

## VYUŽITÍ UMĚLÝCH NEURONOVÝCH SÍTÍ PRO KLASIFIKACI SIGNÁLŮ BIOSENZORŮ

V. Dohnal, L. Podloucká, Z. Grosmanová, J. Krejčí

**Došlo: 27. listopadu 2007**

### Abstract

DOHNAL, V., PODLOUCKÁ, L., GROSMANOVÁ, Z., KREJČÍ, J.: *Use of artificial neural networks in bio-sensor signal classification*. Acta univ. agric. et silvic. Mendel. Brun., 2008, LVI, No. 2, pp. 73–80

Biosensors are analytical devices that transform chemical information, ranging from the concentration of a specific sample component to total composition analysis, into an analytical signal and that utilizes a biochemical mechanism for the chemical recognition. The complexity of biosensor construction and generation of measured signal requires the development of new methods for signal evaluation and its possible defects recognition. A new method based on artificial neural networks (ANN) was developed for recognition of characteristic behavior of signals joined with malfunction of sensor. New algorithm uses unsupervised Kohonen self-organizing neural networks. The work with ANN has two phases – adaptation and prediction. During the adaptation step the classification model is built. Measured data form groups after projection into two-dimensional space based on their similarity. After identification of these groups and establishing the connection with signal disorders ANN can be used for evaluation of newly measured signals. This algorithm was successfully applied for 540 signal classification obtained from immobilized acetylcholinesterase biosensor measurement of organophosphate and carbamate pesticides in vegetables, fruits, spices, potatoes and soil samples. From six different signal defects were successfully classified four – low response after substrate addition, equilibration at high values, slow equilibration after substrate addition respectively low sensitivity on syntostigmine.

artificial neural networks, biosensors, pesticides

Biosenzor je analytický přístroj, který obsahuje citlivou část biologického původu, která je buď součástí fyzikálně-chemického převodníku, nebo je s ním v těsném kontaktu. Biosenzor poskytuje průběžný elektrický signál, jehož hodnota je přímo úměrná koncentraci jedné nebo více skupin chemických látek ve vzorku (RECHNITZ, 1991). Měřený elektrický signál vzniká při chemické reakci, velmi často pak mezi imobilizovaným enzymem a stanovovanou látkou. Díky vysoké substrátové specifitě některých enzymových reakcí může být dosaženo vysoké citlivosti a selektivity biosenzorů. Častými aplikacemi biosenzorů jsou detekce toxických látek v potravinách, jako jsou například organofosforové a karbamátové pesticidy (SKLÁDAL, 1992; EVTUGYN, 1996; BACHMANN, 2000).

V průběhu měření je zaznamenáván elektrický signál. Po přidávku vzorku může být koncentrace analytu vyhodnocována dvěma způsoby. První mož-

ností je sledování změny signálu v průběhu času (směrnice signálu, první derivace). Druhou používanou alternativou je záznam ustálené hodnoty signálu. Vzhledem k podstatě vlastního měření, jak po stránce technologické, tak i chemické, může signál nabývat různých časových průběhů. Signálová odezva každého biosenzoru se při měření stejného vzorku může nepatrně lišit, ale vždy vykazuje určité charakteristické vlastnosti. Této skutečnosti je možné využít k identifikaci a klasifikaci poruch vznikajících během měření. Průběh odezvy biosenzoru je velmi složitý, proto byla k jejímu vyhodnocení navržena a testována metodika umělých neuronových sítí (ANN).

ANN jsou systémy strukturním uspořádáním podobné lidskému mozku. Mohou být hardwarové či softwarové povahy. Obdobně jako jejich biologická předloha, i ANN se skládají z jednotlivých vzájemně propojených výpočetních jednotek zvaných

umělé neurony (AN). Variabilita ve vzájemném propojení AN a také ve výpočetní funkci každého z nich vede k prakticky neomezenému množství aplikací. Více detailních informací z teorie i praxe ANN lze nalézt například v knize (KVASNIČKA, 1997). Velmi často jsou ANN využívány pro vyhodnocování signálu jednotlivých biosenzorů či jejich polí (SEEMANN, 1997).

