

**Федеральное государственное автономное образовательное учреждение
высшего образования
«Казанский (Приволжский) федеральный университет»**

На правах рукописи



ДАВЛЕТШИНА РЕГИНА РУДИСОВНА

**ЭЛЕКТРОХИМИЧЕСКИЕ БИОСЕНСОРЫ ДЛЯ ОПРЕДЕЛЕНИЯ ОБРАТИМЫХ ИН-
ГИБИТОРОВ АЦЕТИЛХОЛИНЭСТЕРАЗЫ, ИСПОЛЬЗУЕМЫХ В ТЕРАПИИ НЕЙ-
РОДЕГЕНЕРАТИВНЫХ ЗАБОЛЕВАНИЙ**

02.00.02 – Аналитическая химия

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени
кандидата химических наук

КАЗАНЬ - 2021

Работа выполнена на кафедре аналитической химии Химического института им. А.М. Бутлерова федерального государственного автономного образовательного учреждения высшего образования «Казанский (Приволжский) федеральный университет»

Научный руководитель: *Евтюгин Геннадий Артурович*,
доктор химических наук, профессор

Официальные оппоненты: *Супрун Елена Владимировна*,
доктор биологических наук, ведущий научный сотрудник лаборатории биоэлектрохимии ФГБНУ «Научно-исследовательский институт биомедицинской химии имени В.Н. Ореховича»

Вохмянина Дарья Владимировна,
кандидат химических наук, научный сотрудник кафедры химической энзимологии химического факультета ФГБОУ ВО «Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова»

Ведущая организация: ФГБОУ ВО «Башкирский государственный университет»

Защита состоится «06» мая 2021 г. в 14 - 00 на заседании диссертационного совета КФУ.02.01 при ФГАОУ ВО «Казанский (Приволжский) федеральный университет» по адресу 420008, г. Казань, ул. Кремлевская, 18, Химический институт им. А.М. Бутлерова, бутлеровская аудитория.

С диссертацией можно ознакомиться в научной библиотеке им. Н.И. Лобачевского Казанского (Приволжского) федерального университета. Электронные версии автореферата и диссертации доступны на официальном сайте К(П)ФУ <http://kpfu.ru>. Отзывы на автореферат в двух экземплярах просим отправлять по адресу: 420008, г. Казань, ул. Кремлевская, 18, ФГАОУ ВО «Казанский (Приволжский) федеральный университет», отдел аттестации научно-педагогических кадров.

Автореферат разослан «__» _____ 2021 г.

Ученый секретарь

диссертационного совета КФУ.02.01

кандидат химических наук

Якимова Людмила Сергеевна

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы исследования. Ферментативные методы анализа находят широкое применение в анализе токсических препаратов, таких как пестициды и тяжелые металлы, в объектах эколого-аналитического контроля, а также в контроле лекарственных препаратов в медицине и фармакологии. Количественная характеристика состава объектов анализа основана на изменении активности ферментов в присутствии аналитов за счет их ингибирующего действия. Таким образом, ферментативный анализ моделирует таргетные биохимические взаимодействия в организме человека и позволяет делать выводы о потенциальной опасности или фармакологическом действии тех или иных соединений. Среди ферментов, используемых для определения ингибиторов, особое внимание уделяется холинэстеразам, и в первую очередь, ацетилхолинэстеразе (АХЭ). Данный фермент присутствует в синаптической щели, разделяющей нервные окончания нейронов большинства высших животных, и обеспечивает дискретность передачи нервных импульсов за счет каталитического гидролиза ацетилхолина – природного нейромедиатора. Снижение активности АХЭ приводит к гипервозбуждению мышц и в случае острых отравлений – к летальному исходу. Поскольку антихолинэстеразные агенты производились как боевые отравляющие вещества нервно-паралитического действия, ферментативные методы анализа ингибиторов АХЭ развивали первоначально для предотвращения потерь в условиях боевого применения отравляющих веществ. Впоследствии биосенсоры на основе АХЭ нашли применение в контроле фосфорорганических и карбаминатных пестицидов. В последнее время интерес к аналитическому применению АХЭ усилился в связи с большим вниманием, уделяемым нервно-дегенеративным заболеваниям. В частности, болезнь Альцгеймера сопровождается подавлением активности холинацетилтрансферазы, ответственной за синтез ацетилхолина, поэтому использование обратимых ингибиторов АХЭ восстанавливает концентрацию нейротрансмиттера и подавляет симптоматику заболевания. В настоящее время анализ таких препаратов производится методами жидкостной хроматографии, не совместимой с форматом проведения анализа у постели больного вне лечебного учреждения (point-of-care diagnostics). В этой связи актуальна задача создания быстрых и чувствительных сенсоров для определения обратимых ингибиторов АХЭ с целью контроля количества препаратов антихолинэстеразного действия в организме при терапевтическом приеме и предотвращения случайных отравлений в связи с приемом избыточных количеств лекарств.

