

УДК 542.1: [535.241.6+532.517.2+543.422.5]

ОСНОВНЫЕ НАПРАВЛЕНИЯ ДЕЯТЕЛЬНОСТИ ЛАБОРАТОРИИ ИНФОРМАЦИОННО-ИЗМЕРИТЕЛЬНЫХ БИО- И ХЕМОСЕНСОРНЫХ МИКРОСИСТЕМ

© А.А. Евстапов, В.Е. Курочкин

Институт аналитического приборостроения РАН, Санкт-Петербург

Поступила в редакцию 30 июня 1999 г.

Исследования, проводимые в лаборатории, направлены на создание методологии построения био- и хемосенсорных микросистем, а именно: теории, аппаратуры, методики измерений и проведение экспериментальных исследований по направлениям, представляющим фундаментальный и практический интерес.

ВВЕДЕНИЕ

Лаборатория информационно-измерительных био- и хемосенсорных микросистем является наглядным примером одного из динамично развивающихся подразделений Института, тематика которого отражает некоторые современные тенденции развития приборостроения. В лаборатории сформировалось несколько основных направлений, которым уделяется наибольшее внимание. К ним относятся развитие новых принципов проектирования оптических устройств и систем для научных и прикладных исследований, работы по математическому моделированию сигналов, получению эффективных правил обработки и интерпретации результатов измерений, создание новых экспрессных методик микроанализа. Активное участие сотрудников лаборатории в международных проектах и грантах свидетельствует о высоком уровне профессионализма. За время существования лаборатории было написано и успешно защищено пять диссертаций, в том числе, одна докторская. Исследования и разработки, проводимые в лаборатории, как правило, использовались другими организациями, институтами, внедрялись на промышленных предприятиях. Зримым практическим результатом деятельности подразделения может быть сравнение первой крупной разработки и серийного ее выпуска — многоканального фотометра для иммуноферментного анализа "Линкей", позволяющего измерять жидкие пробы объемом 200-250 мкл, — с принципиально новым компактным образцом хемосенсорного микроанализатора "mSEN" с возможностью анализа проб объемом до 5 мкл, имеющего размеры в десятки раз меньше, чем "Линкей".

1. ПРИБОРЫ И МЕТОДЫ ИММУННОГО АНАЛИЗА

Формирование основных направлений исследований лаборатории начало складываться в 1988 году. В течение нескольких лет осуществля-

лась разработка методических основ по созданию приборов твердофазного иммунного анализа. В рамках этой работы были изучены новые методы твердофазного иммунного анализа, разработаны автоматизированные системы и приборы регистрации результатов иммунного анализа, созданы методические основы проектирования оптических и амперометрических детекторов для иммуноферментного анализа (ИФА). Исследовалась возможность ускорения реакций антиген-антитело с помощью акустических полей. Изучались методы твердофазного иммунного анализа, включая метод иммуносорбции биологических агентов на пористых мембранах с регистрацией результатов специфического взаимодействия с помощью спектрофотометра отраженного света, методы люминесценции в ячейках стандартного 96-луночного планшета (или 8-луночного стрипа) для ИФА, амперометрический метод с вводом пробы в поток транспортной среды.

Комплекс проведенных исследований и анализ подобных работ, ведущихся в России и за рубежом, позволил представить и сформулировать перспективы и направления развития биосенсоров и иммуносенсоров [1, 2].

1.1. Оптические приборы

Исследования по разработке и изучению методов твердофазного иммунного анализа проводились с использованием оригинальных макетов приборов, созданных в лаборатории: многоканального фотометра для иммуноферментного анализа, фотометра отраженного света и люминесцентного детектора. Макет 96-канального фотометра для ИФА позволил создать идеологию и основные принципы проектирования многоканальных фотометрических детекторов. В дальнейшем же приоритетным направлением работ явилась опытно-конструкторская работа по созданию и внедрению в производство многоканального фотометра для ИФА. 96-канальный фотометр

“Линкей” позволял практически одновременно регистрировать результаты анализа во всех лунках микротитрационного планшета. Этот прибор стал единственным в России и вторым в мире (первый — V_{\max} Kinetic Reader фирмы Molecular Devices, США) прибором такого класса. Фотометр выпускался Научно-производственным комплексом Аналитических систем и ИФА. Немного позднее были разработаны для АО “Медис” более простые варианты приборов: 8-ми канальный фотометр для ИФА и двухволновой фотометр “Chikken”. Эти, относительно недорогие приборы, были пригодны для использования в небольших лабораториях, где не требуется проводить массовых анализов. Многоканальные фотометры защищены авторскими свидетельствами на изобретение [3].

Наиболее высокочувствительными методами анализа веществ в биофизике, биохимии и медицине (при определении токсинов, вирусов, бактерий и т.д.) являются люминесцентные методы. Для изучения фотолюминесцентных и хемилюминесцентных реакций был разработан и испытан люминесцентный детектор с оригинальной зеркальной оптикой, позволяющей с высокой эффективностью регистрировать слабые световые потоки люминесценции в ячейках микротитрационного планшета или стрипа [4]. Устройство дозирования позволяло добавлять реагенты в ячейку при измерении пробы, что делало возможным изучение кинетики взаимодействий. Детектор позволял осуществлять измерения хемилюминесценции и флуоресценции в спектральной области (400-700 нм) при выборе возбуждения в интервале длин волн от 280 до 500 нм (с помощью интерференционных фильтров). Измерение люминесценции можно было проводить как в аналоговом режиме, так и в режиме счета фотонов.

