

Київський національний університет імені Тараса Шевченка

Інститут високих технологій

Завідувач кафедри молекулярної біотехнології та біоінформатики

доц. Олексій Юрійович Нипорко

Протокол №_____засідання кафедри

від “_____” _____2021 р.

**СТВОРЕННЯ БІОСЕНСОРА НА ОСНОВІ ІОН-СЕЛЕКТИВНОГО
ПОЛЬОВОГО ТРАНЗИСТОРА ДЛЯ ДОСЛІДЖЕННЯ БІОМАРКЕРІВ
ПОТУ ЛЮДИНИ**

Випускна кваліфікаційна робота магістра
студента напряму підготовки

зі спеціальності 162 Біотехнології та

біоінженерія

ОП «Високі технології» (Біотехнологія)

Жоги Всеволода Сергійовича

Науковий керівник, д. ф-м. н., завідувач

відділу функціональних перетворювачів

для сенсорної техніки Інституту фізики

напівпровідників ім. В.Є. Лашкарьова

НАН України

Кукла Олександр Леонідович

Оцінка захисту роботи

Київ 2021 р.

Реферат

Ключові слова: БІОСЕНСОР, ГЛЮКОЗООКСИДАЗА, ЕЛЕКТРОД, ЕЛЕКТРОХІМІЧНИЙ ПЕРЕТВОРЮВАЧ, ІОН-СЕЛЕКТИВНИЙ ПОЛЬОВИЙ ТРАНЗИСТОР, НАПІВПРОВІДНИК, НІТРИД КРЕМНІЮ, НОСИМИЙ ПРИСТРІЙ, ПІТ, ПОТОВА ЗАЛОЗА, ПОТОВИДІЛЕННЯ, СЕЧОВИНА, УРЕАЗА, ФЕРМЕНТ

Дипломна робота другого (магістерського) рівня вищої освіти містить 53 сторінки, 7 таблиць, 26 рисунків, 2 додатки та 18 посилань на використані джерела інформації.

Актуальність теми дослідження обумовлено зростаючим попитом на персоналізовані засоби відстежування показників здоров'я і малу пропозицію на ринку аналітичних пристроїв для зразків поту людини.

Метою роботи є оцінка доречності використання іон-селективних польових транзисторів в парі з біологічним сенсорним елементом для дослідження зразків поту без пробопідготовки.

Завдання дослідження:

- дослідити літературні джерела на існуючі біомаркери поту та їх референтні значення;
- удосконалити методи відбору стабільних електродів на основі іон-селективних польових транзисторів;
- вибрати відповідну технологію іммобілізації активного сенсорного елемента на біологічній мембрані;
- визначити кореляційні залежності відгуку біосенсора на зміну концентрацій глюкози та сечовини;
- порівняти відгук біосенсора на вміст глюкози та сечовини в зразках поту з визначеними кореляційними залежностями.

Предмет дослідження - біомаркери в складі поту людини.

У дипломній роботі було використано наступні методи дослідження: метод кількісних і якісних оцінок, методи статистичного та регресійного аналізу.

Одержані результати в практичному значенні можуть слугувати кроком в розробці більш чутливих, стабільних та мобільних варіантів біосенсорів для визначення кількісного складу поту людини in-situ.

Зміст

Вступ.....	3
1. Теоретична частина.....	5
1.1. Об'єкт дослідження: піт та потовидільна система.....	5
1.1.1. Екринні залози.....	5
1.1.2. Апрокринні залози.....	7
1.1.3. Апоекринні залози.....	7
1.1.4. Сальні залози.....	7
1.2. Будова та функція екринних потових залоз.....	8
1.3. Предмет дослідження: біомаркери потовиділень екринних залоз	10
1.4. Засоби дослідження: біосенсори.....	15
1.4.1. Типи електрохімічних біосенсорів та їх відмінність.....	15
1.4.2. Обраний тип перетворювача: ІСПТ.....	17
2. Практична частина.....	21
2.1. Відбір працездатних та стабільних перетворювачів.....	21
2.1.1. Вимірювальний комплекс.....	21
2.1.2. Проведення первинних вимірювань.....	27
2.1.3. Аналіз первинних даних в програмному середовищі RStudio.....	30
2.2. Нанесення мембран для дослідження обраних біомаркерів поту...	32
2.3. Визначення рН-чутливості біосенсорів.....	34
2.4. Визначення концентраційної чутливості біосенсорів до глюкози та сечовини.....	36
2.5. Процедура збору зразків поту людини.....	44
2.6. Проведення досліджень зразків поту.....	44
Висновки.....	46
Посилання на джерела використаної інформації.....	47
Додаток	
А.....	48
Додаток Б.....	51

Вступ

Ми живемо у час, коли технологічний прогрес досяг такого рівня, щоб змінювати наше ставлення до догляду за здоров'ям. Люди звикли до стандартної поведінки, коли при суб'єктивному погіршенню самопочуття потрібно звертатись до лікаря, який в свою чергу проведе попереднє дослідження та відправить на більш детальне в спеціалізовані лабораторії, будь-то на гематологічні чи тканинно-структурні скринінги. Всі ці процедури потребують часу, переміщення хворого та загалом є реактивними.

Настав час людині самій забезпечити себе технологіями, що дозволить об'єктивно і постійно моніторити власний стан здоров'я та перевести лікування з реактивної фази до превентивної.

За останнє десятиріччя інтернет та смартфони стали доступною необхідністю для більшої частини світу. За цей час галузь носимих медичних пристроїв почала дуже стрімко розвиватись і у 2020 році показник обсягу цього ринку склав 16,6 млрд дол. США і прогнозується зростання валового показника ще на мінімум 26,8% до 2028 року [1]. Більше того, кількість публікацій на тему носимих пристроїв в бібліографічній базі даних PubMed також стрімко зростає саме в останнє десятиліття (Рисунок 1).

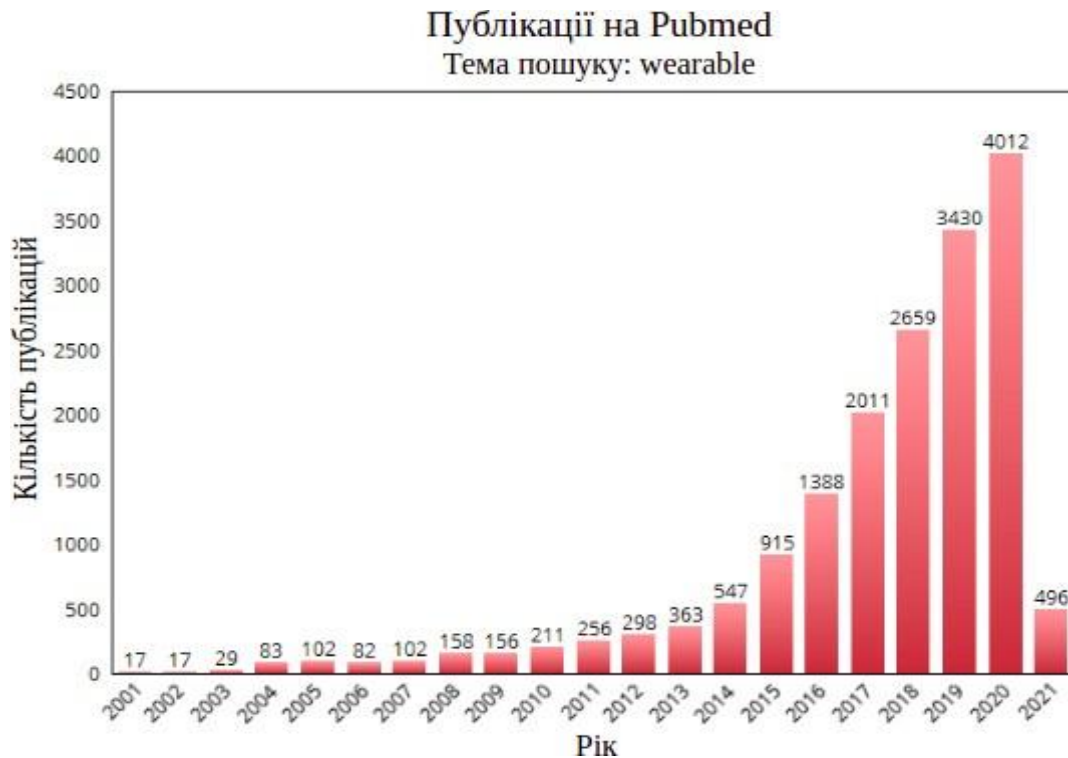


Рисунок 1. Гістограма публікацій на тему “wearable” в базі даних PubMed.

Хоча доступні носимі пристрої здебільшого відстежують такі показники, як частота серцевих скорочень та фізична активність, вони не можуть надати інформацію на більш глибокому, молекулярному рівні. Серед цих пристроїв окремим ешеленом йдуть електрохімічні біосенсори, бо їх використання повинно конкурувати з точними аналітичними методами, які вже стали золотим стандартом в отриманні якісних та кількісних даних. Розробка технології детекції та інтерпретації сигналів є викликом для вчених та інженерів, бо крім стабільної роботи мікроелектроніки треба досягти стабільності та відтворюваності біохімічного елемента, що виконує роль рецептора досліджуємого аналіту.

Існує кілька біорідин-кандидатів, але більшість з них мають обмеження щодо сенсорного зондування. Кров та інтерстиціальна рідина можуть постійно досліджуватися імплантованими пристроями, але важко отримати неінвазивний доступ до широкого спектру показників через носиму платформу. Сльози можуть бути незручним або ризикованим джерелом, а подразнення може викликати рефлекторні сльози, які можуть заважати. Датчики на основі дослідження сечі не можуть бути застосовані у форматі, який можна носити в повсякденному житті. Склад слюни дуже залежить від останнього прийому їжі. На відміну від перелічених рідин, піт представляє великі перспективи для неінвазивного аналізу. Його можна генерувати на вимогу (наприклад, за допомогою місцевої хімічної стимуляції) у зручних

місцях на тілі, що ідеально підходить для моніторингу. В таких випадках датчик розміщується на місці утворення поту людини, що дозволяє швидко оцінити аналіти перед біологічним розкладом або контамінації. Хоча піт представляє власні проблеми для надійного вимірювання та інтерпретації концентрацій біомаркерів, його переваги серед інших біорідин дає підстави на прикладання зусиль для розробки чутливих і стабільних біосенсорних структур та інтерпретування отриманих даних в загальну картину стану здоров'я людини.

В даній роботі буде розглянуто потовидільну систему, піт людини, як об'єкт дослідження, напівпровідникові перетворювачі ІСПТ, як основу для побудови біосенсорів та кількісний аналіз кількох біомаркерів поту.

1. Теоретична частина

1.1. Об'єкт дослідження: піт та потовидільна система

Випаровування поту з поверхні шкіри грає важливу роль в терморегуляції людини, і це найбільш очевидно коли під час напруженої фізичної роботи або перебуванню в спекотному навколишньому середовищі здатність до потовиділення порушується. Теплове виснаження або тепловий удар може трапитись у людей, що страждають від порушення потовиділення, через надмірне перебування в теплі, або що носять інкапсулюючий захисний одяг. В таких випадках температура тіла різко підвищується при фізичному навантаженні, якщо не забезпечити інші засоби охолодження. Терморегуляторна роль потовиділення загальноновизнана, але незважаючи на це поширеною є думка, що потовиділення має цілий ряд інших важливих гомеостатичних функцій, не пов'язаних з терморегуляцією. Наприклад, вважається, що потові залози виконують важливу функцію виділення, подібно нирковій системі, відповідаючи за виведення з організму надлишкових мікроелементів, метаболічних відходів і токсинів. Це переконання може спонукати людей займатися практиками спрямованих на те, щоб викликати

рясну втрату поту заради передбачуваної користі для здоров'я. Однак ефективність потових залоз як екскреторного органу для гомеостатичних цілей в даний час недостатньо ясна, оскільки все ще відсутні всебічні дослідження на цю тему. Інша поширена думка полягає в тому, що виділення певних компонентів з потом може призвести до порушень здоров'я, наприклад, до дисбалансу мікроелементів. Тому метою даної частини є огляд фізіології функцій потових залоз, включаючи типи потових залоз, їх структуру та механізми, що визначають кількість і склад поту, що виділяється на поверхню шкіри. Це забезпечить основу, необхідну для обрання найкращих біомаркерів для перевірки працездатності використовуваних біосенсорів та подальшу практичну користь від використання цього методу досліджень.

В 1933 році Мошер дав визначення терміну потовиділення, що є процесом утворення рідини на поверхні тіла, яка секретується потовими залозами. Потові залози - це тип екзокринних залоз, бо секреція рідини і речовин виділяється через протоку на зовнішню поверхню шкіри [2]. Вони є шкірними придатками, подібно волосяним фолікулам або сальним залозам. Ембріональний розвиток залоз починається коли епітеліальні клітини починають формувати протоку і залозу з диференційованих клітин.

У людини існує три типи потових залоз: екринні (мерокринні), апокринні та апокринні потові залози [3], що схематично зображені на рисунку 2. Екринні потові залози найбільш численні і розподілені майже по всій площі поверхні тіла і відповідають за найбільший обсяг виділення поту. На відміну від них, апокринні і апокринні залози відіграють меншу роль в загальному об'ємі виробленого поту, оскільки вони обмежені певними зонами і не щільно розподілені. Тим не менш, ці два типи необхідно брати до уваги, бо їх секреції можуть також впливати на склад поту, що збирається на поверхні шкіри.

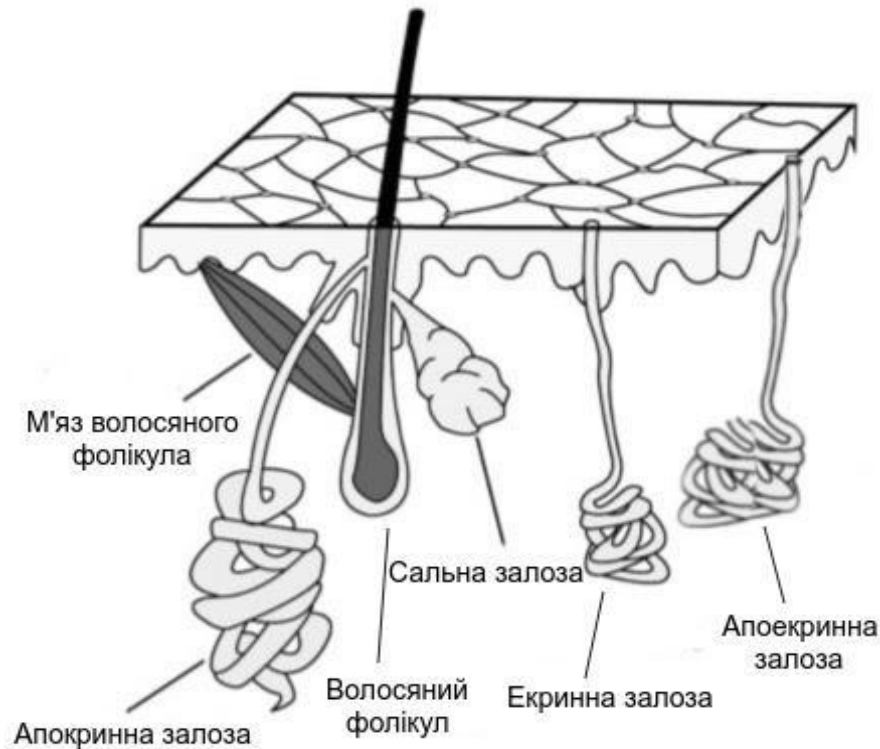


Рисунок 2. Схематичне зображення апокринної, екринної та апокринної залоз в товщі епідермісу.

1.1.1. Екринні потові залози

Екринні залози - перший тип потових залоз, що були описані в 1833-1834 роках, але сучасну назву отримали лише 100 років потому [4]. Екринні залози розташовані по всій поверхні тіла з самого народження, окрім головки статевого члена та губ [5]. Кількість цих залоз може варіювати від 1,6 до 5 млн. та розподілені по всій поверхні тіла із середньою щільністю 200 потових залоз на квадратний сантиметр. Щільність залоз не є рівномірною по всій площі поверхні тіла. Найбільша щільність залоз, згідно з літературними даними, на долонях і підошвах - 300-700 на квадратний сантиметр, а найменша на спині - приблизно 65 потових залоз на квадратний сантиметр [5]. Більш висока щільність потових залоз не обов'язково означає більш високу швидкість потовиділення, тобто це більше залежить від секреторної швидкості окремих залоз, ніж усієї сукупності активних залоз [6]. Піт з екринних залоз складається в основному з H_2O та $NaCl$, але також містить суміш багатьох інших речовин, що походять з інтерстиціальної рідини і самої екринної залози. Структура і функція екринних залоз і склад екринного поту будуть більш детально розглянуті в наступному підрозділі.

1.1.2. Апокринні потові залози

Апокринні залози - це другий тип потових залоз, котрі вперше були описані Краузе в 1844 році [4]. Апокринні потові залози розташовані переважно в пахвовій ділянці, на грудях, обличчі, волосистій частині голови та в промежині. Ці залози відрізняються від екринових залоз тим, що вони більші за розміром і виводяться у волосяні фолікули, а не на поверхню шкіри. Хоча всі потові залози формуються ще при народженні, секреторні властивості апокринних залоз проявляються лише в період статевого дозрівання.

Утворюють маслянистий непрозорий багатий ліпідами секрет, що також може містити білки, цукри та аміак. Іннервація апокринової залози ще недостатньо вивчена, але вже відомо, що залози стимулюються адренергічними та холінергічними подразниками [3].

