

## ВЫВОДЫ

Полученные результаты показывают, что МСК увеличивают уровень пролиферации лимфоцитов и выработку ИФН-гамма в ответ на все использованные стимуляторы, в том числе на митоген ФГА. Введение МСК до ДНК-иммунизации селективно увеличивает интенсивность синтеза ИФН-гамма в ответ на стимуляцию 4-мя рекомбинантными белками ВГС, тогда как в ответ на 3 белка – уменьшает. МСК, введенные после ДНК-иммунизации, подавляют иммунный ответ на плазмиду ВГС. Для раскрытия молекулярных механизмов действия МСК на ДНК-иммунизацию при гепатите С требуются дальнейшие исследования.

*Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ (проект № 17-04-01238).*

## ЛИТЕРАТУРА

1. Zingaretti C, De Francesco R, Abrignani S. Why is it so difficult to develop a hepatitis C virus preventive vaccine? *Clin Microbiol Infect* 2014; 20 (Suppl 5): 103–9. doi : 10.1111/1469-0691.12493.
2. Goodarzi P. et al. Mesenchymal Stem Cells-Derived Exosomes for Wound Regeneration. In: *Advances in Experimental Medicine and Biology*. Springer, New York, NY, 2018 [https://doi.org/10.1007/5584\\_2018\\_251](https://doi.org/10.1007/5584_2018_251).
11. Ayenehdeh JM, Niknam B, Rasouli S, Hashemi SM, Rahavi H, Rezaei N, Soleimani M, Liaeiha A, Niknam MH, Tajik N, Immunomodulatory and Protective Effects of Adipose Tissue-derived Mesenchymal stem cells in an Allograft Islet Composite Transplantation for Experimental Autoimmune type 1 Diabetes, *Immunology Letters* 2017, <http://dx.doi.org/10.1016/j.imlet.2017.05.006>
3. Teixeira GQ, Pereira CL, Ferreira JR, Maia AF, Gomez-Lazaro M, Barbosa MA, Neidlinger-Wilke C, Goncalves RM. Immunomodulation of Human Mesenchymal Stem/Stromal Cells in Intervertebral Disc Degeneration: Insights From a Proinflammatory/Degenerative Ex Vivo Model. *Spine (Phila Pa 1976)*. 2018 Jun 15; 43(12): E673-E682. doi: 10.1097/BRS.0000000000002494.
4. Le Blanc K, Davies LC. Mesenchymal stromal cells and the innate immune response. *Immunol Lett*. 2015 Dec; 168(2) : 140–6. doi: 10.1016/j.imlet.2015.05.004.
5. S. – H. Yang, M. – J. Park, I. – H. Yoon et al., Soluble mediators from mesenchymal stem cells suppress T cell proliferation by inducing IL-10, *Experimental and Molecular Medicine*, 2009, vol. 41, no. 5, pp. 315–324.
6. Масалова О.В., Леснова Е.И., Иванов А.В., Пичугин А.В., Пермякова К.Ю., Смирнова О.А., Туницкая В.Л., Уланова Т.И., Бурков А.Н., Кочетков С.Н., Атауллаханов Р.И., Куц А.А. Сравнительный анализ иммунного ответа на ДНК-конструкции, кодирующие неструктурные белки вируса гепатита С. // *Вопросы вирусологии*, 2013, Т.58, № 2, с. 21–28.

УДК 66.047

## НЕИНВАЗИВНЫЙ МОНИТОРИНГ ГЛЮКОЗЫ В ПОТЕ С ПОМОЩЬЮ ВЫСОКОЭФФЕКТИВНЫХ БИОСЕНСОРОВ

*Е.В. Карпова, Е.В. Щербачева, Д.В. Тихонов, Е.Е. Карякина, А.А. Карякин*

*Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, Москва, Россия*

## ВВЕДЕНИЕ

Неинвазивные методы, применение которых исключает не только повреждение кровеносных сосудов, но и нарушение целостности кожных покровов, являются предпочтительными для диагностики: такие методы безболезненны и предотвращают возможное инфицирование и травмирование пациентов. Однако, несмотря на продолжающиеся исследования, проблема неинвазивной оценки концентраций метаболитов в крови по-прежнему остается нерешенной.