Степень разработанности проблемы. Хотя биосенсоры с иммобилизованной АХЭ хорошо изучены, они в основном ориентированы на определение необратимых ингибиторов фермента. Анализ обратимого ингибирования предъявляет более высо-

кие требования к условиям иммобилизации фермента, поскольку взаимодействие фермент - ингибитор проходит в присутствии субстрата и условия реакции более сложным образом влияют на чувствительность фермента к определяемому соединению. Электрохимические способы регистрации сигнала холинэстеразных сенсоров выгодно отличаются от оптических методов простотой используемого оборудования, удобством реализации в виде компактных сенсоров, чувствительностью регистрации сигнала. Внедрение новых материалов на основе полиэлектролитных комплексов (ПЭК), обеспечивающих коммуникацию биохимических и электрохимически активных компонентов, может существенно улучшить характеристики электрохимической регистрации сигнала об ингибировании холинэстераз, что расширит область контроля остаточных количеств пестицидов антихолинэстеразного действия.

Цель работы состояла в создании электрохимических ацетилхолинэстеразных сенсоров для определения обратимых ингибиторов АХЭ с улучшенными аналитическими характеристиками на основе ПЭК – носителей фермента, а также их тестирование на модельных растворах и в искусственно загрязненных объектах анализа.

Для достижения указанной цели потребовалось решить следующие **задачи**:

1. Изучить с использованием метода поверхностного плазмонного резонанса (ППР) процессы формирования ПЭК и адсорбции на их поверхности АХЭ.
2. Определить условия электрохимической регистрации тиохолина с использованием стеклоуглеродных электродов (СУЭ), модифицированных медиаторными системами – комбинированными покрытиями из углеродной сажи (УС) и фталоцианина кобальта (ФЦК).
3. Установить рабочие условия иммобилизации АХЭ с применением ПЭК для достижения высокой чувствительности регистрации ингибирования фермента.
4. Установить зависимость операционных и аналитических характеристик разработанных биосенсоров при определении ацетилтиохолина (АТХ) и обратимых ингибиторов АХЭ в зависимости от способа модификации преобразователя сигнала.
5. Провести тестирование биосенсоров в модельных растворах ингибиторов и искусственно приготовленных образцах физиологических жидкостей с помощью разработанных ацетилхолинэстеразных биосенсоров и определить требования к пробоподготовке образцов с учетом оказываемого матричного эффекта.

Научная новизна работы состоит в следующем:

1. С использованием метода ППР выявлены закономерности образования ПЭК на поверхности преобразователя сигнала из растворов полиэлектролитов - полиаллиламина (ПАА), поли(диаллилдиметиламмоний хлорида) (ПДДА), дендримера поли(амидоамина) (ПАМАМ) 4 поколения, полистиросульфоната натрия (ПСС) и дезок-

сирибонуклеиновой кислоты (ДНК), включая закономерности сборки комплексов и количество иммобилизованной на них АХЭ.

2. Определено влияние строения ПЭК и конфигурации носителя на кинетику гидролиза субстрата АХЭ и операционные характеристики ацетилхолинэстеразных сенсоров.

3. Разработаны и охарактеризованы ацетилхолинэстеразные сенсоры на основе ПЭК, различающихся по способу модификации поверхности трансдьюсера, в определении обратимых ингибиторов АХЭ, используемых в терапии нейродегенеративных заболеваний, таких как физостигмин, донепезил, берберин, гуперзин А (ГУП), галантамин (ГАЛ).

4. Определена возможность использования разработанных, биосенсоров для определения донепезила, берберина, ГУП и ГАЛ в искусственной урине на уровне, меньшем, чем ожидаемые концентрации указанных ингибиторов при регулярном терапевтическом приеме.

Теоретическая и практическая значимость диссертационной работы состоят в том, что:

1. Разработаны простые и надежные способы модификации СУЭ слоями УС, ФЦК и ПЭК - носителями фермента, обеспечивающие быстрый отклик и высокую точность измерения сигнала биосенсоров на субстрат и обратимые ингибиторы АХЭ.

2. Установлены факторы, влияющие на структуру ПЭК и их способность удерживать фермент в процессе измерения ингибирующего действия ингибиторов обратимого действия.

3. Проведена кинетическая характеристика АХЭ на различных носителях в реакциях гидролиза АТХ и ингибирования лекарственными препаратами, применяемыми при лечении нейродегенеративных заболеваний.

4. Предложены высокочувствительные способы определения обратимых ингибиторов АХЭ, используемых в терапии нейродегенеративных заболеваний, с хроноамперометрической регистрацией сигнала ацетилхолинэстеразного биосенсора.

5. Проведена оценка потенциальных матричных эффектов и предложены простые протоколы пробоподготовки и проведения измерения ингибирующего действия указанных препаратов в искусственно приготовленных образцах урины.