Jednou z aplikací, kde ANN významně konkurují i statistickým metodám, je klasifikace dat. Tu lze provést například tzv. samoorganizujícími se mapami (SOM). SOM byly vyvinuty v roce 1982 Teuvo Kohonenem (KOHONEN, 1995). Jejich princip spočívá v „projekci“  $n$ -rozměrného vektoru dat do méně dimensionálního prostoru, nejčastěji 1-3D na základě vnitřní struktury dat. Výsledkem aplikace je pak „mapa“, kde data strukturně blízká jsou promítnuta do stejné buňky a data odlišná do topologicky vzdálenějších buněk. Díky tomu je možné v „mapě“ najít oblasti, do kterých se promítají pouze data s konkrétní vlastností, což je základem klasifikačního uplatnění těchto ANN. Metoda poskytuje obdobné výsledky jako clusterová analýza či lineární diskriminační analýza (FRÍAS, 2002).

Cílem této práce bylo otestovat možnost využití ANN pro klasifikaci poruch signálu biosenzorů na bázi imobilizované acetylcholinestrázy (AChE) při detekci a stanovení organofosforových a karba-

mátových pesticidů ve vzorcích půdy, ovoce, zeleniny a bramborových hlíz.

## MATERIÁL A METODY

### PŘÍSTROJOVÉ VYBAVENÍ

K měření vzorků bylo využito přenosného polního mikroprůtokového analytického systému (BVT Technologies, a. s., Brno, Obr. 1), sestávajícího z biosenzoru, mikroprůtokové jednotky, bioanalyzátoru a notebooku.

Použité biosenzory s imobilizovanou acetylcholinesterázou byly vyráběny tlustovrstvou technologií. Sledované pesticidy vykazují inhibiční účinek AChE, a proto je možné je tímto biosenzorem stanovit. Mikroprůtoková jednotka (MPS), hlavní součást systému s mikrofluidním kapilárním uspořádáním, umožňuje přesný a stálý tok kapaliny na aktivní povrch elektrochemického senzoru. Toto uspořádání vede k vysoké míře opakovatelnosti měření. Bioanalyzátor (voltametrický převodník), doplněný programovým vybavením pro analýzu a vyhodnocení signálu biosenzoru, sloužil k propojení mikroprůtokové jednotky s počítačem.

K ovládání bioanalyzátoru, zaznamenávání a grafické analýze signálu byl použit přiložený software OFBio.



1: Přenosný polní mikroprůtokový systém

## CHEMIKÁLIE

Chlorid acetylthiocholinu (ATCh), syntostigmin, hydrogenfosforečnan sodný a dihydrogenfosforečnan draselný byly zakoupeny u firmy Sigma-Aldrich, s. r. o. (Praha, Česká republika).

## VZORKY

K měření byly použity vzorky ovoce (pomeranče, grepy, citrony, kiwi, hroznové víno), zeleniny (paprky, rajčata, lilek, pórek, zelí, petržel), koření (fenykl), půdy a bramborových hlíz (PODLOUCKÁ, 2005). Den před plánovanou analýzou byly zmrazené vzorky vytaženy z mrazicího boxu. V den měření došlo po rozmrazení k jejich homogenizaci a filtraci přes vatou.

## POSTUP MĚŘENÍ

Veškerá měření byla prováděna dle návodu výrobce biosenzoru. Do skleněné cely MPS bylo napičkováno 10 ml pufru (63 mM hydrogenfosforečnan sodný, 3,3 mM dihydrogenfosforečnan draselný, pH 8,3) a vložen biosenzor. Po připojení MPS ke zdroji napětí a zapnutí míchání bylo vyčkáno ustálení proudu v rozmezí  $\pm 0,5$  nA. Po ustálení proudu bylo přidáno 20  $\mu$ l 253 mM ATCh (substrát) a po ustálení signálu odečtena odezva. Následně byl přidán 1 ml měřeného vzorku do MPS a bylo sledováno ustalování odezvy. Nakonec bylo přidáno 10  $\mu$ l syntostigminu jako standardu pro inhibici AChE.

## APLIKACE UMĚLÝCH NEURONOVÝCH SÍTÍ

Ke zpracování naměřených dat byl použit programový balík PDP++ verze 3.1 (<http://www.cnbc.cmu.edu/Resources/PDP++/PDP++.html>). Tento software byl napsán podle knihy McClellanda a Rumelharta (McClelland, 1987).

