

## **ИСПОЛЬЗОВАНИЕ СИСТЕМЫ ФИЛЬТРАЦИИ ШУМОВ И ПОВЫШЕНИЯ КАЧЕСТВА СИГНАЛА НАТЕЛЬНОЙ БИОСЕНСОРНОЙ ПЛАТФОРМЫ ПРИ ОДНОВРЕМЕННОМ ИЗМЕРЕНИИ НА ДВИЖУЩЕМСЯ ОБЪЕКТЕ СОДЕРЖАНИЯ ГЛЮКОЗЫ И ЛАКТАТА В ПОТУ**

**Колтунов Игорь Ильич**

д-р техн. наук, профессор, Московский политехнический университет, ученый секретарь, РФ, г. Москва

**Панфилов Антон Владимирович**

канд. экон. наук, генеральный директор ООО НПГ «Традиция», РФ, г. Москва

**Посельский Иван Александрович**

руководитель НТЦ «Автоматизированные технические системы» Московского политехнического университета, РФ, г. Москва

**Чубуков Николай Николаевич**

руководитель проекта ООО НПГ «Традиция», РФ, г. Москва

**Бараненко Сергей Васильевич**

инженер, ООО НПГ «Традиция», РФ, г. Москва

*Данное исследование выполняется при финансовой поддержке Министерства Образования и Науки России по соглашению №14.577.21.0232 от «29» сентября 2016 года (уникальный номер RFMEFI57716X0232), прикладные научные исследования проводятся по теме «Исследование научно-технических решений и разработка интеллектуальной нательной биосенсорной платформы превентивного мониторинга и оценки показателей организма человека «Сенсорная сеть тела» с возможностью коррелирования данных, полученных от различных датчиков в зашумленной среде».*

**Аннотация.** Целью данной работы являлась оценка параметров ферментных биосенсоров для определения глюкозы и лактата и возможности их применения в составе датчиков аппаратно-программного комплекса «Сенсорная сеть тела».

**Ключевые слова:** биосенсор; метаболит; фермент; глюкоза; лактат; неинвазивный мониторинг; кюветная система; открытая проточная система; хроноамперометрическая зависимость; потенциостат.

**Введение.** Одним из современных направлений в создании сенсорных систем является разработка биосенсоров, используемых в носимых датчиках, контролирующих содержанием различных метаболитов биологической жидкости. Можно выделить два важных метаболита –

глюкозу и лактат, концентрация которых в поте связана с концентрацией в крови прямо пропорциональной зависимостью.

Для определения концентрации глюкозы и молочной кислоты использованы методы ферментативной детекции лактата и глюкозы с использованием биосенсоров на основе отечественных электродов, полученных методом графитовой матричной печати.

Полученные результаты являются новыми и могут быть использованы при разработке биосенсоров для датчиков аппаратно-программного комплекса «Сенсорная сеть тела».

**Материалы, приборы, реактивы.** В качестве основы биосенсоров выбраны 3-контактные электроды, полученные матричной печатью и осаждением берлинской лазури на поверхность рабочего электрода. Для регистрации использовали потенциостат-гальваностат EmStat (PalmSens BV, Нидерланды). Измерения проводили по трехэлектродной схеме.

**Системы измерения.** Использованные системы измерения: кюветная и проточная. Также использована открытая проточная система (ОПС).

**Результаты. Характеристики биосенсоров для детекции глюкозы (Гл) и лактата (Лт) при имитации искусственного пота путем включения в образец различных концентраций Гл и Лт (измерения в кювете постоянного объема). Имобилизация ГОД**

Разработана методика имобилизации биоматериала на поверхности ЭМП в гель хитозана, подобрано соотношение фермента и имобилизующего агента.

В таблице 1 представлены данные по подбору проб; таблица 2 дает представление о кинетических константах и параметрах используемого биосенсора для детекции глюкозы. На рисунке 1 показаны получаемые калибровочные зависимости для различных концентраций фермента.

**Таблица 1.**

**Соотношение реагентов в смеси, наносимой на электрод с берлинской лазурью для имобилизации фермента**

Номер пробы	Хитозан, мкл	ГОД (10 мг/мл), мкл	Буфер, мкл	Ответ на 1 мМ Н <sub>2</sub> О <sub>2</sub> , мкА
1	1	1	8	0.53
2	2	1	7	0.56
3	3	1	6	0.70
4	4	1	5	0.73
5	5	1	4	0.77
6	6	1	3	0.60
7	7	1	2	0.59
8	8	1	1	0.46
9	9	1	0	0.17

