

# ПРИМЕНЕНИЕ МНСТ

## APPLICATION OF MNST

УДК 616-072

**В. С. Осипович**<sup>1</sup>, канд. техн. наук, доцент, seth22@yandex.ru;

**К. Д. Яшин**<sup>1</sup>, канд. техн. наук, доцент, зав. кафедрой, yashin@bsuir.by;

**В. П. Шонтя**<sup>2</sup>, профессор, зав. кафедрой, **А. П. Серяков**<sup>2</sup>, магистр технических наук

<sup>1</sup> Белорусский государственный университет информатики и радиоэлектроники, Минск, Республика Беларусь

<sup>2</sup> Технический университет Молдовы, Кишинев, Республика Молдова

### МЭМС ДЛЯ ДИАГНОСТИКИ ВОЗБУДИТЕЛЕЙ ЗАБОЛЕВАНИЙ

Поступила в редакцию 20.04.2015 г.

*Разработана структурная схема прибора для экспресс-диагностики в домашних условиях заболеваний человека. Прибор включает: лазер для возбуждения флуоресценции маркеров (наночастиц); фотодетектор для регистрации уровня интенсивности флуоресценции наночастиц; микроконтроллер; пористую мембрану для закрепления анализируемых агентов; микронасос для прокачки анализируемой жидкости через мембрану; микроклапаны для управления подачей анализируемой жидкости на пористую мембрану; светофильтр 560 нм для вырезания из общего спектра света, возникающего в результате флуоресценции биологических компонентов.*

**Ключевые слова:** консольный биодатчик, микробалка, индикация возбудителей заболеваний, метаболиты, биомаркеры, аптамеры, экспресс-диагностика

#### Введение

Микродатчики применяют в газовом и биохимическом анализе, медицинских измерениях, при определении подлинности продукта. Основным здесь является ультрачувствительный микромеханический способ с использованием консольных матриц. Одной из актуальных задач в биомедицинской диагностике является обеспечение высокой чувствительности и избирательности анализов. В качестве веществ для метки антигенов используют органические флуорохромы. Параллельно с развитием флуоресцентных меток и методик иммунологического анализа происходит переход на лазерные источники возбуждения и оптоволоконные системы передачи сигнала. Внедрение этих элементов в сочетании с компьютерной обработкой информации открывает широкие перспективы для создания компактных регистрирующих устройств. Разработка физико-технологических основ создания прибора экспресс-индикации возбудителей заболеваний, безусловно, актуальна для биотехнических и особенно диагностических целей.

*Цель настоящей работы* — анализ патентной и научно-технической информации о работе и применении МЭМС-биодатчиков, а также разработка

структурной схемы и конструкции прибора экспресс-индикации микроорганизмов и возбудителей заболеваний человека в исследуемом объеме анализируемой жидкости для предварительной медицинской диагностики в домашних условиях. Основные результаты работы связаны с разработкой структурной, функциональной и электрической принципиальной схем прибора. Микробиодатчики применимы для диагностирования и измерения развития болезни или эффектов лечения.

#### Индикация возбудителей заболеваний человека с использованием микроэлектромеханических устройств и систем

Консоли представляют собой прямоугольные микрополоски кремния толщиной менее 1 мкм (рис. 1). Адсорбция молекул различных веществ (за счет взаимодействия этих молекул с молекулами рецептора) приводит к изгибу микроконсоли (МК) вследствие поверхностного напряжения. Изгиб регистрируется отклонением лазерного луча. Консольные биодатчики (КБД) используют в различных средах: вакууме, газах или жидкостях. Главные преимущества таких КБД — их небольшой размер, быстрое время отклика, высокая чувствительность, преобразование сигналов без индикаторных меток [1].

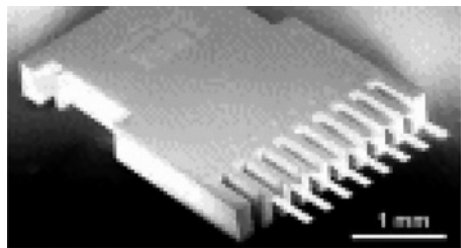


Рис. 1. Консольная матрица [1]

Fig. 1. Console matrix [1]

Авторы работы [1] используют матрицу из восьми МК. Каждая МК покрыта чувствительным слоем для обеспечения высокоспецифического молекулярного взаимодействия. Система может фиксировать одновременно несколько картин для различных анализов. Для этого каждую из МК покрывают разными чувствительными слоями. В газообразной среде конструкция используется как искусственный нос для анализа быстроиспаряющихся паров и запахов.

Датчиками управляют в статическом, динамическом и тепловом режимах. В статическом режиме происходит механический отклик МК после адсорбции молекул из анализируемой среды. Поверхностное напряжение приводит к изгибу МК с отклонением  $\sim 10$  нм [1]. В динамическом режиме МК колеблется в частоте резонанса с использованием пьезоэлектрического привода. Для определения молекул аналита МК покрыта специальным чувствительным молекулярным слоем. После адсорбции определяемого вещества частота резонанса МК уменьшается [1]. Изменение частоты резонанса в 1 Гц соответствует изменению массы адсорбированного на МК аналита примерно в 1 пг. В тепловом режиме различие в коэффициентах линейного расширения консольного материала (например, монокристаллический кремний и металл толщиной 100 нм) вызывает изгиб консольного датчика (биметаллической структуры). Температурные изменения 5...10 К вызывают отклонение МК в несколько нанометров, которые могут быть измерены [1].

Имеется необходимость обнаружения и идентификации химических и биологических веществ, таких как нуклеиновые кислоты, белки, наркотики, взрывчатые вещества, токсины, фармацевтические препараты, канцерогенные вещества, яды, аллергены и инфицированные клетки [2]. Проведение клинических исследований требует специальной подготовки лаборантов и использования специального оборудования. Существующие лабораторные методы анализа используют газовую жидкостную хроматографию и/или масс-спектропию;

они требуют много времени и являются дорогостоящими. Поэтому КБД, способные точно и эффективно обнаружить/показать химические и биологические вещества, обеспечат существенную выгоду в стоимости и времени анализа.