## PŘÍPRAVA NAMĚŘENÝCH DAT

Pro vyhodnocování signálu biosenzoru pomocí ANN nejsou vhodná naměřená data ve své původní podobě z důvodu jejich velikosti a rozdílné časové závislosti. Prakticky neexistují dvě měření, při kterých by byl substrát, vzorek i syntostigmin přidán ve stejných časových intervalech. V průběhu měření byla totiž hodnota signálu odečítána s frekvencí 1 Hz a tato hodnota automaticky ukládána do počítače. Délka měření se proto v jednotlivých případech pohybovala v rozmezí 500–2500 sekund (500–2500 bodů). Pro aplikaci Kohonenových SOM bylo nutné počet vzorků sjednotit.

## VÝSLEDKY

Pro převzorkování signálu bylo nutné zvolit takovou metodu, aby po provedení této operace byly co nejlépe zachovány charakteristické vlastnosti naměřené proudové závislosti a zároveň došlo ke sjednocení vzorků odpovídajících jednotlivým přídávkům v průběhu měření. Každé měření tak bylo rozděleno do čtyř částí, a to na část před přídávkem ATCh,

část mezi přídávkem ATCh a přídávkem vzorku, mezi přídávkem vzorku a přídávkem syntostigminu a část po přídávku syntostigminu. Z Obr. 2 je zřejmé, že první, třetí a čtvrtá část jsou časově téměř stejné, zatímco druhá část je časově asi dvakrát delší než ostatní. Rovněž stojí za povšimnutí, že směrnice jednotlivých částí se příliš nemění.

Z těchto důvodů byl zvolen následující způsob vzorkování: z první, třetí a čtvrté části byly brány vždy čtyři vzorky, z druhé části pak vzorků osm. Vzorky v každé části byly brány ekvidistančně. Tak bylo dosaženo toho, že 4., 12. a 16. složka výsledného vektoru odpovídala vždy přídávku ATCh, vzorku, respektive syntostigminu (Obr. 3).

## CHARAKTERISTICKÉ CHOVÁNÍ BIOSENZORU

Během měření vzorků některé biosenzory vykazovaly určité charakteristické chování, které se lišilo od ideálního průběhu měření. Při ideálním průběhu měření se proud po začátku měření ustálí na relativně nízké hodnotě blízké nule. Doba ustalování po počátku měření se pohybovala kolem 5 minut. Po přídávku ATCh, spouštějícího enzymovou reakci, nastala téměř okamžitě proudová odezva s malým překmitem a bez výrazného šumu s ustálením do 10 minut. Po přídávku vzorku nastal mírný pokles proudu způsobený kromě vlastní inhibice AChE složkami vzorku také zředěním pufru vzorkem. Úroveň signálu ihned po přídávku poklesla kvůli zředění pufru vzorkem (10 : 1) a inhibici AChE. V některých případech došlo vlivem elektroaktivních látek k prudkému nárůstu proudu. Po přídávku syntostigminu nastal očekávaný prudký pokles proudu.

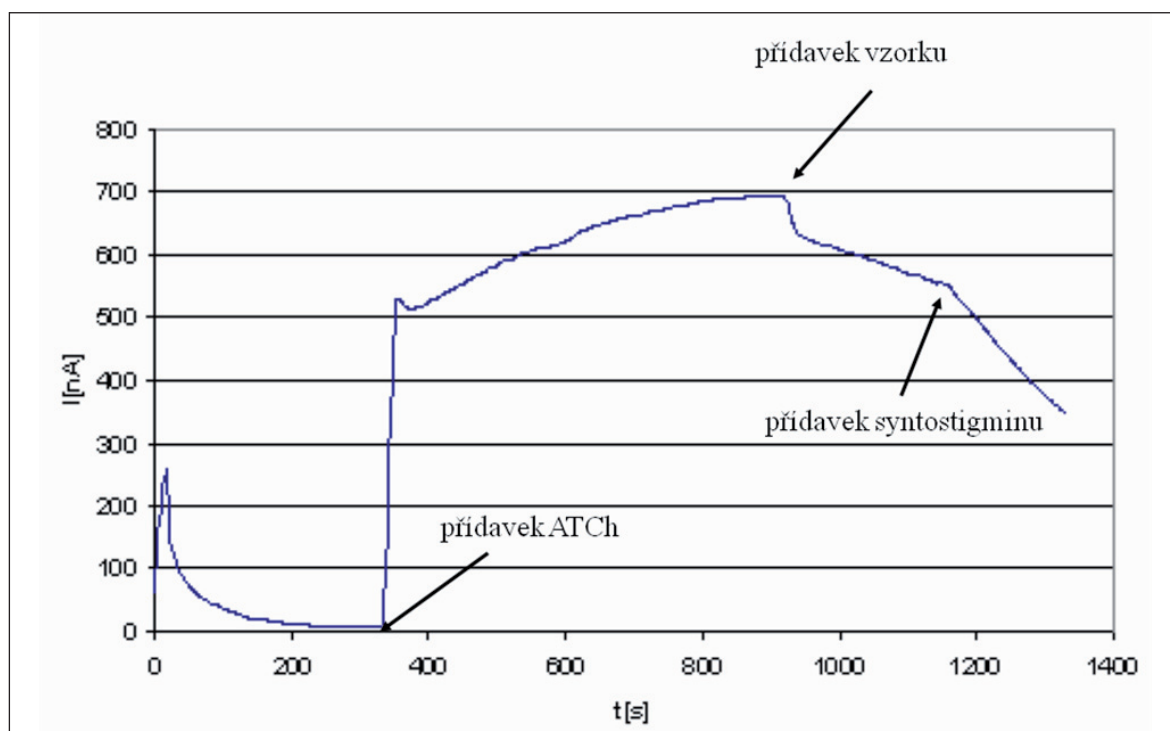
Každá inhibice se projevila snížením aktivity enzymu a tím i poklesem proudu. Rychlost poklesu signálu, pozorovaná po přídávku inhibitoru, je úměrná inhibičnímu účinku dané látky. Pro vyhodnocení koncentrace pak byla použita relativní inhibice (Rovnice 1). Typický průběh signálu během měření je uveden na Obr. 2.