1.1.3. Апоекринні потові залози

Апоекринні залози - це третій тип з сімейства потових залоз. Вони були відкриті та описані лише в 1987 році командою на чолі з проф. Сато Катсуюкі [3]. Апоекринні залози утворюються з екринних у віці 8 - 16 років під пахвами, мають середні розміри, вивідний канал виходить на поверхню шкіри (Рисунок 2). Функція та іннервація цієї залози все ще недостатньо вивчена, але на моделі *in vitro* встановлено, що апокринна залоза більш чутлива до холінергічних, ніж до адренергічних подразників.

1.1.4. Сальні залози

Ці залози хоч і не належать до потових, але вони відіграють важливу роль в утворенні секрету апокринних залоз, бо їх канали зв'язані (Рисунок 2). Сальні залози - це голокринні залози, які виділяють в'язку, багату ліпідами рідину, що складається з тригліцеридів, ефірів воску, сквалену, холестерину та ефірів холестерину. Виділення сальних і апокринних залоз виконують важливу терморегуляторну роль. У жарких умовах виділення емульгують екриновий піт і таким чином сприяють утворенню потової плівки, що перешкоджає втраті крапель поту зі шкіри. [7]

1.2. Будова та функція екринних потових залоз

Анатомія

Анатомічна структура екринних залоз представляє собою секреторний клубочок і протоку, що складається з трубчастого епітелія. Секреторний клубочок складається з трьох типів клітин: світлих, темних та міоепітеліальних. На Рисунку 3(в) показано світлі клітини, які відповідають за секрецію первинного поту. Світлі клітини містять систему міжклітинних каналців, відносно велику кількість активних мітохондрій і натрій-калієвих насосів. Темні клітини можна відрізнити по великій кількості темних гранул в цитоплазмі. Їх функція погано вивчена, але вважається, що вони потенційно можуть служити сховищем різних біологічно активних елементів, що беруть участь в регуляції функції світлих клітин і клітин протоки. Функція міоепітеліальних клітин відносно однакова в усіх екзокринних залозах, що полягає в забезпеченні структурної підтримки залози проти гідростатичного тиску та виконання ролі скорочувача для виведення рідини назовню. Сама протока складається з двох шарів клітин: базального і люмінального. Ці клітини поєднані між собою містками, що утворює суцільний синцитій. В протоці відбувається реабсорбція іонів Na і Cl в міру проходження поту через протоку, як показано на Рисунку 2,г, в результаті чого на поверхню шкіри виділяється гіпотонічний піт [8].

Фізіологічні процеси

Процес активації екринної залози починається з нейромедіатора ацетилхоліну (ACh) і його лігандного впливу на мускариновий рецептор (mAChR) на базолатеральній стороні світлої клітини (Рисунок 3,в). Після цього запускається каскад і Ca^{2+} притікає в цитоплазму клітини ззовні і з внутрішньоклітинного депо. Через надлишок іонів кальцію клітина позбувається K^+ з базолатеральної сторони і Cl^- з апікальної сторони клітини через калієві та хлорні канали відповідно. Цей процес провокує зморщення світлої клітини і до притоку іонів натрію, калію і хлора через котранспортер Na-K-Cl (NKCC) на базолатеральній стороні і послідовним Na^+ і K^+ витиком через натрій-калієвий і калієвий канали на тій самій стороні клітини. Таким чином, новий надлишок Cl^- знову виводиться з апікальної сторони в проксимальну протоку. Підвищений рівень Cl^- в люмені створює електрохімічний градієнт для іонів натрію, що викликає рух Na^+ через міжклітинні перетини. Виток KCl з клітини створює осмотичний градієнт для руху води в люмен через аквапоринові канали (AQP-5) [8].

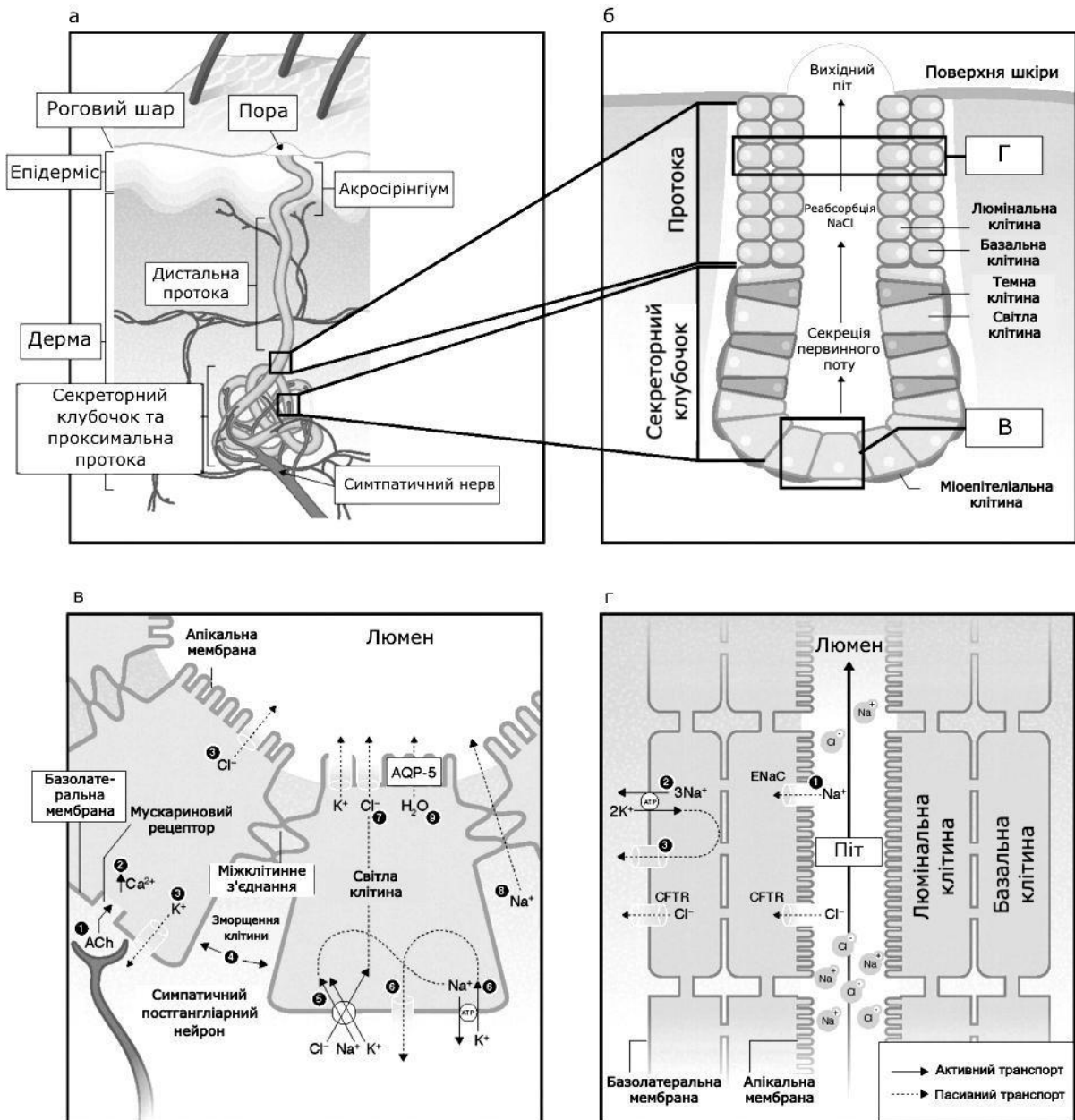


Рисунок 3. Будова екринної потової залози (панелі А - Б) та механізми секреції поту в секреторному клубочку (панель В) та реабсорбція Na і Cl в проксимальній протоці (панель Г). ACh - ацетилхолін; AQP-5 - аквапорин-5; CFTR - мембранний канал муковісцидозу; ENaC - епітеліальний Na-канал; NaCl - хлорид натрію.

Іонна реабсорбція

Пасивний транспорт Na^+ з люмена в клітину відбувається через амілорид-чутливі натрієві канали (ENaC), а виток у міжклітинний простір через натрій-калієві канали. Надлишковий калій, що утворюється в клітині в процесі активного переносу натрія, виводиться через калієві канали. Рух Cl^- з люмена в клітину і з клітини в міжклітинний простір відбувається здебільшого пасивно через муковісцедозні мембранні канали (CFTR), що схематично показано на

Рисунку 3(г). На активність базолатеральних натрій-калієвих каналів впливає гормон альдостерон. Потова протока також реабсорбує бікарбонат (HCO_3^-). Це відбувається напряду або через секрецію іонів водню. Загальна реабсорбція в протоці зворотно пропорційна швидкості потовиділення [8].

Керування потовиділенням

У людини потовиділення є насамперед засобом терморегуляції. Екринні потові залози в першу чергу реагують на теплові стимули; особливо на підвищення температури тіла, але температура шкіри і пов'язане з нею збільшення шкірного кровотоку також відіграють певну роль. Центральні і шкірні терморцептори сприймають підвищення температури, і ця інформація обробляється в преоптичній області гіпоталамуса для запуску судомоторної відповіді. Теплове потовиділення опосередковується переважно симпатичною холінергічною стимуляцією. Виділення поту стимулюється вивільненням ацетилхоліну з немієлінізованих симпатичних постгангліонарних волокон. Екринні залози також активуються у відповідь на адренергічну стимуляцію, але в набагато меншому ступені. Крім того, екскринових потові залози реагують на нетеплові стимули, пов'язані з фізичним навантаженням, і вважається, що вони опосередковуються механізмами зворотного зв'язку, пов'язаними з метабо- і механорецепторами м'язів, осморцепторами і, можливо, барорецепторами. Швидкість потовиділення в усьому тілі є продуктом щільності активних потових залоз і швидкості секреції кожної залози. Максимальна швидкість потовиділення у дорослої людини може досягати до 2–4 літрів на годину або 10–14 літрів на добу ($10\text{--}15 \text{ г / хв м}^2$) [8,9].

1.3. Предмет дослідження: біомаркери потовиділень екринних залоз

Піт людини - це дуже складна речовина і хоча він в основному складається з води і NaCl , також містить безліч інших розчинників в різній концентрації. В Таблиці 1 наведені деякі з найбільш часто досліджуваних компонентів та їх можливі діапазони концентрацій, що були виявленні в поті в ході багатьох дослідів [10]. В Таблиці 2 приведено інформацію про кореляцію компонентів поту з плазмою крові або інтерстиціальною рідиною, а також їх функціональну роль у здоров'ї. Важливо відзначити, що концентрації, перераховані в цих таблицях, є приблизними діапазонами і не призначені для відображення нормальних референсних діапазонів. В даний час немає достатніх даних, можливо, за винятком Na , Cl і K , щоб визначити нормативні

діапазони для компонентів поту. Замість цього зазначені діапазони покликані забезпечити певний контекст з точки зору відносного порядку величини концентрацій всіх складових в порядку від більш високих (наприклад, NaCl) до більш низьких концентрацій (наприклад, мікроелементи і важкі метали). Оскільки інтерстиціальна рідина є рідиною-попередницею для первинного поту, з цього випливає, що багато компонентів кінцевого поту походять з цього рідинного простору. Однак точні механізми секреції більшості компонентів, крім Na і Cl, в значній мірі невідомі. Потенційні механізми можуть включати активні або пасивні механізми транспорту (дифузія через мембрани або парацеллюлярний транспорт). Деякі компоненти з'являються в поті в результаті метаболізму потових залоз (наприклад, лактат) [11]. Інші ж (наприклад, антимікробні пептиди, протеолітичні ферменти), як вважається, виробляються потовими залозами і грають функціональну роль в здоров'я шкіри. Варто додати, що існує багато інших компонентів, які не були включені в таблиці, наприклад: кортизол, нейропептиди, брадикінін, циклічний АМР, ангіотензин і гістамін, але їх біологічна роль в потоутворенні ще не встановлена.

Таблиця 1. Мікро- і макро- компоненти поту. Референтні та кореляційні значення. Потенційні методологічні проблеми

Назва	Діапазон концентрацій	Кореляція з кров'ю	Коментарі
Натрій	10–90 ммоль/Л	Існує, але залежить від швидкості реабсорбції	Концентрація варіюється (до 2-3 разів) в залежності від швидкості потовиділення.
Хлор	10–90 ммоль/Л	Існує, але залежить від швидкості реабсорбції	Концентрація варіюється (до 2-3 разів) в залежності від швидкості потовиділення.
Калій	2–8 ммоль/Л	Змішані результати або занадто мало досліджень, щоб зробити висновок	Часто переоцінюється (до 2-3 разів) при використанні техніки “ручного мішка” через поверхневе забруднення
Кальцій	0,2–2,0 ммоль/Л	Немає	Завищення (до 3 разів) через [Ca] епідермального походження або залишки в протоці потових залоз
Магній	0,02–0,40 ммоль/Л	—	Завищення (до 3 разів) через поверхневе забруднення
Залізо	0,0001–0,03 ммоль/Л	Немає	Завищення (до 2-3 разів) через [Fe] епідермального походження або залишки в протоці потових залоз; високий вміст [Fe] в багатому клітинами поті
Цинк	0,0001–0,02 ммоль/Л	—	Завищення (до 2 разів) через поверхневе забруднення
Мідь	0,0005–0,02 ммоль/Л	—	Завищення (до 3,5 разів) через поверхневе забруднення
Лактат	5–40 ммоль/Л	Немає	Концентрація залежить від швидкості потовиділення. Забруднення поверхні шкіри через залишки лактата в протоці
Етанол	2–30 ммоль/Л	Існує пряма кореляція	В першу чергу походить з плазми. Детоксикація - недостатньо доказів. Випаровування етанолу під час збору поту
Глюкоза	0,01–0,20 ммоль/Л	Змішані результати або занадто мало досліджень, щоб зробити висновок	Можливе забруднення поверхні шкіри залишковою глюкозою в протоці

Продовження таблиці 1

Сечовина	4–12 ммоль/Л	Змішані результати або занадто мало досліджень, щоб зробити висновок	Концентрація залежить від швидкості потовиділення. Забруднення поверхні шкіри через залишкову сечовину в протоках. Переважно походить з плазми. Легко проникає через стінку залоз і клітинну мембрану, тому очікується, що концентрації сечовини будуть такими ж або трохи вище, ніж в плазмі. Однак виміряні концентрації в поті часто значно вище, ніж в плазмі; можливо, через синтезу сечовини залозою або проблем з поверхневим забрудненням.
Аміак	1–8 ммоль/Л	Змішані результати або занадто мало досліджень, щоб зробити висновок	Концентрація в 20-50 разів вище, ніж в плазмі, і обернено пропорційна швидкості потовиділення і рН. В першу чергу походить з плазми. Про виведення метаболічних відходів – недостатньо доказів. Забруднення поверхні шкіри залишковим NH_3 в протоці потових залоз і / або розкладання сечовини бактеріями на шкірі.
Бікарбонат	0,5–5,0 ммоль/Л	Змішані результати або занадто мало досліджень, щоб зробити висновок	Визначає рН поту. Концентрація змінюється в залежності від швидкості потовиділення. Таким чином, кінцевий рН поту нижче при більш низькій швидкості потовиділення.
Важкі метали (арсеній, свинець, ртуть, кадмій)	0,00002–0,00006 ммоль/Л	Немає	Концентрації в поті часто значно вище, ніж в плазмі. Детоксикація – недостатньо доказів. Забруднення поверхні шкіри епідермісом і / або виділеннями шкірного сала.
Антибіла та антимікробні пептиди	—	—	Механізм секретії неясний; продукуються екринними залозами. Захищає від інфекцій, контролюючи кількість патогенних бактерій на поверхні шкіри. Забруднення поверхні шкіри залишковими антибілами і антимікробними пептидами в потових протоках.
Інші білки (альбумін, α -глобулін, γ -глобулін,...)	—	—	Параклеточном транспорт, але шлях вивчений в повному обсязі; Передбачається, що це пов'язано з ремоделюванням щільних з'єднань. Концентрація залежить від швидкості

			потовиділення. Можливість забруднення епідермальним білком
--	--	--	--

Продовження таблиці 1

Цитокини (інтерлейкін-1 α , 1 β ,...)	—	Змішані результати або занадто мало досліджень, щоб зробити висновок	Походять від екринних залоз і плазми. Концентрація збільшується зі збільшенням швидкості потовиділення. Забруднення поверхні шкіри, як епідермального походження, так і залишковими цитокинами в протоках потових залоз
Амінокислоти	—	—	Секреторні механізми невідомі. Натуральні зволожувачі шкіри, підтримують цілісність бар'єру шкіри. Забруднення поверхні шкіри, як епідермального походження, так і залишковими амінокислотами в протоках потових залоз
Протеолітичні ферменти	—	—	Походить з екринних потових залоз і / або епідермісу. Концентрація збільшується зі збільшенням швидкості потовиділення. Підтримка і захист шкіри шляхом десквамації рогового шару, ддролізу сміття в протоках, припинення алергенів. Забруднення поверхні шкіри, як епідермального походження, так і залишковими протеолітичними ферментами в протоках потових залоз.
Стийкі органічні забруднювачі (хлорорганчні пестициди, поліхлоровані бфеніли)	—	Немає	Концентрації в поті часто значно вище, ніж в плазмі. Стийкими органічними забруднювачами є ліпофільними і тому можуть з'являтися на поверхні шкіри через виділення шкірного сала. Детоксикація – недостатньо доказів. Забруднення поверхні шкіри епідермісом і / або виділеннями шкірного сала.
Інші токсини (Бісфенол А, полібромовані дифенілові етери)	—	Немає	Концентрації в поті часто значно вище, ніж в плазмі. Детоксикація – недостатньо доказів. Забруднення поверхні шкіри епідермісом і / або виділеннями шкірного сала

1.4. Засоби дослідження: біосенсори

Важливим етапом в дослідженні аналітів є вибір вірної технології з точки зору забезпеченості необхідними засобами, точністю та чутливістю, економічної доцільності. Мета даної роботи в отриманні достовірних даних зі зразків поту, методами, що передбачають використання тих технологій, що можуть бути використані багаторазово і в подальшому імплементовані в носимі пристрої для постійного моніторингу стану організму. Біосенсорика - це галузь аналітичної біотехнології, де сходяться ці вимоги. Біосенсор складається з двох частин - біоселективного компонента, який відповідає за детектування і передачу інформації з біологічного домену в фізико-хімічний вихідний сигнал з визначеною чутливістю, та фізичного перетворювача, що відповідає за передачу цього сигналу до електричного домену та його перетворення на електричний сигнал, який можна реєструвати як відгук сенсору та аналізувати. Саме вибір відповідного перетворювача, що буде задовольняти поставленим вимогам і є основною темою даного підрозділу.

