сенсорного чипа, имеющего соответствующий вход (рис. 3, *a*). Сразу после взятия крови проба в виде жидкости или газа поступает в микроканал сенсорного прибора, где, благодаря особенностям его конструкции, вступает в контакт с несколькими сенсорами последовательно или одновременно. Простейшие системы могут использовать толстоплёночные сенсоры, например, для измерения газов крови (PO_2 , PCO_2) и pH. Полупроводниковые сенсоры (ISFET, ChemFET, ImmunoFET) сейчас активно применяются в устройствах такого типа и предоставляют широкий выбор возможных веществ для анализа, включая газы, ионы, белки, препараты и гормоны. Также могут быть использованы и оптические сенсоры на полупроводниковых чипах. В таких системах успешно применяются мощные методы спектрофотометрического анализа. Поверхностная плазмонная резонансная диагностика (SPR — Surface Plasmon Resonance) является ещё одной эффективной оптической техникой, используемой в сенсорах, например в сенсорных рецепторах или сенсорах для выявления антигенов и антител.

Область применения, в которой получен наиболее значительный эффект от использования сенсорных массивов, — это генетические исследования, нацеленные на определение генной предрасположенности к болезням [11]. Микроматрица ДНК (рис. 3, *b*), или ген-чип, состоит из набора определённых сегментов одноцепочечной ДНК, обычно прикрепляемых



© P. Rolfe

Рис. 3. Сенсорная сборка с микрофлюидными и индивидуальными сенсорными чипами, используемая для быстрого анализа крови, (*a*); микроматрица ДНК (*b*)

к предметному стеклу, и при его гибридизации с соответствующим комплементарным сегментом ДНК возникает флюоресценция присоединённого флюорофора. Этот образец флюоресцирующих микроточек затем анализируется как изображение. Микроматрицы сейчас используются для изучения зависимости между генетическим составом и поведением клеток, например, для нахождения методов ранней диагностики рака, сердечно-сосудистых заболеваний и нарушений мозгового кровообращения, а также в тканевой инженерии.

Копирование природных сенсоров и процессов — биомиметика — в значительной степени стимулирует разработку сенсорных матриц (биочипов) [3, 4]. Биологические клетки, составляющие основу сенсорных систем зрения, слуха, обоняния («электронного носа»), осязания и вкуса, имитируются в полупроводниковых устройствах, образующих биомиметические чипы. Эти сенсорные матрицы часто объединяют при обработке информации в нейронные сети для обеспечения высокой избирательности. Они начинают оказывать заметное влияние на новый подход к восстановлению и замене органов в области клеточной инженерии [3].

Наносенсоры, клетки и ткани. В настоящее время наносенсоры достаточно разнообразны и уже оказывают влияние на клеточные и тканевые исследования. Эти сенсоры базируются на оптических, электрических, магнитных и акустических принципах [12]. Наночастицы, наноболочки, нанопроводники, углеродные нанотрубки (CN) и квантовые точки (QD) могут быть использованы для создания таких сенсоров. Наночастицы золота (GN) воспринимают окружающее их диэлектрическое пространство, и этот феномен можно эффективно использовать при разработке сенсоров. Расширить функциональность GN-частиц можно посредством молекулярного распознающего элемента, и поэтому частицы будут действовать как биосенсоры. Наноболочки, состоящие из сферического диэлектрического (например, кварцевого) ядра, окружённого золотым или серебряным слоем толщиной несколько нанометров, могут зондироваться волнами соответствующей длины от УФ до ИК, вследствие чего происходит резонанс плазмона, который существенно увеличивает интенсивность излучения — это так называемая технология поверхностно усиленной рамановской спектроскопии (SERS). Нанопроволочные сенсоры могут измерять изменение удельной электропроводности, имеющее место при присоединении макромолекулы к нанопроволочной поверхности.

Полупроводниковые квантовые точки могут быть эффективно использованы в качестве флюоресцентных меток с λ_e , зависящей от размера QD, в клетках и тканях, например, чтобы локализовать или проследить за мезенхимными стволовыми клетками при их пересадке в ткань или при культивации совместно с другими типами клеток [13]. QD на сегодняшний день применяются во всё большем числе сенсоров [14], в частности основанных на флюоресцентном резонансном переносе энергии (FRET) для анализа ДНК [15]. Углеродные нанотрубки предоставляют интересные возможности для изготовления сенсоров благодаря своим необычным электрическим и физическим свойствам. Разработан биосенсор глюкозы, в котором массив CN прикреплён к платиновому субстрату, глюкозооксидаза связана с CN и достигнут прямой перенос электронов с фермента на платиновый электрод [16].