Методология и методы исследования. Для подтверждения образования ПЭК и иммобилизации на их поверхности АХЭ использовали метод регистрации ППР. Изменение электрохимических характеристик СУЭ при их модификации УС, ФЦК, ПЭК и иммобилизации АХЭ изучали с помощью регистрации циклических вольтамперограмм и с помощью спектроскопии электрохимического импеданса. Регистрацию

аналитического сигнала ацетилхолинэстеразных сенсоров в присутствии субстрата и ингибиторов осуществляли, измеряя ток окисления тиохолина – продукта ферментативного гидролиза, в хроноамперометрическом режиме. Математическую обработку полученных данных и метрологическую оценку результатов эксперимента осуществляли с помощью специализированного программного комплекса OriginPro 8.1 (OringLab Corporation).

Положения, выносимые на защиту:

1. Образование ПЭК различного состава в виде тонкой пленки на поверхности ППР сенсора и иммобилизация АХЭ на поверхности образовавшихся комплексов. Зависимость характеристик фермента от состава комплекса и числа слоев ПЭК.
2. Модификация СУЭ с помощью УС и ФЦК с последующим формированием на них ПЭК для иммобилизации АХЭ для улучшения условий переноса электрона и регистрации сигнала хроноамперометрическим методом.
3. Выбор рабочих условий формирования биочувствительного слоя биосенсоров и измерения обратимого ингибирующего действия лекарственных препаратов, исходя из особенностей модификации электродов-трансдьюсеров.
4. Результаты определения физостигмина, донепезила, берберина, ГУП и ГАЛ с помощью разработанных амперометрических ацетилхолинэстеразных сенсоров, различающихся составом ПЭК, в модельных растворах и в искусственной урине. Оценка и способы нивелирования матричного эффекта пробы.

Личный вклад автора. Давлетшина Р.Р. формулировала цели и задачи исследования, выполнила литературный обзор библиографических данных по теме диссертации, провела эксперименты по модификации и характеристике электродов с помощью УС и ФЦК, осуществила эксперименты по получению и характеристике ПЭК, по иммобилизации на их поверхности АХЭ, по установлению аналитических и операционных характеристик разработанных биосенсоров при определении субстрата и обратимых ингибиторов ацетилхолинэстеразы. Давлетшина Р.Р. участвовала в критическом рассмотрении и обобщении полученных результатов экспериментов, ею также проводилась математическая и метрологическая обработка экспериментальных данных и подготовка публикаций по теме диссертации и самой диссертации.

Степень достоверности полученных результатов подтверждается применением комплекса современных физических методов исследования, включающих электрохимические, измерение ППР, спектроскопию электрохимического импеданса, основанных на использовании сертифицированного оборудования.

Апробация работы. По материалам научно-квалификационной работы опубликовано 4 статьи, из них 3 - в международных журналах, входящих в международные

системы цитирования Scopus и Web of Science, и одна статья - в отечественном журнале, входящем в список ВАК для опубликования результатов кандидатских, докторских диссертаций и систему Web of Science. Все полученные результаты опубликованы. Результаты диссертации докладывались и обсуждались на следующих конференциях: Третий съезд аналитиков России (Москва, 2017 г.), Ломоносов-2018 (Москва, 2018 г.), Четвертый междисциплинарный симпозиум по медицинской, органической и биологической химии и фармацевтике (Новый свет, 2018 г.), Материалы и технологии 21 века (Казань, 2018 г.), Итоговая научная конференция сотрудников Казанского университета за 2018 год (Казань, 2019 г.), XXI Менделеевский съезд по общей и прикладной химии (Санкт-Петербург, 2019г.), X Юбилейная всероссийская конференция по электрохимическим методам анализа «ЭМА-2020» (Казань, 2020 г.).

Связь работы с научными программами, планами, темами. Работа выполнена в рамках основного научного направления Химического института им. А.М. Бутлерова «Синтез, строение, реакционная способность и практически полезные свойства органических, элементоорганических и координационных соединений» и поддержана грантом РФФИ № 17-03-00381 «Новые подходы к повышению чувствительности определения обратимых ингибиторов - потенциальных фармпрепаратов от нейродегенеративных заболеваний с помощью электрохимических ацетилхолинэстеразных сенсоров».

Публикации. По теме диссертационного исследования опубликовано 10 печатных работ, из них 4 статьи в реферируемых журналах, входящих в библиографические базы данных Web of Science и Scopus и 6 тезисов доклада на всероссийских и международных конференциях. Соавторами в публикациях являлись: д.х.н. Евтюгин Г. А., научный руководитель, к.х.н. Иванов А.Н, студент Шарафиева И.Р., к.х.н. Шамагсумова Р.В., к.х.н. Евтюгин В.Г. принимали участие в изучении образования ПЭК.

Объем и структура работы. Диссертационная работа изложена на 132 страницах текста компьютерной верстки, включает 23 рисунка и 20 таблиц. Диссертация состоит из Введения, 5 глав, Заключение и Списка использованных библиографических источников, содержащего 245 ссылок на работы российских и зарубежных авторов.