1.4.1. Типи електрохімічних біосенсорів та їх відмінність

Для того, щоб вірно інтерпретувати типи електрохімічних біосенсорів, рекомендації щодо визначення, класифікації та номенклатури було взято з технічного звіту Міжнародного союзу фундаментальної та прикладної хімії (IUPAC) [12].

Електрохімічний біосенсор - це самостійний інтегрований пристрій, який здатний надати конкретну кількісну або напівкількісну аналітичну інформацію за допомогою біологічного розпізнавального елемента (біохімічного рецептора), який утримується в безпосередньому просторовому контакті з елементом електрохімічної трансдукції. Існує декілька основних типів електрохімічного детектування:

- Амперометричний;
- Потенціометричний;
- Кондуктометричний;

Амперометричний метод заснований на вимірюванні сили струму, що виникає в результаті електрохімічного окислення або відновлення електроактивних речовин. Зазвичай це здійснюється шляхом підтримання

постійного потенціалу на робочому електроді на основі Pt, Au та С або масивів електродів відносно електрода порівняння, який також може служити допоміжним електродом, якщо струми низькі (10^{-9} до 10^{-6} А). Отриманий струм безпосередньо корелює з концентрацією електроактивних елементів або його швидкістю виробництва / споживання в прилягаючому біокаталітичному шарі. Оскільки швидкість біокаталітичної реакції часто обирають таким чином, щоб бути першочергово залежним від концентрації аналіту, такі стаціонарні струми зазвичай пропорційні концентрації аналіту.

Потенціометричні вимірювання передбачають визначення різниці потенціалів між індикатором та еталонним електродом або двома еталонними електродами, розділеними селективною мембраною, коли між ними не протікає значний струм. Перетворювачем може бути іон-селективний електрод (ІСЕ), який є електрохімічним датчиком на основі тонких плівок або селективних мембран як елементів розпізнавання. Найпоширенішими потенціометричними приладами є рН-електроди; доступні кілька інших іонних (F^- , I^- , CN^- , Na^+ , K^+ , Ca^{2+} , NH_4^+) або газо- (CO_2 , NH_3) селективних електродів. Потенційні різниці між цими індикаторними та еталонними електродами пропорційні логарифму активності іонів або швидкості руху газу (або концентрації), як описано рівнянням Нернста-Доннана. Це лише в тому випадку, коли: (і) селективність мембрани або шару нескінченна або якщо існує постійна або досить низька концентрація інтерферуючих іонів; та (ii) різниця потенціалів на різних фазових кордонах незначна або постійна, за винятком межі мембрани та розчину зразка.

Коли шар біокаталізатора розміщений поруч з потенціометричним детектором, слід враховувати, як і для будь-якого датчика біокаталізатора, наступне:

- транспорт субстрату, що підлягає аналізу, до поверхні біосенсора;
- дифузію аналіту до реакційного шару;
- реакцію аналіту в присутності біокаталізатора;
- дифузію продукту реакції як до детектора, так і до розчину.

Ще однією важливою особливістю біосенсорів на основі ІСЕ, таких як рН-електроди, є велика залежність їх реакції від буферної ємності зразка та від його іонної сили.

Важливою варіацією потенціометричних систем, що використовуються для визначення концентрації іонів, є *іон-селективний польовий транзистор* (ІСПТ). ІСПТ складається з іонно-селективної мембрани, накладеної безпосередньо на ізолюваний затвор ПТ. Принцип дії ІСПТ, як сенсорного елемента, заснований на зміні провідності каналу польового транзистора при

зміні концентрації певних іонів у розчині. Коли такі ІСПТ поєднуються з біокаталітичним або біокомплексним шаром, вони стають біосенсорами і зазвичай їх називають або ферментними (ФПТ), або імунологічними (ІПТ) польовими транзисторами. Робочі властивості пристроїв на основі ФПТ та ІПТ тісно пов'язані з властивостями біосенсорів на основі ІСЕ.

Багато ферментних реакцій, таких як реакція уреазі, та багато рецепторів біологічних мембран можуть контролюватися за допомогою *іонно-кондуктометричних* або *імпедиметричних приладів* за допомогою зустрічно-гребінчастих мікроелектродів. Оскільки чутливості вимірювання заважає паралельна провідність розчину зразка, зазвичай проводять диференціальне вимірювання між датчиком з ферментом та ідентичним без ферменту.

Таблиця 2. Типи електрохімічних перетворювачів для класифікованих типів вимірювань із відповідними аналітами, що підлягають вимірюванню

Тип вимірювання	Перетворювач	Аналіт
1. Потенціалометричний	іон-селективний електрод (ISE); скляний електрод; газовий електрод; металевий електрод	K ⁺ , Cl ⁻ , Ca ²⁺ , F ⁻ , H ⁺ , Na ⁺ ,... CO ₂ , NH ₃ ; окисно-відновні аналіти
2. Амперометричний	металевий або вуглецевий електрод; хімічно-модифіковані електроди(СМЕ)	O ₂ , цукри, спирти,...; цукри, спирти, феноли, олігонуклеотиди,...
3. Кондуктометрична, імпедиметрична	зустрічно-гребінчасті електроди; металевий електрод	Сечовина, заряджені молекули, олігонуклеотиди,...
4. Іонний заряд або ефект поля	іон-селективний польовий транзистор (ІСПТ); ферментний ПТ (ФПТ)	H ⁺ , K ⁺ , ...

1.4.2. Обраний тип перетворювача: ІСПТ

Як досліджуваний варіант фізичного перетворювача обрані іон-селективні польові транзистори, принцип діє яких детально описаний в роботі [13]. В цій роботі було проаналізовано фізико-технологічні обмеження, що виникають при побудові інтегральних сенсорних масивів на основі іоноселективних польових транзисторів, виконаних для р-канальної МДН-

технології на єдиній кремнієвій підкладці. При розробці даного сенсорного масиву особливу увагу було приділено усуненню головних недоліків типових ІСПТ, які суттєво обмежують використання цих приладів в широкій практиці - це проблеми з герметизацією, швидким старінням приладу і взаємовпливу сусідніх сенсорних елементів. Показано, що оптимальний вибір як конструктивно-технологічних, так і електричних параметрів сенсорного масиву дозволяє отримати необхідну стабільність і відтворюваність вихідних сигналів всіх сенсорних каналів, забезпечуючи надійну роботу приладу в цілому.

З точки зору побудови мультисенсорів - потенціометричні транзисторні польові структури представляються доволі перспективними, оскільки вони мають гарну чутливість, високу швидкодію, малі розміри, сумісність зі стандартними мікроелектронними технологіями і придатністю для масового виробництва.

З приладової точки зору ІСПТ можна інтерпретувати, як спеціальний тип МДП-транзистора, в якому видалений металевий затвор, а діелектричний шар приведено в контакт з розчином (електролітом), через який до структури прикладається зовнішня напруга. Для придання хімічної чутливості до певної речовини безпосередньо на затворний діелектрик наносять хімічно селективну мембрану. Деякі з твердотільних діелектричних матеріалів самі можуть виступати в якості чутливих мембран. В нашому випадку це нітрид кремнію (Si_3N_4), що селективно реагує на іони водню.

Характеристики реальних ІСПТ-структур істотно залежать від якості затворного діелектрика, зарядів в оксиді і поверхневих пасток на межі поділу оксиду з кремнієм. Для реалізації рН-чутливих ІСПТ як затворного діелектрика найчастіше використовується "сендвіч" з оксиду і нітриду кремнію. Використання переваг оксиду і нітриду кремнію (а саме, малої щільності поверхневих електронних станів в оксиді і високою рН-чутливості і хімічної стійкості нітриду кремнію [14]) дозволяє досягти необхідної якості затворного шару. В наступній роботі [15] запропонована технологія розробки диференційних ІСПТ-сенсорних елементів, котрі і були використані в даному дослідженні.

Щоб отримати високу стабільність і довготривалу надійність сенсорних елементів та відсутності їх взаємовпливу в складі багатоканального масиву було обрано р-канальну МДН-технологію на кремнієвих підкладках КЕФ-4,5 з кристалізацією $\langle 111 \rangle$ або $\langle 100 \rangle$ та з формуванням підзатворного діелектричного шару із отриманої термічним окисленням плівки SiO_2 товщиною 50 нм та осадженої в реакторі зниженого тиску плівки Si_3N_4 товщиною 50-70 нм.

Необхідність забезпечення вільного та зручного доступу до активної чутливої (затворної) області сенсорних елементів для нанесення на них біомембран є загальною топологічною особливістю всіх конструкцій ІСПТ, що направлені на роботу в біохімічних лабораторіях. (Рисунок 4).

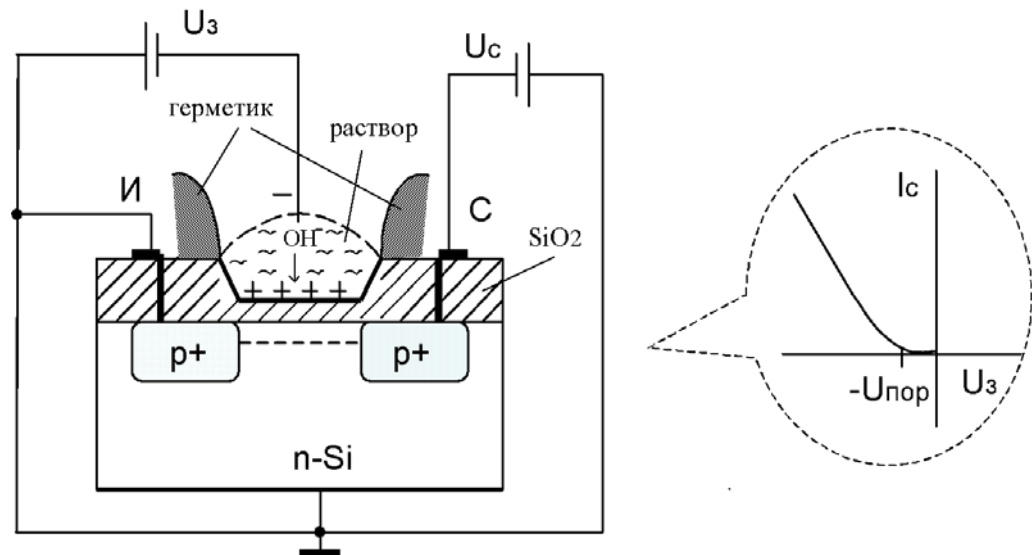


Рисунок 4. Схематичне зображення типового p -канального ІСПТ, затвор якого приведено в контакт з розчином електроліту.

Топологія приладу передбачає розміщення двох ідентичних p -канальних транзисторів на одному кристалі загальною площею 8×12 мм. Схематичне зображення топології диференційного сенсора показано на Рисунку 5. Дифузійні p^+ -шини з контактами до стоку і виток кожного з транзисторів виведені на край чипа. Для усунення можливості утворення паразитного каналу провідності між p^+ областями двох транзисторів, чип містить захисну роздільну n^+ область шириною 50 мкм з контактом до підкладки. Гребінчаста геометрія затворної області транзистора з відношенням довжини каналу до його ширини $100:1$ забезпечує достатній рівень крутизни перехідної характеристики.

Вікно в шарі окислу, яке витравлюється для вирощування затворного діелектрика повторює геометрію каналу з перекриттям 7 мкм. Для усунення можливості виникнення дефектів при відкриванні контактних вікон перед напилюванням алюмінію, було використано двох-стадійне травлення окремо шарів нітриду кремнію і окислу. Для цього була введена додаткова операція фотолітографії та додані відповідні елементи топології на фотошаблоні.

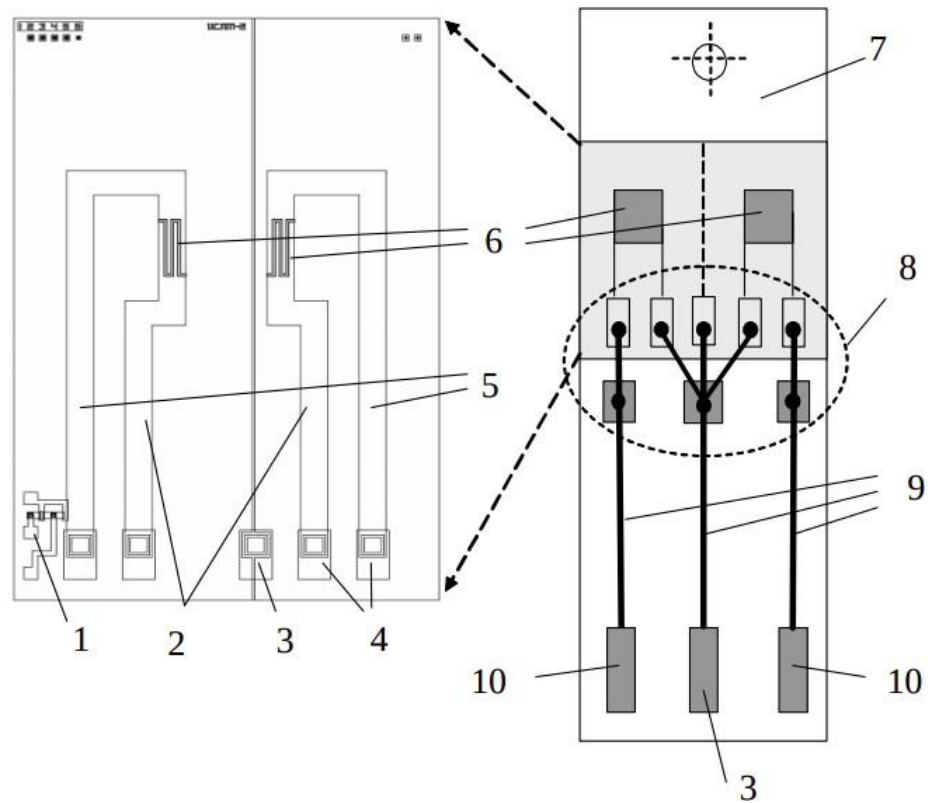


Рисунок 5. Контурний вигляд топології диференційної пари ІСПТ (а) та конструкція електроду (б): 1 - два тестових МДН-транзистори з металевими затворами; 2, 5 - p^+ -дифузійні шини від областей витоку і стоку кожного із транзисторів; 3 - контакт до n -підкладки (в центрі), об'єднаний з виводами витоків транзисторів; 4 - алюмінієві контактні острівці до транзисторів, виведені на край чипа; 6 - гребінчасті області затворів; 7 - монтажна плата; 8 - область герметизації; 9 - друковані провідники; 10 - контакти до витоків транзисторів.

Виготовлені польові транзистори мають наступні параметри:

- пробивна напруга p - n переходів біля 50 В;
- напруга живлення на канал в режимі насичення -5 В
- гранична напруга (відкриття) для активних транзисторів біля -2 В;
- гранична напруга для паразитних транзисторів біля -15 В;
- струм витоку через затворний діелектрик на рівні 10^{-12} А.

2. Практична частина

Створення біосенсорів, зокрема для дослідження маркерів поту на основі ІСПТ, потребують ретельного опрацювання певних задач. По-перше, вивчення, розвиток та проведення сучасних методів відбору працездатних та стабільних потенціометричних електродів через вимірювання вольт-амперних, кінетичних, дрейфових та рН-чутливих характеристик. Питання актуальне з огляду на те, що на перший погляд працездатні електроди насправді мають певні дефекти характеристик, що в подальшому відгукується у спроможності достовірно інтерпретувати результати в біосенсорних дослідженнях. Нестабільність порогової напруги, дрейф базової лінії, повільна швидкість релаксації поверхні на зміну рН розчину, нерівномірність вольт-амперних характеристик та велика різниця у величинах струмів у обох каналах диференційної пари - саме ці фактори повинні бути зареєстровані для подальшого вибракування досліджуваного ІСПТ. По-друге, метрологічні вимірювання для визначення залежності зміни провідності каналу від зміни рН досліджуємого розчину. По-третє, відбір релевантних біомаркерів поту для проведення досліджень, що підтверджують працездатність методу аналізу біологічного матеріалу через вимірювання біосенсором на основі обраного типу ІСПТ.

