

# זיהוי מחלות בעזרת נשיפה באמצעות מערך חיישנים נומטריים

ד"ר יואב ברוזה ופרופ' חוסאם חאיק, הפקולטה להנדסה כימית ומכון ראסל ברי לננוטכנולוגיה, הטכניון - מכון טכנולוגי לישראל, חיפה 3200003, ישראל

שימוש בריח גוף, בכלל, ובארומת הנשיפה של אדם, בפרט, ככלי אבחון רפואי אינו חדש. אחד התיעודים הראשונים לכך נמצא לפני יותר מאלפיים שנה בכתביו של היפוקרטס בסביבות 400 לפנה"ס. היפוקרטס, שהיה רופא (על שמו שבועת היפוקרטס שכל רופא היום מתחייב לקיימה), מציין כי ניתן להשתמש בריח הנשיפה של חולה כמבחן רפואי דיאגנוסטי, כשהוא מתייחס למחלות כגון הליטוסיס (Halitosis). מאז ועד היום חלה התפתחות אדירה בטכנולוגיה, ובסביבות שנות ה-70 של המאה הקודמת שבו חוקרים לבחון דוגמאות נשיפה במסגרת מחקר מדעי ללא כיוון קליני מוצהר. לפני כ-20 שנה החלו להופיע עבודות בספרות המדעית, שבהן החלו חוקרים לבחון דוגמאות נשיפה לשימושים קליניים. במקביל התפרסמו באותה תקופה עבודות שבהן נעשה שימוש בחוש הריח של כלבים לזיהוי של מחלות שונות כגון סרטן.

## וכך נולד לו רעיון...

רצה הגורל וחבר קרוב של אחד המחברים, פרופ' חאיק, שהיה מדען צעיר באותה התקופה, חלה במחלת הסרטן. העובדה כי אדם שמספר שבועות קודם לכן נראה בריא לחלוטין, הופך בן רגע לחולה במחלה קשה ללא אזהרה מוקדמת השפיעה עליו רבות, והוא החל לחשוב כיצד ניתן לעזור לחבר. פרופ' חאיק נתקל באותן עבודות אשר הראו כי כלבים מסוגלים לזהות מחלות לפי ריח, וחשב כי ניתן ליישם רעיון זה באופן מלאכותי, וכך נולד הרעיון של אף אלקטרוני לזיהוי מחלות.

חוש הריח של כלבים מפותח ביותר. בחלל האף יש לכלבים מעל 1000 סוגים שונים של קולטנים, וכל סוג יכול להופיע במספר רב של עותקים, אשר מסתכם במיליונים של קולטנים בשכבת ההרחה במוחם של הכלבים. עובדה זו נותנת לכלבים יכולות הרחה מעולות עם רגישויות שהן פי 3-4 יותר מאלה של בני-אדם. כאשר מולקולות ריח מגיעות אל האף, הן נקלטות ע"י אותם קולטנים שמעבירים אל המוח סיגנל חשמלי המתפרש כריח. בעלי כלבים בעולם דיווחו כי כלביהם נהגו לרחרח אזורים בגופם שלאחר מכן הסתבר שהיו בהם גידולים סרטניים. דיווחים מדעיים שונים ברחבי העולם הראו כי ניתן לאמן את הכלבים לזהות ריחות ייחודיים אלו, ובבדיקות מבוקרות הצליחו כלבים לזהות כלים שבהם נמצאה דגימת רקמה סרטנית לעומת כלים שהכילו דגימה בריאה. שימוש בכלבים הוא טוב אבל גורר עמו קשיים רבים שאינם מתאימים לדיאגנוסטיקה הרפואית בעולמנו, ולכן עלה הרעיון שלפיו אם נוכל לפתח באופן טכנולוגי מערך של חיישנים שידמה את האף של הכלב, ייתכן שנוכל לזהות תבניות ריח ייחודיות המאפיינות מחלה מסוימת, בדיוק באותו האופן שהחוקרים ראו בשימוש עם כלבים שונים.