**Таблица 2.**

**Характеристика полученных электродов (для кюветного способа измерения)**

Параметр	Концентрация ГОД на электроде, мкг/мм <sup>2</sup>		
	10	1	0,1
Уравнение, описывающее калибровочную зависимость	$V = V_0 + \frac{V_{max} S^h}{K_M^h + S^h}$ где $V_0 = 0.12$ ; $V_{max} = 1.58$ ; $h = 6.37$ ; $K_M = 0.58$ ; $R^2 = 0.99$	$V = V_0 + \frac{V_{max} S^h}{K_M^h + S^h}$ , где $V_0 = 0.07$ ; $V_{max} = 1.39$ ; $h = 2.08$ ; $K_M = 1.22$ ; $R^2 = 0.99$	$V = \frac{V_{max} S^h}{K_M^h + S^h}$ , где $V_{max} = 5.11$ ; $h = 0.60$ ; $K_M = 100.8$ ; $R^2 = 0.99$
Линейный диап. детекции, мМ	0.02 - 1	0.02 - 3	0.02 - 1
Уравнение регрессии для линейного участка	$y = 1.6452x - 0.0878$	$y = 0.4385x + 0.0611$	$y = 0.3476x + 0.0199$
Коэффициент корреляции R <sup>2</sup>	0.97	0.99	0.97
Коэф. чувств., мкА/мМ	1.65	0.44	0.35
Мин. предел обнаруж., мМ	0.02	0.02	0.02
Диапазон детекции, мМ	0.02 - 1	0.02 - 3	0.02 - 10
Коэффициент вариации, %	3.4	4.0	3.8

Примечания:  $V_0$  - константа уравнения при нулевой концентрации субстрата,  $V_{max}$  - максимальное значение скорости реакции,  $h$  - константа Хилла,  $K_M$  - константа Михаэлиса,  $S$  - концентрация субстрата,  $R^2$  - коэффициент корреляции.

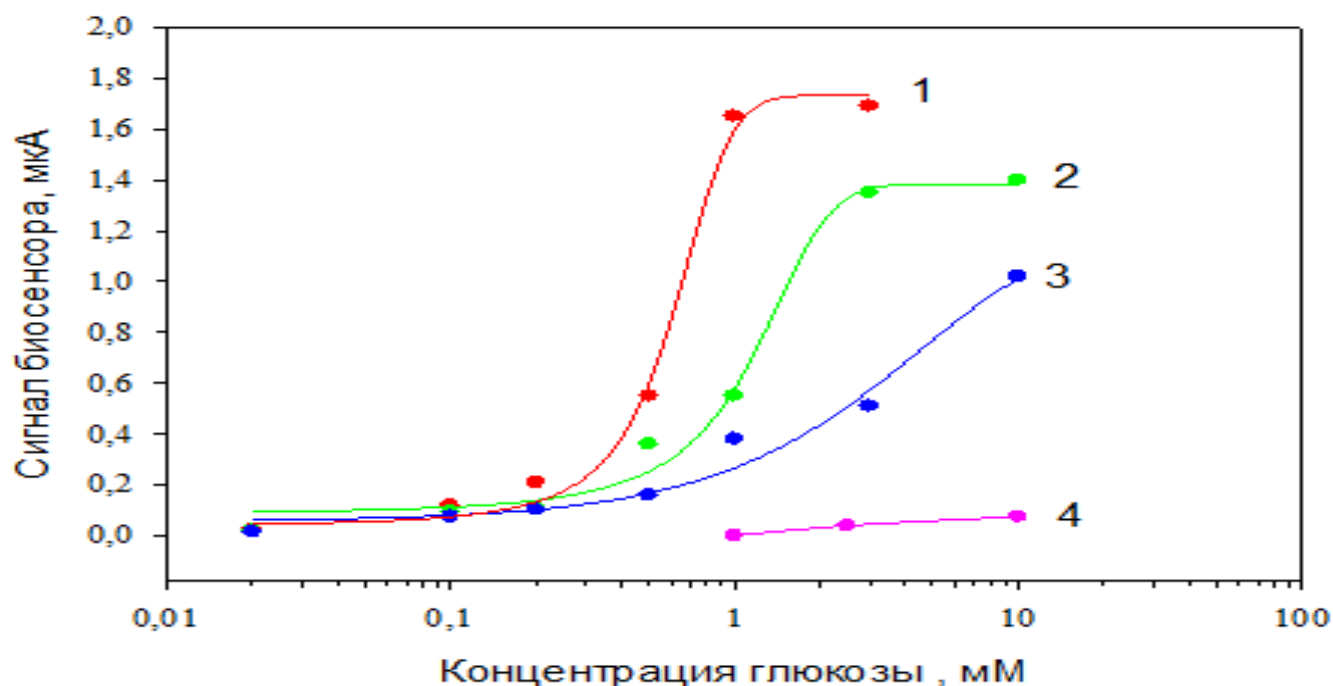


Рисунок 1. Калибровочные кривые для электродов с различным количеством фермента ГОД на поверхности электрода: 1 - концентрация ГОД 10 мкг/мм<sup>2</sup>; 2 - 1 мкг/мм<sup>2</sup>; 3 - 0.1 мкг/мм<sup>2</sup>; 4 - 0.01 мкг/мм<sup>2</sup>

Иммобилизация ЛОД. Для иммобилизации ЛОД использовали смесь фермента с хитозаном

при объемном соотношении «фермент : хитозан : буфер», равным 1:5:4 (Таблица 3).