Разработан метод преобразования биомолекулярных реакций в наномеханическое действие с использованием взаимной связи между двумя явлениями [2]. С одной стороны, это изменение поверхностного напряжения, возникающего вследствие соединения ДНК и закрепления рецептор-лиганд на МК, с другой стороны, это наноразмерное отклонение МК. Молекулярная сила, являющаяся результатом адсорбции молекул, вызывает поверхностное напряжение. МК сгибается в результате неспецифической адсорбции белков [2]. Метод не требует применения флуоресцентных меток, оптического возбуждения и относится к методам связывания лигандов в жидкой среде. В этих случаях используется прочная МК. Это означает, что либо МК имеет большой размер, либо материал, из которого она изготовлена, имеет относительно большой модуль упругости Юнга. Большие МК могут ухудшать чувствительность при обнаружении малых количеств целевых веществ. Кроме того, такая МК зачастую требует длительного воздействия аналита для накопления поддающегося обнаружению количества этого вещества.

Применение биодатчиков для диагноза и лечения болезни описано в работе [3]. Способ позволяет определить состав вещества в жидкостях, включая кровь, и продукты дыхания. Описаны биодатчики, которые подражают естественно происходящим реакциям в клетках (например, в РНК-цепи нуклеотидов). Биодатчики используют в комбинации с сигнальными агентами, чтобы обеспечить показ на экране биомаркеров, присутствующих в выдохнутом воздухе. В качестве биодатчиков используют аптамеры, как наиболее эффективные определители единичных молекул [3]. Они обладают более высокой специфичностью и надежностью, чем основанные на антителах диагностические технологии. Аптамеры способны измерить такие концентрации липида, которые на несколько порядков ниже, чем при использовании диагностических тестов с антителами. Для аптамеров это одна детектируемая молекула на триллион или даже секстиллион других молекул [3]. В отличие от антител, производство которых основано на животных и/или культуральных технологиях, производство аптамеров происходит в пробирке. Синтез аптамеров дешев [3], их получают реакцией с участием полимеразы. Далее, как только последовательность цепочки известна, они могут быть синтезированы из отдельных естественных и/или синтетических

нуклеотидов. Аптамеры устойчивы к длительному хранению при комнатной температуре.

Биомаркер представляет собой биохимическое вещество, у которого есть определенная специфическая молекулярная особенность. Это делает биомаркер применимым для диагностирования и измерения развития болезни или эффектов лечения. Метаболиты и биомаркеры, найденные в дыхании человека, включают определенные вещества (табл. 1). В работе [3] описан биологический метод анализа образцов (дыхание и кровь). Анализ заключается в обнаружении аналитов (биомаркеров) в физических жидкостях человека, имеющих отношение к различным жизненным условиям или болезням, таким как опьянение, рак, болезнь печени, почек или диабет.

Способ обнаружения молекулярной связи и/или идентификации целевых веществ путем мониторинга отклонений МК (рис. 2) с контролем обратной связи описан в работе [4]. В табл. 2 представлены методы обнаружения молекулярных связей. Группа 1 обеспечивает наиболее высокую селективность и чувствительность при идентификации биомолекулярных веществ [4].

Устройство и технология определения массы вещества, основанная на регистрации частот резонирующей МК, описаны в работе [5]. МК покрыта

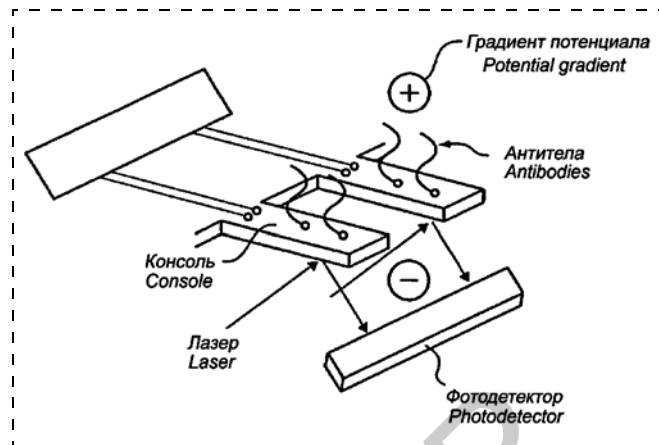


Рис. 2. Схема обнаружения молекулярной связи путем мониторинга отклонений консоли [4]

Fig. 2. Circuitry for detection of a molecular bond by monitoring of the console deviations [4]

фиксированным контрагентом, способным взаимодействовать с определяемой клеткой или молекулой. Определяется исходная частота резонанса МК, покрытой фиксированным контрагентом. В результате обработки раствором, который взаимодействует с контрагентом, масса МК возрастает. Регистрируется вторая частота резонанса. Разница в частотах дает основание заявить, что обнаружена целевая клетка или молекула. Частотные характеристики МК определяются оптическим методом с помощью отраженного света и двух фотодетекторов либо интерференционным методом с помощью одного фотодетектора.

В работе [5] описаны высокочувствительные КБД для определения химического или биологического вещества. Если ранее было достаточно измерять количество вещества порядка микрограмма, то сегодня наука и промышленность имеют потребность в обнаружении отдельной клетки, внутриклеточного элемента или вещества массой порядка  $10^{-15}$  г. Например, в пищевой промышленности даже ничтожно малые количества некоторых токсинов быть могут вредными и опасными для людей. Пример — бактерия *Escherichia Coli* (*E. Coli*). Повышенное внимание СМИ усилило волнение потребителей к присутствию *E. Coli* в мясных продуктах, яблочном соке и побегах люцерны (корм для коров).

Система [5] включает источник света, МК и фотодиод. Один конец МК неподвижно закреплен, другой конец резонирует под действием внешней среды. Частота резонанса зависит от массы МК. Фотодиод генерирует сигнал. Отраженный от вершины МК свет является функцией частоты вибрации МК. Поверхность МК покрыта контрагентом для связывания с определенным анализируемым веществом. Осевшее вещество увеличивает

Таблица 1

Метаболиты и биомаркеры, найденные в дыхании человека

Метаболиты и биомаркеры	Индикатор	Диагноз
Альдегид	Этанол	Опьянение
Ацетон	Соль аминокислоты	Диабет
Аммиак	Аминокислоты	Уремия и болезнь печени
Оксид углерода	Повышенный процент СО	Внутреннее загрязнение воздуха
Хлороформ	Галогенизированные вещества	Внутреннее загрязнение воздуха
Дихлорбензол	Галогенизированные вещества	Внутреннее загрязнение воздуха
Диэтиламин	Холин	Кишечный бактериальный рост
Водород	Газы кишечника	Нетерпимость к лактозе
Изопрен	Жирная кислота	Метаболическое напряжение
Метанэтиол	Метионит	Кишечный бактериальный рост
Метилэтилкетон	Жирная кислота	Внутреннее загрязнение воздуха
О-толуидин	Метаболит карциномы	Бронхогенная карцинома
Сульфиды пентана	Перокисленный липид	Инфаркт миокарда
Сероводород	Метаболизм	Периодонтальная болезнь

массу МК. Процессор соединен с фотодиодом, выполняет программу определения массы анализируемого вещества, удерживаемого связующим контрагентом. Длина МК 0,5...1000 мкм. МК разработана для обнаружения вещества, включающего патоген, микроорганизм, бактерию, вирус или некоторую группу из этого. Связывающий контрагент может включать в себя антитело, которое соединяется с такими объектами, как клетка, фрагмент клетки или ее элемент.