$$RI = (dI/dt)/I_{SS} \quad (\text{Rovnice 1})$$

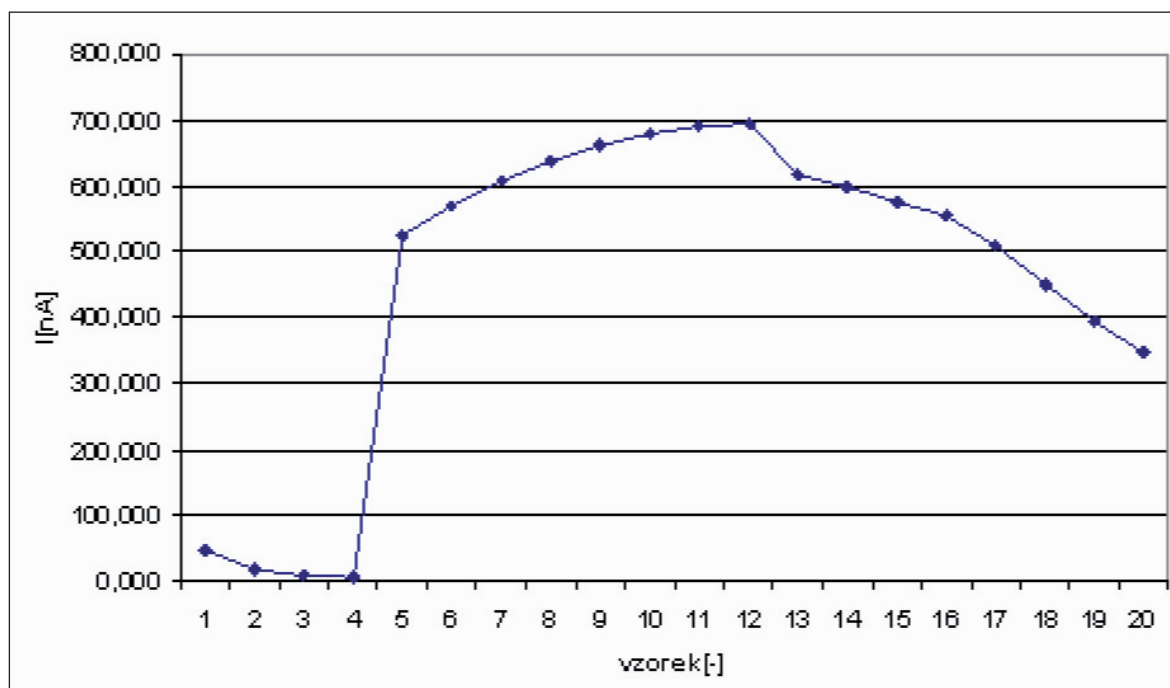
Symbol RI odpovídá relativní inhibici,  $dI/dt$  pokles proudu za jednotku času,  $I_{SS}$  proud po ustavení rovnováhy po přídávku substrátu.