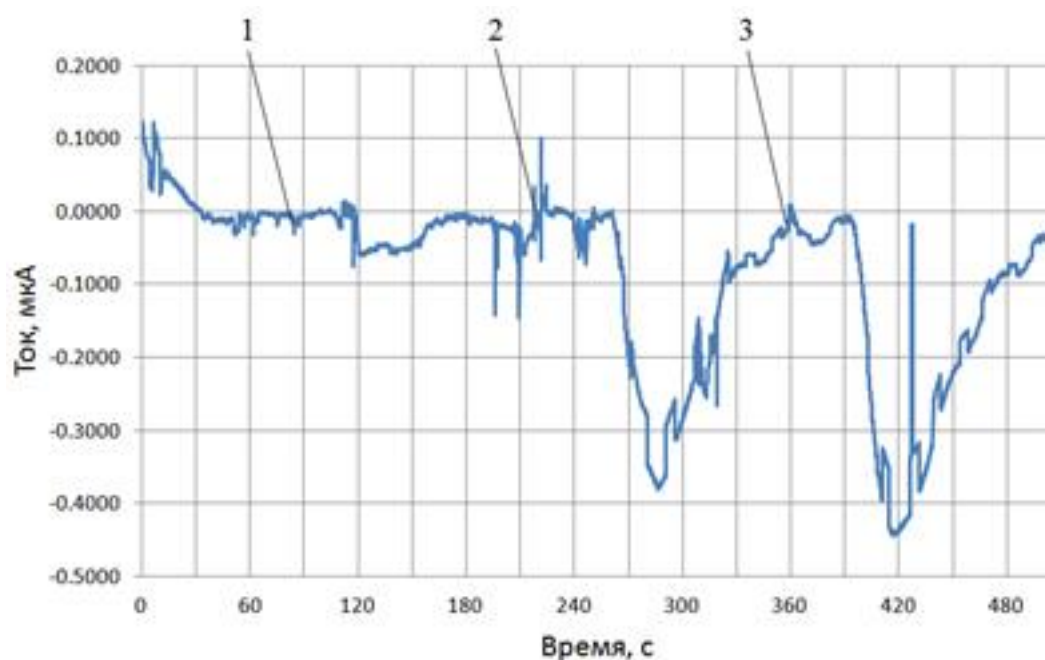
**Таблица 3.**

**Оценка ошибки измерения при использовании кюветы**

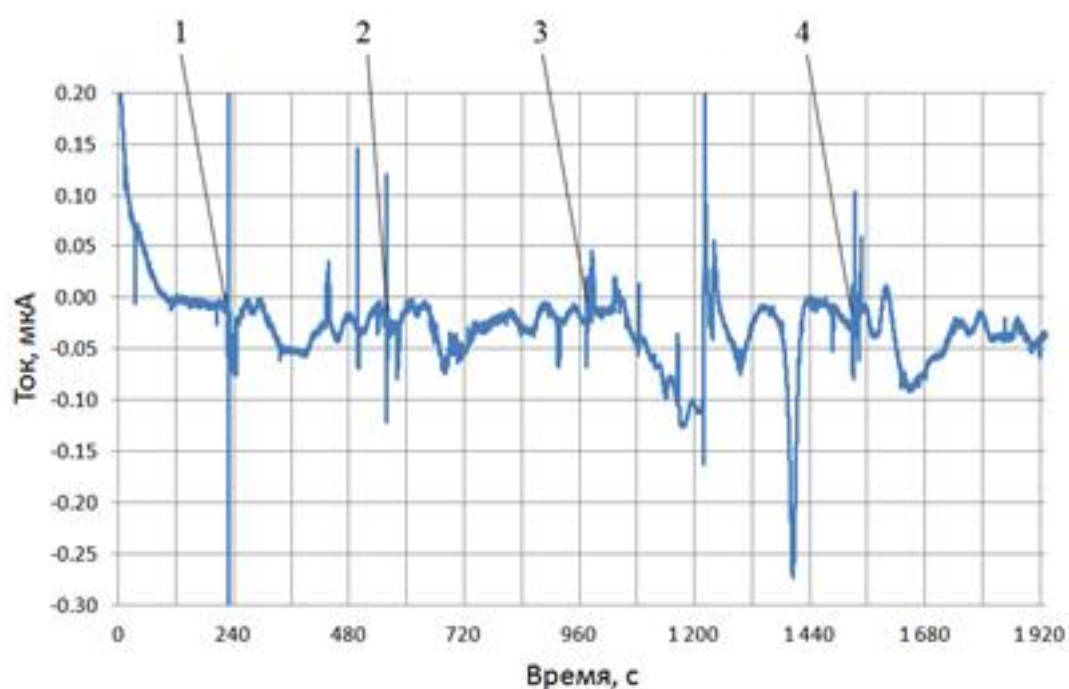
Номер измерения	Биосенсор Гл			Биосенсор Лт		
	№1	№2	№3	№1	№2	№3
1	0,12	0,13	0,14	0,95	0,89	0,89
2	0,13	0,13	0,12	0,92	0,88	0,95
3	0,15	0,14	0,12	0,91	0,90	0,93
4	0,14	0,13	0,14	0,94	0,93	0,91
5	0,15	0,15	0,12	0,87	0,86	0,90
Среднее, мкА	0,138	0,136	0,128	0,918	0,892	0,916
Дисперсия, мкА	0,013	0,009	0,011	0,031	0,025	0,024
Ошибка измерения, %	9,45	6,58	8,56	3,39	2,90	2,63
Сигнал / станд. откл.	65	65	65	56	56	56

Получены соотношения «сигнал/стандартное отклонение» для Лт и Гл, составляющие 56 и 65 соответственно при ошибке измерения менее 10 %. Это удовлетворительный результат, так как по условиям задачи требуется обнаружение изменений относительной концентрации содержания лактата и глюкозы в организме человека более чем на 10 %.