КБД для обнаружения газов и паров описаны в работе [6]. Покрытые специальными веществами, МК подвергаются химическому воздействию не-

сколько часов. Измерения проводят до момента появления потенциала Леннарда—Джонса (соседние молекулы отталкиваются, а на больших расстояниях притягиваются). Во многих случаях абсорбция молекул на поверхности МК может быть направлена в обратную сторону путем простого нагревания системы или помещения ее в вакуум.

#### Разработка прибора для определения концентрации наночастиц по интенсивности флуоресценции

Проведенные исследования [7, 8] позволили разработать и изготовить макетный образец прибора для экспресс-диагностики в домашних усло-

Таблица 2

Методы обнаружения молекулярных связей

№ п/п	Группа методов	Принцип работы	Модификации
1	Обнаружение химических связей (молекул) путем контроля за значениями отклонений МК. Фиксированное отклонение консоли соответствует определенному химическому взаимодействию (веществу)	Для обнаружения конкретных молекулярных связей определенные вещества прикрепляют к одной или нескольким МК. Наличие искомого вещества приводит к образованию химических связей (новых химических соединений) и к отклонениям МК; отклонения фиксирует блок регистрации	В микросистеме может быть использован источник уравновешивающей силы для приведения консоли в изначальное положение. Сила может быть магнитной, электрической или радиационной. Блок обнаружения и механизм, который генерирует уравновешивающую силу, соединены с блоком обработки и контроля информации. Компьютер регулирует обратные связи, поддерживающие консоль в фиксированном положении путем балансировки силы отклонения и уравновешивающей силы. Концентрация искомого вещества в образце рассчитывается на основании значения уравновешивающей силы
2	Анализ на основе антител. Любое соединение, молекула или их группа, для которых создано антитело, могут быть обнаружены различными приемами иммунологического анализа (ELISA, вестерн-блоттинг и т.д.)	Искомое вещество (антиген) или антитело к искомому веществу присоединено к неподвижной опоре (предметному стеклу, стенке пробирки). Антитело к искомому веществу предварительно помечается флуоресцентной, ферментной или другой меткой. Таким способом может быть обнаружено присоединение антитела к искомому веществу (прямой иммуноферментный или иммунофлуоресцентный анализ)	Если антитело присоединено к опоре, то присоединение искомого вещества к нему может быть обнаружено с использованием еще одного меченого антитела (трехслойный анализ или непрямой иммунофлуоресцентный анализ). Анализ на основе антител может иногда показывать неприемлемо высокие уровни неверных позитивных и негативных результатов вследствие перекрестной реактивности антигенов с различными антителами, низкой антигенности искомого вещества (ведущей к низкой чувствительности анализа), неспецифической адсорбции антител к различным поверхностям и т.д. Метод эффективен при высоких концентрациях искомого вещества
3	Анализ на основе скрещивания олигонуклеотидов для обнаружения целевых олигонуклеотидов, информационных РНК, геномной ДНК и т.д.	Проба олигонуклеотида, которой помечено целевое вещество, скрещивается с образцом, который подозревается на содержание целевой нуклеиновой кислоты	Были разработаны ДНК-чипы, которые содержат сотни или даже тысячи индивидуальных олигонуклеотидных проб. Скрещивание целевой нуклеиновой кислоты и пробы олигонуклеотида может быть обнаружено при использовании флуоресцентных меток, радиоактивных меток и т.д. Существуют ограничения, связанные с чувствительностью и/или специфичностью анализа. Это связано с тем, что скрещивание нуклеиновой кислоты может произойти между последовательностями, которые в точности дополняют друг друга через неудачное скрещивание, ведущее к неверным позитивным результатам
4	Анализ активности энзимов (ферментов)	Определяют скорость, с которой энзимы катализируют ту или иную биохимическую реакцию. Она, в свою очередь, измеряется скоростью превращения субстрата или скоростью накопления продуктов реакции	Для определения ферментативной активности используют следующие методы. Химический — количественное определение субстрата или продуктов с помощью химических реагентов. Спектрофотометрический — измерение скорости ферментативной реакции по изменению поглощения субстрата при характеристической длине волны. Манометрический — определение количества газа, выделяющегося в процессе реакции. Поляриметрический — фиксируется изменение оптического вращения. Хроматографический — количественное определение субстрата или продуктов с помощью различных видов хроматографии

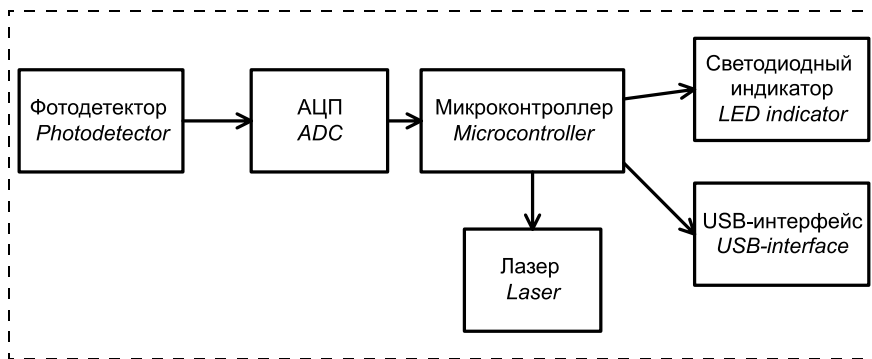


Рис. 3. Структурная схема прибора для определения концентрации наночастиц по интенсивности флуоресценции

Fig. 3. Circuitry of the device for determination of the concentration of nanoparticles by the intensity of the fluorescence