Navzorkovaný průběh ideálního měření je na Obr. 3. Na horizontální ose jsou vynášeny jednotlivé vzorky a na vertikální ose jim odpovídající funkční hodnoty. Navzorkováním ideálního průběhu měření byla ztracena část informace o konkrétním měření. Ze srovnání Obr. 2 a 3 lze však konstatovat, že si navzorkovaná data ponechala charakteristické vlastnosti biosenzoru.

Odhylky od optimálního chování biosenzoru lze rozdělit do několika kategorií, a to na nestabilní odezvu po přídávku substrátu, vadnou membránu, nízkou odezvu po přídávku substrátu, malou citlivost na syntostigmin, ustalování ve vysokých hodnotách a pomalé ustalování po přídávku substrátu.



2: Grafický výstup měření



3: Navzorkovaný ideální průběh měření

Nestabilní odezva senzoru může být způsobena několika příčinami, jako je například změnou napájecího napětí motoru mikroprůtokového systému v průběhu měření. Další příčinou špatného fungování systému mohla být vadná membrána (špatně imobilizovaný enzym na pracovní elektrodě). Při měření docházelo pak k pohybu membrány a tím i k následnému vysokému šumu. Malá odezva po

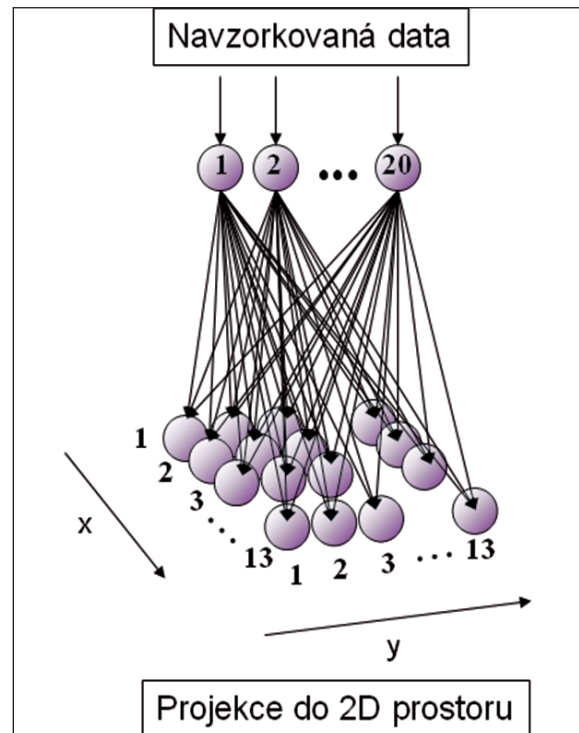
přidavku substrátu (méně jak 100 nA) vedla ke zvýšení nepřesnosti měření a nedává dostatečný prostor pro změření inhibice. Znamená též, že enzym má již zbytkovou aktivitu, a tudíž není vhodný k měření. Malou citlivostí na syntostigmin byla označována ta měření, kdy nedocházelo k předpokládanému prudkému poklesu proudu po přidavku inhibitoru. Při ustalování ve vysokých hodnotách po po-

čátku měření byl experiment zatížen velkou chybou (nízké hodnoty RI). Pomalé ustalování po přidavku substrátu se projevilo pomalu rostoucí hodnotou proudu namísto skokového zvýšení.