2.1. Відбір працездатних та стабільних перетворювачів

Для відбору працездатних та стабільних потенціометричних електродів на основі ІСПТ через вимірювання вольт-амперних, кінетичних, дрейфових та рН-чутливих характеристик було використано два прилади: СТ-2 та MES 5.5.

За основний референс для проведення відбору використовувалась стаття з метрологічних досліджень даного типу ІСПТ [16].

2.1.1. Вимірювальний комплекс

Характеріограф транзисторів СТ-2

Характеріограф СТ-2 (Рисунок 6) призначений для автоматизованої реєстрації вольт-амперних характеристик p -канальних іон-селективних польових транзисторів або інших керованих напругою пристроїв, що мають схожі електричні параметри.

Характеріограф оснащений двома незалежними каналами формування керуючої напруги (зокрема одне значення напруги може прикладатися одночасно до двох зразків) і двоканальним вимірювачем струму. Модуль керування реалізовано на основі мікроконтролера ATmega16, що має вбудовані АЦП, які використовуються для вимірювання струму в каналах транзисторів. Напруга стік – витік та напруга на затворі задається за допомогою двох ЦАП, які були створені з використанням вбудованих АЦП та додаткових зовнішніх резисторів і конденсаторів. Реєстрація характеристик і регулювання робочих параметрів здійснюється за допомогою програмного забезпечення, що працює на зв'язаній ЕОМ. Сполучення здійснюється по послідовному інтерфейсу RS-232. Генерована приладом тестова напруга є негативною щодо загальної точки (підкладки або витоку зразка).

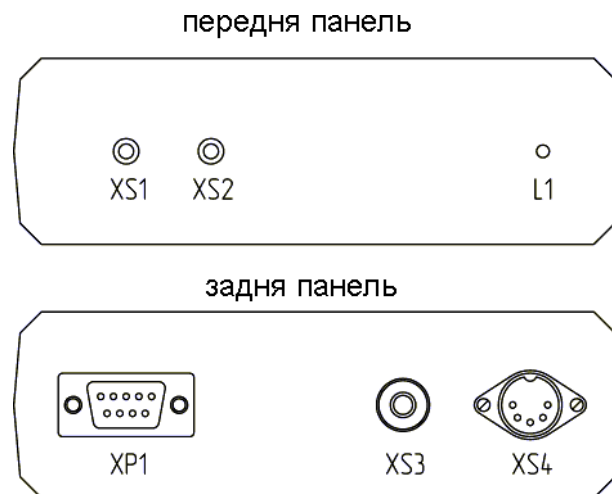


Рисунок 6. Зовнішній вигляд і призначення елементів приладу СТ-2: XS1 (TRS-3.5) – роз’єм для підключення виводів стоку і підкладки зразка; XS2 (TS-3.5) – технологічний роз’єм; L1 – індикатор наявності живлення; XP1 (DE-9) – роз’єм для з’єднання з послідовним портом ПК; XS3 – клемма для підключення затвора зразка (електроду порівняння у разі ІСПТ); XS4 (DIN-5-180) – роз’єм для підключення джерела живлення.

Основні технічні характеристики характеріографа приведені в таблиці 3.

Зразок для тестування підключається до приладу за допомогою роз’ємів XS1 і XS3. При використанні зразків в конструктивному виконанні датчиків аналізатора ІСПТ, підключення здійснюється комплектним сполучним кабелем без додаткових адаптерів. Електрод порівняння слід підключати після підключення зразка. Для інших зразків рекомендується наступний порядок підключення: першим приєднується контакт витоку/підкладки, далі контакти стоку і останнім контакт затвора. Відключення зразка проводиться в зворотному порядку.

Таблиця 3. Основні технічні характеристики характеріографа СТ-2.

Параметр	Значення
Діапазон формованої напруги, В	0,5...8,5
Гранична здатність навантаження формувача напруги, мА	10
Діапазон вимірюваних струмів, мкА	8..2400
Похибка формування напруги	± 0.1 В в діапазоні 0,5-8,5 В ± 0.05 В в діапазоні 1,0-7,0 В
Похибка вимірювання струму	± 2 мкА або $\pm 1\%$ залежно від вимірюваного значення
Роздільна здатність ЦАП, двійкових розрядів	10
Ефективна роздільна здатність АЦП, двійкових розрядів	11,9
Максимальна кількість реєстрованих відліків характеристики	100
Час реєстрації одного відліку, сек	$2 \pm 0,5$

Контроль і управління роботою характеріограф здійснюються програмно із зв'язаної ЕОМ. Програмне забезпечення (ПЗ) приладу виконує наступні функції:

- установка діапазонів розгортки керуючої напруги і кількості реєстрованих відліків характеристики;
- візуалізація зареєстрованих характеристик, зокрема одночасна візуалізація декількох (до п'яти) характеристик;
- запис зареєстрованих характеристик в постійну пам'ять ПК (на жорсткий диск або зовнішній носій даних) у вигляді текстового файлу;

Запуск реєстрації ВАХ з автоматичною розгорткою напруги в заданих діапазонах здійснюється натисканням на кнопки Start в головному вікні програми (Рисунок 7). Індикатор прогресу в рядку стану при цьому відображає відносну кількість зареєстрованих відліків. Вольт-амперна характеристика автоматично графічно візуалізується в процесі реєстрації. За допомогою

перемикачів X axis і Y axis в головному вікні можна змінювати параметр, що відображається на вісі абсцис (напруга затвора або напруга стоку) і відключати по вибору візуалізацію одного з вимірювальних каналів (I0 та I1). Значення струмів, що виходять за межі номінального діапазону вимірювання характеріографа (Таблиця 3) візуально не відображаються, а в таблиці у відповідні позиції в цьому випадку замість чисельних значень записуються спеціальні маркери.

Процедура реєстрації може бути при необхідності передчасно зупинена клацанням миші на кнопці Stop у головному вікні програми.

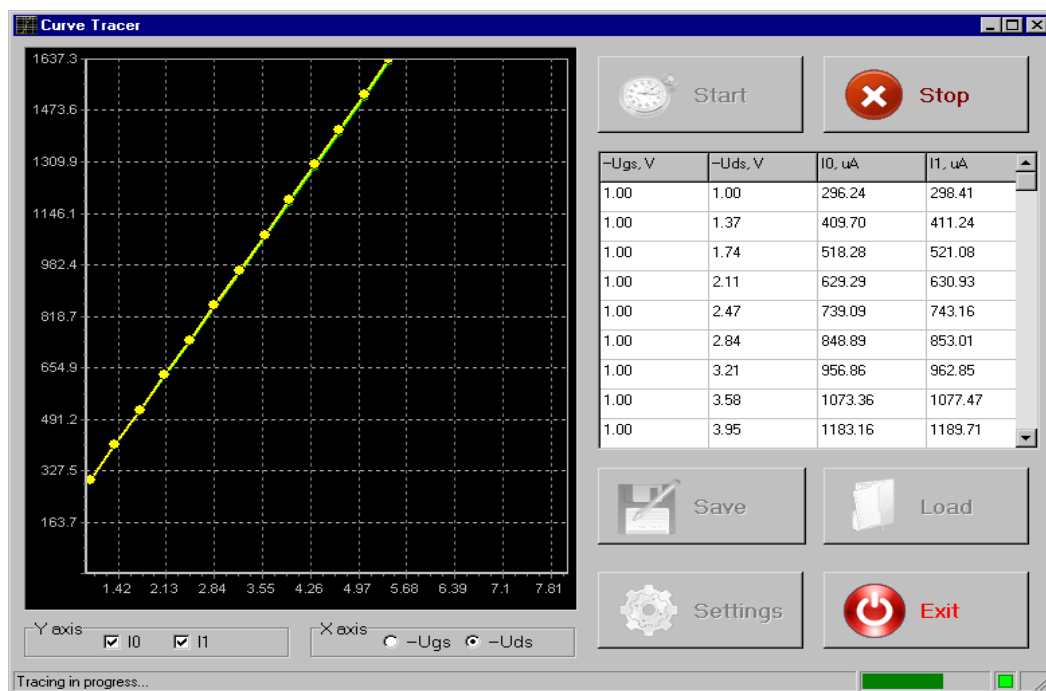


Рисунок 7. Вид головного вікна програми в процесі реєстрації ВАХ.

Після закінчення реєстрації значення відліків характеристики можна зберегти у вигляді текстового файлу за допомогою кнопки Save в головному вікні програми. Формат збереження файлу - двовимірний масив, розділений табуляцією.

Вимірювальний перетворювач MES 5.5

Вимірювальний двоканальний перетворювач MES-5.5 (Рисунок 8, 9) призначений для реєстрації величини сили струму в каналах здвоєних р-канальних протон-чутливих польових транзисторів (при контрольованій нарузі на стоці), автоматичного перетворення зареєстрованих значень в одиниці рН (при наявності необхідної калібрувальної інформації), і передачі

отриманої вимірювальної інформації в пов'язану ЕОМ для подальшого запису, обробки та зберігання.

Прилад працює з датчиками, що мають об'єднані виводи витоків і підкладки, і роздільні виводи стоків. Контрольована керуюча напруга прикладається до виводу витоків / підкладки щодо загальної точки вимірювальної схеми. Для фіксації потенціалу аналізованого розчину використовується хлорсрібний електрод порівняння, також з'єднаний із загальною точкою вимірювальної схеми. Прилад дозволяє формувати керуючу напругу (задається оператором безпосередньо з панелі управління або програмно з сполученої ЕОМ) в діапазоні 0..6 В з кроком ~ 25 мВ. Діапазон вимірюваних струмів становить 350..650 мкА, що при первинній рН-чутливості датчиків ~ 50 мВ/рН, пороговій напрузі ~ 2.5 В і крутизні передавальної характеристики ~ 800 мкСм дозволяє проводити вимір рН в діапазоні 4..10 (6 декад) з дозволом ~ 0.05 рН.

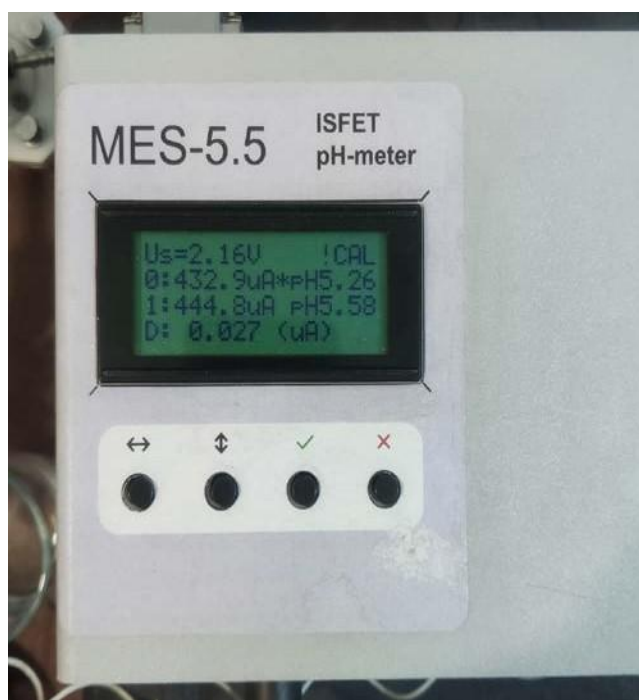


Рисунок 8. Вигляд вимірювального перетворювача MES-5.5 в робочому стані.

Підключення датчиків і електродів порівняння до приладу здійснюється після включення живлення. Рекомендується підключати електрод порівняння і датчик, встановлені в кюветі-пробоприймачі, заповненої зразковим або калібрувальним розчином, безпосередньо після включення, щоб прогрів приладу відбувався при наявності ненульового струму в каналі ІСПТ.

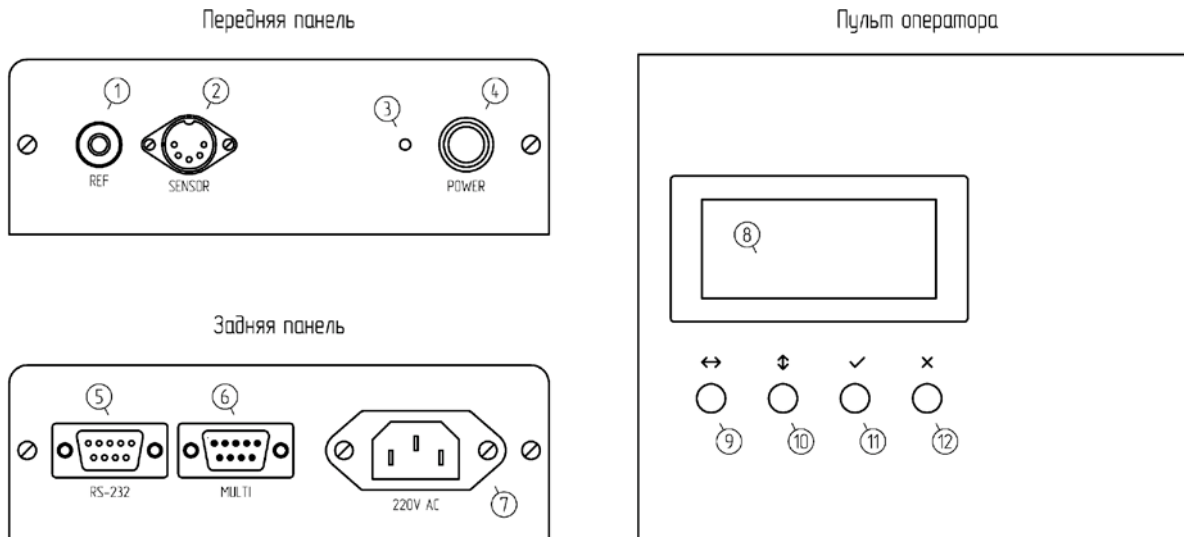


Рисунок 9. Загальний вигляд вимірювального перетворювача MES-5.5. Цифрами позначені: 1 - клемма підключення електроду порівняння; 2 - роз'єм підключення датчика; 3 - індикатор наявності вторинного електроживлення / готовності; 4 - вимикач первинного електроживлення; 5 - роз'єм інтерфейсу сполучення з керуючою ЕОМ; 6 - роз'єм інтерфейсу послідовної шини; 7 - приєднувальний роз'єм шнура первинного електроживлення; 8 - алфавітно-цифровий індикатор; 9 - клавіша переміщення курсора / перегортання сторінок; 10 - клавіша інкремента числового значення / переміщення покажчика меню; 11 - клавіша введення / підтвердження вибору; 12 - клавіша скасування вибору / виклику меню.

Основними функціями, виконуваними перетворювачем MEM-5.5, є такі:

- відображення на алфавітно-цифровому індикаторі поточних значень вимірюваних величин (Рисунок 10) (струмів у каналах датчиків, величин рН при наявності калібрувальної інформації);
- відображення відносної різниці струмів в каналах датчика, з можливістю корекції зсуву і детектування максимуму;
- відображення поточної величини напруги, прикладеного до датчика;
- відображення допоміжної інформації про стан приладу, в тому числі інформації про хід тестування в процесі самодіагностики;
- реєстрація та інтерпретація запитів, що вводяться оператором з пульта;
- обмін вимірювальною і керуючою інформацією з сполученою ЕОМ.

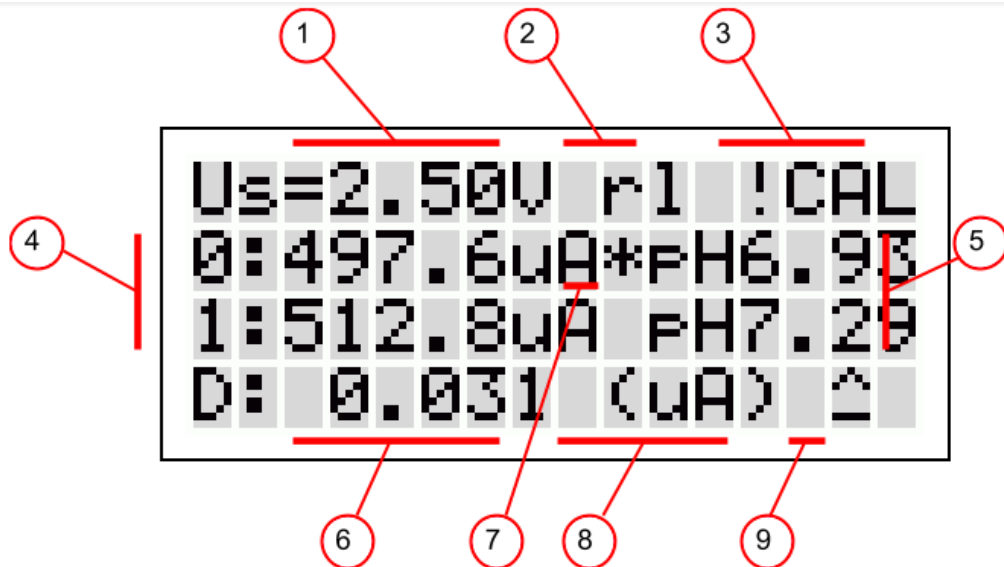


Рисунок 10. Загальний вигляд алфавітно-цифрового індикатора пульта оператора в режимі безперервних вимірювань (основному режимі функціонування приладу). Цифрами позначені поля виведення інформації: 1 - робоча напруга датчика; 2 - вказівник підключення вбудованого зразкового навантаження; 3 - попередження / повідомлення про помилку; 4 - значення сили струму в нульовому і першому каналах датчика; 5 - розрахункові значення рН в нульовому і першому каналах датчика; 6 - відносна різниця сигналів в нульовому і першому каналах датчика; 7 - вказівник опорного каналу; 8 - одиниці виміру, використані для обчислення відносної різниці сигналів; 9 - вказівник режиму відображення відносної різниці сигналів.

