

©В. П. Марценюк<sup>1</sup>, О. М. Мочульська<sup>2</sup>, О. Р. Боярчук<sup>2</sup>, Г. А. Павлишин<sup>2</sup>,  
А. С. Сверстюк<sup>2</sup>, Ю. В. Завіднюк<sup>2</sup>, В. І. Бондарчук<sup>2</sup>

Університет в Бельсько-Бялій, Республіка Польща<sup>1</sup>

ДВНЗ “Тернопільський державний медичний університет імені І. Я. Горбачевського”<sup>2</sup>

## ПЕРСПЕКТИВИ РОЗРОБКИ І ЗАСТОСУВАННЯ БІОСЕНСОРІВ ТА ІМУНОСЕНСОРІВ ІЗ ДІАГНОСТИЧНОЮ МЕТОЮ У КЛІНІЧНІЙ МЕДИЦИНІ

**Резюме.** Складність біологічних методів аналізу полягає в тому, що речовини, які визначають, є органічними сполуками, перебувають у складних, багатокomпонентних розчинах і сумішах. Звідси очевидно, що традиційні методи фізико-хімічного аналізу не дозволяють вирішувати багато актуальних проблем. Сучасний розвиток електронної техніки, зокрема біомедицині, поставив першочерговим завданням створити високоточні первинні перетворювачі (сенсорні елементи) для систем чутливого і селективного експрес-аналізу рідких середовищ на наявність діагностично важливих речовин. У даний час описано біосенсори для визначення речовин біологічного й абіотичного походжень у найрізноманітніших середовищах. Сучасні конструкції біосенсорів є досить компактними пристроями, які поєднують біологічний тестуючий елемент і фізико-хімічний аналізатор. У статті висвітлено основні види, принципи роботи та перспективи використання біосенсорів та імуносенсорів з діагностичною метою в клінічній практиці.

**Мета дослідження** – провести аналіз сучасної зарубіжної літератури щодо видів біосенсорів та перспективи їх застосування як експрес-методу діагностики в клінічній медицині.

**Матеріали та методи.** У дослідженні застосовано бібліосемантичний та аналітичний методи.

**Результати досліджень та їх обговорення.** Під час виконання дослідження було проведено огляд та аналіз останніх даних зарубіжної науково-медичної літератури щодо видів, принципів роботи, розробки та можливостей застосування біосенсорів та імуносенсорів у клінічній медицині. Біосенсори включають в себе компонент біологічного розпізнавання, наприклад біотканину, мікроорганізм, фермент, рецептор, нуклеїнову кислоту, або антитіло в тісному контакті з трансдьюсером. Залежно від способу передачі сигналу (виду трансдьюсера), біосенсори можуть бути розділені на такі основні групи: оптичні, масові, теплові, електрохімічні, електрохемілюмінесцентні, п'єзоелектричні, на основі поверхневого плазмового резонансу. Крім того, всі біосенсори можна розділити на дві великі групи: з прямим виявленням і з непрямим виявленням аналіту. Інтерес до електрохімічних біодатчиків з використанням недорогих одноразових витратних матеріалів привів до застосування розвитку тонко- і товстоплівкових технологій у виробництві біосенсорів різних типів. Найперспективнішими серед біосенсорів для клінічної діагностики є сенсори і методи, в основі яких лежить використання імунореакцій, які називають імуносенсорами.

**Висновки.** В останні десятиліття проводять дослідження з розробки методів і сенсорів, які можуть бути застосовані практично в будь-якому місці як експрес-метод діагностики в клінічній медицині. Найкраще для цієї мети підходять портативні, швидкі й чутливі біосенсорні технології з можливістю негайної інтерпретації результатів. Біосенсори та імуносенсори, завдяки їх високій специфічності та чутливості, дозволяють виявляти широкий спектр аналітів у зразках зі складною матрицею (слина, кров, сироватка, лімфа, сеча) з мінімальною пробопідготовкою.

**Ключові слова:** біосенсор; імуносенсор; рецептор; антиген; антитіло; імунний комплекс.

**ВСТУП** Складність біологічних методів аналізу полягає у тому, що речовини, які визначають, є органічними сполуками, перебувають в складних, багатокomпонентних розчинах і сумішах [1–3]. Тому очевидно, що традиційні методи фізико-хімічного аналізу не дозволяють вирішувати багато актуальних проблем. Створення перших біосенсорних пристроїв можна віднести до другої половини ХХ ст. [3–6]. У даний час описано біосенсори для визначення речовин біологічного й абіотичного походжень у найрізноманітніших середовищах. Сучасні конструкції біосенсорів є досить компактними пристроями, які поєднують біологічний тестуючий елемент і фізико-хімічний аналізатор [6, 7]. Габарити таких пристроїв, зазвичай, визначають за розмірами аналізатора, що можуть бути досить малої величини (від декількох міліметрів до декількох десятків мікрон). В останнє десятиріччя інтенсивного розвитку набувають дослідження в галузі біосенсорних пристроїв [1–4].

**Метою дослідження** було провести аналіз сучасної зарубіжної літератури щодо видів біосенсорів та перспективи їх застосування як експрес-методу діагностики в клінічній медицині.

**МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ** У дослідженні застосовано бібліосемантичний та аналітичний методи.

**РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕНЬ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ** Сучасний розвиток електронної техніки, зокрема біомедицині, поставив першочерговими завданнями ство-

рити високоточні первинні перетворювачі (сенсорні елементи) для систем чутливого і селективного експрес-аналізу рідких середовищ на наявність діагностично важливих речовин [1, 2, 5, 7]. Термін “сенсор” використовують для опису пристрою в цілому, тобто це пристрій, що визначає або вимірює фізичну властивість і тим чи іншим способом регулює результат вимірювань [3, 4]. Термін “трансдьюсер” належить до пристрою, який перетворює зміни (фізичної чи хімічної природи), що спостерігають у ході аналізу, у вимірювальний сигнал (як правило, електричний), величина якого пропорційна концентрації речовини, яку визначають і називають субстратом [3–5]. Іноді використовують більш універсальний термін – аналіт. Елемент розпізнавання – основний компонент будь-якого сенсора. Саме розпізнавальний елемент визначає здатність сенсора вибірково реагувати на один чи декілька аналітів серед множини багатьох інших речовин [3]. Усі сенсори можна поділити на 3 типи [5, 6, 8–10]:

- а) фізичні сенсори – призначені для визначення відстані, температури, тиску;
- б) хімічні сенсори – призначені для якісного і кількісного визначення хімічних речовин;
- в) біосенсори – молекулярні сенсори, що мають аналітично селективну межу поділу фаз, до якої прилягає або з якою інтегрований датчик, функція якого полягає у передачі взаємодії між поверхнею й аналітом прямо або через хімічні медіатори.