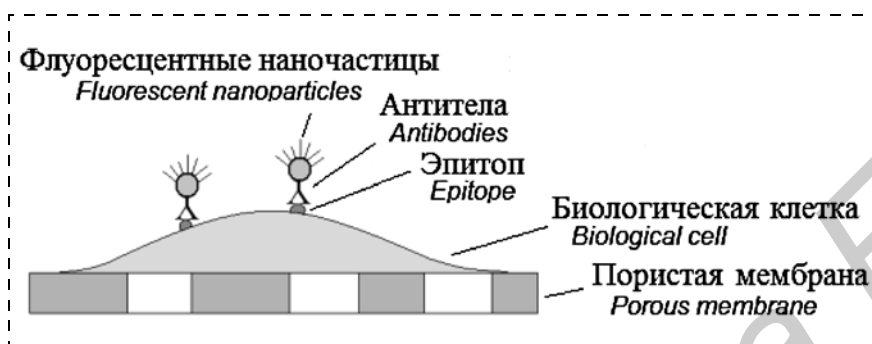


Рис. 4. Схема детектирования клеток, маркированных наночастицами

Fig. 4. Circuitry for detection of the cells marked by nanoparticles

виях заболеваний человека. Прибор включает: лазер для возбуждения флуоресценции маркеров (наночастиц); фотодетектор для регистрации уровня интенсивности флуоресценции наночастиц; микроконтроллер.

Микроконтроллер используется для расчета концентрации анализируемого вещества по интенсивности флуоресценции, для калибровки прибора, для расчета концентрации наночастиц и/или биологического материала и для обеспечения связи с персональным компьютером (рис. 3).

Пористая мембрана (рис. 4) пропускает через поры раствор с биологическими компонентами и задерживает искомым детектируемый агент (например, клетку). На этом биологическом агенте (на его эпитопах) адсорбируются наночастицы, связанные с антителами к детектируемому биологическому агенту. Возбуждение флуоресценции наночастиц осуществляется полупроводниковым лазером. Длина волны лазера и длина волны флуоресценции наночастиц различаются. Между фотодетектором и пористой мембраной (рис. 5) размещается светофильтр, пропускающий свет с длиной волны, излучаемой наночастицами. Это позволяет вырезать из общего спектра свет, возникающий в результате

флуоресценции биологических компонентов. Интенсивность света, регистрируемого фотодетектором, зависит от количества наночастиц на поверхности пористой мембраны. Последнее, в свою очередь, будет зависеть от количества детектируемых биологических компонентов.

На основании структурной схемы разработана схема электрическая принципиальная прибора. Она включает USB-мост CP2102, микроконтроллер Pic16f887 и фотоприемник TSL257. Фотоприемник обеспечивает регистрацию изменения интенсивности света  $2,93 \text{ мкВт/см}^2$  на каждые 2 В при длине волны 560 нм.

Разработаны алгоритм работы программного обеспечения микроконтроллера и алгоритм обработки прерываний (рис. 6 и 7). На основании блок-схем алгоритмов разработано программное обеспечение с использованием языка программирования C, среда разработки MP LAB.

Апробация макетного образца прибора для определения концентрации наночастиц по интенсивности флуоресценции осуществлена в Институте химии новых материалов (г. Минск).

Для апробации макетного образца прибора была собрана экспериментальная установка с флуоресцентным микроскопом Planar MVI (Беларусь). В слот для цифрового фотоаппарата был помещен фотодетектор. Флуоресцентное излучение наночастиц CdSe/ZnS проходило через светофильтр 560 нм. На предметном столе микроскопа размещали стекла с каплями коллоидного раствора наночастиц. Для апроба-

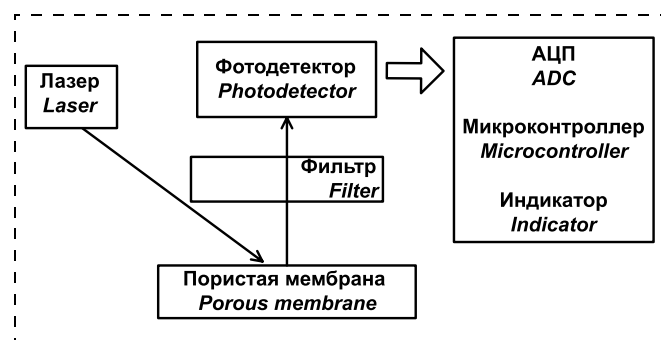


Рис. 5. Схема прибора для определения концентрации наночастиц

Fig. 5. Circuitry of the device for determination of the concentration of nanoparticles

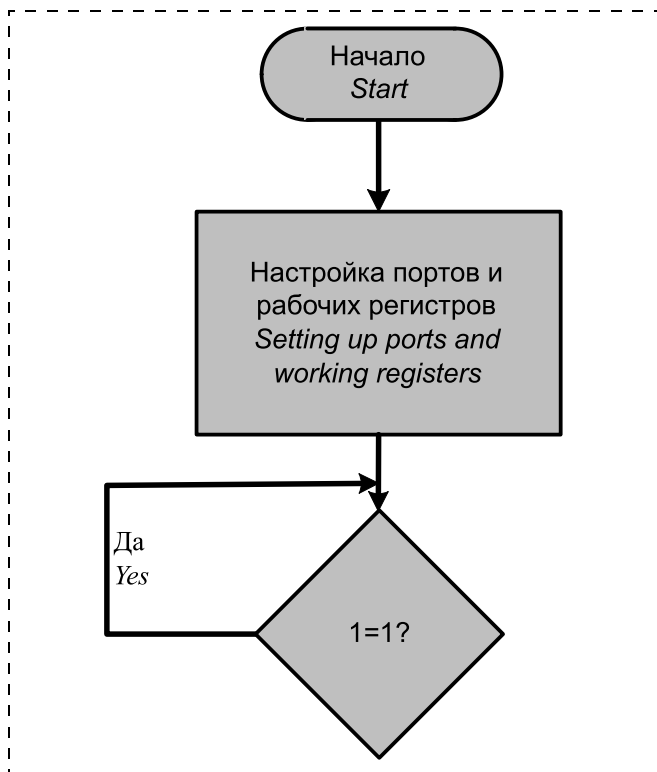


Рис. 6. Блок-схема алгоритма работы программного обеспечения микроконтроллера

Fig. 6. Unit circuitry of the algorithm for operation of the software of the microcontroller