## מרעיון למציאות...

כאמור, בשלב זה כבר היה תיעוד ראשוני בספרות המקצועית על חומרים כימיים הנפלטים בנשיפה, דהיינו, מולקולות אורגניות נדיפות: Volatile Organic Compounds (VOCs). בנוסף לחמצן, מים ופחמן דו-חמצני שמהווים את עיקר המולקולות הנפלטות בנשיפה, מצאו החוקרים כי ישנם חומרים שונים בריכוזים של חלק אחד למיליון (ppm), למשל, אצטון ופחמן חד-חמצני, וחומרים הנפלטים גם בריכוזים של חלק אחד לביליון (ppb), כגון איזופרן, אצטאלדהיד, פנטאן, אתאנול ועוד. חלק ממולקולות אלו נוצר ע"י הגוף עצמו בתהליכים מטבוליים מגוונים באיברי הגוף השונים באופן נורמלי אך גם במצבים אנורמליים (כגון מחלה) (איור 1), וחלק מהמולקולות הוא תוצאה של חשיפה לחומרים שונים החודרים לגוף בדרכים שונות, למשל, דרך המזון שאנו צורכים, האוויר שאנו נושמים או התרופות שאנו לוקחים. [1, 2]

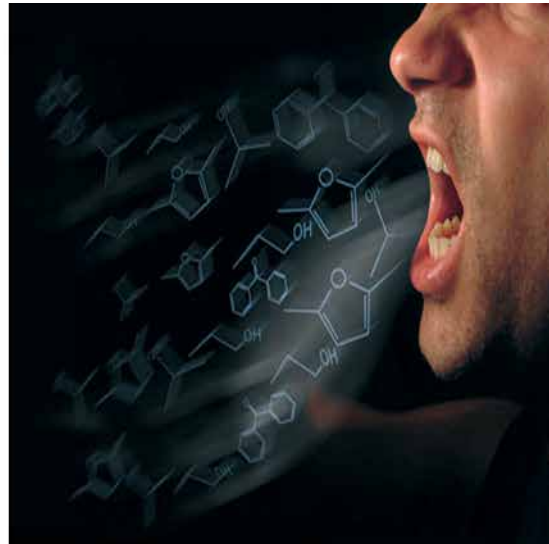
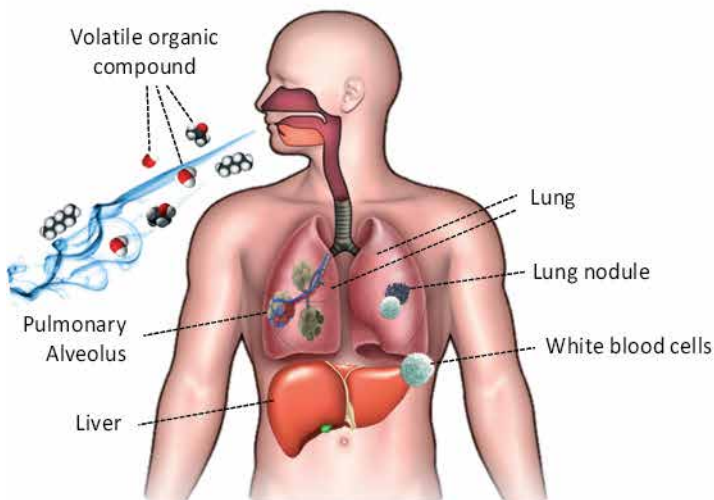
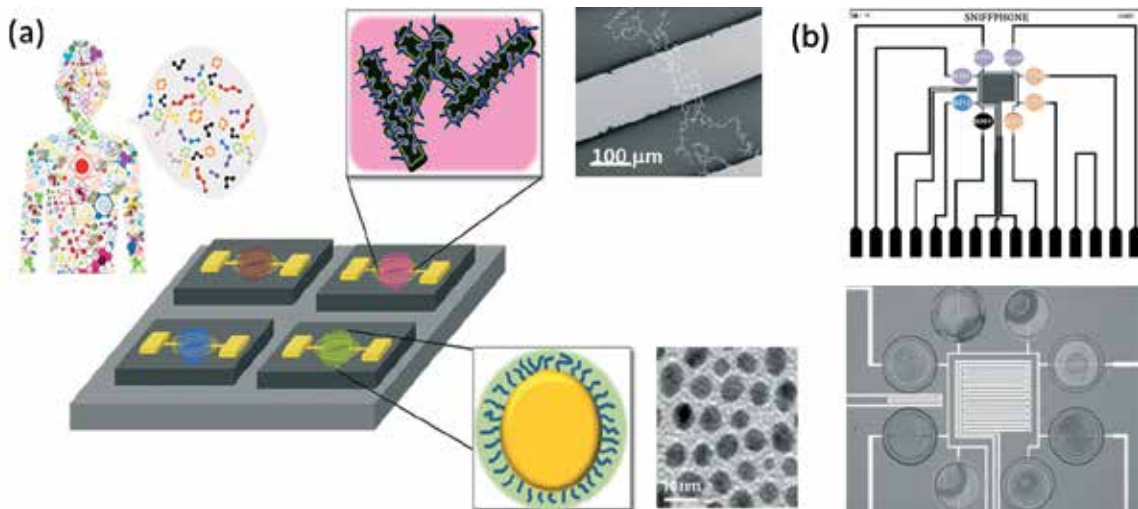