Варто відмітити, що багато речовин не мають властивостей, які дозволяють визначати їх шляхом безпосереднього вимірювання будь-якої фізико-хімічної характеристики [4, 5, 10–12]. У такому випадку потрібні пристрої з елементами розпізнавання (сенсорними елементами), які базуються, зокрема на принципах ліганд-рецепторної (ключ-замок) взаємодії. До таких пристроїв належать біосенсори. Головною особливістю таких приладів є те, що біологічна природа має розпізнавальний елемент. Їх рецепторний шар має біологічну природу (біотканини, мікроорганізми, рецептори, ферменти, антитіла, нуклеїнові кислоти) [3, 4, 9, 11–13, 15]. Чутливість розпізнавального елемента визначає основну аналітичну характеристику сенсорів – селективність та специфічність [4, 5]. Даній вимозі відповідають 5 типів об'єктів: ферменти; антитіла; нуклеїнові кислоти; біотканини (тварин, рослин, грибів), рецептори. Проте через досягнення у галузі нанотехнологій та генної інженерії цей перелік дещо розширився (із синтезом аптамерів та молекулярно імпринтованих полімерів). Сенсори на основі антитіл або рецепторів іноді називають афінними біосенсорами [3–5, 13–15]. Антитіло можна отримати практично до будь-якої речовини [6, 9]. У біосенсорах на основі антитіл використовують спеціальні методи реєстрації сигналу, який виникає унаслідок зв'язування антитіл з антигеном [9]. Для детекції акту цієї взаємодії застосовують різноманітні мітки, якими можуть бути ферменти, флуоресцентні або хемілюмінісцентні молекули, метали. Крім того, антитіла можна іммобілізувати практично на усіх типах трансдьюсерів. Можливо, цим і пояснюється велика кількість публікацій за даною тематикою та позитивна динаміка зростання активності застосування антитіл, як розпізнавальних елементів сенсорів і дотепер. Найпоширенішими трансдьюсерами, на яких можна іммобілізувати антитіла, є електрохімічні, електрохемілюмінесцентні, п'єзоелектричні, на основі поверхневого плазмового резонансу [4–8, 15, 16].

До біосенсорів (зокрема імуносенсорів) належать ферментні, флуоресцентні, волоконно-оптичні біосенсори, біосенсори на основі польових транзисторів, оптичні системи, п'єзоелектричні, мікрохвильові системи, прилади на основі резонансу поверхневих плазмонів і перетворювачів, чутливі до конформації [1, 11, 12]. Такі пристрої широко використовують в аналітичній практиці у різноманітних галузях медицини [5, 16].

Нагальною проблемою сучасного світу є розробка підходів та засобів аналітичної біотехнології, оскільки її успішне вирішення дасть змогу істотно покращити якість життя через удосконалення методів діагностики хвороб [3–6]. У наш час зростає інтерес щодо розробки портативних біохімічних сенсорних приладів, які дають змогу отримати інформацію про взаємодію молекул у газових та рідких середовищах. Робота найчутливіших сенсорних систем заснована на імунохімічних реакціях, які дають змогу отримувати унікальні за специфічністю та чутливістю результати [1, 3, 16–18].

Біосенсори – чутливі системи зі спеціальними елементами, що мають властивість визначати кількість субстанції, яка утворюється в процесі реакції завдяки високій селективності. Є інші визначення і завдання біосенсорів [2, 4, 5]. Біосенсори – це аналітичний винахід, що інтегрує біологічний елемент і не здатний до зворотної біоспецифічної взаємодії з аналітичним та сигнальним переносником. Активним елементом біосенсорів є шар

молекул, тобто біовизначальником. Біосенсори складаються з 3-х частин: біологічний визначальний компонент, сигнальний трансдуктор та електрична або селективна одиниця. Більшість медичних біосенсорів – це антитіла або ферменти як біокомпоненти. Такі біосенсори знайшли застосування у різних галузях медичної науки і практики, як оптичні, амперометричні або п'єзотрансдуктори [3, 11–13, 16]. Використання різноманітних імунокомпонентів є дуже привабливим у даному напрямку досліджень. Однак при іммобілізації антитіл на поверхні біосенсорних перетворювачів їх антигензв'язувальна активність, звичай, значно знижується порівняно з активністю тих же антитіл у вільному стані. Головними причинами цього вважають стеричні обмеження та випадкову орієнтацію антитіл на сенсорній поверхні. Щоб запобігти цьому, можна було б створити проміжний шар, який включав би в себе імуноглобулінзв'язувальні білки, наприклад поверхневий рекомбінантний білок для іммобілізації компонентів біоселективного елемента імуносенсора [4, 5, 9].

Специфічність, чутливість й універсальність біосенсорів багато в чому завдячують властивостям елементів розпізнавання біологічної природи, найпопулярнішими з яких є моноклональні антитіла [3, 6]. Шляхом підбору відповідних антитіл можна створювати досить складні системи, які дозволяють ідентифікувати сполуки найрізноманітнішого спектра. Хоча в багатьох випадках природні рецептори (зокрема моноклональні антитіла) взаємодіють із лігандами з високою специфічністю, у нефізіологічних умовах вони вкрай нестабільні, а можливості їх отримання у великих кількостях часто обмежені. Крім того, далеко не усі молекули мають свої природні рецептори, тому створення "синтетичних рецепторів", здатних до розпізнавання і зв'язування різноманітних молекул-мішеней із високою афінністю і специфічністю, являє великий науково-практичний інтерес у галузі технології та виробництва сенсорної електронної техніки [3–5, 11–13]. Одним із шляхів розробки синтетичних макромолекулярних рецепторів є отримання молекулярних відбитків різних сполук (шаблонів) на полімерній матриці унаслідок молекулярного імпринтингу – співполімеризації функціонального і зшивального мономерів за наявності молекулярного шаблону. Надзвичайна привабливість молекулярно-імпринтованих полімерів для практичного використання під час створення сенсорів зумовлена вкрай високою стабільністю, простотою отримання, з'ясуванням з природними рецепторами афінністю і селективністю [6]. Для того, щоб на основі молекулярно-імпринтованих полімерів створити "синтетичні рецептори", які б витіснили антитіла з технологічної ніші виробництва імуносенсорів без радикальних змін в уже добре відпрацьованих методах імуноаналізу, необхідно, аби молекулярно-імпринтові полімери запозичили такі властивості антитіл, як розчинність, розміри, специфічність, афінність, наявність епітопів (антигенних детермінант), а також зберігали свої основні переваги (низька вартість, швидкість виготовлення, висока стабільність). Незважаючи на безсумнівні успіхи у технології молекулярного імпринтингу, низка невирішених проблем, пов'язаних зі складністю виробництва молекулярно-імпринтованих полімерів із гомогенними ділянками зв'язування за афінністю і специфічністю, гальмує створення високоселективних "синтетичних рецепторів" [3–5, 11–13]. Так, на сьогодні для синтезу молекулярно-імпринтованих полімерів найширше викорис-

