

МЕТОДЫ БИОХИМИЧЕСКИХ ИССЛЕДОВАНИЙ

УДК [542]:577.352.523+621.382.3

©Коллектив авторов

ПРИМЕНЕНИЕ ИОНСЕЛЕКТИВНЫХ ПОЛЕВЫХ ТРАНЗИСТОРОВ (ИСПТ) С ФОТОПОЛИМЕРИЗУЕМЫМИ ПОЛИУРЕТАНОВЫМИ МЕМБРАНАМИ В НЕФРОЛОГИИ ДЛЯ ОПРЕДЕЛЕНИЯ КОНЦЕНТРАЦИИ (АКТИВНОСТИ) ИОНОВ КАЛИЯ.

АБРАМОВА Н.Ю. *, БОРИСОВ Ю.А., БРАТОВ А.В. *, ГАВРИЛЕНКОВ П.В.,
ДОМИНГЕС К. *, СПИРИДОНОВ В.Н., СУГЛОВА Е.Д.

Санкт-Петербургский государственный медицинский университет им. акад.
И.П.Павлова

* Национальный центр микроэлектроники, Барселона, Испания

Изучена возможность применения ионселективных полевых транзисторов с фотополимеризуемыми полиуретановыми мембранами для контроля электролитного состава диализирующих растворов, применяемых в аппаратах «искусственная почка», а также плазмы больных, получающих лечение хроническим гемодиализом. Описаны краткосрочные и долговременные характеристики работоспособности калийселективных полевых транзисторов при непрерывном контакте с растворами. Произведено сравнение показаний таких транзисторов и иных сенсорных систем. Показано, что достаточная надежность при измерении в области физиологических концентраций в сочетании с невысокой стоимостью обеспечивают возможность применения калийселективных полевых транзисторов для мониторингового контроля содержания ионов калия как в диализирующих растворах, так и в плазме больных, получающих лечение хроническим гемодиализом.

Ключевые слова: нефрология, гемодиализ, кровь, калий, ионометрия, ИСПТ

ВВЕДЕНИЕ. Уже многие годы ионселективные электроды являются основным инструментом определения концентраций (активностей) ионов в биологических жидкостях [1, 2]. И хотя ионометрический метод не является референтным в клинических лабораториях и службах контроля [3], в отделениях хронического гемодиализа с успехом применяются анализаторы, базирующиеся на блоках ионселективных электродов производства Fresenius, Kone, Radelkis и других фирм. Все сенсоры, используемые в этих приборах, должны отвечать следующим требованиям:

■ относительно небольшие размеры, так как проба биологического материала,

как правило, имеет ограниченный объем;

- высокая селективность и соответствующий данному биологическому материалу концентрационный интервал выполнения функций;

- полное отсутствие или незначительная степень взаимодействия материала датчика с биологической пробой [4].

Вышеперечисленные необходимые параметры датчиков вполне могут быть присущи ион-селективным полевым транзисторам (ИСПТ, ISFET) с различными типами селективных мембран.

Именно отсутствие внутреннего жидкостного заполнения и возможная предельная минимизация делают использование ИСПТ в гемодиализном контроле столь перспективным. Малые размеры датчиков предопределяют незначительные изменения в гидродинамике аппарата «искусственная почка» при мониторинговом контроле диализирующих растворов. Особую значимость такой контроль приобретает при бикарбонатном типе гемодиализа, поскольку диализирующий раствор формируется в аппарате путем смешивания при одновременном разведении двух концентратов: концентрата, содержащего большой перечень ионов щелочных и щелочноземельных металлов и имеющего кислую реакцию, и основного концентрата, представляющего собой раствор NaHCO_3 . Еще более важным представляется выполнение в миниатюрном варианте комплекса датчиков, дающее возможность одновременного мониторинга концентраций нескольких ионов при переходе на индивидуальный режим (для каждого пациента) при процедуре бикарбонатного диализа. Реализация такого сенсорного комплекса могла бы привести к проведению гемодиализной процедуры не только в режиме диалога «пациент-аппарат» или «врач-аппарат», но и, при наличии в аппарате блока обратной связи, к автономной регуляции процедуры.