Figure was adapted from Ref. [3] with permission, Copyright (2012) American Chemical Society

**איור 1 - אנליזת נשימה לאפיון מחלות מבוססת על זיהוי חומרים נדיפים הנפלטם בנשיפה. כימיקלים אלו נוצרים בתהליכים מטבוליים שונים בתוך הגוף במצב נורמלי - בכבד, למשל, - אך גם כתוצאה ממחלות שונות כדוגמת סרטן ריאה בסכמה המצורפת.**

לכן שתי המטרות היו (לא בהכרח בסדר זה): (1) למצוא מהם אותם חומרי ריח שבעזרתם ניתן לזהות מחלה מסוימת (2) כיצד ניתן לבנות מערכת חישה מלאכותית שתזהה את אותן מולקולות. במעבדה לחקר התקנים מבוססי ננו-חלקיקים (Laboratory for nanomaterial based devices - LNBD) בטכניון עובדים וחוקרים תהליכים ומערכות בתחום ההנדסה, אלקטרוניקה, חומרים, כימיה, ביולוגיה ורפואה. אחד מעמודי התווך במעבדה הנו המחקר והפיתוח של חיישנים לזיהוי של מולקולות אורגניות נדיפות. החיישנים מורכבים באופן כללי משני חלקים עיקריים: קולטן (receptor) ומתמר (transducer). תפקיד הקולטן לקלוט את המולקולה הכימית מהסביבה וליצור קשר עם החומר הנבדק. המתמר הופך את האות (סיגנל) הכימי שנקלט בקולטן לאות חשמלי שניתן למדוד במערכות מדידה חשמליות. שינוי באות החשמלי נמדד לרוב ע"י שינוי בהתנגדות החשמלית, בזרם או בכל ערך חשמלי מדיד אחר. לכן באופן מעשי ניתן ליצור שילובים שונים של קולטנים ומתמרים ליצירת חיישנים שונים. בחיישנים המפותחים במעבדה נעשה שימוש בשכבות קולטן שונות, שכבות אלו מבוססות על חלקיקים ננומטריים ( $10^{-9}$  מטר או מיליונית המילימטר) כמו חלקיקי זהב ננומטריים, חוטי סיליקון ננומטריים או צינוריות פחמן ננומטריות (איור 2). [4, 5] לצורך ההמחשה, חלקיק כזה של



**איור 2 - שימוש בחומרים בסקלה הננומטרית מאפשר לקבל תכונות ייחודיות ועדיפות של חישה. ישנם סוגים שונים של חומרים ננומטריים אשר משמשים לבניית חיישנים ומערכות האף האלקטרוני כגון: חלקיקי זהב ננומטריים, חוטי סיליקון ננומטריים או צינוריות פחמן ננומטריות. (a) מערך חיישנים יכול להיות מורכב מסוגים שונים של חיישנים כמתואר באיור. כל חיישן מורכב מאלקטרודת זהב הצמודה למשטח סיליקון, ועליה מונחים הננו-חלקיקים המשמשים כשכבת הקולטן. figure adapted from Ref. [6] with permission (b) השימוש בחומרים ננומטריים מאפשר ליצור ציפים הניתנים לשילוב במכשירים ניידים כגון טלפונים סלולריים. למשל, בתמונה ציפ בגודל  $1.5 \text{ cm}^2$  המכיל שמונה חיישנים שונים.**