Вихідний файл вимірювань - це двовимірний масив розділений табуляцією, що має розширення .dat.

2.1.2. Проведення первинних вимірювань

Проведення дослідження починається з обрання зі сховища представлених електроди в довільному порядку, котрі підлягають подальшому тестуванню. Перед початком роботи треба перевірити все устаткування, обрати єдиний аналітичний буфер для всіх подальших вимірювань, а також два стабільних хлорсрібних електроди порівняння. Для проведення первинних досліджень було обрано комерційний аналітичний буфер зі значенням рН 7.00 фірми InLab Solutions. Хлорсрібні електроди порівняння обирались шляхом перевірки їх найменшого розкиду напруги. Далі обрані ІСПТ-електроди розміщувались в спеціально розробленій куветі та заповнювались аналітичним буфером. Далі за процедурою (Розділ 2.1.1) приєднувались робочі кабелі та електрод порівняння, який робочою стороною був занурений в аналітичний розчин (Рисунок 11).



Рисунок 11. Приєднаний ІСПТ-електрод в кюветі з аналітичним розчином до характеріографа та з зануреним хлорсрібним електродом порівняння.

Первинні результати вимірювання електродів за допомогою характеріографа дозволяють швидко вибракувувати ті, що не відповідають поставленим умовам:

- не мають сигналу хоча б в одному із каналів;
- мають нерівномірне лінійне зростання показника струму від прикладеної напруги;
- кутовий коефіцієнт зростання має значення менше 0,75

Загалом було проведено 50 тестових вимірювань і для подальшої діагностики було відібрано 30 електродів.

Важливим показником для відібраних сенсорів є значення робочої напруги при якій величина струму каналів в нейтральному розчині дорівнює 500 ± 5 мкА, що дозволяє в повній мірі використовувувати діапазон вимірюваних струмів в ± 150 мкА в MES 5.5 при зміні кислотності буферу.

Подальша діагностика сенсорів за допомогою приладу MES 5.5 є найбільш тривалим процесом з огляду на те, що кожен електрод повинен вимірюватись не менше 90 хвилин для релевантного визначення показників дрейфу вихідного струмового сигналу кожного датчика і різниці між ними (диференційний відгук) [16]. Окрім цього, важливими показниками є рівень

шуму вихідного сигналу і його лінійна залежність від різних показників рН розчину при прикладанні робочої напруги.

На етапі проведення вимірювань вівся журнал досліджень, де записувались основні дані досліджуємого електрода, місцезнаходження збереженого файлу, кількість вимірювань і загальні коментарі (Рисунок 12).

04.03.21

Продовжуються вимірювання і відбір перспективних транзисторів.

Двоє діб транзистори 16217 и 15617 відмочувались в ФБ. Подивимось на зміну їх характеристик.

Кювета	Транзистор	Електрод	U в I ~ 500мкА	Назва папки	Всього вимірів
N1	16217	n2	2.58(Δ~14)	7	2
N3	15617	n3	2.34(Δ~15)	7	2
N1	089311	n2	1.9(Δ~52)	7	4
N3	15217	n3	2.3(Δ~7)	7	1
N1	7217	n2	2(Δ~28)	7	4
N3	5617	n3	2.6(Δ~20)	7	3

Написано зручний код для швидкого відбору транзисторів. Залишилось внести критерії відбору, щоб процедура відбору була автоматизована.

Рисунок 12. Вигляд робочого журналу досліджень в Google Docs.

Вимірювання величини сили струму в каналах починається із задання робочої напруги на електрод порівняння, що може відрізнитись від дослідженої на попередньому етапі через релаксаційні процеси на чутливому до протонів шарі нітриду кремнію. Після запуску, процес реєстрації сигналу продовжується до моменту, допоки не вичерпається заданий час або не буде перервано в ручному режимі. В обох випадках дані зберігаються в буфері програми.

Вихідний файл пристрою MES 5.5 несе в собі інформацію про дискретний час вимірювань, величини струмів обох каналів та їх диференційний показник (опціонально), що зберігається у двовимірному масиві даних (Рисунок 13). Це є невичерпною інформацією для подальшої обробки даних, так як величина робочої напруги ніде не зберігається, тому для більш ефективної автоматизованої роботи в програмному комплексі був розроблений зручний формат назви цільового файлу з розширенням .dat (Рисунок 14).

1	time_s	chan_0	chan_1
2	0	464.885773549818	550.934554037622
3	0.5	464.752735855804	550.808382805236
4	1	464.651169444246	550.707388598813
5	1.5	464.497246262785	550.547457263429
6	2	464.400257492311	550.446749159574
7	2.5	464.274944567627	550.331163722194
8	3	464.107288462914	550.196123310207

Рисунок 13. Вигляд даних розширення .dat (показано перші 3 секунди вимірювань)

089311gbgluc_n2_time_60_min_U_460.dat

Рисунок 14. Приклад шифрування назви вихідного файлу з ПЗ “Multisensor Workstation”, де 089311 - індифікатор транзистора; gb - тип біосенсора (опціонально); gluc - тип дослідження (опціонально); n2 - ідентифікатор обраного електрода порівняння; time_60 - час виміру в хвиликах; U_460 - робоча напруга (В*100).

2.1.3. Аналіз первинних даних в програмному середовищі RStudio

R - мова програмування і програмне середовище для статистичних обчислень, аналізу та відображення даних у графічному вигляді (Рисунок 15). R належить до інтерпретованих мов програмування і для роботи використовується командний інтерпретатор.

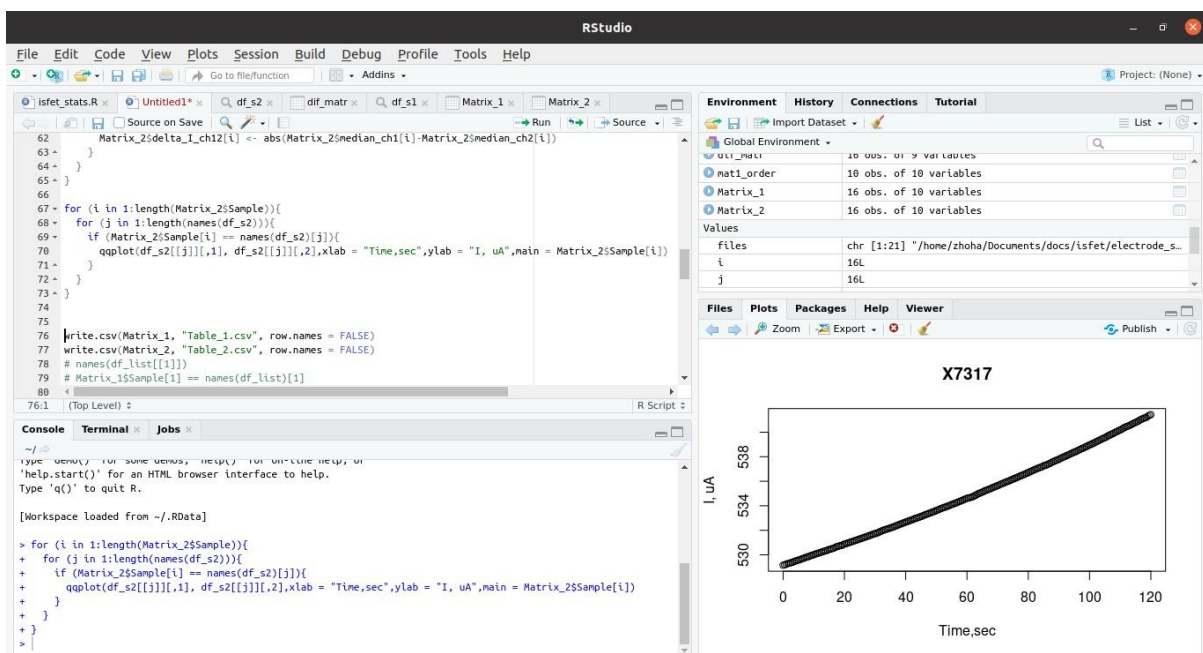


Рисунок 15. Інтерфейс програмного середовища RStudio.

Дані файла з розширенням .dat мають двовимірну структуру, тому легко можуть бути інтерпретовані програмою. Для того, щоб отримати вичерпну інформацію про дослідження кожного електрода, дані з назви файлів були інтегровані в зведену таблицю за допомогою написаної функції “datalist”, що автоматизує процес і не потребує мануального введення описаних показників (Додаток А). Ці дані в подальшому допомагають виділяти зміни в прикладеній робочій напрузі по кожному окремому електроду, що виникають в разі релаксаційних процесів або при нанесенні біологічних мембран та час, який був витрачений на вимірювання.

Далі виконуються статистичні обрахунки, що допомагають виділити такі важливі параметри, як дрейф базової лінії, швидкість релаксації поверхні на зміну рН розчину та рівень шуму сигналу.

Маючи статистичні дані проводиться відбір найкращих електродів. Спочатку відбраковувались ті, що мали завелику дельту в значеннях струму між каналами (>60 мкА). Після рекомендованих в [16] 1,5 год. для нормалізації дрейфових явищ робились повторні заміри електродів. Всі електроди, що мали завеликий розкид та мали артефактні стрибки струму посеред вимірювання - відбраковувались. Після повторних досліджень в різні дні - було обрано лише 5 електродів для подальших робіт з підготовки біосенсорів для аналізу біомаркерів поту людини: №№ 089311, 078311, 109311, 15217, 014411.

Для того, щоб в подальшому оцінити відгук підготовлених біосенсорів на додавання аліквот з відомими концентраціями обраного біомаркера, необхідно провести вимірювання обраних біосенсорів на підготовленому 5 мМ фосфатному буфері, який підходить для подібних вимірів. Зведені дані представлені в Таблиці 4.

Таблиця 4. Зведені дані по обраним електродам виміряних на 5 мМ фосфатному буфері з рН 6,5. U - прикладена робоча напруга; R_ch* - різниця між мінімальним і максимальним значенням струму в каналі; IQR_ch* - міжквартильний діапазон струму; med_ch* - медіана значень струму за час вимірювання.

Sample	Time	U	R_ch0	R_ch1	IQR_ch0	IQR_ch1	med_ch0	med_ch1	R_ch01	IQR_ch01	med_ch01
X014411	60	1.99	4.261	5.883	1.216	1.885	489.933	496.169	1.863	0.629	-6.321
X078311	60	1.71	147.241	155.588	5.391	5.738	489.923	497.878	11.531	0.319	-7.929
X089311	60	1.88	6.871	6.812	0.553	0.451	526.413	471.999	0.313	0.113	54.385
X109311	60	1.86	49.032	47.934	2.22	2.19	503.199	486.077	1.098	0.054	17.118
X15217	60	2.38	167.58	154.292	5.515	3.894	506.245	495.405	60.701	1.606	10.835

З таблиці видно, що відібрані електроди є цілком стабільні і підпадають під обрані критерії відбору.

2.2. Нанесення мембран для дослідження обраних біомаркерів поту

Критерії відбору біомаркерів спираються на два моменти. По-перше, це матеріальне забезпечення, тобто наявність ферментів та аналітів для проведення досліджень на концентраційний відгук. По-друге, обрані біомаркери повинні забезпечувати різний діапазон референсних концентрацій, щоб зрозуміти межі чутливості сенсора для зразків поту. До критеріїв відбору не належить медична доцільність чи будь-яка інша, що пов'язана з кореляцією показників здоров'я.

З Таблиці 1 випливає, що всі представлені біомаркери за актуальним концентраційним діапазоном можна умовно поділити на мікромолярні та мілімолярні. До перших з концентраційним рівнем до 1 мМ речовини відносяться магній (0,02–0,40 мМ), залізо (0,0001–0,03 мМ), мідь (0,0005–0,02 мМ), цинк (0,0001–0,02 мМ), глюкоза (0,01–0,20 мМ). В зв'язку з тим, що глюкозооксидаза є найбільш поширеним ферментним біореагентом в багатьох біологічних лабораторіях, то логічним вибором серед цих претендентів виступає саме глюкоза. Також цей біоаналіт неодноразово показував свою дієвість в роботі саме з обраним типом перетворювачем [17].

Серед інших біомаркерів з актуальним діапазоном концентрацій вище 1 мМ можна віднести натрій (10–90 мМ), хлор (10–90 мМ), калій (2–8 мМ), лактат (5–40 мМ), етанол (2–30 мМ), сечовина (4–12 мМ), аміак (1–8 мМ). Виходячи з попереднього твердження про дослідження мікроелементів, наш вибір лежав серед органічних сполук. Серед них цей вибір був між лактатдегідрогеназою, уреазою та алкогольоксидазою. Саме в цій роботі була вибрана сечовина, як другий біомаркер для дослідження.

Нанесення біомембран, матеріальне забезпечення ферментами та вибір технології проводився на базі відділу біомолекулярної електроніки Інституту молекулярної біології і генетики під керівництвом ст. наук. співр., д. б. н. Солдаткіна О.О.

Першого разу на перетворювачі “089311” та “15217” було нанесено біологічні мембрани з іммобілізованим ферментом глюкозооксидаза (ГОД) з наступними пропорціями:

1-й диференційний транзистор (channel 0):

- Фосфатний буфер (20 мМ) - 80%
- Гліцерин - 10%

- ГОД - 5% (271 од/мг)
- БСА - 5%

2- й диференційний транзистор (channel 1):

- Фосфатний буфер (20 мМ) - 80%
- Гліцерин - 10%
- БСА - 10%

Час іммобілізації: 10 хвилин

Результати досліджень представлено в розділах 2.3, 2.4 та 2.6.

Іншого разу на перетворювачі “089311” та “014411” було нанесено біологічні мембрани з іммобілізованим ферментом ГОД з наступними пропорціями:

1-й диференційний транзистор (channel 0):

- Фосфатний буфер (20 мМ) - 80%
- Гліцерин - 10%
- ГОД - 5% (271 од/мг)
- БСА - 5%

2-й диференційний транзистор (channel 1):

- Фосфатний буфер (20 мМ) - 80%
- Гліцерин - 10%
- БСА - 10%

Також на перетворювачі “078311” та “109311” було нанесено біологічні мембрани з іммобілізованим ферментом уреазою з наступними пропорціями:

1-й диференційний транзистор (channel 0):

- Фосфатний буфер (20 мМ) - 80%
- Гліцерин - 10%
- Уреаза - 5% (271 од/мг)
- БСА - 5%

2- й диференційний транзистор (channel 1):

- Фосфатний буфер (20 мМ) - 80%
- Гліцерин - 10%
- БСА - 10%

Час іммобілізації: 15 хвилин

Результати досліджень представлено в розділах 2.3, 2.4 та 2.6.

2.3. Визначення рН-чутливості біосенсорів

Процес визначення рН-чутливості біосенсорів потребує повторного вимірювання вольт-амперних характеристик досліджуваного електрода, але вже при різних величинах кислотності рідинного буферу. Це допоможе визначити величину рН досліджуваного зразка поту на контрольному референтному транзисторі, що несе на собі нейтральну біомембрану, тобто без ферменту. Цей показник може нести в собі додаткову інформацію про співвідношення H^+ до HCO_3^- (Розділ 1.2). Також це може слугувати додатковою інформацією про зміну різниці сили струму між каналами від зміни кислотності середовища, що може призвести до неточних інтерпретацій сигналів, якщо не врахувати ці дані.

Діапазон значень рН поту людини може варіювати від 4,3 до 8,5 [18], тому для визначення залежності сили струму від рН використовувались комерційні аналітичні буфери InLab Solutions зі значеннями $4,01 \pm 0,02$, $7,00 \pm 0,02$ та $9,21 \pm 0,02$. Процес визначення відбувався за відпрацьованою технологією за роботою [16].

В процесі визначення рН-чутливості біосенсорів використовувались два електроди: 078311 і 089311. Для них було побудовано сенсограми відгуків на зміну величини рН (Рисунок 16, 17) та графіки концентраційної залежності відгуку від рН-чутливості з лінійною апроксимацією (Рисунок 18).

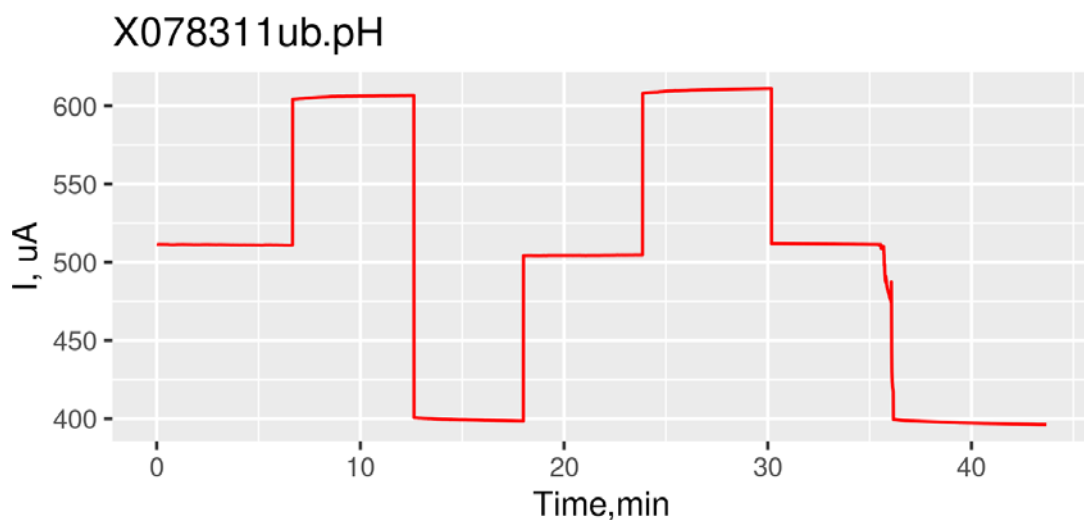


Рисунок 16. Сенсограма відгуку біосенсора “078311ub” на зміну величини рН.