Необходимость регистрации результатов специфических взаимодействий, проведенных с использованием метода иммуносорбции биологических агентов на пористых мембранах, потребовала создания макета спектрофотометра отраженного света. Спектрофотометр позволял регистрировать отражательную способность объектов и материалов, имеющих плоскую поверхность, в спектральной области 400-800 нм со спектральным разрешением 10 нм при пятне зондирующего излучения размером около 4 мм. Регистрация результатов анализа методом иммуносорбции показала высокую чувствительность при определении вирусов картофеля (на порядок выше, чем классический ИФА в планшетах), но при этом наблюдался высокий уровень фона, обусловленный неспецифической сорбцией.

1.2. Электрохимические и амперометрические детекторы

Началом работ по созданию теоретических основ проектирования амперометрических детекторов явилась разработка макета амперометрической ячейки с мембранными электродами, позволяющей реализовать прямые измерения взаимодействия антиген-антитело [5]. На основе такой ячейки можно создать достаточно дешевый и удобный для автоматизации детектор, позволяющий достигнуть высокой производительности при анализе. Однако, существенными недостатками такого анализа является худшая чувствительность, чем при анализе с колориметрической меткой, а также подверженность ячейки к быстрому загрязнению [6, 7]. Повышение чувствительности, специфичности и экспрессности анализа может быть достигнуто за счет сопряжения электрохимических реакций с высокоспецифичными биореакциями типа: фермент-субстрат или антиген-антитело [8]. Таким образом, дальнейшее развитие работ по регистрации иммунных взаимодействий связано с разработкой, модернизацией и исследованиями проточного электрохимического анализатора для ИФА, созданного совместно с Самаркандским медицинским институтом [9, 10]. В анализаторе использовался проточный амперометрический датчик с индикаторным платиновым электродом. Иммунологическая реакция и реакция пероксидазного окисления йодид-ионов проводилась в лунках планшета для иммунологических исследований, а затем полученная проба с помощью перистальтического насоса закачивалась в ячейку датчика. На поверхности платинового электрода проходило электровосстановление йода — продукта ферментативной реакции — вызывающее изменение электрического сигнала на электроде. Электрохимический анализатор позволял определять содержание различных биологически активных соединений в жидких средах (сыворотке крови, моче, культуральной жидкости, слюне и др.). Высокая экспрессность определения (до 360 проб/час) делала перспективным использование анализатора для клинической медицины, биотехнологии, сельского хозяйства, экологических исследований. В процессе исследований была разработана и изучена модель детектирования результатов ИФА проточным коаксиальным электрохимическим детектором, а также предложены некоторые критерии и проведена оптимизация детектора по этим критериям [11].

Теоретические исследования процессов конвективного массопереноса в жидкости в коаксиальных капиллярах малых размеров проточных коаксиальных электрохимических детекторов были продолжены в работе [12]. Была разработана методика оценивания величины диффузионного потока, учитывающая влияние входного участка,

диффузионного слоя, физических свойств жидкости-носителя (вязкость, коэффициент диффузии) и позволяющая осуществлять оптимизацию геометрии или/и режима измерения (быстродействие, величина отклика, степень использования анализируемого вещества, чувствительность отклика к пульсациям скорости транспортировки вещества и т.д.) проточных аналитических микросистем с чувствительными элементами коаксиальной конструкции. На примере одного из приложений — оценивания величины установившегося предельного тока коаксиального амперометрического детектора — подтверждена лучшая, по сравнению с ранее используемыми методиками, сходимість расчетных оценок к экспериментальным данным.

Физико-химические исследования процесса массопереноса вещества в малагабаритных конструкциях кольцевого сечения позволили оценить диффузионный поток при пузелейном конвективном движении и при неограниченном объеме анализируемого вещества, а также сформулировать и предложить новые правила для оптимизации конструкции и гидродинамического режима проточных аналитических систем по критерию максимумов отклика [13].

1.3. Разработка и внедрение методик иммунного анализа

В ходе разработки методических основ по созданию приборов твердофазного иммунного анализа были получены новые методики регистрации иммуноспецифических взаимодействий: на пористых мембранах, в U-образных ячейках 96-луночного планшета посредством гемагглютинации при вертикальном фотометрировании, а также адаптированы и внедрены в лабораторную практику некоторые прикладные методики иммуноферментного анализа. Исторически сложилось так, что научная работа в лаборатории неразрывно была связана с прикладными исследованиями, проводимыми совместно с другими организациями. Например, одновременно с созданием новых методик иммунного анализа успешно велась работа по практическому внедрению методик. Плодотворным явилось сотрудничество с Всесоюзным Институтом защиты растений (ВИЗР) по разработке и внедрению иммуноферментного метода анализа для диагностики вирусных заболеваний картофеля. На базе Научно-производственного объединения “Белогорка” осуществлялся контроль качества посадочного материала и выбраковка зараженных растений с целью оздоровления сортов картофеля и создания элитного семенного фонда сортов “Гатчинский”, “Невский”, “Столовый-19” и др. В этих работах для массовой диагностики впервые был применен макет многоканального фотометра для ИФА, разработанный и изготов-