**Измерения образцов в проточной системе.** На рисунках 2 и 3 показан вид сигналов при использовании проточной системы измерения. Отклик появляется через 80-100 с после воздействия.



**Рисунок 2. Сигнал глюкозного биосенсора в проточной системе измерения. Стрелками показано введение 1 - 1 мМ, 2 - 5 мМ, 3 - 10 мМ глюкозы**

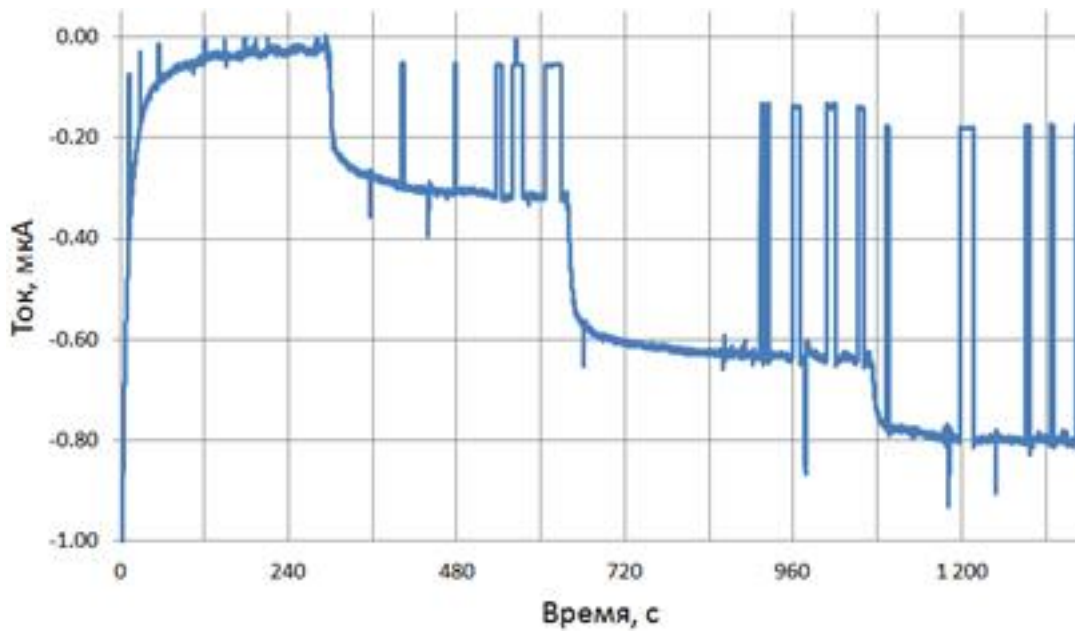


**Рисунок 3. Сигнал лактатного биосенсора в проточной системе измерения. Стрелками показано введение 1 - 2 мМ, 2 - 2 мМ, 3 - 4 мМ, 4 - 4 мМ лактата**

Для проточной системы получены соотношения «сигнал/стандартное отклонение» для Лт и Гл от 25 до 39 и от 25 до 176 соответственно при ошибке измерения менее 10 %. Полученные результаты можно признать приемлемыми, несмотря на ухудшение качества сигнала по сравнению с кюветой.

**Измерение пота в кюветной и проточной системах. Измерение в кюветной системе.**

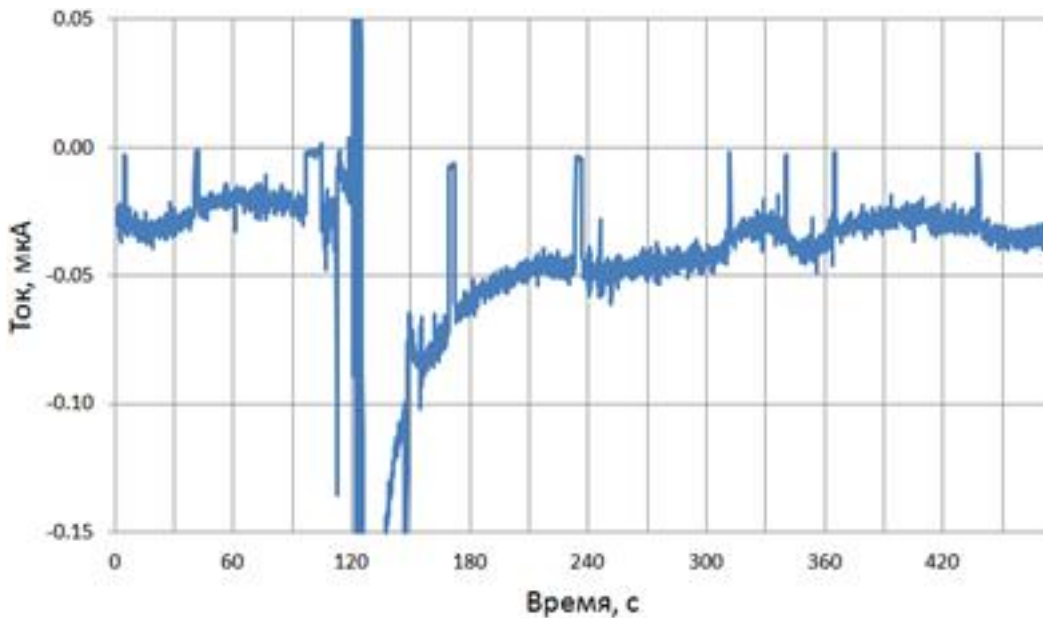
На рисунке 4 показан вид сигнала биосенсора для контроля лактата в кюветной системе измерения при введении 6 мкл образца пота.