Во **Введении** охарактеризована актуальность темы исследования, сформулированы цель и задачи для ее достижения, представлены положения, составляющие научную новизну, теоретическую и практическую значимость диссертационной работы, методологию исследования, положения, выносимые на защиту. Указаны личный вклад автора и сведения об апробации диссертации. Дана общая структура диссертации и число публикаций, в которых изложены полученные результаты.

Глава 1 (Обзор литературы) посвящена биосенсорам для определения ингибиторов холинэстераз. В частности, рассмотрены особенности взаимодействия холинэстераза - ингибитор, сборка холинэстеразных биосенсоров, характеристики холинэстеразных биосенсоров для определения необратимых ингибиторов фермента и лекарств, используемых при лечении нейродегенеративных заболеваний.

Глава 2 (Экспериментальная часть) содержит описание использованных в работе реактивов и оборудования, методик модификации электродов и иммобилизации фермента при создании биосенсоров, а также методики определения субстрата и ингибиторов ацетилхолинэстеразы с помощью биосенсоров с различным составом поверхностного слоя.

Глава 3 (Характеристика образования полиэлектролитных комплексов и иммобилизации на их поверхности АХЭ методом ППР) посвящена результатам, полученным с помощью метода ППР, при формировании полиэлектролитных комплексов и иммобилизации АХЭ на их поверхности.

В **Главе 4** (Влияние модификаторов ацетилхолинэстеразных сенсоров на их операционные характеристики и кинетические параметры гидролиза ацетилтиохолина) приведены характеристики модификаторов, улучшающих электрохимические условия регистрации аналитического сигнала в виде тока окисления тиохолина, а также рассмотрены операционные и кинетические характеристики биосенсоров при гидролизе АТХ, отличающихся составом модификаторов для иммобилизации и способами иммобилизации фермента.

Глава 5 (Характеристика биосенсоров при определении обратимых ингибиторов АХЭ) содержит результаты, полученные с использованием разработанных биосенсоров, отличающихся составом модификаторов для иммобилизации и способами иммобилизации фермента, при определении обратимых ингибиторов АХЭ, используемых в терапии нейродегенеративных заболеваний, в модельных растворах и в растворе искусственной урины.

Диссертация выполнена на кафедре аналитической химии Химического института им. А.М. Бутлерова ФГАОУ ВО «Казанский (Приволжский) федеральный университет».

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Экспериментальная часть

В качестве полиэлектролитов для формирования ПЭК были использованы ПАА ($M_w \approx 65$ кДа), ПДДА ($M_w \approx 400-500$ кДа), ПСС ($M_w \approx 1$ МДа) и дендример ПАМAM с этилендиаминновым ядром поколения 4 ($M_w = 14214.17$ Да) и ДНК из эритроцитов цыпленка ($M_w \approx 1.2$ МДа). Растворы полиэлектролитов готовили путем растворения точной навески в необходимом объеме деионизированной воды.

ППР сигнал в виде резонансного угла падения лазерного излучения, выраженного в миллиградусах (мград., m°), регистрировался на приборе AUTOLAB ESPRIT (Голландия). Перед формированием ПЭК золотую поверхность ППР чипа модифицировали 1мМ раствором 11-мекраптоундекаовой кислоты в этаноле. Последовательное осаждение противоположно заряженных полиэлектролитов проводили, путем инкубирования рабочей поверхности ППР чипа в 100 мкл раствора очередного полиэлектролита в течение 10 минут. Сорбцию АХЭ на поверхности ППР чипов, модифицированных ПЭК, осуществляли, помещая 70 мкл раствора АХЭ с определенной концентрацией в ППР ячейку на 30 минут. Аналитическим сигналом, пропорциональным количеству адсорбированного фермента, являлась разница между углом ППР до и после инкубирования чипа с раствором фермента. Рассчитанный максимальный ППР отклик при полном заполнении поверхности сенсора глобулами АХЭ составляет 669 миллиградусов [Lahiri J. Anal. Chem. –1999. – V.71, № 4. – P.777–790.]. Это значение было использовано для вычисления эффективности иммобилизации АХЭ (I_m) выраженной в процентах (1), где ϑ - сигнал ППР, соответствующий определенной концентрации использованного раствора фермента.

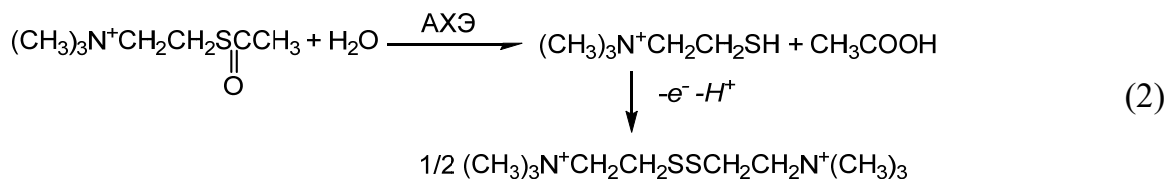
$$I_m = \frac{\vartheta}{669} 100\%, \quad (1)$$