ленный в ИАНП РАН. Высокое быстродействие прибора позволяло эффективно реализовать огромное количество анализов (свыше 15 000) при определении наиболее распространенных вирусов картофеля (X, M, Y, S). При диагностике применялись новые правила интерпретации результатов измерений, позволяющие с высокой надежностью осуществлять распознавание здоровых и зараженных растений. Помимо этого, совместно с ВИЗР проводились исследования по изучению бактериальных заболеваний картофеля (“черная ножка”) методом иммунофлуоресцентной микроскопии. В результате этих исследований была разработана методика обнаружения бактерий *Ervinia phytophthora* в клубнях картофеля. За работы по изучению бактериальных заболеваний картофеля Рудницкой Г.Е. была присуждена серебряная медаль ВДНХ [14].

Также, в рамках работ по определению вирусных заболеваний картофеля проводилось изучение возможности диагностики вирусных заболеваний иммунофилтративным методом. К сожалению, это перспективное направление в дальнейшем так и не было развито в ИАНП РАН.

1.4. Математическое моделирование сигналов. Разработка правил и алгоритмов обработки результатов измерений

На первых стадиях проводились исследования моделей иммуноспецифических взаимодействий и изучались модели сигналов детекторов. Была выбрана и изучена общая модель сигнала — случайный кусочно-детерминированный процесс. Разработаны методы оценивания параметров сигнала с помощью сигнатурного рекурсивного оценщика. Предложены модели распределений сигналов, описываемые функциями плотностей вероятностей класса Джонсона [15, 16]. Разработан адаптивный подход при вынесении решения о положительных или отрицательных результатах реакций, который был реализован в алгоритме обучения по контрольным выборкам и способах классификации результатов иммунного анализа [17].

2. РАЗВИТИЕ МЕТОДОВ ХИМИЧЕСКОГО АНАЛИЗА СРЕД

В последние годы приоритетным направлением научной деятельности лаборатории явилось создание новых методов и аппаратуры для химического экспресс-анализа сред. Наиболее перспективными оказались комбинированные и гибридные методы обнаружения и оценки концентрации веществ.

2.1. Биосенсоры и хемосенсоры

Результатом исследовательской работы “Научные основы перфузионно-экстракционных мем-

бренных процессов. Комбинированные и гибридные методы индикации веществ, основанные на их использовании" явилось создание методов получения пластифицированных селективных мембран, экстрагирующих ионы некоторых металлов из растворов. При извлечении ионов металлов из растворов в мембране образовывались светопоглощающие комплексы, количественная оценка которых осуществлялась спектрофотометрическими методами. Построение градуировочных зависимостей для выбранного типа мембраны давало возможность получить оценку концентрации ионов металла в исследуемом растворе. Были получены и отработаны технологии приготовления мембран, чувствительных к ионам меди, железа и некоторых других металлов, что явилось отправной точкой развития приборов нового класса.

Продолжением и крупной практической реализацией этих исследований явилась работа по контракту с немецкой фирмой SCHERING (Chemosensoren fuer die Bestimmung der Konzentration bestimmter Metalle- zum Beispiel von Kupfer in Loesungen- oder von freien Gadoliniumionen in Loesungen von Gadoliniumkomplexen). В ходе работ был создан универсальный комплект средств для экспрессного определения концентрации ионов металлов в жидких средах с использованием хемосенсоров однократного применения. Для контроля гальванических ванн электрохимического производства фирмы были разработаны хемосенсоры, позволяющие определять содержание ионов меди в широком диапазоне концентраций, а для контроля промышленной линии фармакологического производства были разработаны хемосенсоры, чувствительные к ионам гадолиния [18]. Оба типа хемосенсоров были успешно испытаны в производственных условиях и переданы заказчику. Весь коллектив лаборатории был задействован в огромном и разнообразном объеме исследований, что и позволило получить достаточно конкретные и практически значимые результаты. Одними из важнейших проблем при исследовании явились: изучение условий хранения и сроков сохранности хемосенсоров, а также выявление возможности получения хемосенсоров с заданными свойствами. В работе впервые был использован комплексный подход к созданию принципов построения и расчета гибридных детекторов химического экспресс-анализа, который в дальнейшем был уточнен и сформулирован в диссертационных работах [19, 20].

В рамках последующей работы "Биосенсоры и хемосенсоры" проведен исчерпывающий анализ литературных данных по современному состоянию и перспективам развития аналитических систем на основе ферментных и химических сенсоров, получены новые хемосенсоры для определения рН в микрообъемах жидких проб, созданы но-

вые многоканальные фотометры отраженного света для исследований био- и хемосенсоров, разработаны и изготовлены спектрофотометрический анализатор SEN и портативный микрофотометр mSEN. При разработке хемосенсоров для определения рН в микрообъемах проб и на поверхности неметаллических материалов были изучены пластифицированные мембраны разного состава, выбран состав, позволяющий получить заданную точность определения в рабочем диапазоне значений рН, и разработаны технологии приготовления хемосенсоров на основе индикаторных мембран для инструментального и визуального определения рН. Такие сенсоры могут быть использованы в химических лабораториях, биохимических и медицинских исследованиях, экологии, при контроле природных и сточных вод, контроле воздуха помещений, где используются летучие кислоты и органические вещества и т.д. Показана применимость полученных хемосенсоров для определения рН влажных поверхностей неметаллических материалов (дерево, камень). Проведены исследования ферментных методов на основе нового препарата эстераза-1 при определении фосфорорганических соединений и показана принципиальная возможность создания биосенсоров для обнаружения фосфор и хлорорганических соединений в водных пробах.