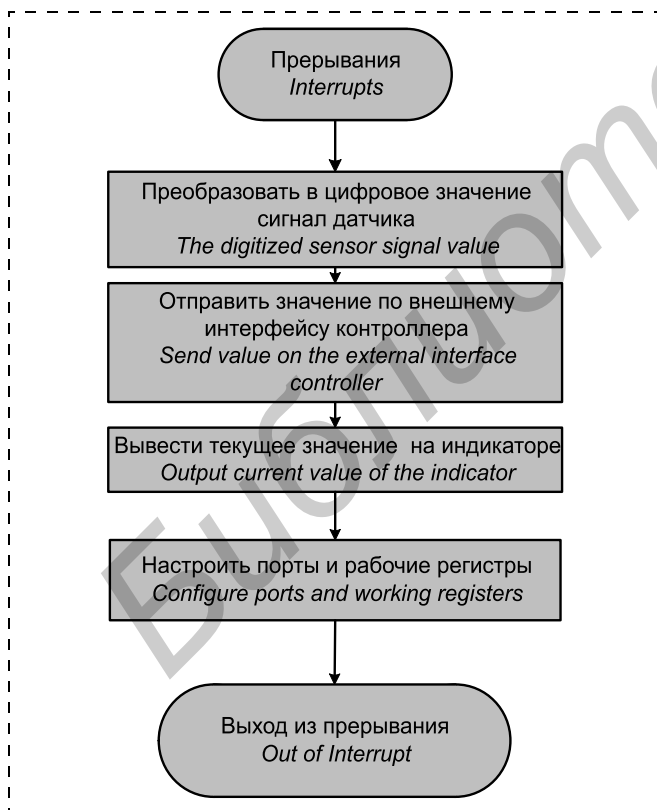


Рис. 7. Блок-схема алгоритма обработки прерывания программного обеспечения микроконтроллера

Fig. 7. Unit circuitry of the algorithm for processing of an interruption of the software for the microcontroller

Таблица 3

Результаты апробации макетного образца прибора

Table 3

Results of approbation of the model sample of the device

№ образца Numbers of the samples	Концентрация наночастиц, мг/мл Concentration of the nanoparticles, mg/ml	Показания прибора, усл. ед. Indicators of the device, standard units
1	0,5	854
2	0,125	218
3	0,03	52
4	0,008	15
5	0,002	4

ции использовали пять образцов. Результаты измерений интенсивности флуоресцентного излучения наночастиц CdSe/ZnS с использованием изготовленного макетного образца прибора приведены в табл. 3.

Результаты апробации макетного образца прибора для определения концентрации наночастиц по интенсивности флуоресценции показали его работоспособность, а также необходимость и возможность дальнейшей научно-исследовательской и опытно-конструкторской работы по разработке конструкции, калибровке и изготовлению МЭМС-версии прибора для экспресс-индикации заболеваний человека.

Перспективы развития технологии

Разработанный технический подход может быть применен для изготовления МЭМС-устройства экспресс-диагностики заболеваний человека. В этом случае в структурную схему микроустройства необходимо добавить микронасос для прокачивания жидкости через пористую мембрану и микроклапаны для управления подачей жидкости (анализируемая жидкость или жидкость с антителами) на пористую мембрану. Проведение предварительных анализов в домашних условиях позволяет ускорить процесс борьбы с заболеванием и уменьшить количество анализов, проводимых в клинических лабораториях. Примером анализа в домашних условиях является устройство для определения инсулина в крови для людей с сахарным диабетом. Российские ученые разработали экспресс-тест для диагностики инсульта [9]. Однако таких примеров очень мало. Проведение клинической диагностики требует дорогостоящего оборудования и специалистов высокой квалификации. Постоянно возникает потребность в создании новых методик и устройств для проведения быстрой экспресс-диагностики в домашних условиях, поскольку многие современные методики иммуноанализа достаточно хорошо отработаны [10].

## Закключение

Разработана структурная схема прибора экспресс-индикации возбудителей заболеваний человека. Разработаны функциональная и электрическая принципиальная схемы прибора экспресс-индикации возбудителей заболеваний. Проведено моделирование работы прибора с применением систем автоматического проектирования. Изготовлен экспериментальный образец прибора экспресс-индикации возбудителей заболеваний человека в домашних условиях.

### Список литературы

1. Lang H. P., Hegner M., Gerber Ch. Cantilever array sensors // *Materialstoday*. 2005. Vol. 4. P. 30–36.
2. Fritz J., Baller M. K., Lang H. P., et al. Translating biomolecular recognition into nanomechanics // *Science*. 2000. Vol. 288. P. 316–318.
3. Pat. 20060160134 USA G01N 33/53. Novel application of biosensors for diagnosis and treatment of disease. / Melker R. J., Dennis J. M., Martin Ch. N., Stewart J. D.; Saliwanchik Lloid and Saliwanchik a Professional Association. Appl. № 296757; 7.12.2005; pub. 20.06.2006.

4. Pat. 20050244820 USA C12Q 1/70; C12Q 1/68; C12Q 1/04. Detecting molecular binding by monitoring feedback controlled cantilever deflections / Su X., Chan S., Koo T.-W., Yamakawa M. Berlin A. A.; Intel Corporation. Appl. N 11/111, 308; 20.04.2005; pub. 3.11.2006.

5. Pat. 0223171 USA C12M 1/34. High Sensitivity mechanical resonant sensor / Craighead H. G., Ilic B., Czaplewski D. A., Hall R. H.; Cornell Research Foundation, Inc. Appl. N 11/343,488; 31.01.2006; pub. 5.10.2006.

6. Lang H. P., Berger R., Battiston F., Ramseyer J.-P. et al. A chemical sensor based on a micromechanical cantilever array for the identification of gases and vapors // *Applied Physics*. 1998. Vol. 66. P. 61–64.

7. Osipovich V. S., Yashin K. D., Terpinskaya T. I. et al. Photostability of CdS-based nanocrystalline structures used to visualize biological tissues // *Journal of Applied Spectroscopy*. 2012. Vol. 80. N. 1. P. 93–98.

8. Яшин К. Д., Терпинская Т. И., Осипович В. С. и др. Технология создания медицинской нанобиоинформационной диагностической системы на полупроводниковых нанокристаллах // *Нано- и микросистемная техника*. 2012. № 4 (141). С. 11–14.

9. Есенбаева Г. Т., Баширова Т. П., Кадырова И. А. Экспресс-методика прогнозирования вероятности возникновения инсульта у пациентов // *Фундаментальные исследования*. 2013. № 5–1. С. 72–74.

10. **Наноструктуры** в биомедицине / под ред. К. Гонсалвес, К. Хальберштадт, К. Лоренсин, Л. Наир; пер. с англ. М.: БИНОМ. Лаборатория знаний, 2013. 519 с.