Электрохимические сенсоры были созданы на основе СУЭ с площадью рабочей поверхности 2.83 мм^2 , модифицированных УС и ФЦК. На поверхности модифицированных СУЭ иммобилизовали АХЭ из электрического угря с удельной активностью 1468 ЕА/мг протеина. Ковалентная иммобилизации АХЭ осуществлялась карбодиимдным метод с использованием N'-этилкарбодиимида (EDC) и N-гидроксисукцинимидом (NHS). Для нековалентной иммобилизации фермента были использованы ПЭК, формируемые на поверхности СУЭ, модифицированных УС и ФЦК, последовательным инкубированием в растворах противоположно заряженных полиэлектролитов в течение 10 минут. Иммобилизацию АХЭ на поверхности СУЭ, модифицированных ПЭК, осуществляли, помещая на поверхность сенсора 1.5 мкл раствора АХЭ 0.05 ЕА / мкл (если не указано иное) до полного высыхания. В некото-

рых случаях поверх иммобилизованной АХЭ наносили дополнительные слои электролитов способом, описанным выше. Полученные ацетилхолинэстеразные биосенсоры хранили в сухом виде при температуре +4° С.

Вольтамперограммы и хроноамперограммы регистрировали с помощью потенциостата-гальваностата AUTOLAB PGSTAT 302N с программным обеспечением NOVA 1.11 (Metrohm Autolab B.V., Нидерланды). Измерения спектроскопии электрохимического импеданса (СЭИ) проводились с использованием модуля FRA потенциостата-гальваностата AUTOLAB PGSTAT 302 N в присутствии 10 мМ K₃[Fe(CN)₆] и 10 мМ K₄[Fe(CN)₆] в 0.05 М фосфатном буферном растворе, содержащем 0.1 М NaCl, pH = 7.8 (ФБ). Спектры импеданса регистрировали в диапазоне частот от 105 до 0.04 Гц при формальном стандартном потенциале феррицианида, определяемом как полусумма пиковых потенциалов. Параметры EIS рассчитывались с использованием программного обеспечения поставщика NOVA 1.11 с эквивалентной схемой Рэндлса R(C[RW]).

Субстратом ферментативной реакции с АХЭ служил АТХ. Активность АХЭ определяли в режиме хроноамперометрии, измеряя ток окисления тиохолина - продукта ферментативного гидролиза АТХ (2).



Для этого электрод с иммобилизованной АХЭ помещали в ФБ и поляризовали при +200 мВ при магнитном перемешивании в течение 5–10 с, затем регистрировали анодный ток в стационарных условиях без перемешивания раствора в течение 180 с до установления стационарного значения тока i_0 . Далее в ячейку добавляли раствор АТХ, содержимое перемешивали в течение 5–10 с и после остановки повторяли измерение тока i_s , соответствующего окислению тиохолина, образующегося в ферментативной реакции. Аналитическим сигналом (i_0), отвечающим активности фермента при определенной концентрации субстрата, служила разность токов, измеренных в присутствии (i_s) и в отсутствие субстрата (i_B): $i_0 = i_s - i_B$. Степень ингибирования иммобилизованной АХЭ устанавливали, измеряя хроноамперометрический отклик сенсора в растворе, содержащем субстрат, в отсутствие и в присутствии ингибитора. Для этого после измерения отклика на субстрат в виде тока окисления тиохолина (i_0) в тот же раствор добавляли ингибитор и через минуту опять проводили измерение отклика (i_i).

Степени ингибирования (I%) рассчитывали по формуле $I\% = \frac{i_0 - i_i}{i_0} \cdot 100\%$.

Характеристика образования полиэлектролитных комплексов и иммобилизации на их поверхности АХЭ методом поверхностного плазмонного резонанса.

Анализ ППР сигнала, регистрируемого при формировании ПЭК, говорит о значительно большем количестве образующихся комплексов при использовании ПАА в качестве поликатиона по сравнению с ПДДА. Уменьшение концентрации ПАА с 0.5 до 0.1 мг/мл довольно значительно снижает количество образующихся комплексов с PSS. Замена PSS на ДНК при образовании комплексов с ПАА кардинально усиливает рост полиэлектролитного покрытия. При использовании ПАМАМ в качестве поликатиона, следует отметить необычное уменьшение количества образующихся комплексов PSS/ПАМАМ при увеличении концентрации раствора ПАМАМ. Это противоположно свойствам других изученных полиэлектролитов (ПАА, PSS, ДНК), когда увеличение их концентрации приводит к увеличению количества образующихся ПЭК.