По данным ВОЗ  $\approx 5\%$  населения мира страдают от сахарного диабета. Диабет опасен не столько сам по себе, сколько осложнениями, к которым он может привести: сердечно-сосудистые заболевания, слепота, риск ампутации, почечная недостаточность и т. д. Концентрация глюкозы в крови является ключевым параметром для пациентов с диабетом, а поддержание ее на соответствующем уровне позволяет значительно отсрочить появление и развитие возможных осложнений.

Физические методы оценки концентрации глюкозы в крови (например, спектроскопия в ближней ИК-области) оказались неприменимы в силу их недостаточной чувствительности [1, 2]. Следовательно, для неинвазивной диагностики необходимо рассмотреть анализ экскреторной жидкости. К примеру, неинвазивно собираемый пот уже используется в клинической практике: по его проводимости судят о наличии такого заболевания как кистозный фиброз [3, 4].

Анализ пота на содержание метаболитов выглядит многообещающим; однако обычные электрохимические клинические анализаторы не применимы для этой цели, т. к. компоненты пота инактивируют платину, используемую в качестве трансдьюсера в подавляющем большинстве биосенсоров. Отравление трансдьюсера компонентами пота не наблюдается для берлинской лазури (БЛ) – наиболее высокоэффективного электрокатализатора восстановления пероксида водорода [5]. В нейтральных средах БЛ на три порядка превосходит платину как по активности в реакциях окисления и восстановления  $H_2O_2$ , так и по селективности к восстановлению пероксида водорода в присутствии кислорода. Кроме того, было показано, что (био) сенсоры на основе БЛ могут быть использованы без внешнего источника питания. Возможность работы таких сенсоров в режиме генерации мощности позволила не только упростить необходимое для измерений оборудование (можно заменить потенциостат амперметром), но также улучшить соотношение сигнал/шум в 5–10 раз [6].

Ранее было предпринято несколько попыток оценить уровень глюкозы в крови путем измерения её концентрации в экскреторной жидкости. Одна из самых известных и удачных с коммерческой точки зрения разработок – устройство «Glucowatch» (Cygnus Corp.) [7], которое, однако, быстро исчезло с рынка ввиду очень низкой точности анализа. В литературе по-прежнему можно найти устройства, похожие по принципу работы на Glucowatch, например, так называемая глюкозная татуировка [8]. Основная проблема таких устройств состоит в том, что в связи с отсутствием в них проточной системы они не могут быть применены для непрерывного мониторинга.

Литературные данные по вопросу концентрации глюкозы в поте противоречивы [9]. Кроме того, в [10, 11] показано, что существует тенденция к одновременному увеличению концентрации глюкозы в крови и поте, однако данных о наличии или отсутствии корреляции не приводится.

В настоящей работе было показано, что, несмотря на отсутствие видимой корреляции между абсолютными значениями концентраций глюкозы в крови и поте, наблюдается корреляция между их изменениями. Путем интеграции глюкозного биосенсора в тонкослойную ячейку, разработанную на основе коммерчески доступного коллектора пота, создан прототип устройства для непрерывного анализа неразбавленного пота в режиме реального времени.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Эксперименты проводили в воде Millipore Milli-Q. Неорганические соли квалификации ч. д. а. использовали без дополнительной очистки. Все неорганические соли, перфторсульфонируемый полимер МФ4 СК (аналог Nafion), органические растворители и пероксид водорода (30 % раствор) были приобретены в Реахим (Москва, Россия), а D-глюкоза и глюкозооксидаза в Sigma-Aldrich (Германия). Планарные печатные трехэлектродные сенсорные структуры (диаметр рабочего электрода 1.8 мм) были изготовлены ООО Русенс (Россия).

Электрохимические измерения проводили с помощью универсального портативного потенциостата-гальваностата PalmSens3 (Palm Instruments BV, Нидерланды), подключенного к персональному компьютеру с программным обеспечением PS Trace. Измерения в режиме генерации мощности осуществляли с помощью цифрового мультиметра Tektronix DMM4020 (Tektronix Inc., США). Проточно-инжекционный анализ проводили в самодельной проточной ячейке, соединенной со шприцевым насосом Perfusor Compact (Braun, Германия). Скорость потока составляла 0.67 мл/мин.