**Рисунок 4. Зависимость тока от времени при регистрации лактата в пробе пота (введено 3 раза по 2 мкл пробы)**

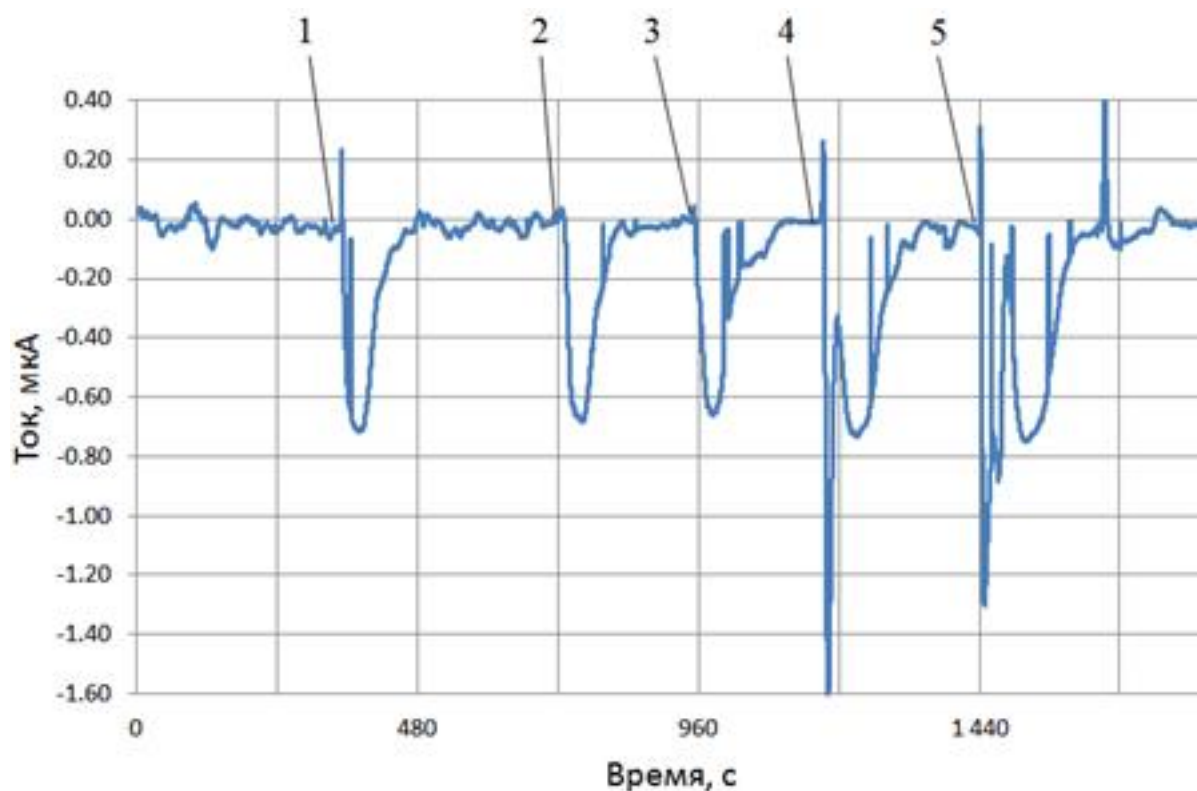
Содержание лактата в пробе пота измеряется биосенсором с ошибкой менее 1,4 %, результат не зависит от разбавления исходной пробы в пределах линейного диапазона концентраций.

На рисунке 5 показан вид сигнала биосенсора для глюкозы в кюветной системе измерения на введение 200 мкл образца пота.