Новейшие требования к микроаналитическим системам нашли отражение в постановке основных задач исследовательской работы "Новые принципы построения хемосенсоров: хемосенсоры для определения следовых количеств веществ и мультихемосенсоры". В рамках этой работы были сформулированы принципы "построения" и отработана методика получения индикаторных мембран, используемых в качестве чувствительного элемента оптического рН-сенсора; разработан и опробован экспресс-метод определения рН в микрообъемах буферных и слабобуферных растворов с помощью отражательной фотометрии, обладающий преимуществами перед традиционным потенциометрическим методом: нечувствительностью к электромагнитным помехам и статическому электричеству; отсутствием электрода сравнения; миниатюрностью прибора. Изучено влияние состава мембранной композиции, условий хранения и эксплуатации на метрологические характеристики индикаторных мембран, выработаны требования к упаковке мембран. При выборе состава мембранной фазы руководствовались важным "принципом инертности": влияние компонентов на величину рН анализируемой пробы должно быть минимально. Показана принципиальная возможность определения величины рН в микрообъемах буферных растворов в области от 2,0 до 8,0 ед. рН. Рассмотрены и изучены основные погрешности, возникающие при использовании оп-

тического рН-сенсора. Полученные сенсоры могут быть использованы в химических лабораториях, при биохимических, медицинских и экологических исследованиях, при контроле природных сточных вод и т.д.

Помимо этого, рассмотрены варианты получения, методы исследования и применение тонких пленок, в том числе, и Ленгмюр-Блоджетта на основе специфического взаимодействия между стрептавидином и липидами, содержащими субстрат — биотин.

В процессе исследований было проведено моделирование и изучено влияние характеристик подложки, объема и показателя преломления жидкой пробы на оценку отражательной способности системы капля-мембрана. Были выработаны рекомендации для выбора наилучшего (с точки зрения фотометрирования в отраженном свете) объема пробы. Показано, что изменение отражательной способности системы капля-мембрана вследствие изменения толщины мембраны (при наличии эффекта “набухания”) и появление прозрачного тонкого (до 10% от толщины мембраны) слоя с отличным от мембраны и капли показателем преломления, имеют одинаковый порядок величин.

2.1. Оптические приборы для исследования поверхности

Для изучения спектрофотометрических свойств чувствительных элементов были созданы установки, позволяющие измерять отражательные свойства поверхностей и тонких пленок различных материалов. К универсальной системе для изучения оптических свойств широкого класса разных объектов следует отнести спектрофотометрическое устройство, созданное на базе многоканального оптического спектрометра разработанного в ГОИ им. С.И. Вавилова, позволяющее измерять отражательные свойства материалов при разных условиях освещения и регистрации светового потока.

Для исследования селективных пластифицированных мембран были разработаны и изготовлены макеты спектрофотометров отраженного света,

в значительной степени ускорившие процесс изучения экстракционных свойств мембран и отработку технологий их приготовления. Экспериментальное и теоретическое изучение тонкослойных мембран, имеющих ограниченные и соизмеримые размеры, показало, что при их фотометрировании в отраженном свете удастся достигнуть чувствительности измерений в несколько раз превышающей чувствительность при измерении в проходящем свете [21, 22, 23, 24]. Все это позволило впоследствии создать специальные оптические детекторы для хемосенсорных микросистем,

наилучшим образом подходящие для регистрации изменения оптической плотности полимерных мембран.

2.2. Оптические детекторы для хемосенсорных микросистем

Для новых методов химического анализа с использованием селективных пластифицированных мембран были созданы макеты, а затем опытные образцы специализированных фотометров отраженного света, позволяющих с высокой чувствительностью регистрировать результаты концентрирования веществ на полимерных мембранах. Первый подобный образец фотометра был разработан для фирмы SCHERING AG. Оригинальное использование в конструкции прибора волоконно-оптических световодов позволяло получить устройство с вращающейся оптической головкой, обеспечивающее фотометрические измерения в вертикальной и горизонтальной плоскостях, а также при повороте на 180° .

Для отработки методик экспресс-анализа с использованием пластифицированных мембран и технологий их получения были созданы многоканальные спектрофотометры отраженного света на основе фотодиодных линеек. Спектрофотометры предназначались для проведения измерений тонкослойных оптически прозрачных материалов на отражающей подложке или отражающих непрозрачных материалов. в видимом спектральном диапазоне от 400 до 700 нм со спектральным разрешением 18 и 9 нм. Фотометры позволяли изучить и сравнить оптические свойства мембран, исследовать изменение отражательной способности после взаимодействия с пробой, отработать критерии оценки качества мембран, оценить точность метода.