חומר הוא בגודל של אחת חלקי מאה-אלף מעובי של שיערה אנושית. לכל אחד מחומרים אלו ניתן לקשור מולקולות כימיות שונות כדי ליצור שונות בשכבת הקולטן המתאפיינת בסלקטיביות שונה ובזיקה (affinity) שונה לכל חיישן וחיישן כלפי מולקולות המטרה. חומרים אלה נקראים: "ליגנדות" (Ligands).

את טכנולוגיית החיישנים ניתן ליישם בשתי גישות מרכזיות: האחת, גישה סלקטיבית המתאפיינת בחיישן אחד שהוא ייחודי למולקולת מטרה אחת. לדוגמה, מכשיר הינשוף המשטרתי יודע לזהות אלכוהול בנשיפה, והוא רגיש רק לאלכוהול. הגישה השנייה היא 'שילוב תגובות' (cross reactive). בגישה זו, בדומה לאף של הכלב (או של בעלי חיים בכלל), כל חיישן (קולטן) יכול להגיב למספר מולקולות, וכל מולקולה יכולה להגיב עם מספר חיישנים. בצורה זו אנחנו יכולים לקבל מספר רב של אותות (כמספר החיישנים) אשר מהם ניתן ליצור תבנית ריח אופיינית או "טביעת אצבע של ריח". בגישה זו אנו נדרשים לאמן את המערכת לזהות תבנית ריח ייחודית, בדומה לאימון של כלב, אשר ניתן ללמד אותו לזהות ריח של חומרי נפץ או ריח של סמים או אנשים נעדרים. לכן גישה זו נקראת אף אלקטרוני, כי היא מחקה את אופי הפעולה של האף של החיה (איור 3).