С другой стороны, вполне реальными препятствиями на пути применения ИСПТ в биологических целях могут служить и недостаточная продолжительность жизни датчиков, и изменение значений стандартных Э.Д.С. с течением времени, неполнота функции, особенно в области нижней границы физиологических концентраций электролитов.

Известно, что стандартные мембраны с поливинилхлоридной (ПВХ) матрицей, столь хорошо зарекомендовавшие себя при изготовлении ионселективных электродов для определения концентраций (активностей) самого широкого спектра ионов, обладают плохой адгезией по отношению к кремниевой подложке полевых транзисторов [2]. Это приводит к быстрому отслоению селективной мембраны, особенно при работе в обычном для биологических и медицинских процедур температурном интервале $35-38^\circ\text{C}$. Качество ИСПТ также напрямую связано с качеством герметизации полупроводникового кристалла, поскольку плохая изоляция повышает уровень электрического шума выходного сигнала, снижает воспроизводимость показаний, уменьшает время жизни сенсора. Поэтому в последнее время широко проводится поиск новых материалов-герметиков для ИСПТ, а также альтернативных материалов для формирования ионселективных мембран.

Некоторыми из соавторов настоящей работы в качестве материала мембранной матрицы вместо ПВХ были выбраны фотополимеризуемые уретандиакрилаты, а также оптимизированы составы мембран, используемых для изготовления ИСПТ, и методы их получения, нанесения на ИСПТ и герметизации

последних [5-7].

Основными преимуществами ИСПТ с полиуретановыми фотополимеризуемыми мембранами являются:

- технологичность изготовления с использованием фотолитографической технологии;
- полностью твердое исполнение;
- высокое входное и низкое выходное сопротивление;
- возможность размещения нескольких различных датчиков на минимальной площади, и, следовательно, формирования целого сенсорного блока.

Целью настоящего исследования явилось изучение возможности использования K^+ -селективных ИСПТ с фотополимеризуемыми полиуретановыми мембранами для контроля электролитного состава диализирующих растворов, применяемых в аппаратах «искусственная почка», и плазмы крови больных, получающих лечение хроническим гемодиализом.

МЕТОДИКА. В работе были использованы K^+ -ИСПТ с фотополимеризуемыми полиуретановыми мембранами. Их изготовление происходило в два этапа.

Сначала осуществлялась герметизация транзисторов по методике, подробно описанной в [7]. Эпоксикакрилат E-beryl-600, обладающий хорошими изолирующими свойствами, методом центрифугирования наносили на пластину с транзисторами слоем толщиной 15-20 мкм. Затем с помощью соответствующего фотошаблона защитный слой полимеризовался, при этом оставались открытыми затвор транзистора, контактные площадки и линии разреза на пластине. Пластины разрезали на отдельные транзисторы, их покрывали толстым (100-200 мкм) слоем полимера и повторно экспонировали через соответствующий шаблон, позволяющий оставлять открытой область затвора.

На втором этапе на указанную область наносили ионселективную мембрану. Коридор оптимальных составов калийселективных мембранных композиций на основе фотополимеризуемых акрилатов подробно описан в [6]. Нами был использован состав, приведенный в таблице 1. Время облучения при фотополимеризации мембранной композиции составляло 2 минуты.

Таблица 1. Состав K^+ -селективной мембраны, используемой при изготовлении ИСПТ.

Название компонента	Содержание (в % от массы мембраны)
Уретандиакрилат алифатический -олигомер Ebecryl-270	38
Сшивающий агент - гександиолдиакрилат (ГДДА)	10
Фотоинициатор - 2, 2'-диметоксифенилацетофенон Irg 651	1
Пластификатор - диоктилсебацат DOC	48,5
Ионофор - валиномицин	2
Ионообменник - тетрахлорфенилборат калия	0,5

Определение концентраций (активностей) ионов калия в пробах

диализирующего раствора и крови пациентов, получающих лечение хроническим гемодиализом, мы осуществляли на установке, изображенной на рисунке 1. Нами была применена традиционная методика [8, 9] поддержания постоянного значения тока в канале транзистора (I_D) (от 60 до 200 мкА индивидуально для каждого сенсора) при постоянной величине напряжения сток-исток ($V_D=1В$) путем компенсации изменений тока, вызванных изменением состава раствора, подачей дополнительного напряжения на электрод сравнения. Измерения проводились с помощью специального устройства, разработанного и собранного в Национальном центре Микроэлектроники (Барселона, Испания).