V. S. Osipovich<sup>1</sup>, Associate Professor, seth22@yandex.ru,  
K. D. Yashin<sup>1</sup>, Associate Professor, Head of the Department, yashin@bsuir.by,  
V. P. Sontea<sup>2</sup>, Professor, Head of the Department, A. P. Sereakov<sup>2</sup>, Master of Technical Sciences  
<sup>1</sup> Belarusian State University of Informatics and Radioelectronics, Minsk, Republic of Belarus  
<sup>2</sup> Technical University of Moldova, Chisinau, Republic of Moldova

## MEMS for Pathogens Diagnostic

*A concept was developed of a device for express diagnostics of human diseases in home conditions. The device consists of a laser for excitation of the fluorescence of markers (nanoparticles); a photodetector for recording of the level of the intensity of the nanoparticles' fluorescence; a porous membrane for fixing of the analyzed agents; a micropump for pumping of the analyzed liquid through the membrane; microvalves for control of the supply of the analyzed liquid on the porous membrane; a 560 nm light filter for separation of the light resulting from the fluorescence of the biological components from the total spectrum. It would be expedient to use the proposed concept for development and production of the microelectromechanical devices for the express diagnostics of human diseases.*

**Keywords:** cantilever biosensor, micro-beam, indication of pathogens, metabolites, biomarktrs. aptamers, express diagnostics

### Introduction

Microsensors are applied in the gas and biochemical analysis, medical measurements, and for determination of the authenticity of products. The ultrasensitive micromechanical method with the use of the console matrixes is the basic method. One of the topical problems of the biomedical diagnostics is to ensure high sensitivity and selectivity of the analyses. At that, the organic fluorochromes are used as antigene markers. In parallel with the development of the fluorescent markers and techniques of immunological analysis there is a transition to the laser sources of excitation and fibre-optical

systems of signal transmission. Their introduction in combination with computer data processing opens prospects for development of compact recording devices. Development of the physico-technological bases for a device for express indication of the pathogens is topical for the biotechnical and diagnostic purposes.

The aim of the work is analysis of information concerning application of MEMS biosensors, development of the operating principle and design of the device for express indication of microorganisms and pathogens of human diseases in the investigated volume of the analyzed HquidTor preliminary diagnostics in home con-

ditions. The basic results of the work are connected with development of the structural, functional and electric circuitry of the instrument. The microsensors are applicable for diagnostics and development of illnesses or effects of treatment.

### Indication of the pathogens of human diseases with the use of microelectromechanics devices and systems

Microconsoles (MC) are rectangular microstrips of silicon with thickness less than 1 micrometer (fig. 1). Adsorption of the molecules of various substances (due to their interaction with the receptor molecules) results in a bend of MC owing to the surface stress. The bend is recorded by a deviation of a laser beam. The console biosensors (CBS) are used in vacuum, gases or liquids. Their main advantages are their small size, quick response time, high sensitivity, and transformation of signals without display markers [1].

The authors [1] use a matrix of eight MC. Every MC is covered with a sensitive layer for a highly specific molecular interaction. The system can record simultaneously several pictures for various analyses. Each of MC is covered with different sensitive layers. In a gaseous environment the design is used as an artificial nose for analysis of the quickly evaporating vapors and smells.

The sensors are controlled in the static, dynamic and thermal modes. In a static mode there is mechanical response of MC after adsorption of the molecules from the analyzed environment. Surface stress leads to a bend of MC with a deviation of  $\approx 10$  nm. In a dynamic mode MC fluctuates in the resonance frequency with the use of a piezoelectric drive. For determination of an analit MC is covered with a sensitive molecular layer. After adsorption of the determined substance the resonance frequency of MC decreases. Its change of 1 Hz corresponds to a change of about 1 pg of the mass of the analit adsorbed on MC. In the thermal mode the difference in the factors of linear expansion of the console material (for example, monocrystal silicon and metal with thickness of 100 nm) causes a bend of a sensor (of the bimetallic structure). Temperature changes of 5...10 K cause deviation in MC of several nanometers, which can be measured [1].

There is a necessity of detection and identification of the chemical and biological substances, such as nucleic acids, proteins, drugs, explosives and cancerogenic substances, toxins, pharmaceutical preparations, poisons, allergens and the infected cells [2]. Clinical researches demand special preparation of the laboratorians and use of special equipment. The existing methods of analysis use gas and liquid chromatography and/or mass spectroscopy; they demand a lot of time and money. Therefore CBS, which can effectively detect/demonstrate chemical and biological substances, will ensure essential benefit in costs and analysis time.

A method was developed for transformation of the biomolecular reactions into a nanomechanical action with the use of the interconnection between the two phenomena [2]. This change of the surface stress is due to connection of DNA and fastening of the ligand receptors on MC and a nanosize deviation of MC. The molecular force, resulting from adsorption of the molecules, causes a surface stress. MC is bent due to a non-specific adsorption of the proteins. The method does not demand fluorescent markers and optical excitation, and belongs to the methods of ligand linkage in a liquid environment. A strong MC is used. That means, that MC has a big size or the material, of which it is made, has higher Young modulus. Bigger MC can worsen sensitivity to detection of small quantities. Besides, such MC demands long influence of an analit for accumulation of the quantity of the substance allowing its detection.

Application of biosensors for diagnostics and treatment of diseases is described in [3]. The method allows us to determine composition of substances in liquids, including blood, and breathing products. The biosensors are described, which imitate naturally the reactions in cells (in the RNA chain of nucleotides). Biosensors are used in combination with signal agents in order to ensure display on the screen of the biomarkers, which are present in the exhaled air. As biosensors aptamers are used as effective determinants of individual molecules. They have higher specificity, than the diagnostic technologies based on antibodies. Aptamers can meas-

Table 1  
Metabolites and biomarkers found in human breath

Metabolites and biomarkers	Indicator	Diagnosis
Aldehyde	Ethanol	Intoxication
Acetone	Amino acid salt	Diabetes
Ammonia	Amino acids	Uraemia and illness of liver
Carbon oxide	Raised percent of CO	Internal air pollution
Chloroform	Halogenated substances	Internal air pollution
Dichlorobenzene	Halogenated substances	Internal air pollution
Diethylamine	Choline	Intestinal bacterial growth
Hydrogen	Gases of intestines	Intolerance to lactose
Isoprene	Fat acid	Metabolic tension
Methane etiol	Metionit	Intestinal bacterial growth
Methyl ethyl ketone	Fat acid	Internal air pollution
O-toludin	Metabolite of carcinoma	Bronchogenic carcinoma
Sulphides of pentane	Peroxidated lipid	Myocardium heart attack
Hydrogen sulphide	Metabolism	Periodontal illness



ure such concentrations of lipid, which are lower by several orders than in diagnostic tests with antibodies. For aptamers it is one detected molecule per billion or even sextillion of other molecules. Unlike the antibodies, the production of which is based on animal and/or cultural technologies, the production of aptamers takes place in a test tube. Synthesis of aptamers is inexpensive, they are obtained due to reaction with participation of polymerase. When the sequence of a chain is known, they can be synthesised from separate natural and/or synthetic nucleotides. Aptamers can be stored at a room temperature.