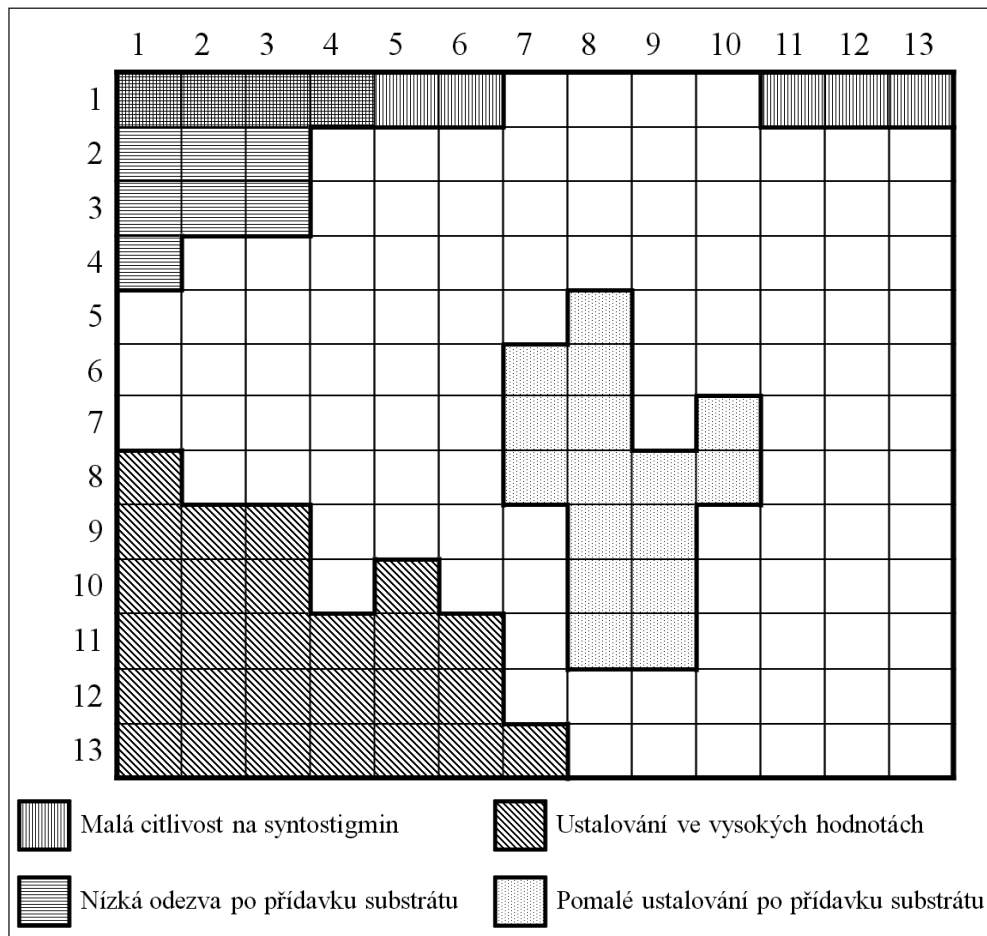
Pro každé měření byl pak získán vektor skládající se z celkem 27 složek, 20 popisujících průběh měření a sedmi, které logicky (0 nebo 1) popisovaly odchylky měření. Tento způsob zápisu byl zvolen proto, že některá měření kombinovala více odchylek.

**ANALÝZA DAT POMOCÍ ANN**

K analýze dat byly použity Kohonenovy samoorganizující se mapy. Tento typ ANN patří mezi „unsupervised“ (bez učitele) typy, kde jsou data pouze organizovány podle jejich vnitřní struktury. Výsledkem je potom projekce mnohorozměrných dat do dvou- či vícerozměrného prostoru. V našem případě se jednalo o projekci vektoru s 27 složkami do dvojrozměrného prostoru o rozměrech 13 × 13 buněk (neuronů, Obr. 4). Samoorganizace sítě spočívá v tom, že podobné případy jsou touto ANN zobrazeny ve stejné buňce nebo v jejím blízkém okolí. Výsledná projekce naměřených případů v SOM je na Obr. 5. Z náčrtu je tedy zřejmé, že ANN dokáže rozpoznat uvedené charakteristické vlastnosti.



4: Topologie Kohonenovy SOM



5: Projekce měřených případů v Kohonenově SOM

## DISKUSE

Celkový počet měření byl 540. Data byla naměřena v rámci dvou rozsáhlých experimentů, měření vzorků České zemědělské a potravinářské inspekce a maloparcelního polního pokusu (plodina brambory, postřiky Afalon, Methanion a Dithane), podporovaných MPO ČR, projekt ANTOPE FD-K2/53.

Z obrázku 5 vyplývá, že téměř všechna měření, u kterých se projevovala nízká odezva po přidavku substrátu, byla promítnuta do levého horního rohu Kohonenovy mapy. V buňce 1-1 leží ta data, která vykazují nejmenší odezvu a při postupu ke středu mapy tato odezva roste. Na hranici této oblasti se vyskytují i hraniční hodnoty odezvy (kolem 100 nA). Jediným odlehklým bodem bylo měření promítnuté do buňky 7-1 (hranice pro oblast ustalování ve vysokých hodnotách). Velikost odezvy činila 42 nA, avšak pro ustalování ve vysokých hodnotách zde byla naměřena hraniční hodnota (30 nA). Z toho vyplývá, že pro ANN je dominantnější vlastností ustalování ve vysokých hodnotách než nízká odezva po přidání substrátu. Navíc, některá data promítnutá v levém horním rohu mapy vykazovala více charakteristických vlastností, především malou citlivost na syntostigmin. Pro neuronovou síť byla v těchto případech dominující právě nízká odezva. Její velikost totiž odpovídá rychlosti enzymové reakce. Nízká odezva nedává dostatečný prostor pro změření inhibiční závislosti, z čehož vyplývá, že se i v naměřených datech často vyskytuje spolu s malou citlivostí na syntostigmin.