товують метод полімеризації у масі, основним недоліком якого є розташування ділянок молекулярного розпізнавання молекулярно-імпринтованих полімерів усередині макропористої структури, що обмежує їх доступність для молекул шаблону [11, 12]. Слабкою стороною молекулярно-імпринтованих полімерів, отриманих з використанням інших форматів полімеризації, зокрема преципітаційної полімеризації, полімеризації в суспензії, полімеризації в емульсії, дисперсійної полімеризації, є невелика кількість ділянок, доступних для зв'язування, що призводить до низької чутливості розпізнавання молекул шаблону. Подолання даних проблем безпосередньо пов'язане із розробкою нових форматів полімеризації і вивченням фізикохімічних механізмів формування молекулярно-імпринтованих полімерів та молекулярного розпізнавання за їх участі. Вибір функціонального мономера, який би утворював міцні комплекси з цільовим аналітом (шаблоном), є нетривіальним завданням, вирішення якого – важлива стадія у створенні високоафінних “синтетичних рецепторів” [3–5, 9, 13].

Враховуючи вищезазначене, актуальним для галузі технології і виробництва сенсорної електронної техніки є проведення теоретичних і експериментальних досліджень фізико-хімічних механізмів формування “моноклональних молекулярно-імпринтованих полімерів” (з максимально гомогенними молекулярними відбитками, доступністю і великою кількістю ділянок молекулярного розпізнавання) та молекулярного розпізнавання за їх участі, що є вихідним положенням для розробки наукових основ технології виготовлення нових функціональних матеріалів (“синтетичних рецепторів”), які використовуватимуть у створенні сенсорів із системами ліганд-рецепторного розпізнавання [3–5]. Вищевказане дасть можливість виключити із систем детектування нестабільні біологічні елементи, а в багатьох випадках і забезпечити визначення аналіту, природні рецептори до якого з певних причини недоступні. Пристрої із системами розпізнавання на основі штучних молекулярно-імпринтованих полімер-рецепторів матимуть притаманну антитілам високу специфічність і характеризуватимуться набагато більшою стабільністю, простотою виготовлення, ніж сенсорні на основі біологічних матеріалів (зокрема рецепторів, ферментів і антитіл) [6, 11–13]. Саме тому визначення нових елементів біосенсорного виявлення має значний науково-практичний інтерес.

Імуносенсори – це клас біосенсорів, пов'язаний із застосуванням антитіл як елементів біочутливості. Реакція відбувається між цільовою аналізованою речовиною та специфічним антитілом [3, 4]. Технології імунохімічного аналізу для визначення антигенів і антитіл є важливим напрямком в імунологічній діагностиці. Найчастіше для цих цілей використовують імунофлуоресцентний та імуноферментний методи. В даний час для вирішення актуальної проблеми специфічної індикації імуномаркерів знаходять застосування аналітичні пристрої, що дозволяють отримувати інформацію про взаємодії антитіл і антигенів у формі електричних сигналів, з використанням різного роду біологічних сенсорів [5, 6, 9, 13, 16].

Імунохімічні методи аналізу, зазвичай, застосовують у біохімічних дослідженнях, в медицині та фармакології, зокрема на антиген-антитіло-взаємодії. Унікальна здатність антитіл до комплементарних взаємодій з антигенами в складних за складом розчинах (слина, кров, сироватка, лімфа, сеча та інші біологічні рідини) забезпечує

високу специфічність і чутливість імуноаналізу, дозволяючи виявляти дуже низькі концентрації клітин, гормонів, ферментів, різних метаболітів і лікарських препаратів [6, 11, 12, 16, 18]. Тому створення імуносенсора (аналітичних пристроїв, які використовують в якості біочутливого елемента антитіла, антигени або білково-гаптенів кон'югати) стає одним із перспективних напрямків аналітичного приладобудування. Залежно від типу фізичного перетворювача (детектора), виділяють електрохімічні, оптичні, термічні, п'єзоелектричні й інші імуносенсори, рекомендовані для вирішення цілого ряду аналітичних завдань. Останнім часом активно вивчають п'єзокварцеві сенсорні, чутливі до зміни маси з рядом переваг: експресивністю, малою інерційністю, портативністю, простотою конструкції і низькою вартістю, а також можливістю здійснювати прямий контроль за імуноними реакціями без попереднього введення флуоресцентної або ферментної міток, що дозволяють реєструвати аналітичний сигнал [4–8, 17]. Аналітичним сигналом п'єзокварцевого імуносенсора слугує зміна частоти коливань п'єзокварцевого резонатора при збільшенні або зменшенні маси біорецепторного покриття через утворення або руйнування на його поверхні імуноного комплексу. Можливі два варіанти використання п'єзокварцевих сенсорів [5]. У першому випадку (статичному) концентрацію з'єднання встановлюють зіставлення даних, отриманих до і після витримання сенсора в аналізованому розчині. До недоліків цього способу необхідно віднести тривалість і трудомісткість аналізу. Другий варіант – проточно-інжекційний аналіз, що дозволяє значно скоротити час отримання аналітичного сигналу, робить можливим проведення серії вимірювань на одному сенсорі. Крім того, відносно вимірювання аналітичного сигналу при проточно-інжекційному аналізі дозволяє нівелювати внесок неспецифічних взаємодій матричних компонентів проби з поверхнею сенсора, швидкості потоку, в'язкості реакцій середовища [3–5, 11–13].