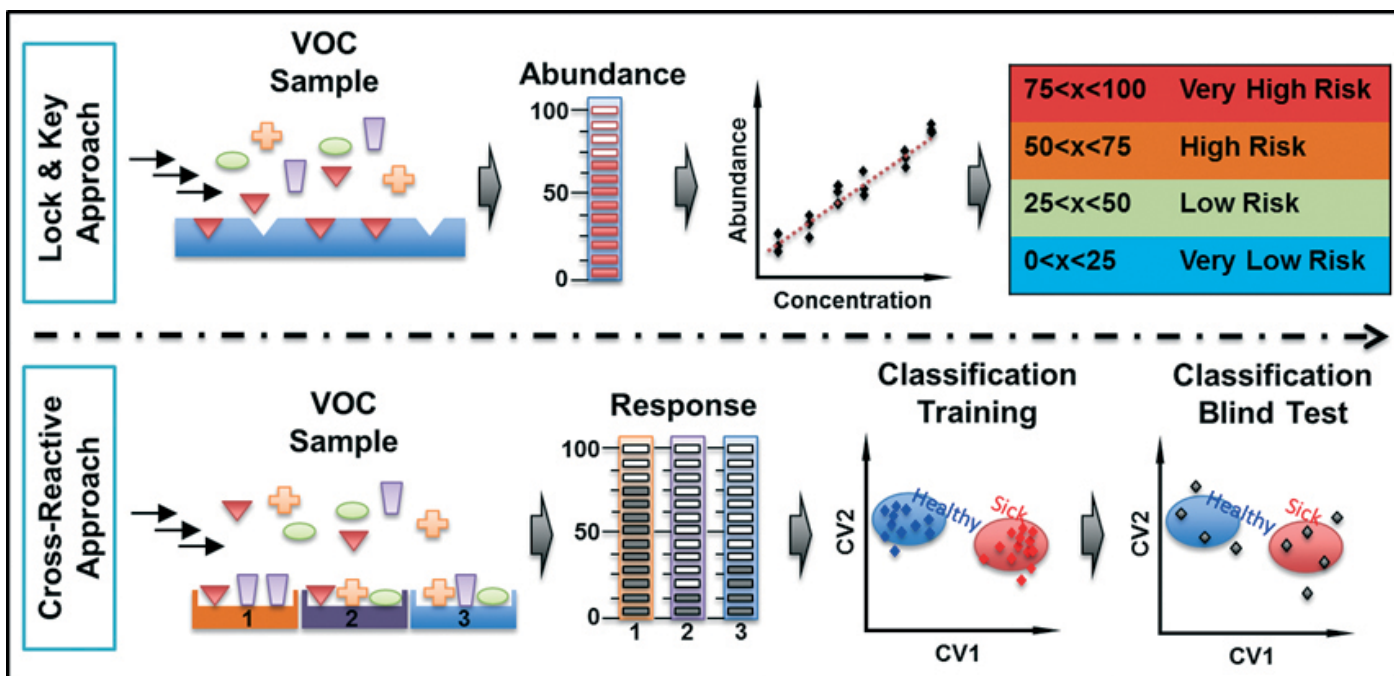


Figure reproduced from Ref. [7] with permission from The Royal Society of Chemistry

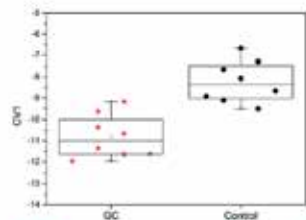
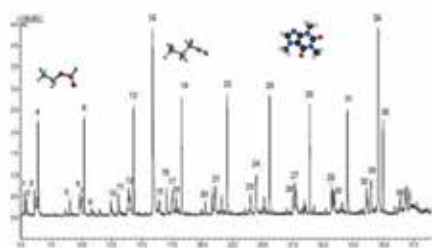
איור 3 - שתי גישות חישה המשמשות כבסיס טכנולוגי למערכות אף אלקטרוני. הגישה הסלקטיבית (גישה מפתח ומנעול) המאפשרת זיהוי של סמן ידוע באופן כמותי וקביעת ספי ריכוז. הגישה של 'שילוב תגובות' (cross reactive) שאותן ניתן לשייך למחלה. הגישה מדמה את האף של היונק ועושה שימוש במגוון חיישנים המגיבים למגוון חומרים ויוצרים תבנית ריח ייחודית.

כאמור, האף האלקטרוני בנוי בבסיסו מאותם חיישנים שהוזכרו למעלה, אך במקרה זה מדובר במערך של חיישנים ננומטריים שונים שכל אחד מהם מושפע במקצת משכבת הקולטן הייחודית שבה הוא מצופה, כדוגמת חלקיקי זהב ננומטריים עטופים בזרועות (ליגנדות) של מולקולות כימיות שונות, לכן שימוש בליגנדה שונה יוצר חיישן שונה. מערך חיישנים זה הוא לב המערכת, ושם מתבצע הזיהוי של מולקולות הריח, שהן המולקולות הנדיפות מהנשיפה. מערך החיישנים נתון בתוך תא סגור שאליו מוזרמת הדוגמה (בדומה לחלל האף של הכלב). לאחר התגובה של החיישן עם מולקולות הריח נוצר שינוי בתכונה החשמלית של החיישן, כגון שינוי בהתנגדות החשמלית אשר נמדד בעזרת מכשיר מדידה מתאים. מידע זה נאסף ע"י מחשב בעזרת תוכנה ייעודית. את הנתונים מעבדים בעזרת תוכנה נוספת אשר בונה אלגוריתמים ייחודיים ומסוגלת לנתח מידע רב-ממדי או רב-משתנים ולזהות תבנית אופיינית לריח, או לדגימת הנשיפה, בדיוק כפי שהמוח של הכלב יודע לזהות את תבנית הריח שאותה אימנו אותו להריח.