Měření, kde se proud ustaloval ve vysokých hodnotách, se promítla do oblasti levého dolního rohu.

V buňce 13-1 a v jejím nejbližším okolí se nacházejí měření s hodnotami ustáleného proudu před přidavkem substrátu kolem 200 nA. Směrem ke středu Kohonenovy mapy pak tato hodnota klesá. Hraniční hodnotou byl stanoven proud 50 nA. V buňkách 10-1, 11-1, 11-2, 12-3 a 13-1 se vyskytují data, která navíc nesou i další vlastnost a to nízkou odezvu po přidavku substrátu.

Většina měření, vykazujících pomalé ustalování po přidavku substrátu, se nachází ve středové části mapy. Malá část měření, kombinující pomalé ustalování a nízkou odezvu po přidavku substrátu, byla promítnuta do oblasti nízké odezvy.

Citlivost na syntostigmin je definována velikostí směrnice přímky proložené naměřeným průběhem signálu po přidavku syntostigminu. Sjednocením času přidavků se směrnice výrazně mění. Po navzorkování dat došlo tedy ke zvětšení množiny dat, která jsou charakteristická malou citlivostí na syntostigmin. I přes tuto systematickou chybu způsobenou vzorkováním byla téměř všechna měření promítnuta do 1. řádku mapy a to ve sloupcích 1-6 a 11-13. V buňkách 1-1 až 1-4 byly zařazeny případy kombinující nízkou citlivost a nízkou odezvu po přidavku substrátu. Dodatečným studiem dat bylo zjištěno, že data mají jednu společnou vlastnost, a to je prudký nárůst proudu následovaný prudkým poklesem po přidavku substrátu.

Použitá metoda vzorkování se ukázala jako nevhodná pro měření s vadnou membránou, kde šum, který je průvodním jevem takového poškození, byl z větší části eliminován.

## SOUHRN

V této práci byly aplikovány umělé neuronové sítě pro vyhodnocení signálu při měření pomocí biosenzoru. Ze šesti různých poruch průběhu signálu je možné čtyři z nich (nízká odezva po přidavku substrátu, ustalování ve vysokých hodnotách, pomalé ustalování po přidavku substrátu a malá citlivost na syntostigmin) určit s pravděpodobností více jak 90 %. Pro detekci měření, kdy byla poškozena membrána biosenzoru a tím způsoben vyšší šum měření, byla použita metoda měření nevhodná. Vlastní umělé neuronové sítě adaptované na tento konkrétní problém mohou být jako program nahrány do mikroprocesoru a být implementovány do přístroje.

umělé neuronové sítě, biosenzor, pesticidy

## SUMMARY

Biosensors are analytical devices that transforms chemical information, ranging from the concentration of a specific sample component to total composition analysis, into an analytical signal and that utilizes a biochemical mechanism for the chemical recognition. The complexity of biosensor construction and generation of measured signal requires the development of new method for signal evaluation and its possible outbreaks recognition. A new method based on artificial neural networks (ANN) was developed for discrimination of characteristic behavior of signal joined with malfunction of sensor.

The observed differences from ideal signal behavior can be divided into several categories – non-stable response after substrate addition (caused by variation of sample flow through detection cell), bad membrane (badly immobilized enzyme on working electrode), low response after substrate addition (low immobilized enzyme activity), low sensitivity on syntostigmine, equilibration at high values and slow equilibration after substrate addition. New algorithm uses unsupervised Kohonen self-organiz-

ing neural networks (SOM). The work with ANN has two phases – adaptation and prediction. During the adaptation step the classification model is build. Measured data form groups after projection into two-dimensional space based on theirs similarity. After identification of these groups and establishing the connection with signal disorders ANN can be used for evaluation of newly measured signals. SOM provides similar results as standard statistical methods, such as cluster analysis or linear discriminant analysis.