Настольным прибором для химических лабораторий, на котором можно было реализовать отработанные методики, явился макет спектрофотометрического анализатора SEN. Макет обладал некоторыми универсальными возможностями: позволял производить измерения в широком спектральном диапазоне, имел несколько встроенных программ, что было избыточно для прибора, предназначенного для рутинных измерений. К тому же, стоимость прибора была достаточно высока из-за наличия монохроматора и сложных механических и электронных узлов. В связи с вышеизложенным, был разработан малогабаритный, простой и дешевый фотометр с повышенной надежностью для полевых и лабораторных условий эксплуатации. Использование фотометра и хемосенсоров на основе пластифицированных мембран позволило создать хемосенсорный микроанализатор “mSEN” [25].

В 1995 г. была выпущена техническая документация и изготовлен на АОЗТ "Техномарин" опытный образец хемосенсорного микроанализатора "mSEN". Компактный прибор, имеющий автономное питание, предназначен для экспрессного определения концентраций ионов металлов (Cu, Fe, Gd) в жидких средах, измерения pH в микрообъемах проб и на поверхности неметаллических материалов. Анализатор отличается предельной простотой при эксплуатации и выполнен с применением современных комплектующих изделий. Для анализатора на основе новых оригинальных технологий созданы химически чувствительные элементы — хемосенсоры. Анализатор имеет существенные преимущества по сравнению с традиционными методами анализа и приборами: низкую трудоемкость при подготовке пробы; малые затраты на обслуживание; высокую экспрессность определения (10-180 с, в зависимости от определяемого компонента); сравнительно малую стоимость анализа и хемосенсорного анализатора; возможность проведения измерений pH в микрообъемах проб и на поверхности неметаллических объектов; возможность проведения анализа в полевых условиях [26].

2.3. Оценка информативных параметров сигналов

Получили дальнейшее развитие теоретические исследования проблем оценивания отклика био- и хемосенсоров: проведено уточнение параметров моделей процессов детерминированного вида с помощью разных методов, оценивание линейности функциональной зависимости с использованием различных критериев, выработаны рекомендации для процедуры построения градуировочной зависимости и уточнения измерения паразитного рассеяния "холостого" сенсора, а также процедуры оценивания качества сенсоров [27-29].

Продолжением работ по математическому моделированию сигналов и обработке результатов измерений стало создание и внедрение в приборы химического экспресс-анализа рекурсивного робастного алгоритма оценивания величины сигнала постоянного уровня. Полученный алгоритм позволяет определять доверительный интервал оценки. В ходе работ были изучены свойства оценок информативных параметров разностных сигналов в алгоритмах с различными зонами нечувствительности, при наличии в измерительной схеме цифровых элементов [30].

Дальнейшее развитие получили вопросы методики обработки экспериментальных данных: изложены правила оценивания необходимого числа точек наблюдения при построении линейных регрессионных моделей и расчета необходимого числа точек наблюдения в случае с дублированием и

без дублирования, исследованы некоторые стратегии измерения, исследована роль точек разбалансировки при решении задачи оценивания параметров регрессионной модели. Проведено подробное изучение рекуррентного точечного оценщика и осуществлен анализ сходимости оценок с помощью частотных критериев устойчивости и стохастическим методом [31, 32].

3. ИЗУЧЕНИЕ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ МИКРООРГАНИЗМОВ С ВНЕШНЕЙ СРЕДОЙ

Совместно с Институтом физиологии С.-Пб. ГУ на приборах, разработанных в лаборатории, проводились исследования по изучению взаимодействия микроорганизмов с внешней средой. Все эти работы представляют законченные независимые исследования.

3.1. Разработка и изучение методов оценивания биоповреждений

При участии сотрудников Государственного Эрмитажа были проведены исследования возможности оценивания эффективности известных и вновь синтезируемых биоцидов при защите музейных экспонатов от отдельных видов микроорганизмов. Экспериментальные исследования проводились путем культивирования микроорганизмов в ячейках микротитрационного планшета с последующим воздействием внешних факторов. Регистрация роста биомассы осуществлялась с помощью фотометра "Линкей". Такой метод фотометрирования микрокультур имеет ряд преимуществ при изучении кинетики роста: малые объемы проб, возможность получения многократных неразрушающих оценок биомассы в течение цикла культивирования, высокая производительность и чувствительность измерений. Полученные зависимости изменения биомассы описывались на основе модифицированной формы уравнения логистического роста Ферхюльста-Пирла. Проведенные исследования позволили разработать методики определения пороговых концентраций биоцидов для музеев и хранилищ [33, 34].

С 1993 г. совместно с Институтом физиологии С.-Пб. ГУ и Ольденбургским университетом (Германия) в лаборатории проводятся работы по изучению биоповреждений и загрязнения мрамора неразрушающими спектрофотометрическими методами. Для образцов мрамора из различных месторождений России, Крыма, Италии и Греции были получены пространственные спектральные зависимости отражательной способности, которые могут использоваться в качестве дополнительных характеристик при идентификации мрамора. Исследовалось изменение отражательной способности мрамора при биоповреждении микрофлорой. Было установлено, что отражательная способность

образцов существенно меняется через 1-1,5 месяца после инфицирования меланин-содержащими микромицетами, что может быть применено для неразрушающей диагностики биоповреждений мрамора на ранних стадиях развития [35]. Работы проводились при поддержке фонда INTAS (грант INTAS 93-1659). Материалы этих исследований были представлены на нескольких международных симпозиумах и вызвали интерес специалистов по археологии, микробиологии, сохранению и консервации памятников искусства [36, 37].