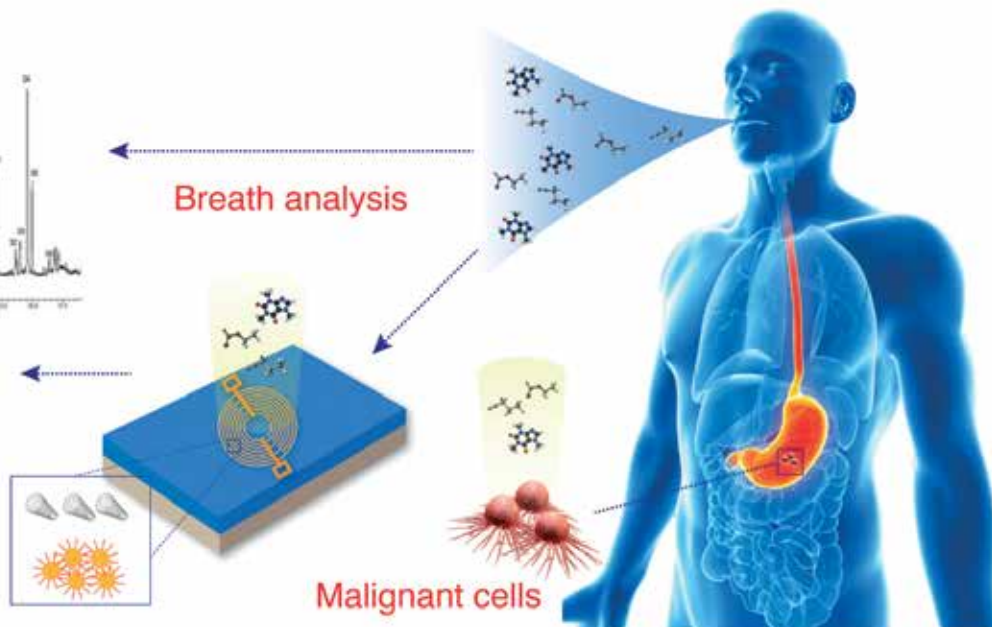
תהליך פיתוח החיישנים לזיהוי המחלה הוא מורכב ומתבסס קודם כל על בנייה של מערך חיישנים. בשלב הבא נלקח מערך זה ונבדקת יכולתו לזהות ריכוזים שונים של מולקולות כימיות ידועות. את לימוד המערכת עושים בתחילה ע"י שימוש בסטנדרטים קנויים של מולקולות שעל פי הדיווחים בספרות יכולות לאפיין מחלה מסוימת. בשלב הבא מתחילים לקחת דוגמאות אמיתיות של אנשים חולים ובריאים במסגרת ניסויים קליניים בבתי החולים בארץ ובעולם. דגימות אלו משמשות לבחינה של שתי המטרות שצוינו מעלה. חלק מהדוגמאות נלקחות לאנליזה במכשירים אנליטיים מעבדתיים גדולים כגון כרומטוגרפיה גזית מחוברת לאנליזת מסות (GCMS, Gas Chromatography Mass Spectrometry). שלב זה מאפשר לבחון ולזהות מולקולות ספציפיות שיכולות לאפיין מחלה ולהוות סמן ביולוגי (Biomarker) למחלה. זיהוי של מולקולות אלו גם יכול לשמש