Межфазный синтез берлинской лазури на поверхности электродов проводили из реакционной смеси, содержащей 2–5 мМ  $K_3[Fe(CN)_6]$  и 2–5 мМ  $FeCl_3 \cdot 6H_2O$  в 0.1 М KCl и 0.1 М HCl, с последующим добавлением 50–200 мМ  $H_2O_2$ . Стабилизированную берлинскую лазурь синтезировали посредством послойного осаждения гексацианоферратов железа и никеля [12]. Ростовый раствор для получения гексацианоферрата никеля содержал 0.5–2 мМ  $NiCl_2$  и 0.1–1 мМ  $K_3[Fe(CN)_6]$  в 0.5 М KCl и 0.1 М HCl. Далее электроды подвергали термической обработке при 100 °C в течение 1 часа.

Глюкозный биосенсор изготавливали путем нанесения смеси, содержащей глюкозооксидазу, на поверхность печатного электрода, модифицированного гексацианоферратами переходных металлов, и высушивания в течение 1 часа при комнатной температуре. Смесь готовили путем добавления к водному раствору фермента (10 мг/мл) раствора, содержащего 0.3 % ПФС в 85 % изопропанолу.

Образцы пота были получены с помощью коммерчески доступного коллектора пота (Macroduct, США) после активации потовых желез с помощью электрофореза (Поток-1, Россия) с 1 % пилокарпином («Синтез», Россия) в течение 10–15 минут. В случае анализа неразбавленного пота вместо коллектора пота использовали неинвазивный монитор.

Анализ капиллярной крови и пота осуществляли в системе для проточно-инжекционного анализа (ПИА) [12–13], оснащенной глюкозным биосенсором. Отбор крови и пота производили у здоровых добровольцев в соответствии с требованиями этического комитета МНОЦ МГУ.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Неинвазивные методы представляют значительный интерес для медицинской диагностики. Однако создание устройства для неинвазивного мониторинга глюкозы будет целесообразным только при наличии корреляции между концентрациями метаболита в крови и исследуемой экскреторной жидкости.

Поскольку литературные данные касательно концентрации глюкозы в поте расходятся, в первую очередь было проведено исследование, целью которого было выявить диапазон содержаний глюкозы в поте. В исследовании приняли участие 30 добровольцев. Для получения образцов пота проводили активацию потовой железы с помощью электрофореза с пилокарпином. Установлено, что концентрация глюкозы в поте в десятки раз ниже, чем в крови (от 30 до 200 мкМ глюкозы, медиана –  $7 \cdot 10^{-5}$  М глюкозы,  $n = 50$ ). Концентрация глюкозы в поте определена с помощью разработанных нами биосенсоров на основе БЛ, стабилизированной гексацианоферратом никеля [13] в режиме проточно-инжекционного анализа (чувствительность определения концентраций глюкозы составила  $0.020 \pm 0.002 \text{ А} \cdot \text{М}^{-1} \cdot \text{см}^{-2}$  ( $n = 3$ ,  $P = 0.95$ ), диапазон определяемых концентраций – от 5 мкМ до 10 мМ глюкозы).