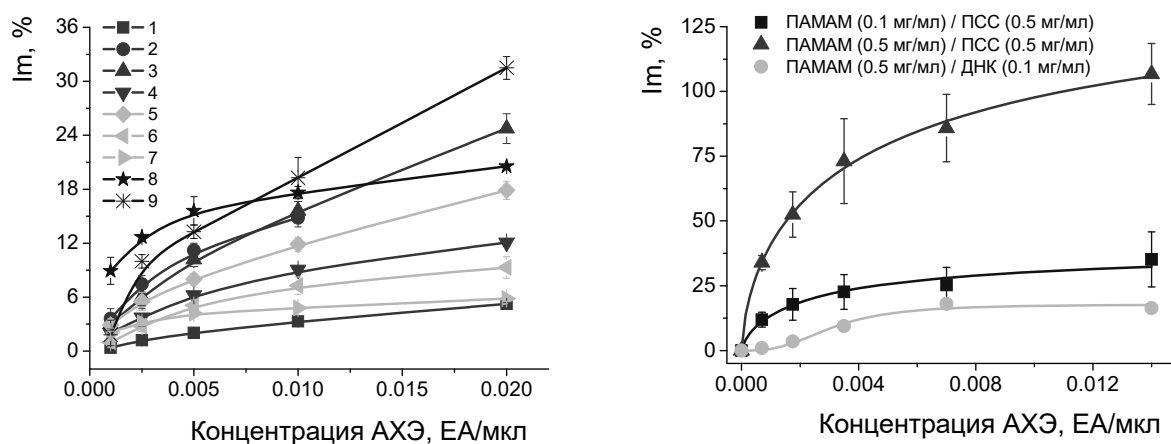


Рисунок 1 - Зависимости Im от концентрации АХЭ в растворе для инкубирования ППР сенсоров, модифицированных ПЭК. 1 - ПАА (0.5 мг/мл) 1 слой; 2 - ПАА (0.5 мг/мл)+ПСС (0.5 мг/мл) 3 слоя; 3 - ПАА (0.1 мг/мл)+ПСС (0.5 мг/мл) 3 слоя; 4 - ПАА (0.1 мг/мл)+ПСС (0.5 мг/мл) 4 слоя; 5 - ПДДА (0.5 мг/мл)+ПСС (0.5 мг/мл) 3 слоя; 6 - ПДДА (0.5 мг/мл)+ПСС (0.5 мг/мл) 5 слоев; 7 - ПДДА (0.5 мг/мл)+ПСС (0.5 мг/мл) 6 слоев; 8 - ПАА (0.02 мг/мл)+ДНК (0.1 мг/мл) 3 слоя; 9 - ПАА (0.1 мг/мл)+ДНК (0.02 мг/мл) 3 слоя.

Для определения влияния состава ПЭК на эффективность иммобилизации АХЭ были получены зависимости Im от концентрации АХЭ в растворе для инкубирования сенсора (рис. 1). Значительной емкостью обладают покрытия с использованием ПАА в качестве поликатиона. Добавление пары слоев PSS/ПАА кардинальным образом увеличивает способность поверхности адсорбировать глобулы фермента. Добавление четвертого слоя полиэлектролита в виде PSS ожидаемо уменьшает емкость из-за электростатического отталкивания отрицательно заряженного полимера и глобул фермента. Замена поликатиона с ПАА на ПДДА в комплексах с PSS, приводит к уменьшению адсорбционной емкости покрытия. Снижение емкости также происходит при увеличении количества слоев. Использование ДНК в сравнении с PSS увеличивает эффективность иммобилизации АХЭ на поверхности ПЭК с ПАА, и умень-

шает на поверхности ПЭК с ПАМAM. Увеличение слоев полиэлектролитов одинакового состава приводит к снижению количества иммобилизуемого фермента.

Из всех изученных комбинаций компонентов комплексов наибольшая эффективность иммобилизации АХЭ наблюдается на поверхности ПЭК, полученных с использованием растворов ПАМAM (0.5 мг/мл) и ПСС (0.5 мг/мл). Учитывая тот факт, что использование ПАМAM, ПАА и ДНК, приводит к значительному усилению роста ПЭК за счет увеличения внутренней и внешней шероховатости покрытий, можно сделать вывод, что именно шероховатость комплексов является ключевым фактором, позволяющим увеличить сорбционную емкость поверхности по отношению к глобулам АХЭ.

Влияние модификаторов холинэстеразных сенсоров на их операционные характеристики и кинетические параметры гидролиза ацетилтиохолина

Характеристика модификаторов СУЭ при окислении тиохолина. Для определения тиохолина СУЭ модифицировались смесью УС и ФЦК. На рисунке 2 представлены циклические вольтамперограммы (ЦВА), регистрируемые в ФБ, содержащем 1 мМ тиохолина, с использованием СУЭ после нанесения на них различных модификаторов.

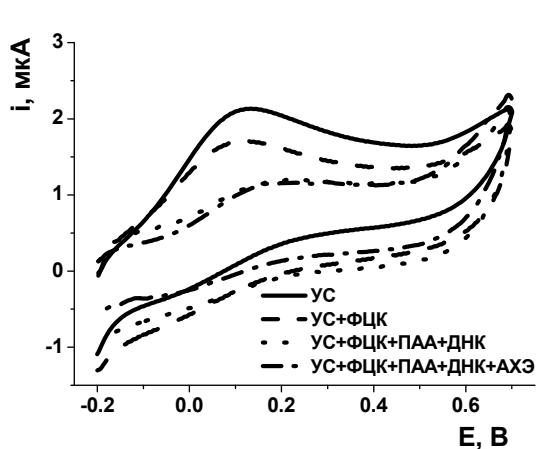


Рисунок 2 - Примеры ЦВА, регистрируемых в ФБ, содержащем 1 мМ тиохолина, на СУЭ, модифицированных УС, ФЦК, ПАА, ДНК и иммобилизованной АХЭ. Скорость сканирования потенциала 100 мВ/с.