A biomarker is a biochemical substance, which has a specific molecular feature. It makes it applicable for diagnosing and measurement of development of an ill-

ness or the effects of treatment. Metabolites and biomarkers found in human breath include certain substances (table 1). In [3] a biological method of analysis of the samples (breath and blood) is described. The analysis consists in detection of analytes (biomarkers) in the physical liquids of persons, related to various vital conditions or illnesses: intoxication, cancer, liver and kidneys illnesses or diabetes.

The method for detection of the molecular bonds and/or identification of the target substances by monitoring of MC deviations with a feedback control is described in [4]. Table 2 presents the methods for detection of the molecular bonds. Group 1 ensures the highest selectivity and sensitivity in identification of the biomolecular substances [4].

Methods for detection of the molecular bonds

Table 2

№	Group of methods	Principle of operation	Modifications
1	Detection of chemical bonds (molecules) by the method of control over the values of MC deviations. The fixed deviation of the console corresponds to a certain chemical interaction (substance)	For detection of the molecular bonds certain substances are attached to one or several MC. Presence of the required substance leads to formation of the chemical bonds (new chemical compounds) and to MC deviations; the deviations are recorded by the recording unit	A microsystem may employ a source of a counterbalancing force for returning of the console in the initial position. The force can be magnetic, electric or radiative. The unit for detection and the mechanism, which generates the counterbalancing force, are connected with the unit for information processing and control. A computer regulates the feedback supporting the console in a fixed position by balancing of the force of deviation and the counterbalancing force. The concentrations of the substances in a sample is calculated on the basis of the counterbalancing force
2	Analysis on the basis of antibodies. The compound, molecule or their group for which the antibody was created, can be detected by the methods of immunological analysis (ELISA, western-blotting, etc.)	The required substance (antigene) or antibody to the required substance is attached to the fixed support (subject glass, test tube wall). The antibody is preliminary marked with a fluorescent, fermental or other label. In such a way one can detect connection of an antibody to the required substance (direct immune-enzyme analysis or fluoroimmunoassay)	If the antibody is attached to the support, then connection of the required substance to it can be revealed with the use of one more marked antibody (a three-layer analysis or indirect fluoroimmunoassay). An analysis on the basis of antibodies can sometimes show unacceptably high levels of incorrect positive and negative results owing to a cross reactance of the antigenes with various antibodies, low antigenicity of the required substance (leading to low sensitivity of the analysis), nonspecific adsorption of the antibodies to various surfaces, etc. The method is effective with high concentrations of the required substance
3	Analysis on the basis of crossing of the oligonucleotides for detection of the target oligonucleotides, information RNA, genomic DNA, etc.	A sample of oligonucleotide, by which the target substance had been marked, is crossed with the sample, suspected for the content of the target nucleic acid	DNA chips were developed, which contain hundreds or thousands of individual oligonucleotide samples. Crossing of the target nucleic acid and a sample of oligonucleotide can be detected with the use of the fluorescent and radioactive marks, etc. There are restrictions connected with the sensitivity and/or specificity of the analysis. This is connected with the fact that crossing of the nucleic acid can be possible between the sequences, which exactly supplement each other through an unsuccessful crossing conducting to incorrect positive results
4	Analysis of the activity of the enzymes	The speed is determined, with which the enzymes catalyze this or that biochemical reaction. It, in turn, is measured by the speed of transformation of a substratum or the speed of accumulation of the products of reaction	For determination of the enzymatic activity the following methods are used. Chemical method — a quantitative determination of a substratum or products by means of chemical reagents. Spectrophotometric method — measurement of the speed of the enzymatic reactions by the change of absorption of a substratum at a characteristic wavelength. Manometrical method — determination of the quantity of the gas escaping in the course of a reaction. Polarimetric method — the change in the optical rotation is recorded. Chromatographic method — determination of a substratum or products by means of various kinds of chromatography

The device and technology for determination of the weight of a substance based on recording of the frequencies of the resonating MC are described in [5]. MC is covered with a fixed counteragent, capable to interact with a cell or a molecule.

The initial frequency of the resonance is determined of the MC, covered with the fixed counteragent. As a result of processing by a solution, which interacts with the counteragent, the weight of MC increases. The second frequency of the resonance is recorded. The difference gives the reason to declare that the target cell or a molecule has been found. The frequency characteristics of MC are determined optically by means of the reflected light and two photodetectors, or by means of the interference method with the help of one photodetector.

In [5] there are descriptions of high-sensitivity CBS for determination of a chemical or biological substance. If earlier it was enough to measure the quantity of a substance of about a microgram, today science and industry need detection of a separate cell, an endocellular element or a substance with weight of about  $10^{-5}$  g. For example, in the food processing industry even insignificantly small quantities of toxins can be dangerous for people. For example — *Escherichia Coli* (*E. Coli*) bacterium. Special attention of the mass-media alarmed the consumers about the presence of *E. Coli* in meat products, apple juice and lucerne (forage for cows).

The system [5] includes a light source, MC and a photo diode. One end of MC is motionlessly fixed, the other end resonates under the influence of the environment. The resonance frequency depends on the weight of MC. The photo diode generates a signal. The light reflected from the top of MC is the function of the frequency of MC vibration. The surface of MC is covered with a counteragent for its binding with a certain analyzed substance. The deposited substance increases the weight of MC. The processor is connected to the photo diode and carries out the program of determination of the weight of the analyzed substance kept by the binding counterpart. The length of MC is 0,5...1000  $\mu\text{m}$ . MC was developed for detection of substances including pathogens, microorganisms, bacteria, viruses or their certain groups. The binding counteragent may include an antibody, which is connected with such objects as cells, their fragments or elements.

CBS for detection of gases and vapors are described in [6]. Covered with special substances MC is exposed to a chemical influence during several hours. Measurements were done before occurrence of Lennard-Jones potential (the neighbouring molecules are pushed off from each other, and at big distances they are drawn to each other). In many cases the absorption of the molecules on the surface of MC may be oriented in the opposite direction by simple heating of the system or its placing in vacuum.