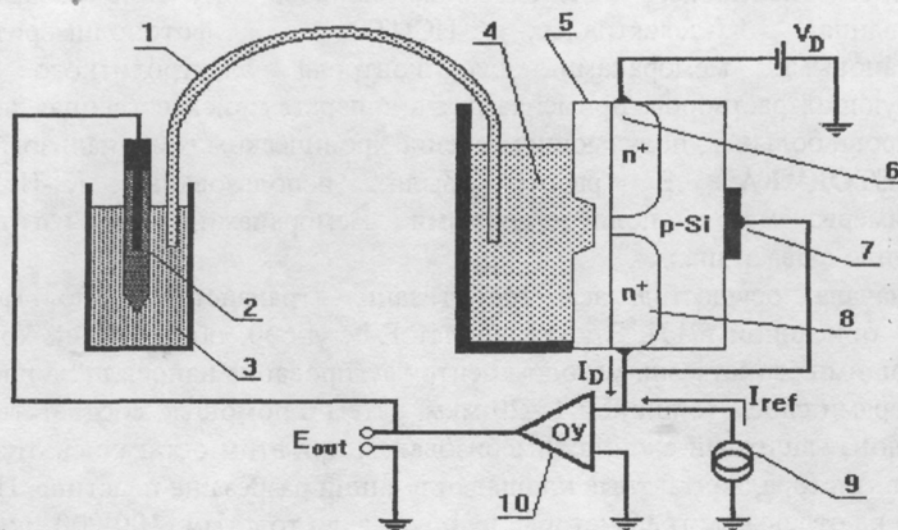


Рисунок 1.

Схема установки для определения концентраций (активностей) ионов калия в пробах диализирующего раствора и крови пациентов: 1 - электролитический мост, заполненный 1М NH_4NO_3 ; 2 - электрод сравнения; 3 - насыщенный раствор хлорида калия; 4 - проба (исследуемый раствор или биологическая жидкость); 5 - ионселективный полевой транзистор; 6 - сток; 7 - контакт к подложке; 8 - исток; 9 - источник тока; 10 - операционный усилитель.

Таблица 2. Составы калибровочных растворов

Компонент	Раствор N 1	Раствор N 2	Раствор N 3	Раствор N 4	Раствор N 5	Раствор N 6
KCl, mM	1	2	2.5	5	25	125
$Na_2HPO_4 \cdot 12H_2O$, mM	Постоянный фон: 10					
NaCl, mM	Постоянный фон: 100					
$NaHCO_3$, mM	Постоянный фон: 20					
$CaCl_2$, mM	Постоянный фон: 1,5					
$MgCl_2$, mM	Постоянный фон: 1,5					
Глюкоза, mM	Постоянный фон: 10					
Сахароза, mM	Постоянный фон: 27					

Калибровку ИСПТ производили при 37⁰С по пяти, а, в некоторых случаях, шести растворам, составы которых приведены в таблице 2. Реперным раствором служил так называемый «раствор Моргана» [10]; он по электролитным

компонентам полностью отвечает составу плазмы крови, его рН составляет 7,34-7,36, что также совпадает с рН крови здоровых доноров.

Все соли для приготовления калибровочных растворов и раствора Моргана имели квалификацию не ниже «ХЧ».

Измерения Э.Д.С. при калибровке контрольных ионселективных электродов, а также при определении концентрации K^+ в пробах диализирующих растворов и крови пациентов производили на иономере И-130 при 37°C, а также на анализаторе Fresenius.

Для определения концентрации K^+ цельную кровь, взятую от больных, обрабатывали раствором гепарина (натриевая соль, 5000 МЕ/мл) из расчета 0,005 мл на 1 мл цельной крови). Плазму крови отделяли от эритроцитов на центрифуге РС-6 при 15°C в течение 10 минут.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ. Образец калибровочного графика, полученного для ИСПТ с фотополимеризуемой полиуретановой мембраной, в сопоставлении с таким же графиком для стандартного ИСЭ на основе ПВХ-мембраны, представлен на рис.2. Как видно, угол наклона калибровочной прямой для ИСПТ оказался несколько меньшим, чем для ПВХ-электрода на протяжении всего интервала концентраций K^+ в исследуемых растворах, особенно в области низких концентраций - от 0,001 до 0,002 мМ. Однако, при физиологических значениях C_{K^+} величина угла наклона для ИСПТ являлась значительной и составляла не менее, чем 52-53 мВ на единицу изменения pK^+ .