У біосенсорах рецепторний біологічний компонент (антитіла, антигени, ферменти, клітини), іммобілізований на поверхні перетворювача, взаємодіє з аналізованою речовиною, викликаючи зміни у фізико-хімічних параметрах системи й тим самим генеруючи сигнал, що підсилюється й надходить на пристрій реєстрації й обробки даних [1, 2, 4].

Електрохемілюмінесценція – імунодосліджувана система, при якій антитіла, мічені до ензиму, фіксовані на парамагнітних носіях, сконцентровані на електроді завдяки магнетизму [8]. Дослідження проводять з метою використання компактних мембран для імунологічних досліджень [4, 11–13, 19]. У цій системі антитіла іммобілізовані на мембрані та насичені міченим антигеном. Коли немічений антиген (зразок) проводять крізь текучу систему, пропорційна кількість міченого антигену переміщується з іммобілізованого антигену на місце зв'язку, і це переміщення визначають за допомогою флуориметра. Концентрацію переміщеного міченого антигену визначають пропорційно до концентрації цільового аналітика, що було введено в систему.

Антитіла, як і ферменти, теж достатньо давно й активно застосовують в імуноаналізі. Через те, що зв'язування антитіл з антигенами міцніше і специфічніше, ніж зв'язування більшості ферментів із субстратами [9, 11, 12], то антитіла є найпопулярнішими елементами розпізнавання у біосенсорах, особливо в імуносенсорах. Крім

того, для них характерна дуже висока чутливість визначення субстрату. Відсутність каталітичної активності ферментів у антибіах компенсується застосуванням разом із ферментами [5], а з розвитком нанотехнологій – з наноматеріалами [1, 3–5, 13] у вигляді кон'югатів. Антитіло можна отримати практично до будь-якої речовини [6]. У біосенсорах та імуносенсорах на основі антитіл використовують спеціальні методи реєстрації сигналу, який виникає унаслідок зв'язування антитіл з антигеном [9]. Для детекції акту цієї взаємодії застосовують різноманітні мітки, якими можуть бути ферменти, флуоресцентні або хемілюмінесцентні молекули, метали. Крім того, антитіла можна іммобілізувати практично на усіх типах трансдьюсерів. Можливо, цим і пояснюється велика кількість публікацій за даною тематикою та позитивна динаміка зростання активності застосування антитіл як розпізнавальних елементів сенсорів і дотепер. Найпоширенішими трансдьюсерами, на яких можна іммобілізувати антитіла, є електрохімічні [6–8, 11, 12, 19], електрохемілюмінесцентні [3, 5], п'єзоелектричні [4, 11, 12], на основі поверхневого плазмового резонансу [3–5, 9, 19].

Антитіла або антигени використовують як чутливі шари імуносенсорів; вони з високою специфічністю зв'язуються з молекулами-аналітами, відповідно до антигенів або антитіл. Застосування антитіл у біосенсорних технологіях дозволяє проводити вимірювання у складних біологічних сумішах, таких, як сироватка або плазма крові [4–6]. Особливо цікавими для створення біосенсорів є моноклональні антитіла (монАТ), які є гомогенними імуноглобулінами однакової специфічності та можуть зв'язуватися з високою спорідненістю із відповідною ділянкою (епітопом) на антигені [2–5].

Відомо та розроблено один із варіантів оптичного імунобіосенсора на основі еліпсометрії повного внутрішнього відбиття, оптичного імунобіосенсора на основі ефекту поверхневого плазмового резонансу для експресного визначення. Використання біодатчиків на основі поверхневого плазмового резонансу набуває дедалі більшої популярності у фундаментальних біологічних дослідженнях, клінічній діагностиці та екологічному контролі [5, 11, 12, 14, 16]. Багато досліджень спрямовано на пошук нових підходів до оптимізації умов іммобілізації біологічного матеріалу для поверхневого плазмового резонансу сенсорів. Найпоширенішими є орієнтоване включення біологічних молекул у плівки різного складу або ж попередня іммобілізація на поверхні. Відомі біосенсори, що можуть контролювати кількість білків [1, 2, 5], глюкози [3, 4], лактату [5], імуноглобулінів [2, 4, 5, 9], гормонів [3, 4, 6, 18] у біологічних середовищах.

Необхідно зазначити, що, незважаючи на успіхи імунологічних досліджень, є складнощі: необхідні специфічні антитіла до кожної сполуки; імуносенсори мають висо-

ку вартість; важко розрізнити сигнали при застосуванні імуносенсорів; можлива втрата чутливості до них. До негативних моментів варто також віднести матричні ефекти, неспецифічну взаємодію, гетерогенність. Сфера їх застосування різноманітна, включаючи моніторинг навколишнього середовища [5]. Фундаментальною основою імуносенсорів стало визначення антигенів із антитілами у біологічних рідинах (слині, крові, сироватці, сечі, лімфі) завдяки утворенню стабільного компонента. Водночас, необхідне підвищення їх специфічності та розпізнавальної здатності. Даний метод не можна поки що застосовувати у виробництві, а тільки у лабораторних дослідженнях. Маючи характеристики трасдукторів, біосенсори істотно малі, але активно проводять спроби зменшити їх розмір для більш ефективного застосування і для експериментів *in vitro* та *in vivo*, що необхідно для досягнення певного фізичного стану, а не для сенсорів взагалі [1, 4, 11, 12, 16].

Імуносенсори використовують для вивчення кінетики біохімічних взаємодій і характеристики перехресного зв'язування імунореагентів [5, 9]. Перелік компонентів, які визначають із використанням імуносенсорів, різноманітний: високо- і низькомолекулярні сполуки, соматичні й бактеріальні клітини, віруси, гриби і фаги, антитіла, антигени. Залежно від маси аналізів, застосовують різні методи виконання імуноаналізу [4, 5, 9, 14]. Визначення великих часток (бактерії, віруси, біологічно активні макромолекули – антитіла, антигени, нуклеїнові кислоти, білки крові), зазвичай, проводять шляхом прямого детектування [3, 4, 6, 14, 15]. При пропусненні через сенсор аналізованої проби компоненти, які визначають, специфічно зв'язуються з іммобілізованими на поверхні електрода рецепторними молекулами, утворюючи імунокомплекси, а решта речовини течуть із потоком розчину-носія. Зростання маси електрода за рахунок утвореного імунокомплексу призводить до зменшення резонансної частоти сенсора пропорційно концентрації аналіту в пробі (рис. 1).