3.2. Исследования взаимодействия микромицетов с фуллеренами

Совместно с Институтом физиологии С-Пб. ГУ, проводились экспериментальные исследования взаимодействия *in vivo* фуллеренов C_{60} с микромицетами. Было обнаружено, что фуллерены не обладают токсичностью для грибов и являются труднодоступным источником углерода для гетеротрофов. Впервые было установлено, что под воздействием живых клеток происходит биотрансформация фуллеренов [38]. Была предпринята попытка более тонкого изучения механизма взаимодействия фуллеренов с микромицетами путем использования флуоресцентных меток. Однако, полученные результаты не позволяли сделать каких-либо однозначных выводов. Работа выполнялась в рамках программы ГНТП «Физика конденсированных сред», раздел «Фуллерены и атомные кластеры», проект 96137.

3.3. Изучение влияния среды на рост несовершенных мицелиальных грибов

На основе анализа известных типов роста колоний и особенностей физиологии несовершенных мицелиальных грибов, а также результатов собственных экспериментов по выявлению особенностей формирования волновых популяционных структур у ряда представителей *Deuteromycetes* предложен наиболее общий механизм пространственно-временного упорядочения в колониях. В его основе лежат конкурирующие процессы потребления субстрата и ингибирования роста грибов продуктами вторичного метаболизма, например, антибиотиками, органическими кислотами и др. Предложенная математическая модель, реализующая механизм пространственно-временного упорядочения, позволяет адекватно описывать становление в колониях грибов таких типов пространственных картин как волновые (зональные) структуры и сплошной газон. При этом, расчеты концентраций мицелия (спор), субстрата и продуктов вторичного метаболизма осуществляются стандартными конечно-разностными методами прямой и обратной прогонки [39].

4. ОПТИЧЕСКИЕ СЕНСОРЫ ДЛЯ КОНТРОЛЯ СОДЕРЖАНИЯ КИСЛОРОДА

С 1996 г. совместно с Институтом точной механики и оптики (Техническим университетом) проводились исследования по изучению и созданию кислородо-чувствительных элементов на твердотельных матрицах. В матрицы вводился краситель, содержащий флуоресцирующие комплексы Ru^{+2} . Присутствие кислорода вызывало тушение люминесценции этих комплексов, что и позволяло определять концентрацию кислорода по характеристикам тушения [40]. Проводились исследования разных матриц (из прессованного кварцевого порошка, травленного боросиликатного стекла, некоторых типов бумаг), а также различных флуоресцирующих комплексов Ru^{+2} , изучались градуировочные зависимости и стабильность характеристик чувствительных элементов во времени. На основе полученных элементов был создан макет компактного оптического сенсора для контроля содержания кислорода в закрытых помещениях.

5. ОПТИЧЕСКИЕ ПРИБОРЫ ДЛЯ МЕДИЦИНЫ

Важной задачей практической медицины является разработка и создание средств неинвазивной диагностики заболеваний и контроля состояния пациента. В лаборатории был создан прибор для измерения пульса и определения кислородного насыщения артериальной крови. Прибор построен по оригинальной схеме, в которой применены полимерные волоконно-оптические элементы, мощные узкополосные светодиоды, сигнальный процессор, использованы современные схемотехнические решения и помехоустойчивые процедуры обработки сигналов [41]. Всесторонне изучалась возможность создания недорогой аппаратуры для неинвазивного измерения концентрации глюкозы в крови. Большинство зарубежных фирм регулярно финансирует проведение подобных исследований, в ходе которых проводится тщательный анализ существующих технологий и элементной базы, обеспечивающих потенциальную возможность создания таких приборов. Проведенный широкий анализ патентной литературы и опубликованных работ, а также макетирование отдельных узлов прибора, позволили сделать вывод о том, что на современном уровне развития технологий и элементной базы невозможно создать достаточно дешевую аппаратуру для массового применения, обеспечивающую приемлемую точность и надежность неинвазивных измерений.

6. УЧЕБНО-МЕТОДИЧЕСКАЯ РАБОТА

За время существования лаборатории ее сотрудники принимали участие в подготовке молодых специалистов в областях: научного приборостроения, приоритетных направлений фундаментальных исследований, создания критических технологий федерального уровня — руководили дипломными проектами студентов старших курсов ИТМО и С-Пб. ГУАП, читали лекции и проводили семинары в рамках программ Учебно-научного центра «Приборы и средства автоматизации для научных исследований». Специалисты лаборатории подготовили 8 дипломников. В лаборатории активно ведется научное руководство работой аспирантов. В.Е. Курочкин подготовил трех аспирантов — все успешно защитили диссертации. В настоящее время осуществляется подготовка еще двух аспирантов.