В таблице 3 приведены величины углов наклона калибровочного графика для нескольких индивидуальных датчиков в зависимости от длительности их непрерывного контакта с растворами, а в таблице 4 - краткосрочные и долговременные характеристики стабильности потенциалов для одного из K^+ -ИСПТ. Следует отметить, что в первые трое суток контакта с растворами, несмотря на вымачивание в 0.01 М КСl, датчики демонстрировали низкий угол наклона (34-38 мВ) и изменения потенциала в пределах 6-7 мВ в одном и том же растворе. В последующем при вымачивании характеристики датчиков постепенно улучшались; затем в течении полутора месяцев ИСПТ были пригодны для проведения анализа диализирующего раствора аппарата «искусственная почка» и плазмы крови больных.

Сравнительное тестирование при определении концентрации K^+ было произведено во временном интервале от 10 до 45 суток от начала контакта с растворами. Результаты представлены в таблице 5.

Таблица 3. Угол наклона (S) и коэффициенты корреляции для индивидуальных датчиков - K^+ -ИСПТ с фотополимеризуемыми полиуретановыми мембранами при длительном контакте со смешанными модельными растворами.

№ K^+ -ИСПТ	Время контакта с растворами (сутки)					
	3		28		50	
	S	R	S	R	S	R
1	52,9	0,995	57,9	0,995	57,9	0,995
2	46,2	0,991	52,4	0,995	52,8	0,990
3	50,1	0,996	53,7	0,997	57,4	0,995
4	53,1	0,998	62,2	0,999	60,1	0,995
5	52,4	0,995	50,8	0,997	51,8	0,996

Первоначально в качестве тестовых были выбраны образцы диализующих

Первоначально в качестве тестовых были выбраны образцы диализующих растворов, полученных в режиме отбора проб из аппаратов «искусственная почка» до входа растворов в диализатор и после прохождения через него. Как следует из результатов, представленных в таблице 5, относительная ошибка определения концентрации K^+ составляла менее 4%, что отвечает общеклиническим требованиям точности при определении концентраций электролитов в биологических пробах [11]. Затем тестирование было произведено и при использовании проб модельного раствора Моргана и образцов плазмы крови больных, получающих лечение хроническим гемодиализом (табл. 6). Как следует из результатов, приведенных в таблицах 5 и 6, почти во всех случаях достоверных различий между показаниями, полученными с помощью K^+ -ИСПТ и иных сенсорных систем, не наблюдалось.