בסיס לאימון החיישנים בשלב הפיתוח וסימולציה לזיהוי מחלה במעבדה. בנוסף נערך מחקר על אותן מולקולות ספציפיות בהקשרים מטבוליים בגוף בניסיון להתחקות אחר מקורן ואחר הקשר שלהן למחלה מסוימת. ההנחה היא שכאשר ניתן יהיה לקשר מולקולה ספציפית לתהליך פיזיולוגי בגוף, ניתן יהיה להבין טוב יותר את המחלה, לפתח דרכים מהירות יותר לזיהוי מוקדם ואף להציע פתרונות ריפוי מותאמים אישית. בשלב הבא שאר הדוגמאות שנאספו משמשות כדוגמאות לבחינה של מערך החיישנים שאושר בשלב המעבדה. דוגמאות הנשיפה שנאספו בכלים ובמבחנות מתאימות, משוחררות לתוך התא המכיל את מערך החיישנים; המולקולות הנדיפות מגיבות עם החיישנים, והסיגנל החשמלי נמדד ונרשם במחשב. עם המידע שנאסף ניתן לבנות אלגוריתם סיווג, שיאפשר אבחנה בין דוגמאות של חולים לדוגמאות של בריאים. לאחר פיתוח אלגוריתם הסיווג, בוחנים שוב את המערכת ע"י דוגמאות לא ידועות במבחן "עיוור". הצלחה במבחן העיוור מהווה שלב חשוב בפיתוח המערכת. אם שלב זה נותן תוצאות חלשות, מתחילים את השלבים מחדש, בוחנים שילוב חדש של חיישנים ובונים אלגוריתם חדש. בשיטה זו ניתן לבנות מערכת של אף אלקטרוני שאותה אנו מכנים נאנוז (Nanose). המערכת תשמש רופאים ברחבי העולם לזיהוי מוקדם של מחלות שונות (איור 4). עד היום נעשה מספר רב של ניסויים קליניים במחלות מתחומים שונים. במחלות ממאירות כגון: סרטן ריאות, סרטן קיבה; במחלות נירולוגיות כגון: טרשת נפוצה, פרקינסון ואלצהיימר; במחלות זיהומיות כגון: שחפת; ובמגוון מחלות מטבוליות. הצלחה יפה נרשמה בכושרה של המערכת לזהות את כל המחלות הללו דרך הנשיפה. [7-12] כחלק מהתקדמות הפרויקט נמצא כי בנוסף לדוגמאות הנשיפה, ניתן לדגום את אותם סמנים נדיפים מאברי הגוף ומונזלי גוף שונים ובכך ליצור פרופיל מפורט על כל ייצור חי. מכלול הסמנים הנדיפים מהגוף נקרא Volatolome, והוא מורכב מנתונים שנאספים מדוגמאות נשיפה, עור, שתן, דם, צואה, תאים ועוד. פרופיל זה יכול לשמש כמפה לזיהוי סמנים נדיפים למחלות, אך גם לאיפיון סטטוס מטבולי של אוכלוסיות שונות לטובת רפואה מותאמת אישית. [2, 13] במקביל לניסויים אלו נעשית התקדמות גם במזעור המערכות, וכיום נבנות מערכות המאפשרות נשיפה ישירה לתוכן, מערכות ניידות ומערכות שניתן לממשק לטלפון סלולארי. כל זאת במטרה לפשט את הדיגום ולאפשר טיפול מוקדם ליד מיטת החולה או במרפאה השכונתית. טכנולוגיה זו אינה עוצרת כאן, והיא גם משמשת ונבחנת בכיוונים לא רפואיים, החל מזיהוי זיהומים סביבתיים, דרך בחינת פוריות של חיות משק ועד זיהוי סמים וחומרי נפץ בביטחון פנים.

### (a) Chemical analysis



### (b) Sensors analysis



איור 4 - סכמת תהליך הדיגום והאנליזה. הנבדק נושף לתוך המערכת (או כלי איסוף). הדוגמאות ניתנות לזיהוי כימי בעזרת מערכות אנליטיות (א) או לזיהוי תבנית נשיפה ייחודית למחלה בעזרת מערך חיישנים (b). הדוגמה המוצגת מייצגת מערכת שנבנתה לזיהוי סרטן קיבה. Figure reproduced from Ref. [8] with permission