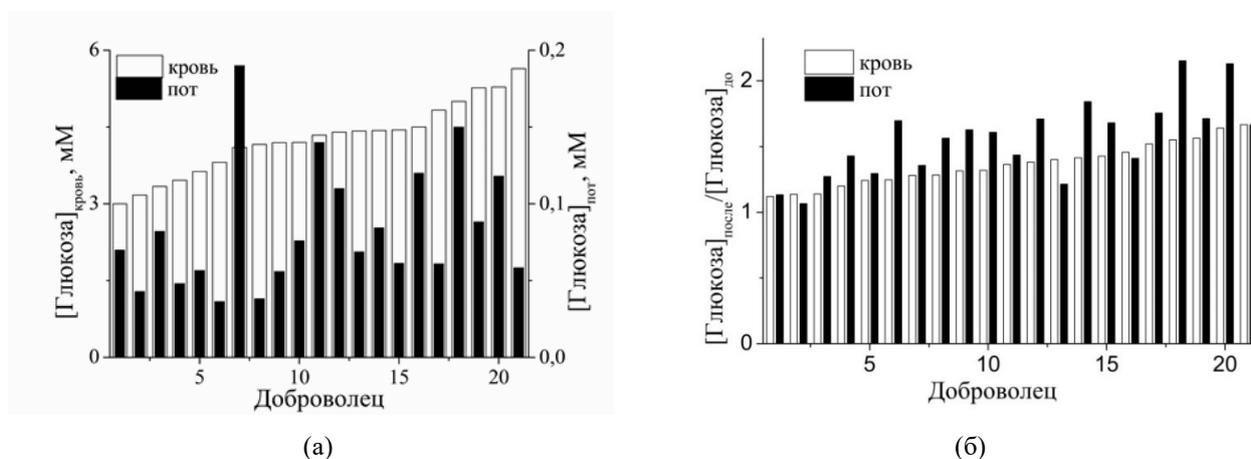


Рис. 1. а) Концентрация глюкозы в крови и поте; б) Изменение концентраций глюкозы в крови и поте

Для исследования корреляции между концентрациями глюкозы образцы капиллярной крови и пота у добровольцев отбирали одновременно (проводили активацию потовой железы и в середине временного интервала отбора пота отбирали образцы крови), а затем исследовали их в режиме проточно-инжекционного анализа. Данные, представленные на рисунке 1а, показывают, что зависимости между полученными значениями нет. Коэффициент корреляции Пирсона составил 0.30 ( $n = 21$ ,  $P = 0.95$ ), что говорит об отсутствии корреляции между абсолютными значениями концентрации глюкозы в поте и крови.

Кроме того, была исследована корреляция между изменениями концентрации метаболита в крови и поте. Для увеличения концентрации глюкозы был использован так называемый глюкозотолерантный тест. Образцы жидкостей отбирали до теста, далее в течение 5 минут добровольцу предлагалось выпить стакан теплой воды, в котором было растворено 75 г. глюкозы, через час процедуру отбора образцов повторяли.

Проведенный анализ показал увеличение концентрации глюкозы в образцах крови и пота, отобранных через 60 минут после начала тестирования. По полученным данным (рисунок 1б), был рассчитан коэффициент корреляции Пирсона, равный 0.74 ( $n = 21$ ,  $P = 0.95$ ), который свидетельствует о наличии положительной корреляции между изменениями концентрации глюкозы в крови и поте.

Таким образом, показано, что, несмотря на отсутствие прямой связи между концентрациями метаболита, анализ пота может служить в качестве альтернативы анализу крови. Несомненно, полностью отказаться от взятия и анализа образцов крови не представляется возможным, однако разработка устройства мониторинга концентрации глюкозы в поте позволит улучшить качество жизни больных сахарным диабетом.

Для создания такого устройства было необходимо объединить систему проточного анализа с встроенным биосенсором и коллектор пота. За основу была взята конструкция, приведенная в работе [14]. На рисунке 2 представлена схема сборки монитора. С помощью двухсторонней клейкой ленты на ровной поверхности ячейки создавали капилляр шириной 1.5 мм для непрерывного протекания пота и приклеивали глюкозный биосенсор на основе БЛ. Обратная сторона ячейки, предназначенная для непосредственного контакта с кожей, представляла собой конусообразное углубление с отверстием (форма поверхности аналогична таковой для коммерчески доступного коллектора пота).



Рис. 2. Схема неинвазивного монитора

Как отмечалось ранее, эксплуатация (био) сенсоров на основе гексацианоферратов переходных металлов в режиме генерации мощности приводит к значительному увеличению соотношения сигнал/шум, что очень важно в данном случае в связи с низкой концентрацией глюкозы в поте, а следовательно, низкими токовыми откликами биосенсора. Перед проведением экспериментов с образцами пота, биосенсор, встроенный в монитор, предварительно градуировали с использованием модельных растворов глюкозы. Для выхода на стационарный уровень капилляр заполняли буферным раствором (0.05 М  $K_2HPO_4/KH_2PO_4$ , 0.1 М  $KCl$ , pH 6.0), после чего наблюдали фоновые значения токов. Затем с низкой скоростью вводили модельные растворы глюкозы и фиксировали изменение токового отклика.