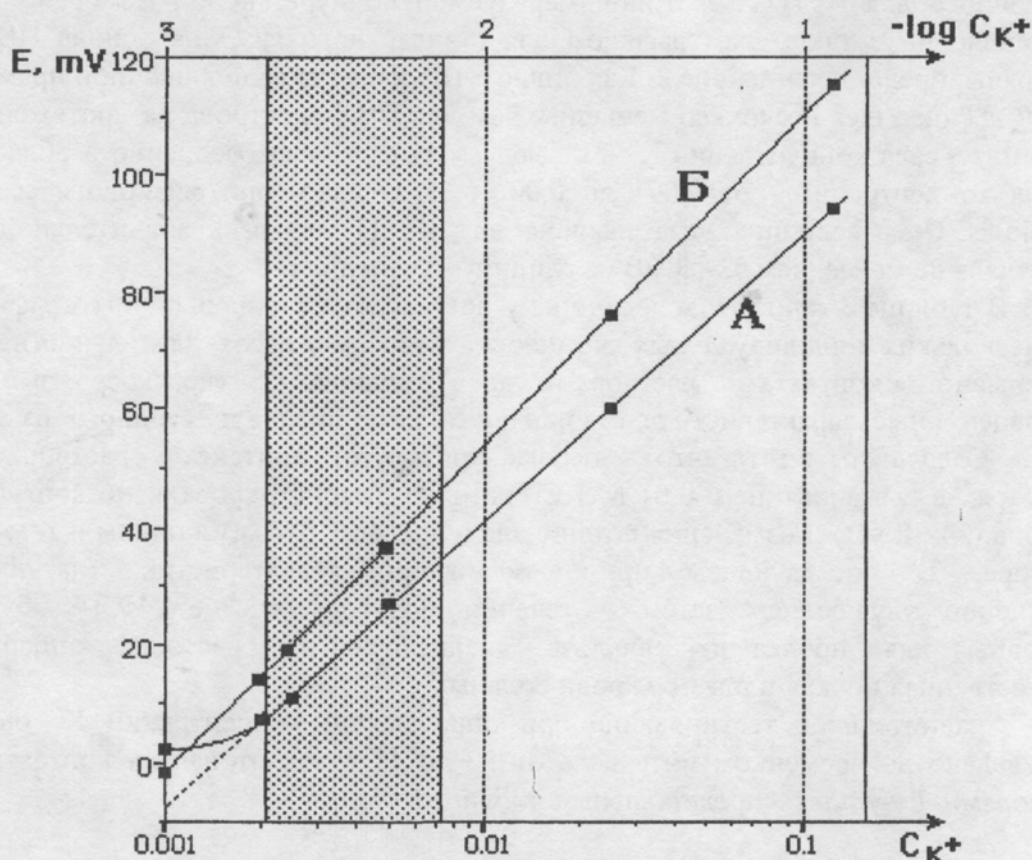


Рисунок 2.

Калибровочные графики, полученные для калийселективного полевого транзистора с фотополимеризуемой полиуретановой мембраной (график «А») и для стандартного калийселективного электрода, изготовленного на основе ПВХ-мембраны (график «Б»). По оси абсцисс: нижняя шкала - « C_{K^+} » - концентрация калия в калибровочном растворе (мМ); верхняя шкала - « $-\log C_{K^+}$ » - отрицательный логарифм концентрации калия в калибровочном растворе. По оси ординат: электродный потенциал «Е, мВ», выраженный в милливольтках. Заштрихованная область соответствует физиологическому диапазону концентраций ионов калия.

Таблица 4. Значения потенциалов (мВ), демонстрируемых индивидуальным K⁺-ИСПТ при калибровке по стандартным растворам. Интервал между измерениями - от 3-х до 4-х минут (Vd=1В, Id=170мА).

Дни	Концентрации K ⁺ в модельных растворах (мМ)					
	1	2	2.5	5	25	125
3	1148,3			1110,0	1086,0	1047,1
	1148,2			1110,7	1085,6	1048,2
	1146,8			1111,1	1089,7	1048,5
	1144,2				1089,7	1047,8
14	972,9		951,0	941,6	903,5	860,9
	970,6		950,1	939,5	903,5	862,3
	970,5		949,8	937,9	904,5	862,0
	969,4		950,3	939,0		
25	952,6		941,0	925,0	889,0	843,7
	951,6		939,6	924,0	888,7	846,0
	951,0		937,8	925,4	888,8	844,0
	951,8		934,9	924,4	889,0	
27	962,3	942,3		931,3	889,9	849,0
	959,8	941,8		929,2	888,4	849,5
	959,7	941,3		928,0	889,5	849,9
	959,5	941,7		927,0	889,1	849,7
50	955,8	941,0		930,6	888,8	848,1
	954,7	940,2		928,8	887,8	847,6
	955,0	942,4		928,6	887,6	848,4
	955,2	940,5		930,0	887,3	848,6

Таблица 5. Результаты определения концентрации K⁺ (мМ) в диализирующих растворах в пробах, взятых из аппаратов «искусственная почка» до входа в диализатор и после выхода из него при использовании K⁺-ИСПТ с полиуретановыми мембранами и ИСЭ с ПВХ мембраной.

Номер аппарата «искусственная почка»	Место забора пробы	Тип датчика	
		K ⁺ -ИСПТ с полиуретановой мембраной	ИСЭ с ПВХ мембраной
18	до входа в диализатор	2,01±0,02	2,03±0,02
	после выхода из диализатора	2,92±0,09	2,68±0,05
19	до входа в диализатор	1,97±0,05	2,00±0,02
	после выхода из диализатора	2,87±0,07	2,58±0,02
20	до входа в диализатор	2,11±0,02	2,13±0,02
	после выхода из диализатора	2,80±0,10	2,78±0,07

Таблица 6. Результаты определения концентрации K⁺ (мМ) в биологических пробах при использовании K⁺-ИСПТ с фотополимеризуемыми полиуретановыми мембранами и на анализаторе Fresenius.