## מה עוד צופן העתיד...

נוסף על השימוש בזיהוי חומרים נדיפים, נמצא כי אותם ננו-חלקיקים מציגים תכונות נוספות שגם אותן ניתן לנצל. נמצא כי החיישנים רגישים ללחץ כיפוף ומגע אשר יכול להוביל לתפיסה חדשה בעולם האלקטרוניקה (יכול לאפשר בעתיד הלא רחוק לקפל ולגלגל את הטלפון החכם למשל). גילוי זה קרה במקרה במהלך מחקר, אך הביא עמו כיוון ופיתוח חדש הנקרא **עור אלקטרוני** המאפשר שילוב של חיישנים אלו במצעים גמישים. [14] חיישנים על מצע גמיש יוכלו לשלב מספר פונקציות המקבילות לעור אנושי וליצור עור מלאכותי שיוכל להרגיש לחיצות או מגע, לחוש בלחות וטמפרטורה, להבחין בחומרים רעילים ועוד. יישום זה יכול להוות פריצת דרך עבור קטועי גפיים המשתמשים כיום בפרוטזות. בנוסף, העור המלאכותי עשוי גם לתפקד כמדבקות לניטור המצב הבריאותי (לדוגמה, פרויקט ביל גייטס שהמעבדה זכתה בו לזיהוי שחפת) או לשמש כ"חיישן

מצוקה" נייד לאוכלוסיות בסיכון, שיכול להזעיק צוות רפואי במקרה סכנה. גם במקרה של העור המלאכותי ניתן ליישם את הטכנולוגיה בתחומים שאינם רפואיים, למשל בתחום התעופה: אפשר יהיה למנוע מראש סדקים זעירים בגוף המטוס שעשויים לגרום לתאונות, אם נעטוף את המטוס בשכבה דקה של עור מלאכותי שיעקוב באופן תמידי אחר המבנה החיצוני. אפשר יהיה לשלב עור מלאכותי גם בפיתוחים של מוטוריקה עדינה ברובוטים או בבקרים בתהליכים הנדסיים.

## ביבליוגרפיה

1. Amann, A. and D. Smith, *Breath analysis for clinical diagnosis and therapeutic monitoring*, ed. A. Amann and D. Smith. 2005. 305-316.
2. Broza, Y.Y., et al., *Hybrid volatolomics and disease detection*. *Angew. Chem. Int. Ed.*, 2015. **54**(38): p. 11036-11048.
3. Hakim, M., et al., *Volatile organic compounds of lung cancer and possible biochemical pathways*. *Chem. Rev.*, 2012. **112**: p. 5949-5966.
4. Broza, Y.Y. and H. Haick, *Nanomaterial-based sensors for detection of disease by volatile organic compounds*. *Nanomedicine*, 2013. **8**(5): p. 785-806.
5. Haick, H., *Chemical sensors based on molecularly modified metallic nanoparticles*. *J. Phys. D: Appl. Phys.*, 2007. **40**(23): p. 7173-7186.
6. Vishinkin, R. and H. Haick, *Nanoscale sensor technologies for disease detection via volatolomics*. *Small*, 2015. **11**(46): p. 6142-6164.
7. Haick, H., et al., *Assessment, origin, and implementation of breath volatile cancer markers*. *Chem. Soc. Rev.*, 2014. **43**(5): p. 1423-1449.
8. Amal, H., et al., *Detection of precancerous gastric lesions and gastric cancer through exhaled breath*. *Gut*, 2016. **65**(3): p. 400-407.
9. Broza, Y.Y., et al., *A nanomaterial-based breath test for short-term follow-up after lung tumor resection*. *Nanomedicine: NBM*, 2013. **33**: p. 92-92.
10. Nakhleh, M.K., et al., *Diagnosis and classification of 17 diseases from 1404 subjects via pattern analysis of exhaled molecules*. *ACS Nano*, 2017. **11**: p. 112-125.
11. Peng, G., et al., *Diagnosing lung cancer in exhaled breath using gold nanoparticles*. *Nat. Nanotechnol.*, 2009. **4**(10): p. 669-673.
12. Broza, Y.Y., et al., *Exhaled breath markers for nonimaging and noninvasive measures for detection of multiple sclerosis*. *ACS Chem. Neurosci.*, 2017. **8**(11): p. 2402-2413.
13. Broza, Y.Y., L. Zuri, and H. Haick, *Combined volatolomics for monitoring of human body chemistry*. *Sci. Rep.*, 2014. **4**: p. 1-6.
14. Segev-Bar, M., et al., *Tunable touch sensor and combined sensing platform: toward nanoparticle-based electronic skin*. *ACS Appl. Mater. Interfaces*, 2013. **5**(12): p. 5531-5541.