Сотрудниками и аспирантами лаборатории разработаны методические пособия для Учебно-научного центра [42-45].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Авторы считают приятной обязанностью отдать должное бывшим сотрудникам лаборатории, которые стояли у ее истоков и участвовали в становлении основных тематик и направлений исследований (Л.С. Рейфман, П.П. Нефедов, В.Н. Чечевичкин, В.Б. Теровский, Г.Н. Мальцева, Т.Н. Полякова), сотрудникам, которые развивали эти новые направления (К.Л. Матисен, А.Л. Сизов, В.В. Сырников, Г.А. Парамонов, Л.Б. Пасов, Л.Б. Юсупова, Л.В. Заслонкина, А.С. Шестакова, Т.В. Калмыкова) и тем немногим, но самоотверженным людям, которые в настоящее время поддерживают высокий уровень работ, ведущихся в лаборатории (А.Л. Буляница, Д.А. Бурьлов, А.О. Петряков, Т.А. Сальникова, Г.Е. Рудницкая, С.Ю. Лаврова, Д.О. Муравьев). Без Н.И. Лапшиной невозможно представить тот список патентов и авторских свидетельств, которые были заявлены в лаборатории. (Некоторых из названных можно видеть на рис. 1: коллектив лаборатории на одном из этапов своей деятельности)



Рис. 1. Коллектив Лаборатории информационно-измерительных био- и хемосенсорных микросистем. (Во втором ряду третий справа — зав.лаборатории В.Е. Курочкин)

Следует упомянуть сотрудников ИАП РАН (А.И. Стрельников, Г.М. Кроик) и отдела НПО "Красногвардеец" (впоследствии НПК АС и ИФА) (В.И. Росселевич, А.П. Терентьева, Е.Н. Выборных), которые в тяжелых условиях помогали внедрять многоканальный фотометр "Линкей" в серийное производство. Огромной признательности авторов заслуживает милейший Л.П. Козлов (Всесоюзный Институт защиты растений — ВИЗР), без энергии которого немыслимой была бы работа по массовой диагностике вирусных заболеваний картофеля. Авторы искренне благодарят своих коллег из Самаркандского медицинского института (Д.М. Ивницкий, Р.А. Ситдыков, М.Ф. Юлаев), которые делали все возможное и невозможное для успешного развития электрохимических анализаторов. Особую благодарность авторы выражают сотрудникам С-Пб. ГУ Л.К. Паниной и И.В. Погребниковой, а также профессору Ольденбургского университета В. Крумбайну, при участии которых ведутся интереснейшие совместные исследования.

ОСНОВНЫЕ ПУБЛИКАЦИИ

1. Теровский В.Б., Курочкин В.Е. // Научное приборостроение. 1995. Т. 5, № 1-2. С.3-12.
2. Курочкин В.Е., Макарова Е.Д. // Научное приборостроение. 1995. Т. 5, № 1-2. С.13-24.
3. Александров М.Л., Евстапов А.А., Курочкин В.Е., Рейфман Л.С. и др. А.с. 18005353. АЗ. (СССР). // Б.И. № 12. 30.03.1993.
4. Евстапов А.А., Сизов А.Л., Матисен К.Л. и др. А.с. 427252 А1 (СССР). // Б.И. № 36. 30.09.1988.
5. Теровский В.Б. // Журн. аналит. химии. 1989. Т. 44, № 8. С.1447.
6. Теровский В.Б. // Журн. аналит. химии. 1990. Т. 45, № 9. С.1815.
7. Теровский В.Б., Раевский К.К., Курочкин В.Е. // Журн. аналит. химии. 1993. Т. 48, № 4. С.670-677.
8. Ситдыков Р.А., Курочкин В.Е., Ивницкий Д.М., Рейфман Л.С. // Научное приборостроение. 1990. С.93-99.
9. Ивницкий Д.М., Ситдыков Р.А., Курочкин В.Е., Рейфман Л.С. // Журн. аналит. химии. 1991. Т. 46, № 6. С.1239-1244.
10. Sitdikov R.A., Ivnitky D.M., Kurochkin V.E. // Anal. Chem. Act. 1992. V. 261. P.45-52.
11. Курочкин В.Е., Стефанович Л.А., Ивницкий Д.М., Ситдыков Р.А. // Научное приборостроение. 1991. Т. 1, № 1. С.86-95.
12. Буляница А.Л., Макарова Е.Д., Курочкин В.Е. // Научное приборостроение. 1997. Т. 7, № 1-2. С.28-39.
13. Буляница А.Л. Массоперенос в коаксиальных элементах проточных аналитических микро- систем. Дисс. канд. ф.-м. наук. С.-Пб. 1997. 183 с.
14. Рудницкая Г.Е., Козлов Л.П., Лазарев А.М. // Тезисы докладов 4-й Всесоюзной конференции по мембранным методам разделения смесей. М. НИИТЭХИМ. 1987. С.91-93.
15. Курочкин В.Е., Фельдман Б.Х. // Научное приборостроение. Автоматизация научных исследований. 1988. С.63-68.
16. Курочкин В.Е., Фельдман Б.Х. // Научное приборостроение. Автоматизация научных исследований. 1988. С.68-73.
17. Курочкин В.Е., Рахманкулов Р.В., Тер-Миносян Г.С. // Медицинская лабораторная техника. М. ВНИИМП. 1986. С.33-39.
18. Makarova E.D., Kurochkin V.E., Evstrapov A.A. und anderen. Chemosensoren fuer die Bestimmung der Konzentration bestimmter Metalle- zum Beispiel von Kupfer in Loesungen- oder von freien Gadoliniumionen in Loesungen von Gadoliniumkomplexen. Forschung-sbericht auf dem Gebiet Teil 1,2. St.Petersburg. 1993. (Отчет для фирмы "SCHERING").
19. Евстапов А.А. Фотометрические детекторы иммунного и химического экспресс-анализа. Дисс. канд. техн. наук. С.-Пб.. 1994. 217 с.
20. Курочкин В.Е. Приборы иммунного и химического экспресс-анализа на основе гибридных методов. Дисс. докт. техн. наук. С.-Пб. 1994. 336 с.
21. Евстапов А.А., Макарова Е.Д., Курочкин В.Е. // Научное приборостроение. 1991. № 4. С.22-36.
22. Евстапов А.А., Курочкин В.Е. // Оптический журнал. 1995. Т.62, № 5. С.50-53.
23. Evstrapov A.A., Kurochkin V.E. // J. Opt. Technology. 1995. V. 62, № 5.
24. Makarova E.D., Kurochkin V.E. // Analytical Communication. 1996, March. V. 33. P.115-116.
25. Евстапов А.А., Макарова Е.Д., Курочкин В.Е. Решение Федерального института промышленной собственности о выдаче патента на изобретение N 96110379/25 (015902) от 21.05.96.
26. Бурьлов Д.А., Евстапов А.А., Макарова Е.Д., Курочкин В.Е., Рудницкая Г.Е., Шестакова А.С. // Журн. Аналит. химии. 1997. Т. 52, № 5. С.552-556.
27. Буляница А.Л. // Научное приборостроение. 1993. Т. 3, № 2. С.68-78.
28. Буляница А.Л. // Научное приборостроение. 1995. Т. 5, № 1-2. С.38-46.
29. Буляница А.Л. // Научное приборостроение, 1996. Т. 6, № 1-2. С.54-58.
30. Буляница А.Л., Бурьлов Д.А. // Научное приборостроение. 1998. Т. 8, № 1-2, С.30-34.
31. Буляница А.Л., Бурьлов Д.А. // Научное приборостроение. 1998. Т. 8, № 1-2. С.25-29.