### **Development of a device for determination of the concentration of nanoparticles by the intensity of the fluorescence**

Researches [7, 8] allowed us to develop and manufacture a model sample of the device for the express diagnostics of human diseases in home conditions. The device includes: a laser for excitation of the fluorescence of the markers (nanoparticles); a photodetector for recording of the level of the intensity of their fluorescence; and a microcontroller.

The microcontroller is used for calculation of the concentration of the analyzed substance by the intensity of the fluorescence; for device calibration; for calculation of the concentration of the nanoparticles and/or biological material and keeping of connection with a personal computer (fig. 3).

The porous membrane (fig. 4) lets through a solution with biological components and detains the detected agent (for example, a cell). On this agent (on the epitopes) the nanoparticles are adsorbed: connected by the antibodies to the detected biological agent. Excitation of the fluorescence of the nanoparticles is carried out by a semi-conductor laser. The wavelength of the laser and the wavelength of the fluorescence of the nanoparticles differ. Between the photodetector and the porous membrane (fig. 5) there is an optical filter, which lets the light with the same wavelength as radiated by the nanoparticles pass through. This allows us to separate the light resulting from the fluorescence of the biological components from the total spectrum. The intensity of the light recorded by the photodetector depends on the quantity of the nanoparticles on the surface of the porous membrane. The latter, in turn will depend on the quantity of the detected biological components.

The basic electric circuitry of the device was developed. It includes CP2102 USB bridge, P1c16f887 microcontroller and TSL257 photodetector, which ensures recording of the change of the intensity of light of 2,93  $\text{mW}/\text{cm}^2$  per each 2 V at the wavelength of 560 nm.

Algorithms were developed for operation of the software for the microcontroller and processing of interruptions (fig. 6 and 7). On the basis of the unit circuitry of the algorithms a software was developed with the use of C language and in MP LAB environment.

Approbation of the model sample of the device for determination of the concentrations of nanoparticles by the fluorescence was carried out at the Institute of Chemistry of New Materials (Minsk). For this purpose an experimental installation was assembled with Planar MV1 fluorescent microscope (Belarus). A photodetector was placed in the slot for a digital camera. The fluorescent radiation of CdSe/ZnS nanoparticles passed through an optical filter of 560 nm. On a subject table for a microscope the glasses were placed with drops of

a colloidal solution of nanoparticles. Five samples were used for approbation. The results of the measurements of the intensity of the fluorescent radiation of CdSe/ZnS nanoparticles with the use of the manufactured model sample of the device are presented in table 3.

The results of determination of the concentration of nanoparticles by the intensity of the fluorescence demonstrated the operability of the device, and also necessity and possibility of the further research and development of the device, its calibration and manufacture of a MEMS version of the device for an express indication of human diseases.

### Prospects for development of the technology

The developed approach can be applied for manufacture of the MEMS device of express diagnostics of human diseases. The microdevice unit circuitry should be complemented with a micropump for pumping of liquids through the porous membrane, and microvalves for control of the supply of the analyzed liquid or a liquid with antibodies to the porous membrane. Preliminary analyses in home conditions will allow us to accelerate the struggle against the diseases and reduce the quantity of analyses in the clinical laboratories. An example of the analysis in home conditions is the device for determination of insulin in the blood of people suffering from diabetes. The Russian scientists have developed an express test for diagnostics of a stroke [9]. However, such examples are very few. Clinical diagnostics demands expensive equipment and qualified professionals. There is a constant need for new techniques and devices for the express diagnostics in home conditions, because many modern methods of immunoassay are developed well enough [10].

### Conclusion

Circuitry of a device for an express indication of the pathogens was developed, the functional and electric circuitry of a device for the express indication of the

pathogens. Modelling was done of operation of the device with application of the systems of computer-aided designing. An experimental sample of the device for the express indication of the pathogens in home conditions was manufactured.

### References

1. Lang H., Hegner M., Gerber Ch. Cantilever array sensors, *Materialstoday*, 2005, vol. 4, pp. 30–36.
2. Fritz J., Baller M., Lang H., et al. Translating biomolecular recognition into nanomechanics, *Science*, 2000, vol. 288, pp. 316–318.
3. Pat. 20060160134 USA G01N 33/53. *Novel application of biosensors for diagnosis and treatment of disease*, Richard J. Melker, Dennis J. M., Martin Ch. N., Stewart J. D.; Saliwanchik Lloid and Saliwanchik a Professional Association — Appl. № 296757, 7.12.2005; pub. 20.06.2006.
4. Pat. 20050244820 USA C12Q 1/70; C12Q 1/68; C12Q 1/04. Detecting molecular binding by monitoring feedback controlled cantilever deflections, Su X., Chan S., Koo T.-W., Yamakawa M. Berlin A. A.; Intel Corporation — Appl. № 11/111,308, 20.04.2005; pub. 3.11.2006.
5. Pat. 0223171 USA C12M 1/34. High Sensitivity mechanical resonant sensor, Craighead H. G., Ilic B., Czaplowski D. A., Hall R. H.; Cornet Research Foundation, Inc. — Appl. № 11/343, 488, 31.01.2006; pub. 5.10.2006.
6. Lang H. P., Berger R., Battiston F., Ramseyer J.-P. et al. A chemical sensor based on a micromechanical cantilever array for the identification of gases and vapors, *Applied Physics*, 1998, vol. 66, pp. 61–64.
7. Osipovich V. S., Yashin K. D., Terpinskaya T. I., et al. Photostability of CdSe-based nanocrystalline structures used to visualize biological tissues, *Journal of Applied Spectroscopy*, 2012, vol. 80, no. 1, pp. 93–98.
8. Osipovich V. S., Yashin K. D., Terpinckaja T. I., et al. Tehnologija sozdaniya medicinskoj nanobioinformacionnoj diagnosticheskoj sistemy na poluprovodnikovyh nanokristallah, *Nano- i mikrosistemnaja tehnika*, 2012, no. 4 (141), pp. 11–14.
9. Esenbaeva G. T., Bashirova T. P., Kadyrova I. A. Jekspress-metodika prognozirovanija verojatnosti voznilmovenija insul'ta u pacientov, *Fundamental'nye issledovanija*, 2013, vol. 5, no. 1, pp. 72–74.
10. *Nanostruktury v biomedicine* / pod red. K. Gonsalves, K. Hal'bershtadt, K. Lorenzin, L. Nair; per. s angl., Moskow: BINOM. Laboratorija znaniy, 2013. 519 p.