**Рисунок 5. Вид сигнала ГОД сенсора на введение 200 мкл пота**

**Измерение в проточной системе.** ОПС была опробована для анализа реальных образцов пота (Рисунок 6).



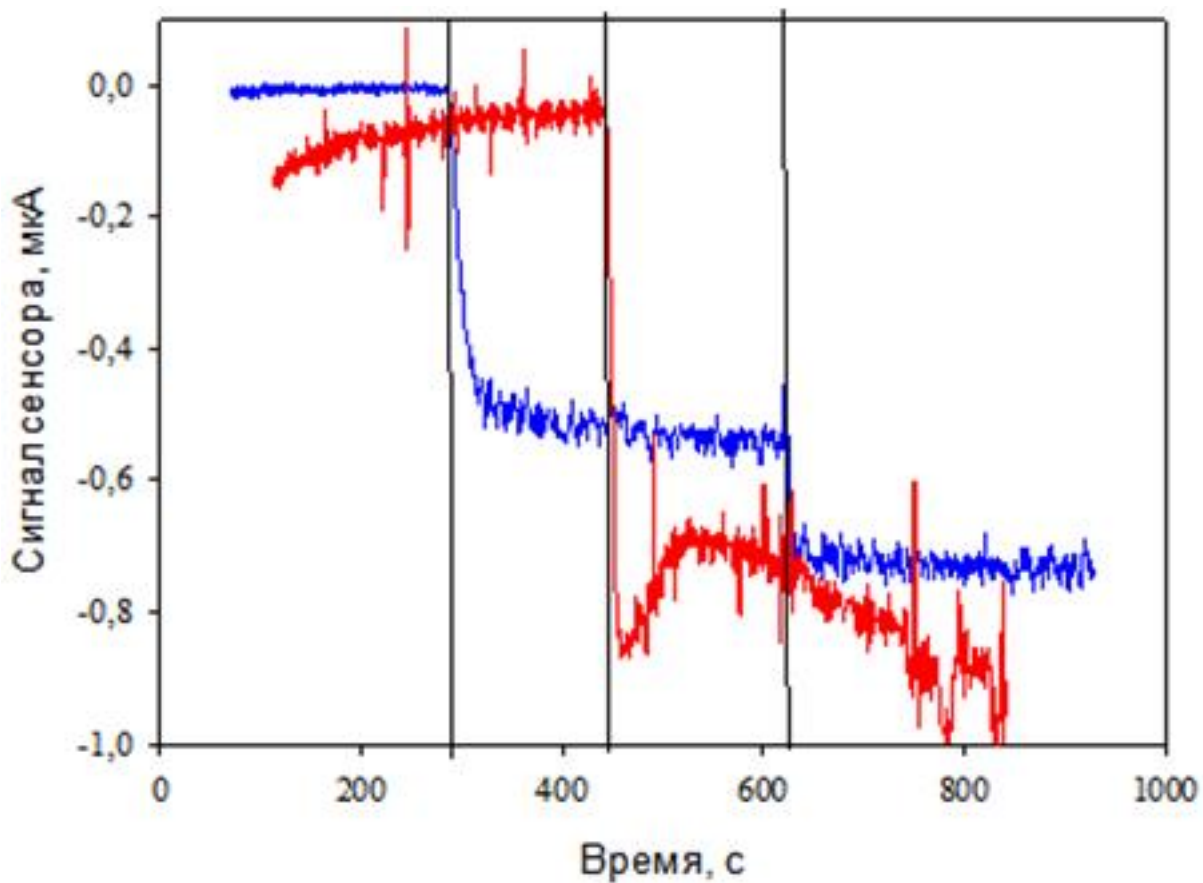
**Рисунок 6.** Вид сигналов ЛОД биосенсора при измерении реальных образцов пота в ОПС. Цифрами показано введение: 1 - 1 мкл пота; 2 - 1 мкл пота; 3 - 1 мкл пота; 4 - 10 мкл пота; 5 - 50 мкл пота

Видно, что уровень сигнала зависит не от объема пробы, а от концентрации определяемого вещества.

**Оценка взаимного влияния биосенсоров Гл и Лт.** Предполагается одновременное использование двух биосенсоров в датчике, поэтому было рассмотрено взаимовлияние электродов Лт и Гл в одной измерительной кювете и регистрации сигнала с двумя потенциостатами. Результаты измерения представлены на рисунке 7 (Гл - синий цвет, Лт - красный). Первоначально в измерительную кювету вводили 1 мМ глюкозы, затем 1 мМ лактата, затем смесь 1 мМ глюкозы и 1 мМ лактата. Видно, что электроды реагируют в соответствии со своим предназначением.

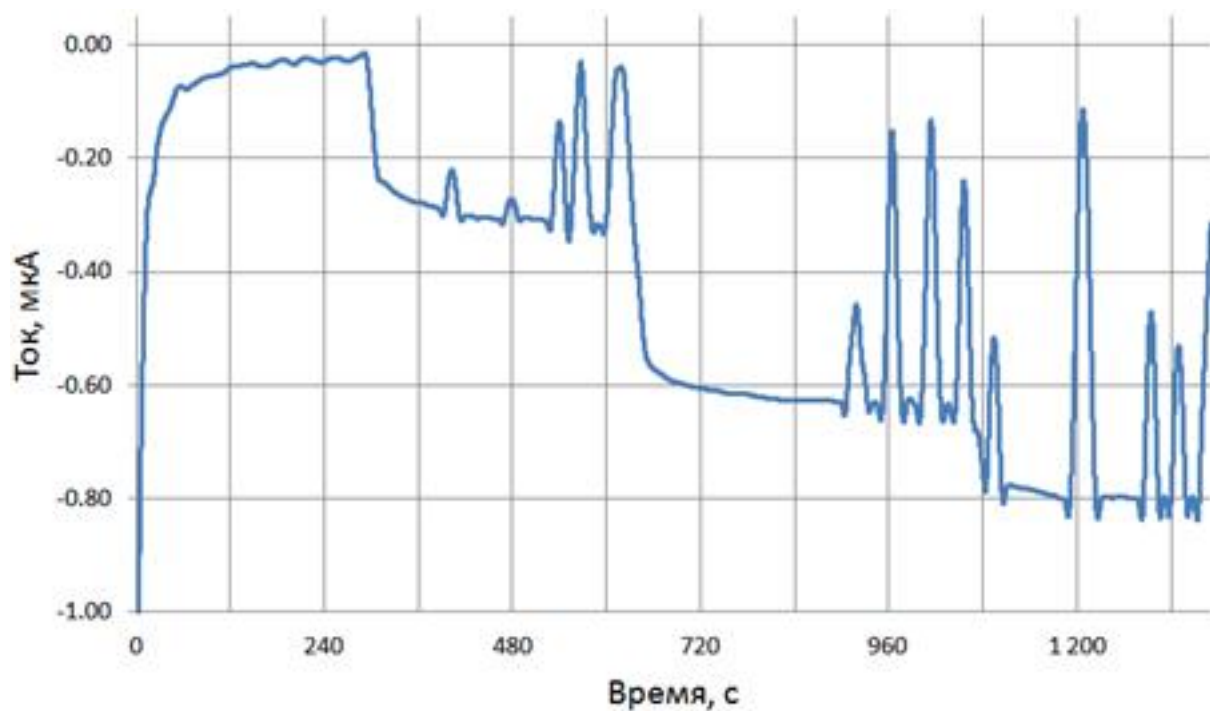
**Обработка сигнала.** Необходимость регистрации сигналов на движущемся объекте, каким является человек, приводит к тому, что на выходе биосенсора присутствуют значительные помехи, вызванные движением.