This algorithm was successfully applied for signal classification obtained from immobilized acetylcholinesterase (AChE) biosensor measurement of organophosphate and carbamate pesticides (Afonon, Methanion, Dithane), that are AChE inhibitors, in fruits (orange, grapefruit, lemon, kiwi, grapes), vegetables (pepper, tomato, eggplant, wild leek, parsley), spice (sweet-fennel), potatoes and soil samples. Total number of measurements was 540. The data were measured with field micro flow analytical system (BVT Technologies, a. s., Brno, Czech Republic) using standard procedure with homogenized and filtrated extracts. Due to various time of measurement the data were resampled to be the same length. For each measurement was obtained vector containing 27 points. The first 20 points described signal course, the resting seven then binary encoded sensor malfunctions. This form of notation was selected because certain measurements combined more signal disorders. The SOM with 27 artificial neurons in input layer and 13 x 13 artificial neurons in output layer was able to distinguish between four typical signals behavior. From six different signal defects were successfully classified four – low response after substrate addition, equilibration at high values, slow equilibration after substrate addition respectively low sensitivity on syntostigmine in more than 90 % of measurements. Used signal sampling method did not allowed to recognize measurement with bad membrane, because its typical sign – very high noise – was eliminated during signal processing. Adapted artificial neural network as a software can be loaded into microchip and implemented to equipment.

#### LITERATURA

- BACHMANN, T. T., LECA, B., VILATTE, F., MARTY, J. L., FOURNIER, D., SCHMID, R., 2000: Improved multianalyte detection of organophosphates and carbamates with disposable multielectrode biosensors using recombinant mutants of *Drosophila* acetylcholinesterase and artificial neural network. *Biosens. Bioelectron.* 15(3–4): 193–201.
- EVTUGYN, G.A., BUDNIKOV, H.C., NIKOLSKAYA, E.B., 1996: Influence of surface-active compounds on the response and sensitivity of cholinesterase biosensors for inhibitor determination. *Analyst* 121: 1911–1915.
- FRÍAS, S., CONDE, J. E., RODRÍGUEZ, M. A., DOHNAL, V., PÉREZ-TRUJILLO, J. R., 2002: Metallic content of wines from the Canary Islands (Spain). Application of artificial neural networks to the data analysis. *Nahrung/Food*, 46: 370–375. ISSN 1521-3803.
- <http://www.cnbc.cmu.edu/Resources/PDP++/PDP++.html>
- KVASNIČKA, V. A KOL., 1997: Úvod do teorie neuronových sítí, IRIS. ISBN 80-88778-30-1.
- KOHONEN, T., 1995: *Self-Organising Maps*, Springer, Berlín.
- MCCLELLAND, J. L., RUMELHART, D. E., 1987: *Explorations in Parallel Distributed Processing Handbook*. MIT Press.
- PODLOUCKÁ, L., 2005: Umělé neuronové sítě pro klasifikaci signálů biosenzorů. *Bakalářská práce*. FELT VUT v Brně, Brno.
- RECHNITZ, G. A., 1991: Biosensors into the 1990s. *Electroanalysis*, 3: 73–76. ISSN 1521-4109.
- SEEMANN, J., RAPP, F. R., ZELL, A., GAUGLITZ, G., 1997: Classical and modern algorithms for the evaluation of data from sensor-arrays. *Fres. J. Anal. Chem.* 359: 100–106.
- SKLÁDAL, P., MASCINI, M., 1992: Sensitive detection of pesticides using amperometric sensors based on cobalt phthalocyanin-modified composite electrodes and immobilized cholinesterases. *Biosens. Bioelectron.* 7, 335–343.

#### Adresa

Mgr. Vlastimil Dohnal, Ph.D., Ústav technologie potravin, Mendelova zemědělská a lesnická univerzita v Brně, Zemědělská 1, 613 00 Brno, Česká republika, e-mail: dohnal@mendelu.cz, Bc. Lenka Podloucká, Ústav mikroelektroniky, Fakulta elektrotechniky a komunikačních technologií, Vysoké učení technické v Brně, Údolní 53, 602 00 Brno, Česká republika; Ing. Zuzana Grosmanová, Ing. Jiří Krejčí, BVT Technologies, a. s., Hudcova 532/78, 612 00 Brno, Česká republika, e-mail: tab@bvt.cz