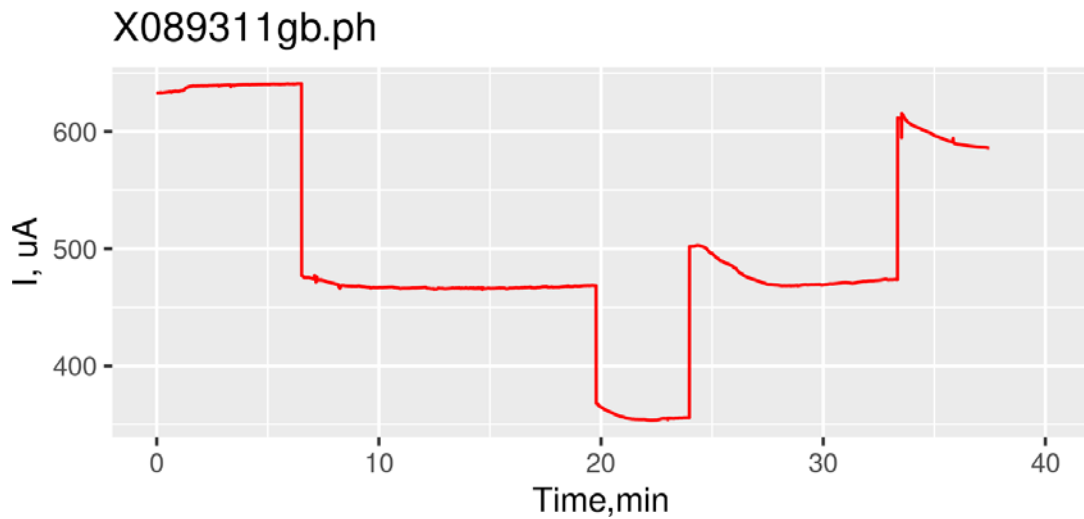


Рисунок 17. Сенсограма відгуку біосенсора “089311gb” на зміну величини рН.

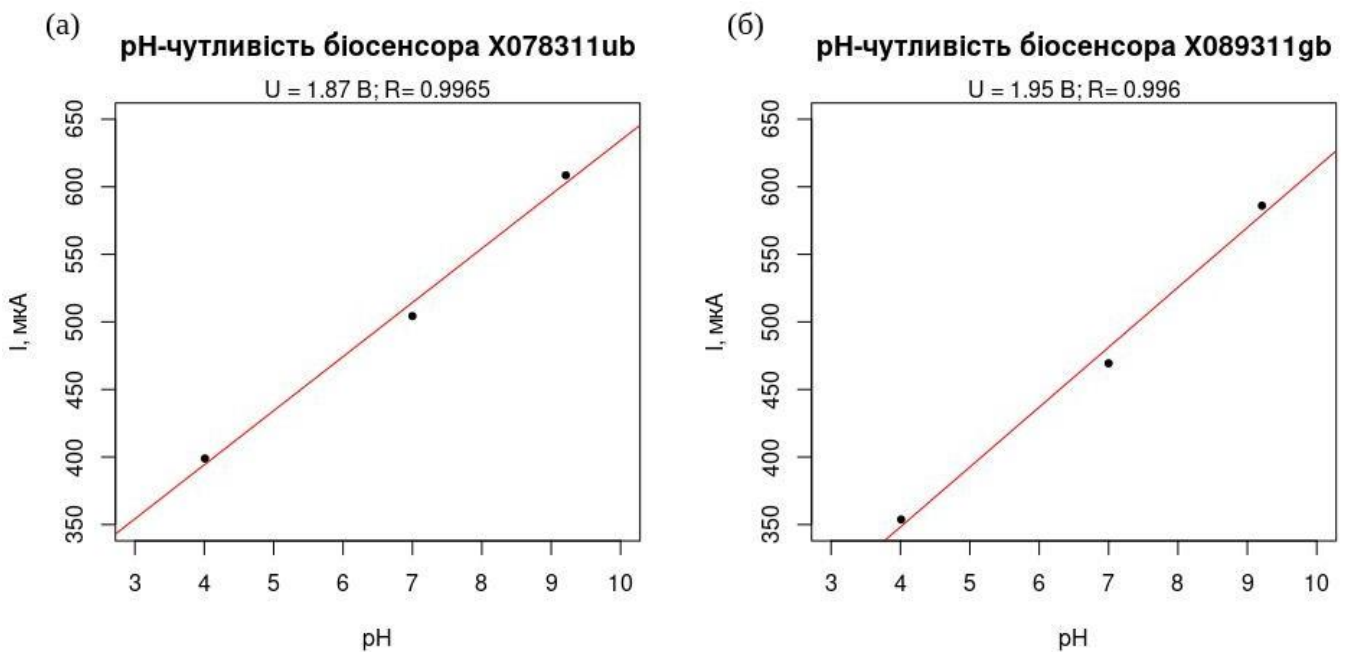


Рисунок 18. Залежність відгуку біосенсорів від величини рН з лінійною апроксимацією для зразків біосенсорів (а) “078311ub” і (б) “089311gb”.

З Рисунку 18 видно, що коефіцієнт кореляції в обох випадках більше 0,99, що говорить про можливість точного визначити рН досліджуваного зразку.

2.4. Визначення концентраційної чутливості біосенсорів до глюкози та сечовини

Подальші кроки в дослідженні роботи біосенсорів полягають в отриманні значень чутливості в диференційному режимі вимірювання.

Диференційний режим - це вимірювання вихідного сигналу диференційної пари транзисторів, що дорівнює різниці сили струму обох каналів. В стані спокою базова лінія стабільна, але коли чутливий до субстрату фермент проводить реакцію, то йде вивільнення або поглинання протонів водню, що призводить до зміни потенціалу в околі мембрани, де іммобілізований цей фермент, а це, в свою чергу, змінює дельту між силами струму двох каналів.

Вимірювання біосенсорів проводилось в 5 мМ фосфатному буфері в кількох режимах додавання субстрата: в безперервному та з перериванням. Безперервний режим полягає в додаванні різниці концентрацій субстрата до буфера таким чином, щоб об'єм розчину в кюветі залишався сталим без зупинки роботи вимірювального перетворювача MES-5.5. Розрахунок різниці об'ємів та концентрацій розраховувались в програмному комплексі R (Додаток Б). Режим з перериванням полягає в зупинці роботи вимірювального перетворювача між змінами розчинів з різними концентраціями та трикратним промиванням електрода фосфатним буфером.

Вимірювання глюкозних біосенсорів

Перші два створені біосенсори мали номери 089311 і 15217. Технологія нанесення чутливої мембрани була описана в розділі 2.2.

Перед вимірюванням було проведено розрахунок різниці об'ємів та концентрацій глюкозного 5 мМ розчину, який необхідно було додавати при неперервному режимі вимірювання (Таблиця 5).

Таблиця 5. Різниця об'єму та концентрація результуючого глюкозного розчину при додаванні 5 мМ концентрованого розчину. ТК - теоретична концентрація; ВК - вихідна концентрація.

ТК глюкози, [мМ]	Дельта об'єму, [мкЛ]	ВК глюкози, [мМ]	Похибка, %
0.01	4	0.01	0
0.025	6	0.02497	0.12
0.05	10	0.04985	0.3

Продовження таблиці 5

0.1	20.2	0.09985	0.15
0.2	40.8	0.19981	0.095

0.5	125	0.49982	0.036
1	222.2	0.99979	0.021
1.5	250	1.49982	0.012
2	285.7	1.99982	0.009

При першому вимірюванні глюкозного біосенсора “089311gb” проводилось послідовне додавання 5 мМ розчину глюкози, починаючи з 15 хв з кроком 5 хв (Рисунок 19).

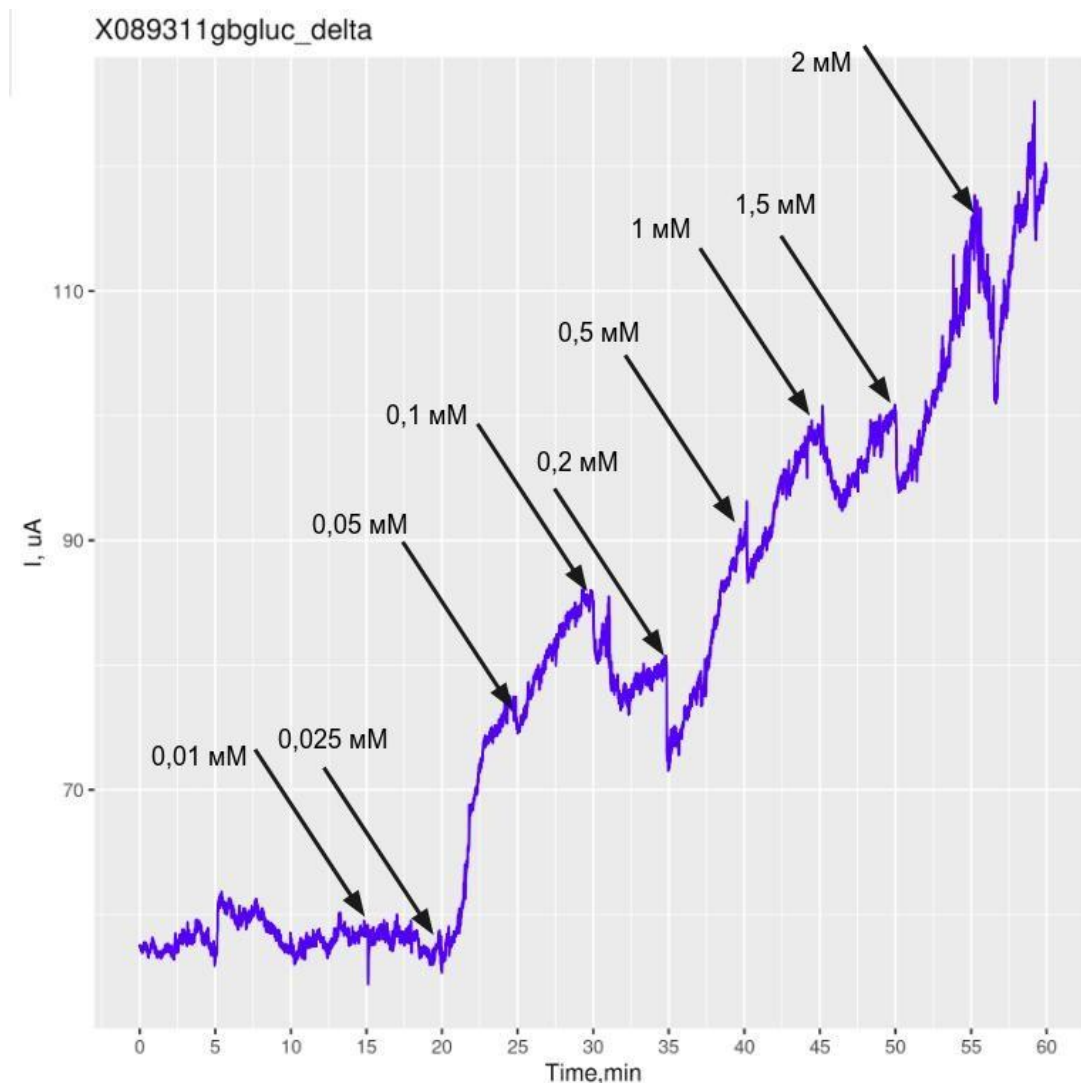


Рисунок 19. Сенсограма відгуку біосенсора “089311gb” на зміну концентрації глюкози в розчині.

З представленної вище сенсограми видно, що на деяких ділянках відбувається випадання зі зростаючої тенденції. Спекулюючи, можна припустити, що при додаванні концентраційного розчину за допомогою семплера було зачеплено електрод порівняння, що і призвело до порушення зростаючої тенденції. Для

більшої наглядності для даного випадку був побудований графік лінійної апроксимації в логарифмічній шкалі (Рисунок 20).

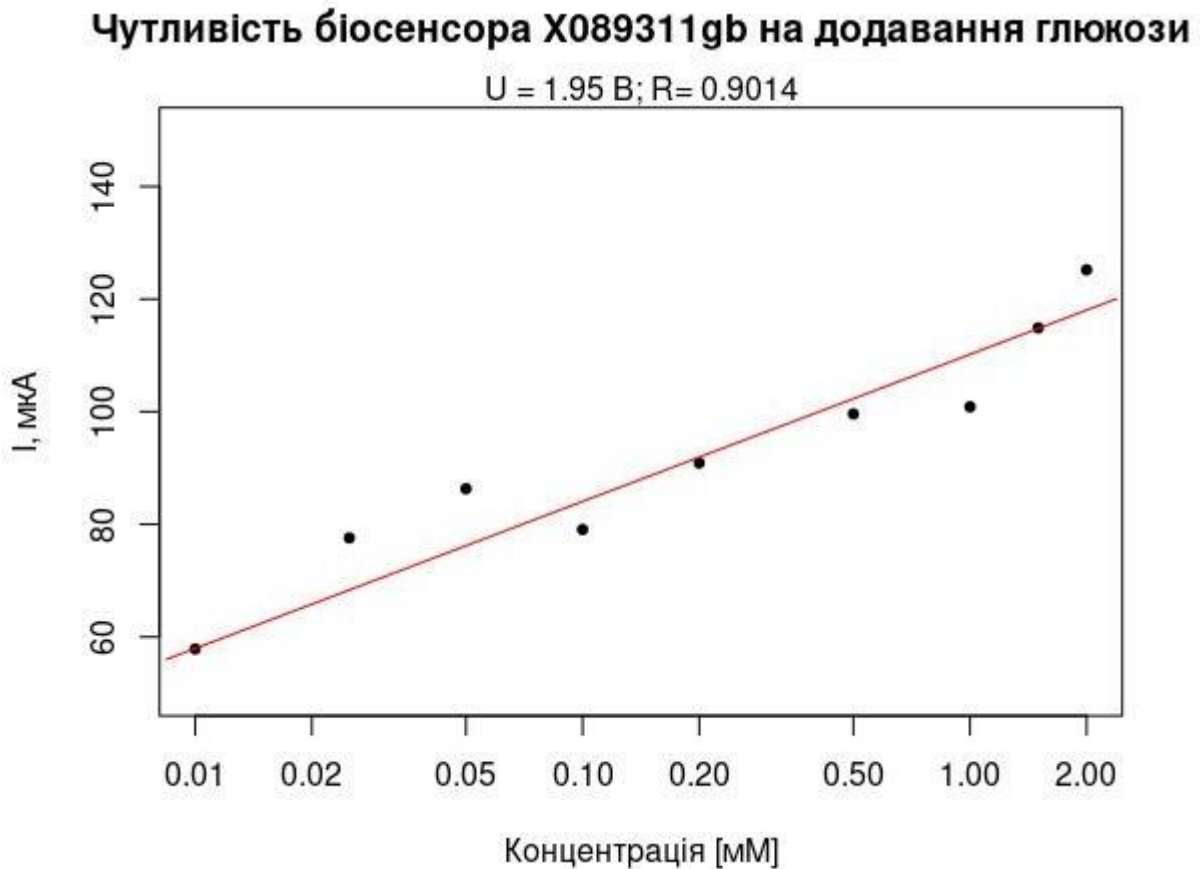


Рисунок 20. Графік лінійної апроксимації для біосенсора “089311gb” на зміну концентрації глюкози в розчині. Вісь концентрацій представлена в логарифмічному масштабі.

Друге вимірювання глюкозного біосенсора “089311gb” проводилось на наступний день в режимі переривання з трикратним промиванням сенсора між вимірюваннями різних концентрацій розчинів. Під час вимірювання електрод порівняння вийшов з ладу, тому процедуру вимірювання довелось перервати до заміни електрода на новий.

Біосенсор “15217gb” не показав відгук на глюкозу і почав видавати шуми, тому було вирішено його прибрати з подальших досліджень.

Видалення мембрани з біосенсора “089311gb” проводилось етиловим спиртом і промиванням дистильованою водою. Повторне нанесення мембран відбувалось з іммобілізацією в 15 хвилин в інкубаторі, що повинно було теоретично збільшити стійкість, але зменшити чутливість. В цей раз повторно використовувався електрод “089311” і новий “014441”.

При вимірюванні глюкозного біосенсора “089311gb” проводилось послідовне додавання 5 мМ розчину глюкози, починаючи з 15 хв з кроком 10 хвилин до концентрації досліджуємого розчину 4,5 мМ (Рисунок 21).