32. Бурьлов Д.А. Рекурсивный робастный оценщик информативных параметров сигналов в приборах химического экспресс-анализа. Дисс. канд. техн. наук. С.-Пб. 1999. 131 с.
33. Matonova V., Kurochkin V.E., Petrjakov A.O., Panina L.K. // Int. Biodeter.& Biodegrad. 1992. V.30. P.303-312.
34. Курочкин В.Е., Парамонов Г.А., Петряков А.О., Панина Л.К. // Научное приборостроение. 1992. Т. 2, № 2. С.85-94
35. Евстапов А.А., Панина Л.К., Курочкин В.Е. // Оптический журнал. 1998. Т. 65, № 5. С.29-33.
36. Evstrapov A., Kurochkin V., Panina L. // Proceeding 4th Intern. Symposium on the Conservation of Monuments in the Miditergranen. 1997. Rodos, GREECE. V.2. P.267-281.
37. Евстапов А.А., Панина Л.К., Курочкин В.Е. // Международная конференция по применению методов естественных наук в археологии. Тез. докл. СПб.ГУ. 1994.
38. Панина Л.К., Курочкин В.Е., Богомолова Е.В., Евстапов А.А., Спицына Н.Г. // Доклады Академии Наук. 1997. Т. 352, № 12. С.275-277.
39. Буляница А.Л., Богомолова Е.В., Быстрова Е.Ю., Курочкин В.Е., Панина Л.К. // Журн. общей биологии. 1999. (В печати).
40. Муравьев Д.О., Евстапов А.А., Курочкин В.Е. // Научное приборостроение. 1999. Т. 9., № 2. С.76-82.
41. Бурьлов Д.А., Евстапов А.А., Курочкин В.Е., Кузнецов П.Б. // Решение Федерального института промышленной собственности о выдаче патента на изобретение N 96121688/14 (028369) от 25.09.98.
42. Семенов А.А., Евстапов А.А., Курочкин В.Е. Рассеяние света в жидкостях. С.-Пб. УНЦ "Приборы и средства автоматизации для научных исследований". 1998. 15 с.
43. Муравьев Д.О., Курочкин В.Е. Физико-химические особенности построения фотOLUMИнесцентных газоанализаторов на основе активных твердотельных матриц. С.-Пб. УНЦ "Приборы и средства автоматизации для научных исследований". 1998. 8 с.
44. Курочкин В.Е., Котов В.П. Полупроводниковые адсорбционно-чувствительные датчики концентраций газов. С.-Пб. УНЦ "Приборы и средства автоматизации для научных исследований". 1998. 50 с.
45. Курочкин В.Е., Котов В.П. Основные положения электрохимии применительно к газовому анализу. С.-Пб. УНЦ "Приборы и средства автоматизации для научных исследований". 1997. 33 с.

SCOPE OF ACTIVITIES OF THE LABORATORY FOR BIO- AND CHEMOSENSOR BASED MEASUREMENT DATA MICROSYSTEMS

А.А. Evstrapov, V.E. Kurochkin
Institute for Analytical Instrumentation RAS, St.Petersburg

The investigation carried on at the Laboratory are aimed at creating the methodology of bio- and chemosensor based microsystem design, including the theory, instrumentation, measurement techniques, and experimental studies in the fields of fundamental and practical interest.