На рисунке 3а показан пример отклика биосенсора в системе неинвазивного монитора при построении градуировочной зависимости. Видно, что наблюдаются низкие значения фоновых токов, а также низкие шумы (не более 1 нА). При добавлении в систему растворов глюкозы, наблюдались небольшие всплески тока, однако система быстро возвращалась в

состояние равновесия. Отклик стабилен, значения тока со временем не уменьшаются. На основе полученных данных строили градуировочную зависимость плотности тока от концентрации глюкозы (рисунок 3б).

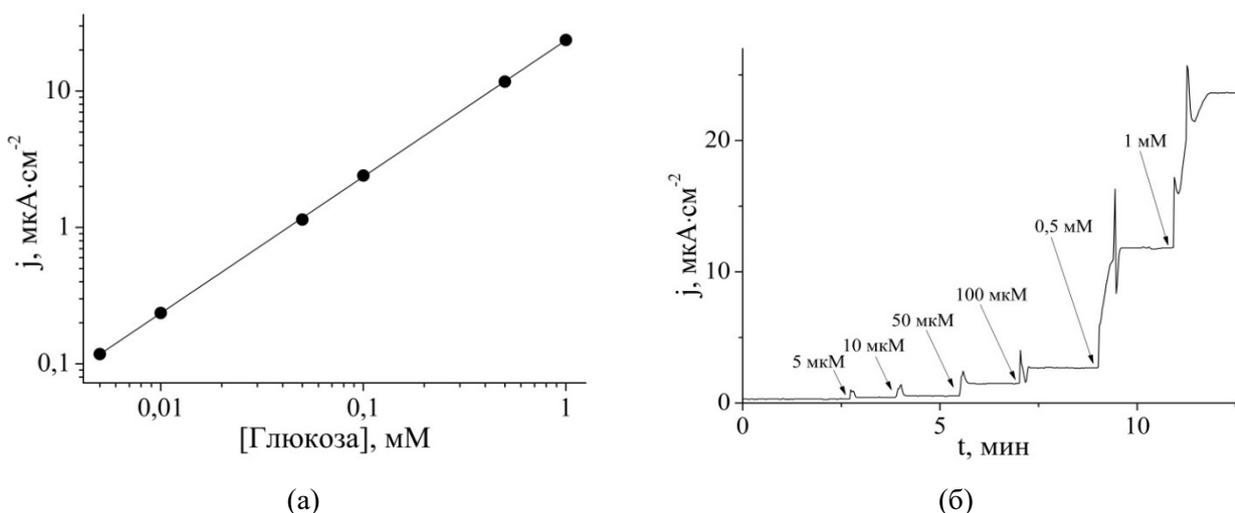


Рис. 3. а) Отклик встроенного в неинвазивный монитор биосенсора на добавление глюкозы; б) Градуировочная зависимость для определения концентрации глюкозы в системе неинвазивного монитора

Линейный диапазон определяемых концентраций биосенсора в системе неинвазивного монитора составил от 5 мкМ до 1 мМ глюкозы, что с запасом покрывает физиологический диапазон содержания глюкозы в поте. Коэффициент чувствительности определения концентраций глюкозы –  $24 \pm 2 \text{ мА} \cdot \text{М}^{-1} \cdot \text{см}^{-2}$  ( $n = 3, P = 0.95$ ), предел обнаружения  $c_{\text{мин}}$  – 4,5 мкМ.