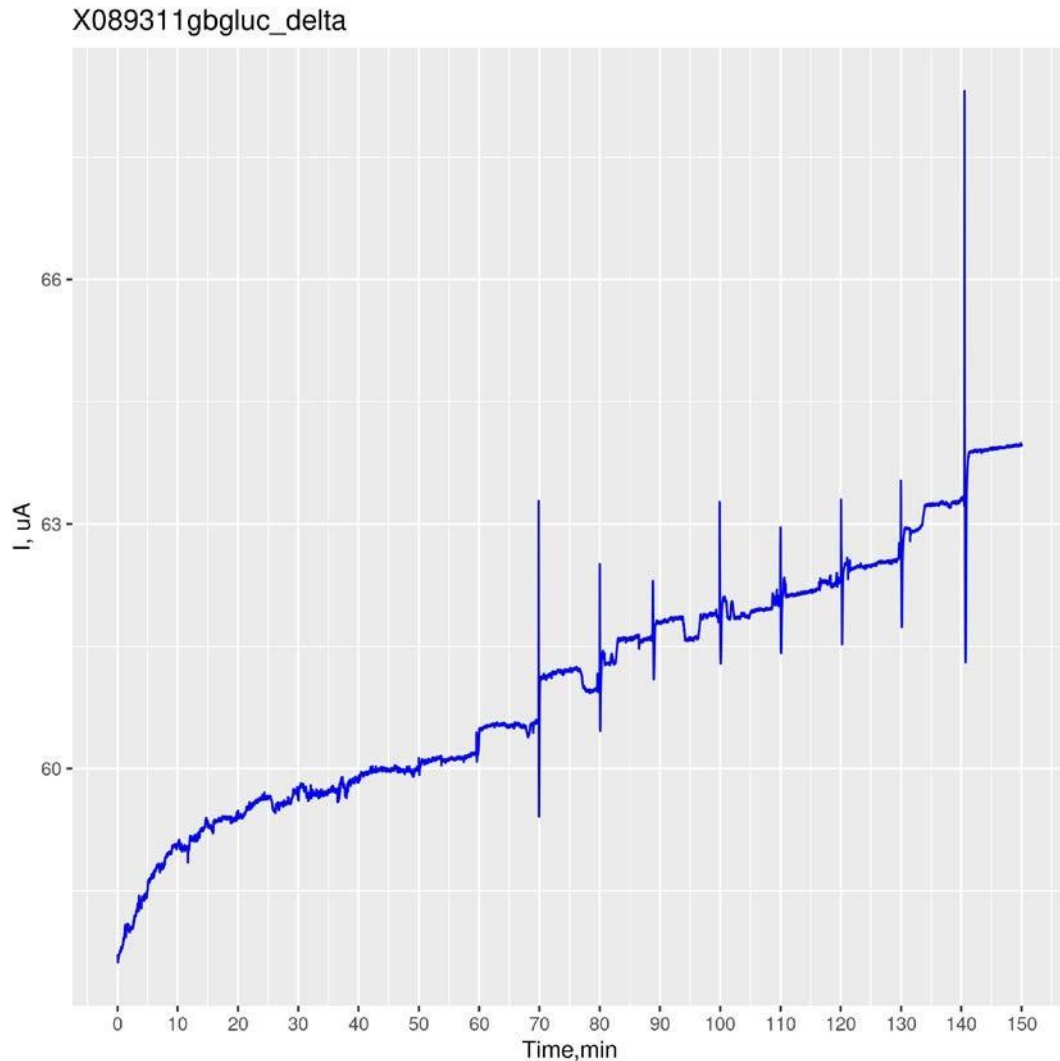


Рисунок 21. Сенсограма відгуку біосенсора “089311gb” з потовщеною мембраною на зміну концентрації глюкози в розчині.

З сенсограми видно, що чутливість відгука значно впала у зв’язку зі збільшеним часом іммобілізації мембрани, як і було передбачено.

Біосенсор “014441gb” не показав відгук на глюкозу і почав видавати шуми, тому його було вирішено його прибрати з подальших досліджень.

Вимірювання біосенсорів сечовини

Мембрани для біосенсорів для визначення сечовини були нанесені за процедурою, яка описана на минулому кроці, тобто з подовженим часом іммобілізації. Для цієї мети було обрано електроди “078311” і “109311”. Розрахунок концентрацій для послідовного додавання концентрованого

розчину сечовини проводився в програмному комплексі R та наведені в Таблиці 6.

Таблиця 6. Різниця об'єму та концентрація результуючого розчину сечовини при додаванні 50 мМ концентрованого розчину. ТК - теоретична концентрація; ВК - вихідна концентрація.

ТК сечовини, [мМ]	Дельта об'єму, [мкЛ]	ВК сечовини, [мМ]	Похибка, %
0.1	8.0	0.1	0
0.2	8.0	0.1996	0.2
0.4	16.1	0.3992	0.19
0.8	32.5	0.799	0.125
1.6	66.1	1.5988	0.072
3.2	136.7	3.1983	0.053
6.4	293.6	6.3988	0.018
12.8	688.2	12.7994	0.004
25.6	2098.2	25.599	0.004

“078311ub” - перший уреазний біосенсор, який піддався випробуванню. Спочатку була фаза релаксації в фосфатному буфері протягом години. Робочі вимірювання проводились на магнітній мішалці із застосуванням безперервної техніки, крок обраний 10 хв. Іноді відбувалися просадки в напрузі від електрода порівняння, постановка на паузу вимірювального перетворювача MES-5.5 і перепід'єднання допомагало швидко повернутися в стабільне базове значення струму в обох каналах. Сенсограма відгуку (Рисунок 22) біосенсора говорить про недостатню чутливість та велику кількість артефактів, тому було вирішено збільшити крок концентрацій сечовини в розчині (Таблиця 7).

Таблиця 7. Різниця об'єму та концентрація результуючого розчину сечовини при додаванні 50 мМ концентрованого розчину. ТК - теоретична концентрація; ВК - вихідна концентрація.

ТК сечовини, [мМ]	Дельта об'єму, [мкЛ]	ВК сечовини, [мМ]	Похибка, %
5	200	5	0
10	222.2	9.9996	0.003

Продовження таблиці 7

15	249.9	14.9993	0.0041
20	285.7	19.9992	0.0038
25	333.2	24.9987	0.0048
30	399.9	29.9986	0.0043

35	499.9	34.9984	0.0044
40	666.5	39.9982	0.0044
45	999.7	44.9977	0.0048

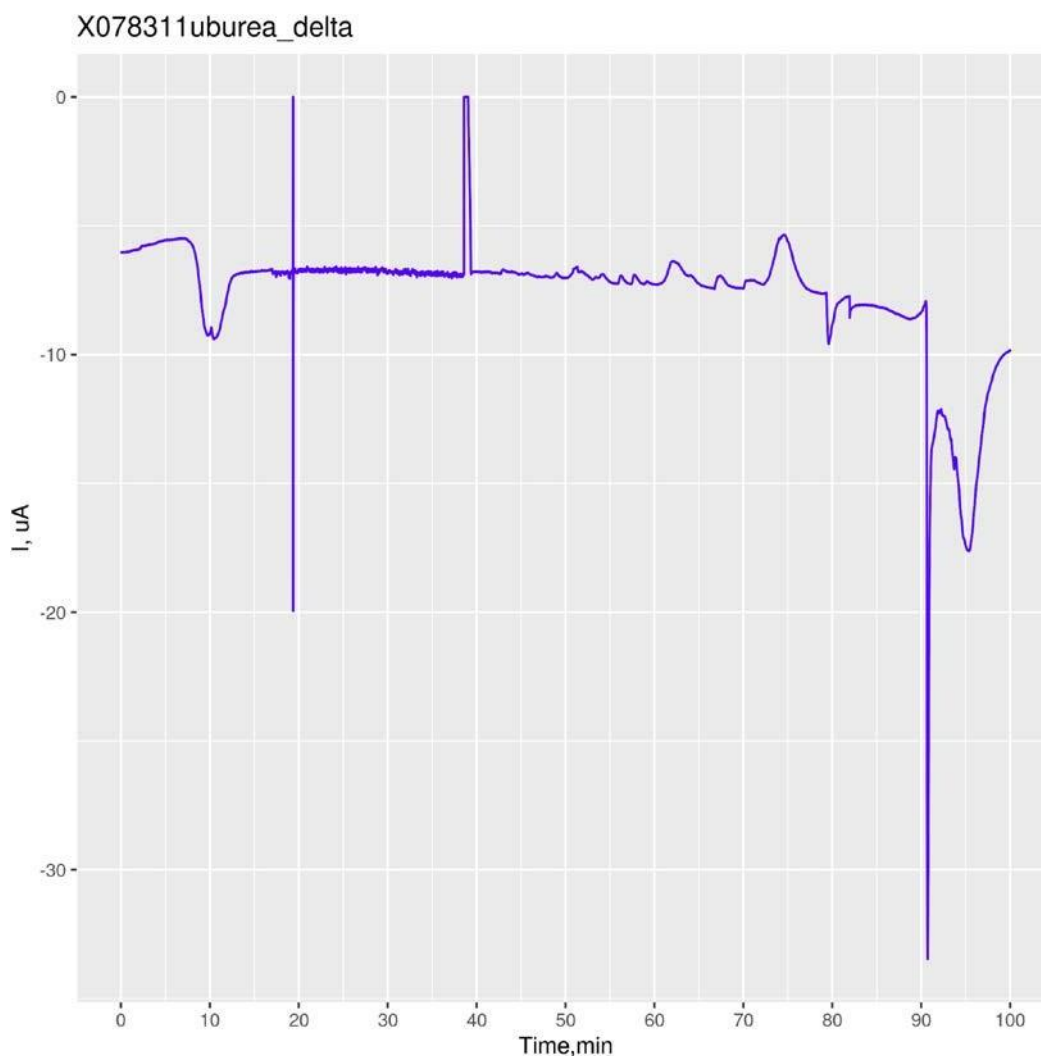


Рисунок 22. Сенсограма відгуку біосенсора “078311ub” на зміну концентрації сечовини в розчині в діапазоні 0,1-25,6 мМ.

Отримана сенсограма (Рисунок 23) вже більш виразніше показує різницю в концентраціях сечовини. Ці дані дають підстави до побудови лінійної апроксимації (Рисунок 24).

Дослідження біосенсора “109311ub” на відгук проводились тільки за Таблицею 6. Відгук на зміну концентрації не простежувався, тому результати сенсограми в даній роботі не наведено.

Після зберігання уреазного біосенсора “078311ub” в сухому стані при температурі 4°C протягом місяця були зроблені повторні вимірювання на відгук за Таблицею 7 і відповідна сенсограма представлена на Рисунку 25. З того

можна прийти до висновку, що відбулась деградація чутливої мембрани і зберігання сенсора протягом тривалого часу за даних умов не є доцільним.

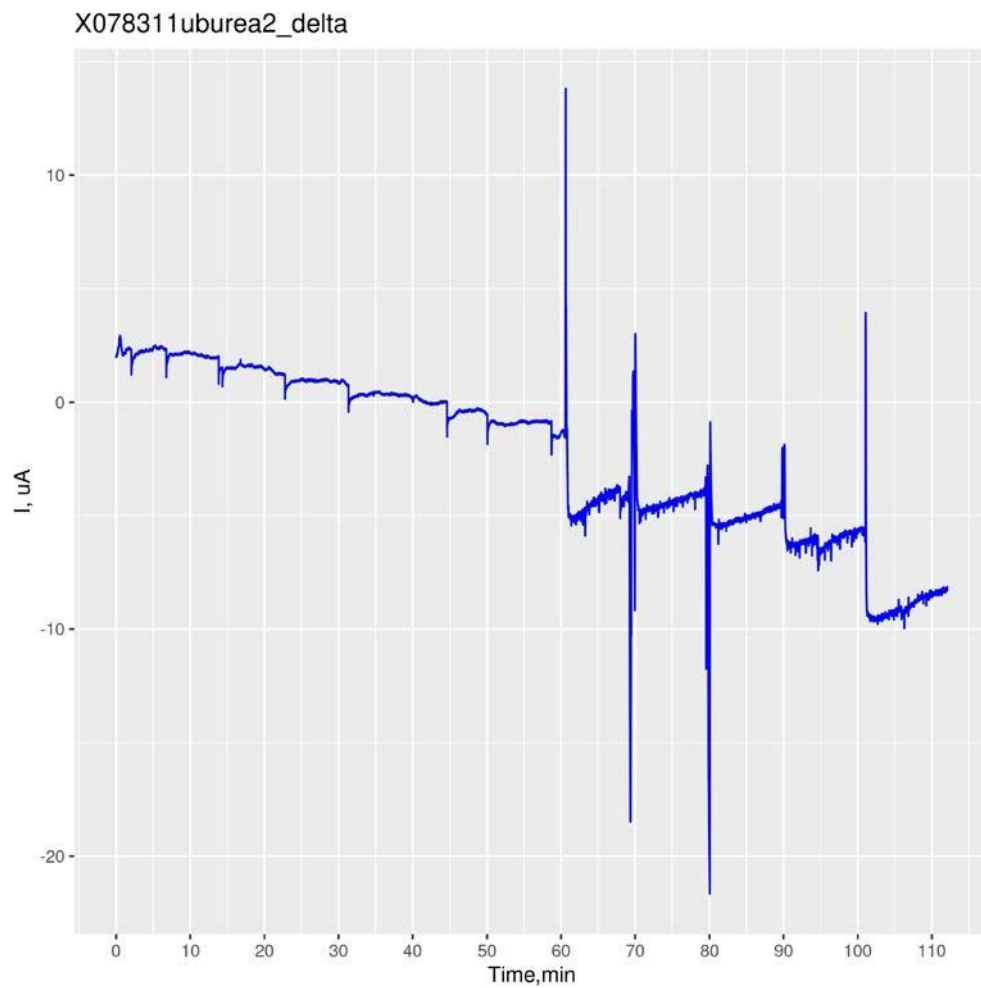


Рисунок 23. Сенсограма відгуку біосенсора “078311ub” на зміну концентрації сечовини в розчині в діапазоні 5-45 мМ.

Чутливість біосенсора X078311ub на додавання сечовини

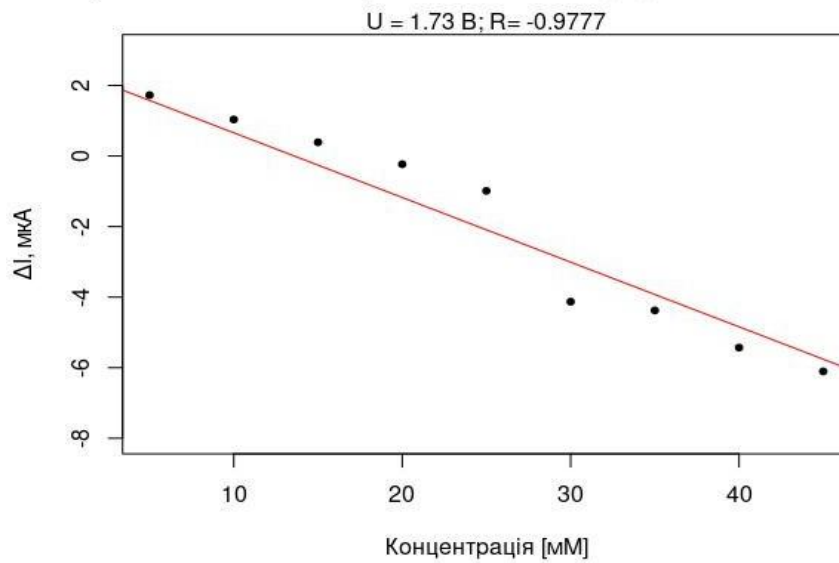


Рисунок 24. Лінійна апроксимація відгуків біосенсора “078311ub” на зміну концентрації сечовини в розчині.

X078311ub.urea

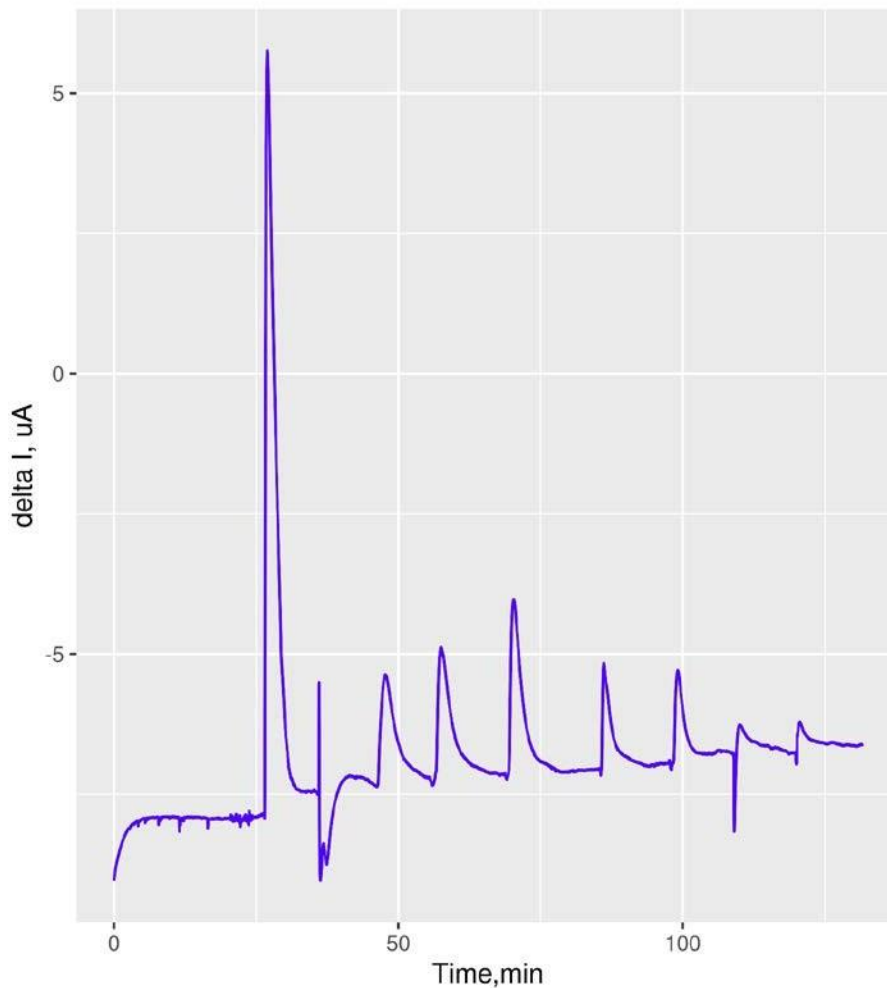


Рисунок 25. Сенсограма відгуку біосенсора “078311ub” на зміну концентрації сечовини в розчині в діапазоні 5-45 мМ після 30 діб зберігання в сухому стані при температурі 4°C.