Проба	K ⁺ -ИСПТ	анализатор Fresenius
Стандартный раствор Моргана С K ⁺ =5 мМ	5,40±0,20	5,10±0,10
Плазма крови	3,52±0,10	3,70±0,10
Цельная кровь	7,20±0,22	6,90±0,30
(частичный гемолиз)	19,50±0,70	20,08±0,10

Таким образом, в области физиологических значений концентраций K^+ -ИСПТ с фотополимеризуемыми полиуретановыми мембранами могут быть использованы в качестве достаточно надежных и относительно недорогих датчиков при мониторинговом контроле содержания K^+ , но только в режимах отбора отдельных проб и «by-pass».

Переход к режиму «in-line», при реализации которого применение сенсоров является наиболее перспективным, требует дальнейших шагов: разработки методики стерилизации ИСПТ, определения оптимальной формы подложки в целях предотвращения дестабилизации гидро- и гемоциркуляций, расширение перечня определяемых ионов для создания единого сенсорного блока.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Корыта И., Штулик К.* (1989) Ионоселективные электроды. М., Мир.
2. *Janata J., Josowicz M., De Vaney D.M.* (1994) *Anal. Chem.*, **66**, 207R-228R.
3. *J.T.Daugirdas, T.S.Ing*, (1994), *Handbook of Dialysis*. Boston-NY-London, Littl, Brown & Company.
4. *Морф В.* (1985) Принципы работы ионоселективных электродов и мембранный транспорт. Пер. с англ. М., Мир.
5. *Bratov A., Abramova N., Munoz J., Dominguez C., Alegret S., Bartroli J.* (1994) *J. Electrochemical Soc.*, **141**, L111-L112.
6. *Bratov A., Abramova N., Munoz J., Dominguez C., Alegret S., Bartroli J.* (1995) *Anal. Chem.*, **67**, 3589-3595.
7. *Munoz J., Bratov A., Mas R., Abramova N., Dominguez C., Bartroli J.* (1996) *J. Electrochem. Soc.*, **143**, 2020-2025.
8. *Vlasov Yu.G.* (1985) Ion-selective field effect transistors: different types and problems // *Ion-selective electrodes - 4 Ed.* E. Pungor, Budapest: Akad. Kiado, 245-282.
9. *Братов А.В., Рождественская Н.В., Левичев С.С., Лисдат Ф.* (1990) *Журн. прикл. хим.*, **63**, 10, 2203-2206.
10. *Cumberbatch M., Zareian K., Morgan D.B., Svamihihan R.* (1981) *Biochem. Med.*, **26**, 60-66.
11. Лабораторные методы исследования в клинике. Справочник под ред. В.В.Меньшикова (1987), М., Медицина.

Поступила 15.09.99

**THE USE OF ION SELECTIVE FIELD TRANSISTORS (ISFETS) WITH
PHOTOCURABLE POLYURETHANE MEMBRANES IN NEPHROLOGY FOR
DETERMINATION OF K^+ CONCENTRATION (ACTIVITY)**

**N. YU. ABRAMOVA, YU. A. BORISOV, A. V. BRATOV, P. V. GAVRILENKOV, K.
DOMINGUEZ*, V. N. SPIRIDONOV, AND E. D. SUGLOBOVA**

Pavlov State Medical University, St. Petersburg, Russia

*Centro Nacional de Microelectronica (CNM), Barcelona, Spain

The applicability is examined of ion selective field transistors with photocurable polyurethane membranes to control of the electrolytic composition of dialyzing solutions used in artificial kidney apparatus, and also of plasma in patient treated by chronic hemodialysis. The short- and long-time characteristics of the efficiency of K^+ -selective field transistors in continuous contact with solutions. Comparative testing of such transistors and other sensing systems is made. It is demonstrated that a sufficient reliability of measurements in the range of physiological concentrations in combination with low cost provide the possibility of using K^+ -selective field transistors for monitoring of the potassium concentration both in dialyzing solutions and plasma in patients on chronic hemodialysis treatment.

Key words: nephrology, hemodialysis, blood, potassium, ionometry, ISFET