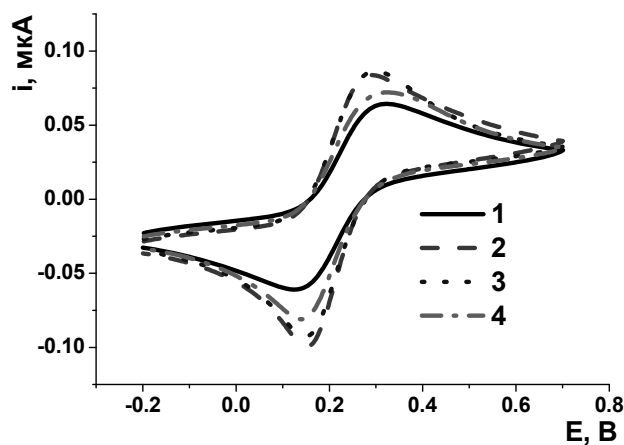


Рисунок 3 - Примеры ЦВА, регистрируемых в ФБ, содержащем 0.01 М $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}$ и 0.01 М $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-}$, на СУЭ, модифицированных: 1 – без модификации; 2 - УС и ФЦК; 3 - УС-ФЦК, ПАА-ДНК; 4 - УС-ФЦК, ПАА-ДНК, АХЭ. Скорость сканирования потенциала 100 мВ/с.

Использование ФЦК совместно с УС уменьшает потенциал окисления тиохолина на 40-50 мВ, однако вместе с этим из-за уменьшения электропроводности покрытия снижается ток. Присутствие на поверхности электрода ПЭК снижает ток и увеличивает потенциал окисления тиохолина до +200 мВ. Иммобилизация фермента не оказывает значительного влияния ни на потенциал, ни на ток окисления тиохолина.

Влияние модификаторов на электрохимические характеристики СУЭ было также изучено с использованием $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ в качестве редокс-индикатора в режимах ЦВА и СЭИ. Модификация СУЭ слоем УС-ФЦК приводит к 15% увеличению пиковых токов и незначительному уменьшению разницы потенциалов пиков, что свидетельствует об увеличении эффективной площади электрода и скорости электронного переноса (рис. 3). По данным СЭИ нанесение слоя УС-ФЦК приводит к уменьшению сопротивления переноса заряда относительно немодифицированного электрода с 1.25 ± 0.10 кОм до 0.67 ± 0.04 кОм. Последующее формирование ПЭК на основе ПАА-ДНК увеличивает сопротивление до 1.11 ± 0.10 кОм, которое при иммобилизации фермента опять снижается до 0.97 ± 0.6 кОм.

Амперометрический холинэстеразный сенсор с ковалентной иммобилизацией АХЭ. Для ковалентной иммобилизации АХЭ на поверхности СУЭ, модифицированных УС и ФЦК, карбоксильные группы в составе УС активировались свежеприготовленным раствором EDC и NHS, после чего на поверхность сенсора добавляли раствор АХЭ. Ковалентная иммобилизация фермента обеспечивалась в результате образования амидных связей между активированными карбоксильными группами УС и аминоклассами на поверхности глобулы фермента. Зависимость тока окисления тиохолина от концентрации АТХ линейна в интервале концентраций субстрата $1.0 \cdot 10^{-6} - 1.0 \cdot 10^{-3}$ М. Этому интервалу соответствует градуировочное уравнение (3). Кажущуюся константу Михаэлиса K_M для реакции ферментативного гидролиза АТХ вычисляли методом Лайнуивера-Берка путем построения зависимости в двойных обратных координатах $1/i - 1/C_{\text{АТХ}}$. Полученное значение $K_M = 0.67$ мМ.

$$(i, A) = 2.77 \cdot 10^{-8} + 4.41 \cdot 10^{-4} \cdot (C_{\text{АТХ}}, M), R = 0.9972, n = 6 \quad (3)$$

Амперометрические холинэстеразные сенсоры с нековалентной иммобилизацией АХЭ на поверхности полиэлектролитных комплексов. Для оценки влияния состава ПЭК на эффективность нековалентной иммобилизации АХЭ и операционные характеристики сенсоров при определении АТХ были получены зависимости токов окисления тиохолина от концентрации АТХ с использованием СУЭ, модифицированных различными комбинациями полиэлектролитов. Для получения ПЭК были использованы следующие комбинации полиэлектролитов: ПАА/ПСС, ПДДА/ПСС, ПАА/ДНК, ПАМАМ/ПСС, ПАМАМ/ДНК. Эффективность иммобилизации оценивали по величине i_{max} . Также эти зависимости использовали для определения характеристик фермент-субстратного взаимодействия в виде K_M . Полученные значения i_{max} и K_M представлены в таблице 1.