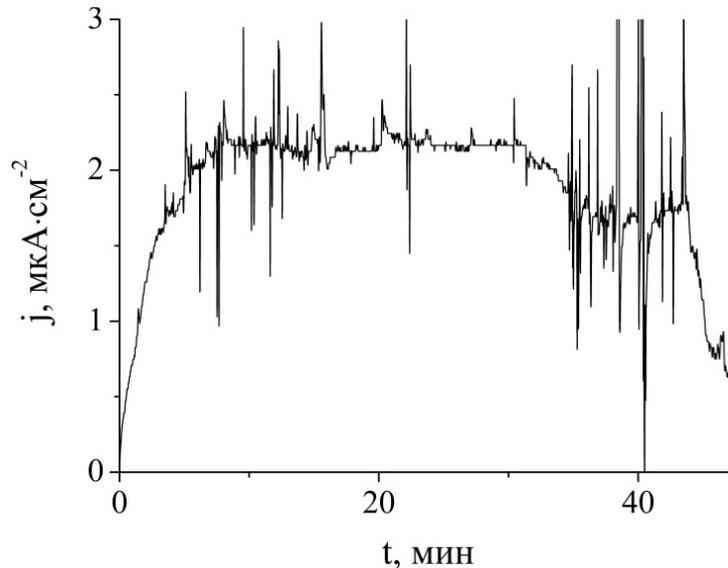


Рис. 4. Отклик биосенсора при определении глюкозы в поте в системе неинвазивного монитора

Перед определением глюкозы в поте в режиме онлайн проводили активацию потовых желез при помощи электрофореза с пилокарпином. Далее прикладывали монитор к месту выделения пота. Пример отклика биосенсора представлен на рисунке 4. Видно, что в течение первых 5 минут происходит постепенное заполнение капилляра потом. Затем в течение  $\approx 20 - 30$  минут наблюдается плато, значение тока соответствует концентрации глюкозы в поте. Затем происходит снижение скорости потоотделения, что объясняет уменьшение токового отклика.

В неинвазивном мониторе предусмотрен капилляр для выведения жидкости из системы (рисунок 2), посредством которого пот собирали в пробирку Эппендорфа и, в дальнейшем, использовали для анализа альтернативным методом: концентрацию глюкозы определяли в разбавленном поте с помощью системы проточно-инжекционного анализа (ПИА), оснащенной глюкозным биосенсором. Результаты по определению содержания глюкозы в поте, полученные с помощью неинвазивного монитора и с использованием альтернативного метода, представлены в таблице 1.

Таблица 1. Концентрации глюкозы в поте, полученные с использованием неинвазивного монитора и альтернативного метода.

Доброволец	Глюкоза в поте, М	
	Монитор	ПИА
1	$(5.8 \pm 0.7) \cdot 10^{-5}$	$(5.6 \pm 0.3) \cdot 10^{-5}$
2	$(6.0 \pm 0.9) \cdot 10^{-5}$	$(5.8 \pm 0.4) \cdot 10^{-5}$
3	$(3.0 \pm 0.4) \cdot 10^{-5}$	$(3.6 \pm 0.3) \cdot 10^{-5}$
4	$(5.0 \pm 0.5) \cdot 10^{-5}$	$(5.4 \pm 0.5) \cdot 10^{-5}$
5	$(7.5 \pm 0.7) \cdot 10^{-5}$	$(7.9 \pm 0.3) \cdot 10^{-5}$
6	$(4.5 \pm 0.5) \cdot 10^{-5}$	$(4.9 \pm 0.2) \cdot 10^{-5}$
7	$(3.2 \pm 0.3) \cdot 10^{-5}$	$(3.6 \pm 0.3) \cdot 10^{-5}$
8	$(13.1 \pm 1.1) \cdot 10^{-5}$	$(13.6 \pm 0.7) \cdot 10^{-5}$
9	$(6.5 \pm 0.6) \cdot 10^{-5}$	$(6.0 \pm 0.3) \cdot 10^{-5}$
10	$(1.6 \pm 0.1) \cdot 10^{-5}$	$(1.6 \pm 0.2) \cdot 10^{-5}$

Из данных, представленных в таблице, видно, что все значения, полученные для неинвазивного монитора, в пределах погрешности совпадают со значениями, полученными альтернативным методом (коэффициент корреляции Пирсона составил  $> 0.99$ ). Таким образом, разработан прототип неинвазивного монитора состояния гипо-гипергликемии, позволяющий проводить непрерывное определение глюкозы в поте.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В настоящей работе впервые показано, что изменения концентрации глюкозы в крови и поте коррелируют, в то время как между абсолютными значениями корреляция не наблюдается. Очевидно, что анализ пота (как и любой другой экскреторной жидкости) не может стать полноценной заменой анализа крови. Однако наличие корреляции между изменениями концентрации глюкозы в поте и крови является достаточным основанием для создания неинвазивного монитора гипо-гипергликемии, который даст возможность онлайн контролировать уровень глюкозы в течение достаточно большого промежутка времени. Это в свою очередь позволит, к примеру, облегчить прохождение процедуры глюкозотолерантного теста, а также следить за концентрацией глюкозы после еды и во время плохого самочувствия больных сахарным диабетом. Путем интеграции глюкозного биосенсора, работающего в режиме генерации мощности, в тонкослойную ячейку был создан прототип монитора для непрерывного определения глюкозы в поте в режиме онлайн.