Такий аналіз виконують як у статичному, так і проточному режимах. Електроди сенсора модифікують антигенами (молекули ДНК, молекули РНК, бактеріальні антигени, гаптен-білкові кон'югати, клітини) або моноклональними антитілами, а також сироватками, що містять поліклональні антитіла. Для визначення низькомолекулярних сполук – лікарських препаратів, гормонів, алкалоїдів, пестицидів, метаболітів, екоотоксикантів, активаторів росту та інших біологічно активних речовин, як правило, використовують конкурентний формат імуноаналізу [3–5, 6, 7, 14] (рис. 2), оскільки при зв'язуванні низькомолекулярних речовин (гаптенів) приріст маси біочутливого шару незначний.

Для проведення аналізу за конкурентною схемою на поверхні сенсора іммобілізують гаптен-білкові кон'югати

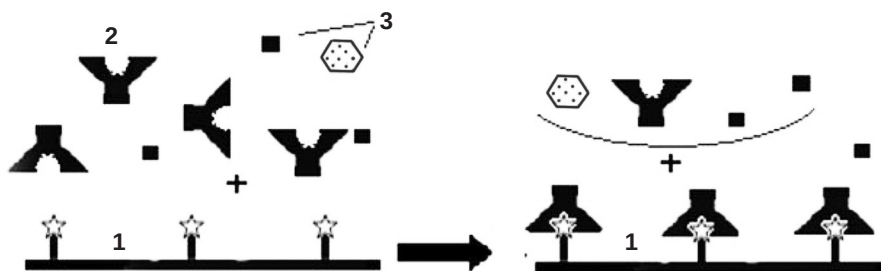


Рис. 1. Схема прямого визначення антитілом: 1 – антиген (гаптен); 2 – антитіло; 3 – неспецифічні компоненти суміші.



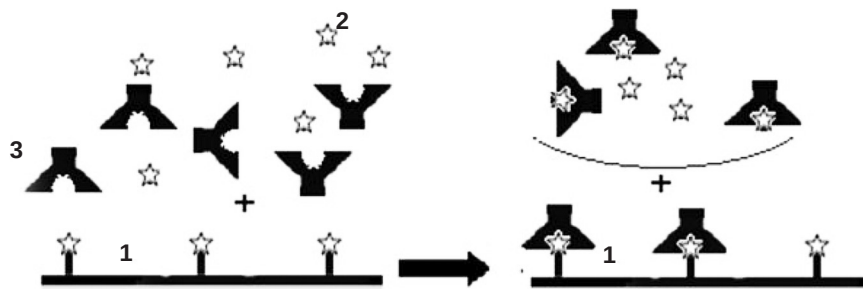


Рис. 2. Схема непрямого/конкурентного аналізу: 1 – іммобілізований антиген (гаптен); 2 – вільний антиген; 3 – антитіло.

на основі їх з'єднання, яке визначають [9]. В аналізовану пробу, яка містить гаптен, вводять фіксовану кількість специфічних антитіл, що можуть зв'язуватися як з іммобілізованими, так і з вільними гаптенами. У цьому випадку, чим нижча концентрація визначеного гаптена в пробі, тим більша кількість антитіл зв'язується з іммобілізованим гаптеном і відповідно більше величина аналітичного сигналу сенсора. За чутливістю конкурентний метод перевершує прямий [3, 4, 9] і в даний час для визначення низькомолекулярних речовин цей метод є особливо перспективним [5].

Експресність вимірювань із використанням біосенсорів стала причиною пильного інтересу до них з боку фахівців з клінічної лабораторної діагностики. Такі аналітичні системи дають можливість не тільки інтенсифікувати роботу при виконанні великої кількості аналізів, але і скоротити час, необхідний для надання лікарської допомоги [1, 4, 5]. Висока чутливість п'єзокварцевих сенсорів дозволяє проводити ранню діагностику, коли симптоми патології проявляються лише на молекулярному рівні. Крім того, важливо, що з'являється можливість спостереження біохімічної чи імунологічної реакції і її окремих стадій у режимі реального часу. За допомогою імуносенсорів можливе виявлення широкого кола клінічно важливих аналітів, які слугують специфічними маркерами багатьох соматичних та інфекційних захворювань [1]. Численні публікації присвячені використанню імуносенсорів для визначення білкових молекул, наприклад антитіл різних класів, у сироватці крові, високий або наростаючий титр яких свідчить про активну інфекцію в організмі та має найбільше діагностичне і прогностичне значення (при корі, краснусі, епідемічному паротиті, вітряній віспі, кандидозі, менінгококовій інфекції, дифтерії, скарлатині та ін.) [3–5, 11, 12]. Залежно від природи вторинних антитіл до імуноглобулінів, які використовують у методиці аналізу, чутливість визначень може відрізнитися на порядок. Для проведення ефективного лікування алергічних захворювань необхідно здійснювати аналіз сироватки крові хворих на вміст імуноглобулінів E (IgE). Для цієї мети розроблено сенсор із рецепторним покриттям на основі вторинних антитіл до людського IgE, що дозволяє визначати сумарний вміст імуноглобулінів у статичних умовах [5, 9]. Для виявлення специфічних антитіл до конкретних алергенів, іммобілізованим в якості рецепторного шару, проводять сендвіч-аналіз. При цьому вторинні антитіла, які вводять після зв'язування рецепторного шару з антитілами досліджуваної сироватки (IgA, IgM, IgG, IgE), виявляються при додаванні в пробу вторинних антитіл до певних субкласів імуноглобулінів відповідно (IgA, IgM, IgG, IgE), що дозволяє визначати в сироватці крові наявність імуноглобулінів (IgA, IgM, IgG,