*Рисунок 7. Одновременная работа электродов Гл и Лт*

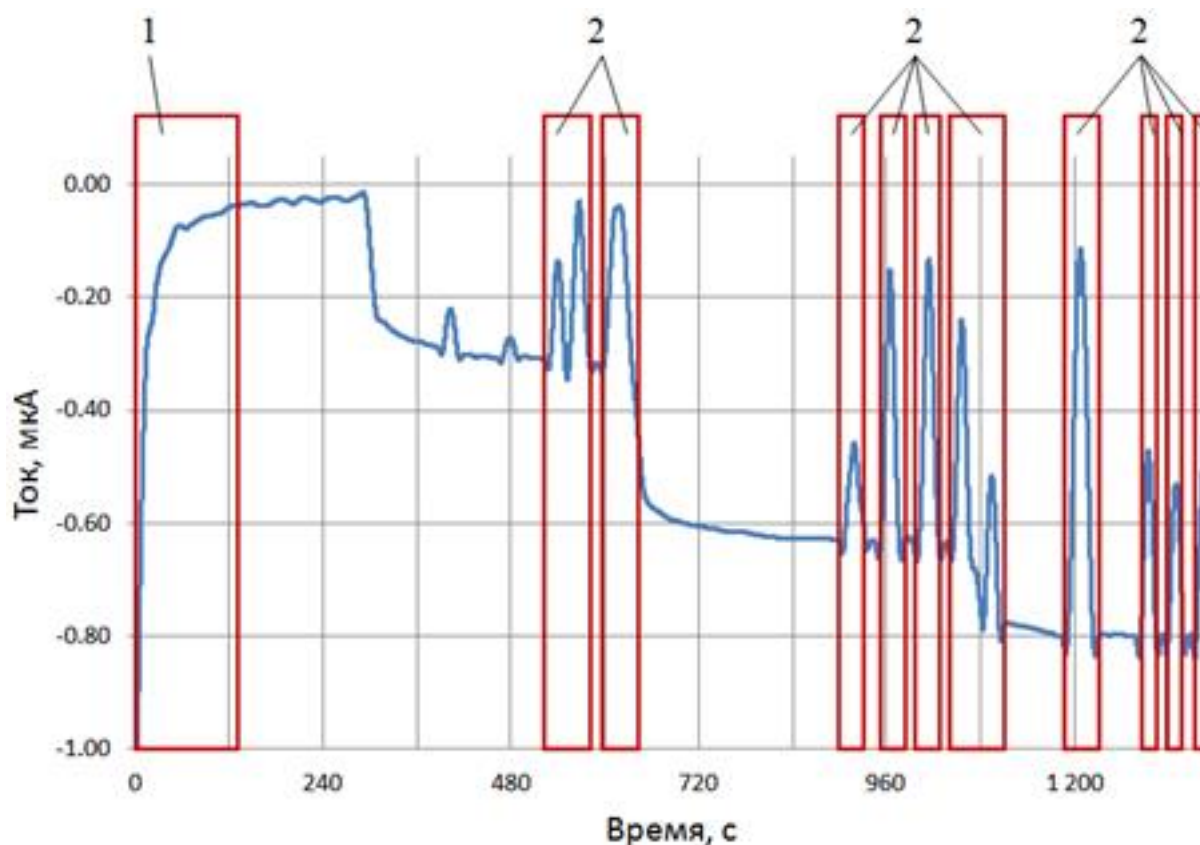
Квадратичное сглаживание показало себя достаточно эффективным инструментом при подавлении шумов биосенсоров в модельных лабораторных условиях. В реальной обстановке ситуация с помехами сложнее, чем с шумами. На рисунке 8 приведён результат сглаживания сигнала с помехами.