2.5. Процедура збору зразків поту людини

У роботі [10] представлено декілька варіантів збору зразків поту людини. Серед них швабрування, через абсорбційні патчі, метод капання та змивання зі всього тіла. Серед них найшвидший та з великою віддачею саме метод швабрування. Він полягає в зіскаблюванні поту з тіла людини спеціальним шпателем та переносом зразка піпетуванням в епендорф чи пробірку. Недолік цього методу полягає в забрудненні зразка частинками клітин шкіри людини, але з огляду на те, що дана робота несе в собі мету показати можливість обраних ІСПТ для реєстрації сигналу зі зразків поту - цим недоліком можна знехтувати.

Збір зразків проводився з попереднім обробленням шкіри миючим засобом на основі господарського мила та послідуочим протиранням дистильованою водою та серветкою. Стимуляція потовиділення проводилась шляхом тренування на велотренажері. Збір зразків починався через 15 хвилин від початку тренування і проводився на протязі ще 15 хвилин, щоб заповнити епендорф об'ємом 2 мл. Донорами поту виступали два чоловіки, віком 29 і 30 років.

Після збору зразки поміщувались в спеціальний термос з льодом, а потім зберігались при температурі 4°C. Час зберігання зразків не перевищував двох тижнів.

2.6. Проведення досліджень зразків поту

На сьогоднішній день було проведено лише одне дослідження одного зразку поту на біосенсорі сечовини "078311ub". Процедура дослідження полягала в первинному виході на робочу напругу в 5 мМ фосфатному буфері. Після досягнення стабільного значення, біосенсор висушувався і потім в вимірювальну кювету додався зразок поту об'ємом 2 мл і одразу вмикався пристрій для реєстрації сигналу відгуку. Сенсограма цього вимірювання показана на Рисунку 26.

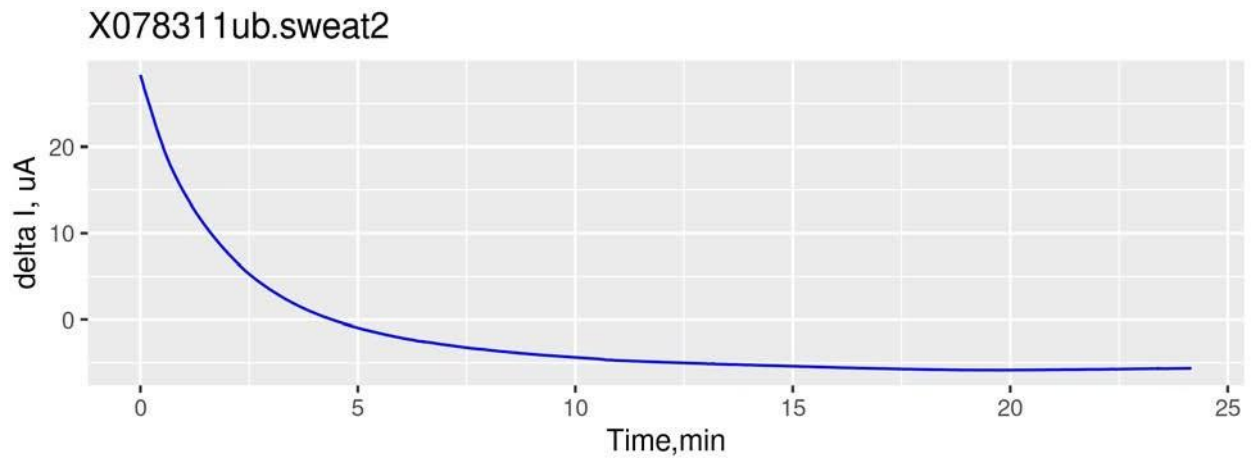


Рисунок 26. Сенсограма відгуку біосенсора “078311ub” зразок поту об’ємом 2 мл.

При прикладеній напрузі в 1,73 В і порівнюючи графіком лінійної апроксимації (Рисунок 24) виходить, що концентрація сечовини в обраному зразку поту знаходиться на рівні 38 мМ, що значно перевищує діапазон референтних значень (Розділ 1.3). Це дає привід не довіряти отриманим даним і провести виміри останніх етапів повторно.

Висновки та подальші кроки

В даній роботі завдяки розробленому програмному алгоритму (Додаток А) було значно поліпшено процес первинного відбору перетворювачів на основі ІСПТ. В результаті цього було відібрано 5 стабільних електродів серед 30-ти тестованих працюючих електродів.

При подальшому виготовленні біосенсорів за технологією відділу біомолекулярної електроніки ІМБГ та їх тестуванні на чутливість відгуку було побудовано графіки залежності вихідного сигналу біосенсорів від зміни рН на аналітичних комерційних буферах, а також в залежності від зміни концентрацій глюкози і сечовини в 5 мМ фосфатному буфері.

Для збору зразків потовиділення людини був використаний метод швабрування, індукованого фізичними навантаженнями. Також був випробуваний метод індукції потовиділення через іонофорез 2% розчину пілокарпіну гідрохлориду, але об'єм виділень був занадто малий, щоб бути використаний в даній роботі.

Проведення досліджень поту людини були перервані через карантинні заходи в м. Києві з 23.03.2021 по 01.05.2021 і очікувані результати були отримані не в повній мірі.

Надалі на меті планується завершити дослідження зразків поту людини на вміст глюкози та сечовини, а також ся провести дослідження із визначення в зразках вмісту етанолу та лактату та порівняти отримані результати з аналітичними методами дослідження.

Посилання на джерела використаної інформації

1. Grand View Research, Inc. "Wearable Medical Devices Market Size, Share & Trends Analysis Report By Type (Diagnostic, Therapeutic), By Site (Handheld, Headband, Strap, Shoe Sensors), By Application, By Region, And Segment Forecasts, 2021 - 2028"
2. Mosher HH. "Simultaneous Study of Constituents of Urine and Perspiration". *The Journal of Biological Chemistry*. 99 (3): 781–790 (1933)
3. Sato, K., Leidal, R. and Sato, F. Morphology and development of an apoeccrine sweat gland in human axillae. *Am. J. Physiol.* 252, R166–R180 (1987).
4. E.T. Renbourn. The History of Sweat and Prickly Heat, 19th–20th Century. *Journal of Investigative Dermatology*, Volume 30, Issue 5, 1958, Pages 249-259
5. Sato, K., Kang, W.H., Saga, K. et al. Biology of sweat glands and their disorders. I. Normal sweat gland function. *J. Am. Acad. Dermatol.* 20, 537–563 (1989).
6. Sato F, Owen M, Matthes R, et al. Functional and morphological changes in the eccrine sweat gland with heat acclimation. *J Appl Physiol* (1985). 1990;69 (1):232–236.
7. Porter, A. M. W. (2001). Why do we have Apocrine and Sebaceous Glands? *Journal of the Royal Society of Medicine*, 94(5), 236–237.
8. Sato K. The physiology and pharmacology of the eccrine sweat gland. In: Goldsmith L, editor. *Biochemistry and physiology of the skin*. New York: Oxford University Press; 1983. p. 596–641.
9. Mack, G. W.; Nadel, E. R. (1996). "Body fluid balance during heat stress in humans". In Fregly, M. J.; Blatteis, C. M. (eds.). *Handbook of Physiology. Section 4: Environmental Physiology*. New York: Oxford University Press. pp. 187–214.
10. Baker, L. B. (2019). Physiology of sweat gland function: The roles of sweating and sweat composition in human health. *Temperature*.
11. Gordon, R. S., Thompson, R. H., Muenzer, J., & Thrasher, D. (1971). Sweat lactate in man is derived from blood glucose. *Journal of Applied Physiology*, 31(5), 713–716.
12. *Electrochemical Biosensors: Recommended Definitions and Classification*. *Pure Appl. Chem.*, Vol. 71, No. 12, pp. 2333-2348, 1999
13. А.Л. Кукла, А.С. Павлюченко, Ю.В. Голтвянский, Ю.М. Ширшов. Многоэлементные сенсорные массивы на основе интегральных кремниевых ионоселективных полевых транзисторов для систем химического мониторинга. *Оптоэлектроника и полупроводниковая техника*, 2007, вып. 42
14. Зи С. Физика полупроводниковых приборов. - М.: Мир, 1984. - Т.1.- 455 с
15. О. Л. Кукла, О. С. Павлюченко, Ю. В. Голтвянский, О. О. Солдаткин, М. Архипова, С. В. Дзядевич, О. П. Солдаткин. Сенсорні масиви на основі диференційних ІСПТ-елементів для моніторингу токсичних речовин природного та штучного походження. *Sensor Electronics and Microsystem Technologies*. 2/2008
16. А. Л. Кукла, С. В. Лозовой, А. С. Павлюченко, С. Н. Нагибин. Исследование метрологических параметров датчиков на основе рН-чувствительных полевых транзисторов. *Технология и конструирование в электронной аппаратуре*, № 2 - 3 (2013).
17. Dzyadevych, S. V., Soldatkin, A. P., El'skaya, A. V., Martelet, C., & Jaffrezic-Renault, N. (2006). Enzyme biosensors based on ion-selective field-effect transistors. *Analytica Chimica Acta*, 568(1-2), 248–258.
18. Herrmann, F., & Mandol, L. (1955). Studies of Ph of Sweat Produced by Different Forms of Stimulation*. *Journal of Investigative Dermatology*, 24(3), 225–246.

ДОДАТОК А

Алгоритм для статистичних розрахунків характеристик електродів і побудова графіків в програмному комплексі R

```

## Завантаження бібліотек
library(ggplot2)

## Необхідно змінити назву папки, де знаходяться файли з розширенням
## .dat, що підлягають аналізу
folder_name = "selected_phB"

## Необхідно змінити шлях де знаходиться обрана папка
folder_path = "~/Documents/docs/isfet/"

## !!!Обрати весь код і запустити програму!!!
files <- (Sys.glob(paste(folder_path, folder_name, "/*.dat", sep="")))

## Створення словника з двовимірними масивами даних у вигляді
## df_"folder_name"
data_list <- function(files) {
  df_s <- NULL
  Samples <- NULL
  for (i in 1:length(files)) {
    name1 = strsplit(files[i], "\\.").[[1]][1]
    name2 = strsplit(name1, "/")[[1]][8]
    name3 = strsplit(name2, "_")[[1]][1]
    df_s <- append(df_s,
                  list(assign(paste(name2),
                              data.frame(read.delim(files[i],
                                                    stringsAsFactors=FALSE))[, 1:3])))
    Samples[i] <- make.names(as.character(c(name3)))
  }
  names(df_s) <- Samples
  for (i in 1:length(files)) {
    if("chan_2" %in% colnames(df_s)[[i]]) {
      next
    } else {
      df_s[[i]]$chan_01 = df_s[[i]]$chan_0 - df_s[[i]]$chan_1
    }
  }
}

```

```

    }
  }
  return(df_s)
}

assign(paste("df_", folder_name, sep = ""), datalist(files))

## Creates and saved a differential data matrix with statistical
## analysis of investigated transistors; saves images of plots
quant mat <- function(df, files){
  T1 <- NULL
  U1 <- NULL
  for (i in 1:length(files)){
    name1 = strsplit(files[i], "\\.").[[1]][1]
    name2 = strsplit(name1, "/")[[1]][8]
    #time
    name4 = strsplit(name2, "_")[[1]][4]
    T1[i] <- as.numeric(c(as.numeric(name4)))
    #voltage
    name5 = strsplit(name2, "_")[[1]][7]
    if (as.numeric(name5) < 100){
      U1[i] <- as.numeric(c(as.numeric(name5)/ 10))
    } else {
      U1[i] <- as.numeric(c(as.numeric(name5)/ 100))
    }
  }
}

assign("Matrix", data.frame(Sample = names(df),
                             Time = T1,
                             U = U1))

# Статистичний розрахунок електродів на основні характеристики
for (i in 1:length(Matrix$Sample)){
  for (j in 1:length(df)){
    if (Matrix$Sample[i] == names(df)[j]){
      Matrix$R_ch0[i] <- round(max(df[[j]][2]), na.rm = TRUE) -
min(df[[j]][2], na.rm = TRUE), 3)
      Matrix$R_ch1[i] <- round(max(df[[j]][3]), na.rm = TRUE) -
min(df[[j]][3], na.rm = TRUE), 3)
      Matrix$IQR_ch0[i] <-
round(IQR(as.numeric(unlist((df[[j]][2])))), na.rm = TRUE), 3)

```

```

    Matrix$IQR_ch1[i] <-
round( IQR(as.numeric(unlist((df[[j]][3])))), na.rm = TRUE), 3)
    Matrix$med_ch0[i] <-
round( median(as.numeric(unlist((df[[j]][2])))), na.rm = TRUE), 3)
    Matrix$med_ch1[i] <-
round( median(as.numeric(unlist((df[[j]][3])))), na.rm = TRUE), 3)
    Matrix$d_I_ch01[i] <- round( abs( Matrix$med_ch0[i] -
Matrix$med_ch1[i]), 3)
    Matrix$R_ch01[i] <- round( max(df[[j]][4], na.rm = TRUE) -
min(df[[j]][4], na.rm = TRUE), 3)
    Matrix$IQR_ch01[i] <-
round( IQR(as.numeric(unlist((df[[j]][4])))), na.rm = TRUE), 3)
    Matrix$med_ch01[i] <-
round( median(as.numeric(unlist((df[[j]][4])))), na.rm = TRUE), 3)
  }
}
}
write.csv( Matrix,

paste(folder_path, folder_name, "/", "tablestat_", folder_name, ".csv", sep=""),
      row.names = FALSE)
# Побудова графіків і збереження в цільовій папці
for (i in 1:length( Matrix$Sample )) {
  ggplot( df[[i]], aes(x=time_s/60)) +
    geom_line(aes(y = chan_0), color = "darkred") +
    geom_line(aes(y = chan_1), color = "red") +
    xlab("Time, min") +
    ylab("I, uA") +
    labs(title = Matrix$Sample[i])
  ggsave(filename = Matrix$Sample[i], device = "png", scale = 1,
    path = paste(folder_path, folder_name, "/", sep = ""))
}
return( Matrix)
}
assign( paste("matrix_", folder_name, sep =
""), quantmat( eval( as.name( paste("df_", folder_name, sep = "")) ), files))

```

ДОДАТОК Б

Алгоритм для розрахунку різниці об'єму та концентрації субстрату для режиму безперервного вимірювання відгуку біосенсора.

```

#Вибір папки та шляху до неї
folder_path = "~/Documents/docs/isfet/"
folder_name = "Glucose_conc"

#Constants
gsc <- 5 # концентрований розчин глюкози, [ммоль/л]
kv <- 2*10^-3 # робочий об'єм кювети, [л]
conc = c(0.01, 0.025, 0.05, 0.1, 0.2, 0.5, 1, 1.5, 2, 2.5, 3, 3.5, 4, 4.5, 5) #
концентрація, яку необхідно досягти, [ммоль/л]

## Об'єми і концентрації для послідовного додавання субстрату
#Variables
dv <- NULL # дельта об'єму, яку необхідно забрати з kv і додати з gsc [л]
sol_con <- NULL # реальна концентрація розчину після додавання dv [ммоль/л]
conc_er <- NULL # похибка концентрації, [%]

for (i in 1:length(conc)) {
  if (i == 1) {
    dv[i] = kv*conc[i]/gsc # [л]
    sol_con[i] = conc[i] # [mmol/l]
    conc_er[i] = (1-abs(sol_con[i]/conc[i]))*100
  } else {
    dv[i] = kv*(conc[i]-sol_con[i-1])/gsc
    sol_con[i] = ((sol_con[i-1]*(kv-dv[i]))+(gsc*dv[i]))/kv # [mmol/l]
    conc_er[i] = (1-abs(sol_con[i]/conc[i]))*100
    if (conc_er[i] < 0) {
      while (conc_er[i] > 0.005) {
        dv[i] = dv[i]-dv[i]*conc_er[i]/100
        sol_con[i] = ((sol_con[i-1]*(kv-dv[i]))+(gsc*dv[i]))/kv
        conc_er[i] = (1-abs(sol_con[i]/conc[i]))*100
      }
    } else {
      while (conc_er[i] < 0.005) {
        dv[i] = dv[i]+dv[i]*conc_er[i]/100
        sol_con[i] = ((sol_con[i-1]*(kv-dv[i]))+(gsc*dv[i]))/kv
      }
    }
  }
}

```



```
sum(vol_conc_table_round$delta_vol_mcl) #сумарний об'єм не обхідного  
концентрованого розчину
```

```
write.csv(vol_conc_table_round,
```

```
paste(folder_path, folder_name, "/", "vol_conc_table_round_2_", folder_name, ".csv",  
sep=""),
```

```
row.names = FALSE)
```