IgE), специфічних до кожного антигену чи алергену. Лінійну залежність аналітичного сигналу сенсора від вмісту імуноглобулінів (IgA, IgM, IgG, IgE) спостерігають в інтервалі  $0,15 \times 10^3$ – $17,5 \times 10^3$  нг/мл [3, 4, 9, 11, 12, 16]. Запропоновано імуносенсор для прямого визначення антитіл до ДНК, що з'являються в крові при розвитку аутоімунних патологічних процесів (системний червоний вовчак, системна склеродермія, аутоімунний тиреоїдит, гломерулонефрит, ревматоїдний артрит) [5, 7, 11, 12, 15, 16]. Сенсор з іммобілізованими одноланцюжковими молекулами ДНК чи РНК використовують як детектор у проточно-інжекційному аналізі, що забезпечує визначення в сироватці крові антитіл до ДНК та РНК на рівні 0,1–25,0 мкг/мл [5, 7, 15, 16]. Збільшення концентрації  $\alpha$ -фетопротеїну (ракового ембріонального антигену) або феритину в сироватці крові людини може бути наслідком онкологічних процесів, що розвиваються в організмі [2–4, 10]. Розроблений сенсор для виявлення феритину, який має високу чутливість, забезпечує визначення цієї речовини у вузькому інтервалі концентрацій, що не дозволяє поки використовувати його для аналізу крові. Методи практичної клінічної діагностики для визначення сечових білків, що застосовують у даний час, що є маркерами ниркової патології, тривалі й у більшості випадків вимагають введення радіоактивної мітки. Мультисенсорна система на основі лінійки п'єзокварцевих біосенсорів уможлиблює одночасне визначення мікрокількостей мікроальбуміну,  $\alpha_1$ - і  $\beta_2$ -мікроглобуліну й IgG в сечі [2, 5, 9]. На жаль, більшість досліджень виконано на модельних водних розчинах. Автори не наводять результатів аналізу реальних біологічних рідин (сеча, сироватка, кров, слина, лімфа), що ускладнює оцінку переваг та недоліків таких біосенсорів [1, 3, 4, 6, 11, 12]. Більшість описаних імуносенсорів призначено для проведення мікробіологічних досліджень. Вони виявилися більш зручними, порівняно з практичними в даний час технологіями, які вимагають для виконання аналізу декількох днів. Створено п'єзоімуносенсори для визначення найпоширеніших хвороботворних бактерій, а також патогенних вірусів (гепатиту, герпесу, вірусу імунодефіциту людини). Детальна інформація представлена в оглядах [2, 3, 6, 14, 16]. Для ідентифікації вірусу гепатиту у рідкісних середовищах запропоновано ДНК-біосенсори [3, 4, 7, 15], за чутливістю не поступаються імуносенсорам. Біосенсори – на основі ДНК-експрес-діагностики туберкульозної інфекції, а також санітарно-гігієнічного контролю зовнішнього середовища. В даний час у біохімічних, імунологічних і генетичних дослідженнях широко використовують бактеріофаги – паразити бактерій, за допомогою яких розшифровують тонку структуру генів, ідентифікацію та пришвидшене виявлення збудників бактеріальних інфек-

цій [3, 5, 11, 12, 14, 15]. Для експресного визначення мікробів, патогенних для людини, запропоновано сенсор, що дозволяє оцінити якість питної води, продуктів харчування і різних видів біологічного матеріалу (слини, крові, сироватці, сечі, лімфі) [1–4, 13, 16]. Таким чином, біосенсиори та імуносенсиори дозволяють визначати в складних зразках (харчові продукти, об'єкти навколишнього середовища, біологічні рідини, лікарські препарати) сліди концентрації різних за своєю природою низькомолекулярних біологічно активних речовин на рівні гранично допустимих концентрацій і нижче [4, 5, 11, 12, 16].

**ВИСНОВКИ** Наукові дослідження в напрямку пошуків біосенсиорів та імуносенсиорів, дослідження їх властивостей, застосування у медичній практиці будуть сприяти підвищенню діагностики та ефективного лікування різних соматичних та інфекційних захворювань. Головна вимога до розпізнавальних елементів біосенсиорів та імуносенсиорів – специфічність (селективність), якій відповідають 5 типів об'єктів: ферменти, антитіла, нуклеїнові кислоти (ДНК, РНК), біотканини (тварин, рослин, бактерій, вірусів, грибів, найпростіших), рецептори. Найчастіше як розпізнавальний елемент біосенсиорів та імуносенсиорів використовують антитіла, що пояснюється найбільшою специфічністю і чутливістю порівняно з іншими видами біологічних об'єктів. Найпоширенішими трансдьюсерами, на яких можна іммобілізувати антитіла, є електрохімічні. Проте через досягнення в галузі нанотехнологій і генної інженерії цей перелік розширився ще й до аптамерів. Одним із перспективних напрямків у галузі розвитку сенсорних пристроїв, що об'єднують специфічність дії антитіл і ферментів, є пошук альтернативи природним антитілам, що пов'язано з тим, що антитілам притаманні такі недоліки, як методична складність отримання; необхідності роботи з донорами; невисока відтворюваність синтезів, оскільки властивості антитіл істотною мірою залежать від індивідуальних особливостей донора; обмеження для аналізу високотоксичних сполук; неможливість проведення аналізу в органічних середовищах,

агресивних відносно імуноглобулінів; нестабільність у широкому діапазоні температур і середовища рН. Сенсори на базі молекулярно імпринтованих полімерів дозволили б уникнути вищеперахованих недоліків, однак для того, щоб на основі молекулярно імпринтованих полімерів створити "штучні рецептори", які б витіснили антитіла з технологічної ніші виробництва сенсорів без радикальних змін у методах аналізу, необхідно, щоб молекулярно-імпринтовані полімери: запозичили такі властивості антитіл, як розчинність, розміри, специфічність, афінність, наявність епітопів (антигенних детермінант); зберегли свої основні переваги (низька вартість, швидкість виготовлення, висока стабільність). Аналітичні можливості біосенсиорів не вичерпуються наведеними прикладами. Широке впровадження в аналітичну практику відносно дешевих аналізаторів рідини на основі біосенсиорів та імуносенсиорів дозволить істотно підвищити якість аналізу, виявляти і визначати біологічні сполуки в об'єктах навколишнього середовища, харчових продуктах, біологічних рідинах, таким чином, розширивши лінійку аналітичних пристроїв для біохімічного, імунологічного або мікробіологічного аналізу. Головна перевага біосенсиорів та імуносенсиорів – висока специфічність біомолекул до цільового субстрату.