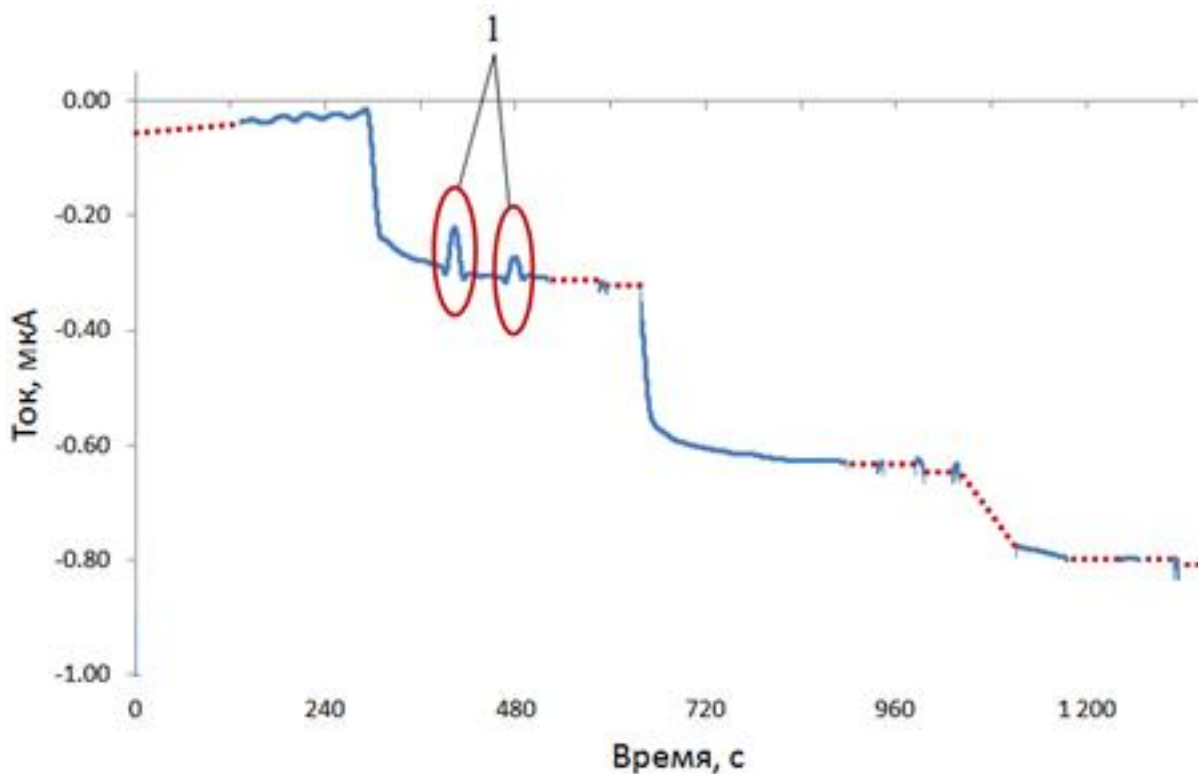
**Рисунок 8. Сглаживание данных рис. 4. (зависимость тока от времени при регистрации лактата в пробе пота)**

Длительность помехи может достигать четырёх минут, при этом эффективность сглаживания недостаточна. Попытки компенсации помех не имеют смысла, так как во время действия помехи характер сигнала меняется, следовательно, на время действия помехи сигнал должен быть признан недействительным и исключён из дальнейшей обработки. В качестве примера на рисунке 9 приведён предыдущий сигнал с выделенными интервалами, на которых данные недействительны.



**Рисунок 9. Интервалы с недействительным сигналом (1 - выход на режим, 2 - помехи)**

При длительности помехи меньше пороговой величины, определяемой параметрами сглаживания, в сигнале могут оставаться следы нераспознанных помех (Рисунок 10). Параметры обработки должны быть выбраны таким образом, чтобы величина этих следов не влияла на надёжность определения состояния носителя биосенсора. Для замещения участков с недействительными данными может быть использована аппроксимация. В качестве примера на рис. 10 показан предыдущий сигнал с участками кусочно-линейной аппроксимации (показаны пунктиром).



**Рисунок 10. Аппроксимация (1 - следы нераспознанных помех)**

**Заключение.** По результатам проведённой работы выяснено, что применение ферментных биосенсоров в качестве чувствительных элементов датчиков для определения уровня содержания глюкозы и лактата в системе, размещённой на человеке, возможно. Обработка сигналов позволяет повысить отношение сигнал/шум сигнала биосенсора до величин, пригодных для автоматизированной обработки. Помехи, возникающие на выходе биосенсоров, могут привести к задержке принятия решения о состоянии человека.

#### **Список литературы:**

1. Neethirajan S. Recent advances in wearable sensors for animal health management // Sensing and Bio-Sensing Research. 2017. V. 12. P. 15-29.
2. Enzyme biosensors for biomedical applications: strategies for safeguarding analytical performances in biological fluids. Review / G. Rocchitta, A. Spanu, S. Babudieri [et al]. // Sensors. 2016. V. 16. P. 780-800.
3. Cotton fabric-based electrochemical device for lactate measurement in saliva / R.S. P. Malon, K.Y. Chua, D.H. B. Wicaksono [et al]. // Analyst. 2014. V. 139. № 12. С. 3009-3016.
4. Relationship between lactate concentrations in active muscle sweat and whole blood / D.A. Sakharov, M.U. Shkurnikov, A.G. Tonevitsky, [et al]. // Bull. Experim. Biol. Med. 2010. V. 150. № 1. С. 83-85.
5. Correlation between sweat glucose and blood glucose in subjects with diabetes / J. Moyer, D. Wilson, № Finkelshtein [et al]. // Diabetes Technol Ther. 2012. V. 14. № 5. P. 398-402.
6. Вентцель Е.С. Теория вероятностей. - М.: Высш. шк., 1999. - 576 с.
7. Анцыферов С.С., Голубь Б.И. Общая теория измерений. - М.: Горячая линия-Телеком, 2007. - 176 с.