Заключение. Микро- и наносенсоры, микросборки и микроматрицы широко разрабатываются и используются для исследований в биологии и для повышения уровня диагностики и лечения заболеваний. Эти два типа сенсоров логично упоминать вместе, так как на практике микро- и наносенсоры комбинируются для изготовления эффективных устройств. Это особенно важно для сенсоров, помещаемых в артерии или вены для мониторинга состояния пациентов отделения интенсивной терапии. В результате возникает необходимость в более компактных сенсорах, например основанных на квантовых точках размером около 10 нм. Однако для сенсоров интенсивного мониторинга актуальной проблемой является не столько размер сенсоров, сколько их нежелательное взаимодействие

с кровью (адсорбцией белков), что может привести к её свёртыванию и выходу из строя сенсора.

Микроматричные сенсоры уже оказали существенное влияние на генетические и клеточные исследования. Тем не менее развитие наноматриц должно открыть возможность более быстрого анализа очень большого числа соединений, и это будет особенно важно для протеомики, обнаружения признаков заболевания в медицинских образцах и разработки новых медикаментов.

Наночастицы (оболочки, сферы, палочки, проволоки, трубки, точки) уже находят своё место в биологических системах, а именно исследовании клеток, тканей, лёгких и желудочно-кишечного тракта. Существуют описания и классификации потенциальных рисков этих частиц, и каждое применение должно основываться на тщательном анализе этих рисков. Так, квантовые точки CdS могут выделять токсичный кадмий под воздействием УФ-излучения определённого уровня.

Микронаномир открывает широкие перспективы для восприятия сложных молекул, благодаря чему можно будет на ранних стадиях выявлять серьёзные заболевания при индивидуальном медицинском обследовании.

Автор выражает благодарность коллегам, которые сотрудничали с ним в Харбинском институте технологии (Китай), Университете г. Генуя (Италия), университетах Каназавы и Васэды (Япония).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. **Öberg P. Å., Togawa T., Spelman F. A.** Sensors in medicine and health care. Weinheim: Wiley-VCH, 2004. 420 p.
2. **Courville J., Walsh J., Cordeau J. P.** Functional organization of the brain stem reticular formation and sensory input // *Science*. 1962. **138**, N 3544. P. 973–975.
3. **Rolfe P.** Sensors and systems that mimic nature // *Eng. Sci. Education Journ.* 1997. **6**, N 4. P. 155–166.
4. **Müller R., Kuc R.** Biosonar-inspired technology: goals, challenges and insights // *Bioinspir. Biomim.* 2007. **2**, N 4. P. 146–161.
5. **Bernet V., Döll C., Cannizzaro V. et al.** Longtime performance and reliability of two different PtcCO₂ and SpO₂ sensors in neonates // *Paediatr. Anaesth.* 2008. **18**, N 9. P. 872–877.
6. **Chase J. G., Hann C. E., Jackson M. et al.** Integral-based filtering of continuous glucose sensor measurements for glycaemic control in critical care // *Comput. Methods Programs Biomed.* 2006. **82**, N 3. P. 238–247.
7. **Rolfe P., Scopesi F., Serra G.** Advances in fibre optic sensing in medicine and biology // *Meas. Sci. Technol.* 2007. **18**, N 6. P. 1683–1688.
8. **Rolfe P.** In vivo chemical sensors for intensive-care monitoring // *Med. Biol. Eng. Comput.* 1990. **28**, N 3. P. B34–B47.
9. **Rais-Bahrami K., Rivera O., Mikesell G. T., Short B. L.** Continuous blood gas monitoring using an in-dwelling optode method: comparison to intermittent arterial blood gas sampling in ECMO patients // *Journ. Perinatol.* 2002. **22**, N 6. P. 472–474.
10. **Craighead H.** Future lab-on-a-chip technologies for interrogating individual molecules // *Nature*. 2006. **442**. P. 387–393.
11. **Wiltgen M., Tilz G. P.** DNA microarray analysis: principles and clinical impact // *Hematology*. 2007. **12**, N 4. P. 271–287.

-
12. **Cui Y., Wei Q., Park H., Lieber C. M.** Nanowire nanosensors for highly sensitive and selective detection of biological and chemical species // *Science*. 2001. **293**, N 5533. P. 1289–1292.
 13. **Muller-Borer B. J., Collins M. C., Gunst P. R. et al.** Quantum dot labeling of mesenchymal stem cells // *Journ. Nanobiotechnol.* 2007. **5**, N 9.
 14. **Gill R., Zayats M., Willner I.** Semiconductor quantum dots for bioanalysis // *Angew. Chem. Intern. Ed.* 2008. **47**, N 40. P. 7602–7625.
 15. **Zhang C.-Y., Yeh H.-C., Kuroki M. T., Wang T.-H.** Single-quantum-dot-based DNA nanosensors // *Nat. Mat.* 2005. **4**, N 11. P. 826–831.
 16. **Sotiropoulou S., Chaniotakis N. A.** Carbon nanotube array-based biosensor // *Anal. Bioanal. Chem.* 2003. **375**, N 1. P. 103–105.

Поступила в редакцию 27 февраля 2010 г.