**Перспективи подальших досліджень** Перспективи застосування біосенсиорів та імуносенсиорів розширюються, більшість досліджень пов'язана із розробками сенсорів, чутливих до медикаментів, та до специфічних біомаркерів сенсорів із метою діагностики різних соматичних та інфекційних захворювань. Біосенсиори та імуносенсиори, завдяки їх високій специфічності та чутливості, дозволяють виявляти широкий спектр аналітів у зразках зі складною матрицею (слина, кров, сироватка, лімфа, сеча) з мінімальною пробопідготовкою та швидким отриманням результатів, можуть бути застосовані як перспективні експрес-методи діагностики в клінічній медицині. Тому дослідження в цьому напрямку будуть розвиватися й надалі.

#### СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Nanomaterial-based biosensors and immunosensors for quantitative determination of cardiac troponins / Alireza Nezami, Sadegh Dehghani, Rahim Nosrati, Negar Eskandari [et al.] // *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. – Vol. 159. – 2018. – P. 425–436.
2. Avraham Rasooly. Development of biosensors for cancer clinical testing / Avraham Rasooly, James Jacobson // *Biosensors and Bioelectronics*. – Vol. 21, Issue 10. – 2006. – P. 1851–1858.
3. Bansil Malhotra D. Biosensors for clinical diagnostics industry / Bansil D. Malhotra, Asha Chaubey // *Sensors and Actuators B: Chemical*. – Vol. 91, Issues 1–3. – 2003. – P. 117–127.
4. Celine I. L. Critical overview on the application of sensors and biosensors for clinical analysis / Celine I. L. Justino, Armando C. Duarte, Teresa A. P. Rocha-Santos // *TrAC Trends in Analytical Chemistry*. – Volume 85, Part A. – 2016. – P. 36–60.
5. Elif Burcu Bahadır Applications of commercial biosensors in clinical, food, environmental, and biotreat/biowarfare analyses / Elif Burcu Bahadır, Mustafa Kemal Sezginçtürk // *Analytical Biochemistry*. – Vol. 478. – 2015. – P. 107–120.
6. Elif Burcu Bahadır. Electrochemical biosensors for hormone analyses / Elif Burcu Bahadır, Mustafa Kemal Sezginçtürk // *Biosensors and Bioelectronics*. – Vol. 68. – 2015. – P. 62–71.
7. Immobilization-free DNA-based homogeneous electrochemical biosensors / Fang-Ting Zhang, Liang-Yuan Cai, Ying-Lin Zhou, Xin-Xiang Zhang // *TrAC Trends in Analytical Chemistry*. – Vol. 85, Part C. – 2016. – P. 17–32.
8. Alarcon-Angeles G. Electrochemical biosensors: Enzyme kinetics and role of nanomaterials / G. Alarcon-Angeles, G. A. Alvarez-Romero, A. Merkoçi. – editor(s): Klaus Wandelt, *Encyclopedia of Interfacial Chemistry* / Elsevier. – 2018. – P. 140–155.
9. Memristive biosensors based on full-size antibodies and antibody fragments / Ioulia Tzouvadaki, Julia Zapatero-Rodríguez, Sébastien Naus [et al.] // *Sensors and Actuators B: Chemical*. – Vol. 286. – 2019. – P. 346–352.
10. A simple immunosensor for alpha-fetoprotein determination based on gold nanoparticles-dextran-reduced graphene oxide / Jiexin Zhou, Cong Zhang, Yuan Chen [et al.] // *Journal of Electroanalytical Chemistry*. – Vol. 833. – 2019. – P. 126–132.
11. Santoro K. / Santoro K., Ricciardi C. *Biosensors* / Benjamin Caballero, Paul M. Finglas ed. – *Fidel Toldrá Encyclopedia of Food and Health*, Academic Press. – 2016. – P. 430–436.
12. Parikha Mehrotra. Biosensors and their applications – A review / Parikha Mehrotra // *Journal of Oral Biology and Craniofacial Research*. – Vol. 6, Issue 2. – 2016. – P. 153–159.

13. Nanomaterials in fluorescent laser-based immunosensors: Review and applications / Pedro R. Aranda, Germán A. Messina, Franco A. Bertolino [et al.] // *Microchemical Journal*. – Vol. 141. – 2018. – P. 308–323.
14. Robert S. Burlage, Joshua Tillmann. Biosensors of bacterial cells / S. Robert // *Journal of Microbiological Methods*. – Vol. 138. – 2017. – P. 2–11.
15. Application of hairpin DNA-based biosensors with various signal amplification strategies in clinical diagnosis / Rozita Abolhasan, Amir Mehdizadeh, Mohammad Reza Rashidi [et al.] // *Biosensors and Bioelectronics*. – Vol. 129. – 2019. – P. 164–174.
16. Sanjay Kisan Metkar Diagnostic biosensors in medicine – A review / Sanjay Kisan Metkar, Koyeli Girigoswami // *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*. – Vol. 17. – 2019. – P. 271–283.
17. Label-free electrochemical impedance immunosensor based on modified screen-printed gold electrodes for the diagnosis of canine visceral leishmaniasis / Taís A. R. Cordeiro, Marcus V. C. Gonçalves, Diego L. Franco [et al.] // *Talanta*. – Vol. 195. – 2019. – P. 327–332.
18. Cholesterol biosensors: A review / Vinay Narwal, Ritu Deswal, Bhawna Batra [et al.] // *Steroids*. – Vol. 143. – 2019. – P. 6–17.
19. Wei-Wei Zhao. Photoelectrochemical enzymatic biosensors / Wei-Wei Zhao, Jing-Juan Xu, Hong-Yuan Chen // *Biosensors and Bioelectronics*. – Vol. 92. – 2017. – P. 294–304.

Отримано 15.02.19

©V. P. Martsenyuk<sup>1</sup>, O. M. Mochulska<sup>2</sup>, O. R. Boyarchuk<sup>2</sup>, H. A. Pavlyshyn<sup>2</sup>, A. S. Sverstyuk<sup>2</sup>, Yu. V. Zavidnyuk<sup>2</sup>, V. I. Bondarchuk<sup>2</sup>  
*University of Bielsko-Biala, Republic of Poland<sup>1</sup>*  
*I. Horbachevsky Ternopil State Medical University<sup>2</sup>*

#### PERSPECTIVES OF DEVELOPMENT AND APPLICATION OF BIOSENSORS AND IMMUNOSENSORS WITH DIAGNOSTIC GOALS IN CLINICAL MEDICINE

**Summary.** The complexity of biological methods of analysis is that substances of defined organic compounds, are in complex, multi-component solutions and mixtures. It is clear that traditional methods of physical and chemical analysis does not solve many current problems. Modern development of electronic technology, in particular, biomedical, has set the priority tasks of creating high-precision primary transformers (sensory elements) for systems of sensitive and selective rapid-analysis of liquid agents for the presence of diagnostic-important substances. Currently, described biosensors for determination of biological and abiotical substances in a variety of environments. Modern biosensor designs are quite compact devices that combine the biological test element and the physico-chemical analyzer. In this article the main types, principles of work and prospects of use of biosensors and immunosensors for diagnostic purposes in clinical practice were highlighted.