*Работа была выполнена при финансовой поддержке РФФ (грант 16-13-00010) и Фонду содействия развитию малых форм предприятий в научно-технической сфере (программа УМНИК).*

## ЛИТЕРАТУРА

1. Tura, A.; Maran, A.; Pacini, G. Diabetes Res. Clin. Pract. 2007, 77, 16–40.
2. Vashist, S.K. Anal. Chim. Acta 2012, 750, 16–27.
12. Barben, J.; Casaulta, C.; Spinass, R.; Schoeni, M.H.; Swiss Working Grp Cystic, F. Swiss Med. Wkly. 2007, 137, 192–198.
3. Naehrlich, L. Klin. Padiatr. 2007, 219, 70–73.
4. Karyakin, A.A. Current Opinion in Electrochemistry 2017, 5, 92–98.
5. Komkova, M.A.; Karyakina, E.E.; Karyakin, A.A. Anal. Chem. 2017, 89, 6290–6294.
6. Tierney, M.J. Cygnus Inc, US5954685-A, 1999.
7. Bandodkar, A.J.; Jia, W.; Yardimci, C.; Wang, X.; Ramirez, J.; Wang, J. Anal. Chem. 2015, 87, 394–398.
8. Harvey C.J.; LeBouf R.F.; Stefaniak A.B. Toxicol. Vitro. 2010, 24, 1790–1796.
9. Moyer, J.; Wilson, D.; Finkelshtein, I.; Wong, B.; Potts, R. Diabetes Technol. Ther. 2012, 14, 398–402.
10. Emaminejad, S.; Gao, W.; Wu, E.; Davies, Z.A.; Nyein, H.Y.Y.; Challa, S.; Ryan, S.P.; Fahad, H.M.; Chen, K.; Shahpar, Z.; Talebi, S.; Milla, C.; Javey, A.; Davis, R.W. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 2017, 114, 4625–4630.
11. Karpova, E.V.; Karyakina, E.E.; Karyakin, A.A. Rsc Advances 2016, 6, 103328–103331.
12. Karpova, E.V.; Karyakina, E.E.; Karyakin, A.A. J. Electrochem. Soc. 2017, 164, B3056–B3058.
13. Pribil, M.M.; Laptsev, G.U.; Karyakina, E.E.; Karyakin, A.A. Anal. Chem. 2014, 86, 5215–5219.

УДК 54.062

## КОМПЛЕКСНОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ АМИНОКИСЛОТ И ОРГАНИЧЕСКИХ КИСЛОТ В КУЛЬТУРАЛЬНЫХ ЖИДКОСТЯХ РАЗЛИЧНЫХ ШТАММОВ-ПРОДУЦЕНТОВ

*С.В. Антонова, Э.Р. Акмаев*

*ФГБУ Государственный научно-исследовательский институт генетики и селекции промышленных микроорганизмов – Национального исследовательского центра «Курчатовский институт», Москва, Россия*

## ВВЕДЕНИЕ

В современном мире большое внимание уделяется правильному питанию, а также получению сбалансированной пищи по содержанию белков, жиров, углеводов и витаминов [1]. Известно, что производство белков в любом организме зависит от поступления с пищей необходимого числа аминокислот, при этом не все аминокислоты могут быть синтезированы непосредственно в организме из других, а могут лишь поступать с пищей [2].

Из 20 аминокислот, необходимых для нормальной жизнедеятельности человека, незаменимыми (не синтезируемыми в человеческом теле) являются 8 (в детском возрасте число незаменимых кислот больше ввиду недостаточности эндогенного синтеза) аминокислот: Валин, Изолейцин, Лейцин, Лизин, Метионин, Треонин, Триптофан, Фенилаланин [2]. Поэтому, получение штаммов-продуцентов незаменимых аминокислот является первостепенной задачей для биотехнологии [3, 4].