**The aim of the study** – to conduct an analysis of modern foreign literature on types of biosensors and their promise of application as an express diagnostic method in clinical medicine.

**Materials and Methods.** Biblisemantic and analytical methods were used in the study.

**Results and Discussion.** During the research, the review and analysis of the latest data of foreign scientific medical literature on the types, principles of work, development and application of biosensors and immunosensors in clinical medicine was conducted. Biosensors include a biological recognition component, for example, bioassay, microorganism, enzyme, receptor, nucleic acid, or antibody in close contact with the transducer. Depending on the method of transmitting the signal (transducer type), the biosensors can be divided into such main groups: optical, mass, thermal, electrochemical, electrochemiluminescent, piezoelectric, based on the surface plasmon resonance. In addition, all biosensors can be divided into two large groups: with direct detection and with the indirect detection of the analyte. The interest in electrochemical biosensors with the use of inexpensive disposable consumables has led to the development of fine and thick-film technology in the production of biosensors of various types. The most promising among the biosensors for clinical diagnosis are sensors and methods based on the use of immune reactions, which are called immunosensors.

**Conclusions.** In recent decades, research on the development of methods and sensors that can be applied practically anywhere is being conducted as an express diagnostic method in clinical medicine. The best way to do this is to use portable, fast and sensitive biosensor technology with the ability to interpret results immediately. Biosensors and immunosensors, due to their high specificity and sensitivity, allow detecting a wide spectrum of analytes in samples with a complex matrix (saliva, blood, serum, lymph, urine) with minimal sample preparation.

**Key words:** biosensor; immunosensor; receptor; antigen; antibody; immune complex.

©В. П. Марценюк<sup>1</sup>, О. Н. Мочульская<sup>2</sup>, О. Р. Боярчук<sup>2</sup>, Г. А. Павлишин<sup>2</sup>, А. С. Сверстюк<sup>2</sup>, Ю. В. Завиднюк<sup>2</sup>, В. И. Бондарчук<sup>2</sup>  
*Университет в Бельско-Бялий, Республика Польша<sup>1</sup>*  
*ГВУЗ “Тернопольский государственный медицинский университет имени И. Я. Горбачевского”<sup>2</sup>*

#### ПЕРСПЕКТИВЫ РАЗРАБОТКИ И ПРИМЕНЕНИЯ БИОСЕНСОРОВ И ИММУНОСЕНСОРОВ С ДИАГНОСТИЧЕСКОЙ ЦЕЛЬЮ В КЛИНИЧЕСКОЙ МЕДИЦИНЕ

**Резюме.** Сложность биологических методов анализа заключается в том, что вещества, которые определяются, являются органическими соединениями, находятся в сложных, многокомпонентных растворах и смесях. Отсюда видимо, что традиционные методы физико-химического анализа не позволяют решать многие актуальные проблемы. Современное развитие электронной техники, в частности биомедицинской, поставило первоочередной задачей создать высокоточные первичные преобразователи (сенсорные элементы) для систем чувствительного и селективного экспресс-анализа жидких сред на наличие диагностически важных веществ. В настоящее время описаны биосенсоры для определения веществ биологического и абиотического происхождения в самых разнообразных средах. Современные конструкции биосенсоров является весьма компактными устройствами, которые сочетают биологический тестирующий элемент и физико-химический анализатор. В статье отражены основные виды, принципы работы и перспективы использования биосенсоров и иммуносенсора с диагностической целью в клинической практике.

**Цель исследования** – провести анализ современной зарубежной литературы по видам биосенсоров и перспективы их применения как экспресс-метода диагностики в клинической медицине.

**Материалы и методы.** В исследовании применены библиосемантический и аналитический методы.

**Результаты исследования и их обсуждение.** Во время выполнения исследования был проведен обзор и анализ последних данных зарубежной научно-медицинской литературы по видам, принципам работы, разработки и возможностей применения биосенсоров и иммуносенсоров в клинической медицине. Биосенсоры включают в себя компонент биологического распознавания, например биоткань, микроорганизм, фермент, рецептор, нуклеиновую кислоту, или антитело в тесном контакте с трансдьюсером. В зависимости от способа передачи сигнала (вида трансдьюсера), биосенсоры могут быть разделены на такие основные группы: на следующие основные группы: оптические, массовые, тепловые, электрохимические, электрохемилюминесцентный, пьезоэлектрические, на основе поверхностного плазменного резонанса. Кроме того, все биосенсоры можно разделить на две большие группы: с прямым обнаружением и с непрямым обнаружением аналита. Интерес к электрохимическим биодатчикам с использованием недорогих одноразовых расходных материалов привел к применению развития тонко- и толстопленочной технологии в производстве биосенсоров различных типов. Наиболее перспективными среди биосенсоров для клинической диагностики являются сенсоры и методы, в основе которых лежит использование иммунореакции, которые называются иммуносенсорами.

**Выводы.** В последние десятилетия проводятся исследования по разработке методов и сенсоров, которые могут быть применены практически в любом месте как экспресс-метод диагностики в клинической медицине. Наилучше для этой цели подходят портативные, быстрые и чувствительные биосенсорные технологии с возможностью немедленной интерпретации результатов. Биосенсоры и иммуносенсоры, благодаря их высокой специфичности и чувствительности, позволяют обнаруживать широкий спектр аналитов в образцах со сложной матрицей (слюна, кровь, сыворотка, лимфа, моча) с минимальной пробоподготовкой.

**Ключевые слова:** биосенсор; иммуносенсор; рецептор; антиген; антитело; иммунный комплекс.

**Адреса для листування:** О. М. Мочульська, ДВНЗ “Тернопільський державний медичний університет імені І. Я. Горбачевського”, майдан Волі, 1, Тернопіль, 46001, Україна, e-mail: mochulska\_om@tdmu.edu.ua