Таблица 1. Определенные i_{\max} и K_M , их стандартная ошибка и коэффициент детерминации, для зависимостей тока окисления тиохалина от концентрации субстрата, полученных с различными комбинациями ПЭК, использованных для иммобилизации АХЭ. Концентрации использованных полиэлектролитов (если не указано в таблице) ПАА 0.5 мг/мл, ПСС 0.5 мг/мл, ПАМАМ 0.5 мг/мл, ДНК 0.02 мг/мл, АХЭ 0.05 ЕА/мкл.

<i>Состав полиэлектролитных комплексов</i>	<i>$i_{\max}, A (Std.Err)$</i>	<i>$K_M, M (Std.Err)$</i>	<i>R^2</i>	<i>$i_{\max}/K_M \cdot 10^4$</i>
АХЭ	$6.81 (1.07) \cdot 10^{-7}$	$6.97 (3.29) \cdot 10^{-4}$	0.8879	9.77
ПАА+АХЭ	$6.46 (0.28) \cdot 10^{-7}$	$1.05 (0.12) \cdot 10^{-3}$	0.9929	6.15
ПАА+ПСС+АХЭ	$1.11 (0.02) \cdot 10^{-7}$	$4.84 (0.35) \cdot 10^{-4}$	0.9968	2.29
ПАА+ПСС+ПАА+АХЭ	$3.83 (0.51) \cdot 10^{-7}$	$1.89 (0.35) \cdot 10^{-3}$	0.9967	2.02
(ПАА+ПСС) ₂ +АХЭ	$9.95 (2.39) \cdot 10^{-8}$	$5.85 (0.29) \cdot 10^{-4}$	0.9993	1.70
(ПАА+ПСС) ₂ +ПАА+АХЭ	$3.36 (0.09) \cdot 10^{-7}$	$1.15 (0.07) \cdot 10^{-3}$	0.9976	2.92
(ПАА+ПСС) ₃ +АХЭ	$1.48 (0.05) \cdot 10^{-8}$	$5.88 (0.39) \cdot 10^{-4}$	0.9987	0.25
ПАА+ПСС+ПАА+АХЭ+ПСС	$4.68 (0.07) \cdot 10^{-8}$	$5.05 (1.24) \cdot 10^{-4}$	0.9430	0.92
ПДДА+АХЭ	$7.21 (0.14) \cdot 10^{-7}$	$1.63 (0.06) \cdot 10^{-3}$	0.9998	4.42
ПДДА+ПСС+АХЭ	$7.73 (0.48) \cdot 10^{-7}$	$2.16 (0.02) \cdot 10^{-3}$	0.9983	3.57
ПДДА+ПСС+ПДДА+АХЭ	$4.22 (0.09) \cdot 10^{-7}$	$9.34 (0.47) \cdot 10^{-4}$	0.9992	4.51
(ПДДА+ПСС) ₂ +АХЭ	$3.59 (0.11) \cdot 10^{-7}$	$6.15 (0.56) \cdot 10^{-4}$	0.9951	5.83
(ПДДА+ПСС) ₂ +ПДДА+АХЭ	$3.57 (0.10) \cdot 10^{-7}$	$6.45 (0.54) \cdot 10^{-4}$	0.9958	5.53
(ПДДА+ПСС) ₃ +АХЭ	$2.82 (0.06) \cdot 10^{-7}$	$4.83 (0.32) \cdot 10^{-4}$	0.9973	5.83
ПАА(0.02мг/мл)+ДНК(0.1мг/мл)+АХЭ	$3.12 (0.14) \cdot 10^{-6}$	$3.45 (0.39) \cdot 10^{-3}$	0.9983	9.03
ПАА(0.1мг/мл)+ДНК(0.02мг/мл)+АХЭ	$4.36 (0.23) \cdot 10^{-6}$	$5.83 (0.99) \cdot 10^{-3}$	0.9979	7.47
ПАА(0.1мг/мл)+ДНК(0.1мг/мл) +АХЭ	$2.16 (0.41) \cdot 10^{-6}$	$2.98 (0.59) \cdot 10^{-3}$	0.9931	7.26
ПАА(0.02мг/мл)+ДНК(0.02мг/мл)+АХЭ	$3.38 (0.01) \cdot 10^{-6}$	$5.13 (0.13) \cdot 10^{-3}$	0.9958	6.58
ПАА(0.1мг/мл)+ДНК+АХЭ	$1.78 (0.02) \cdot 10^{-6}$	$2.78 (0.11) \cdot 10^{-3}$	0.9990	6.36
ПАА(0.1мг/мл)+ДНК+ПАА+АХЭ	$0.99 (0.02) \cdot 10^{-6}$	$1.51 (0.09) \cdot 10^{-3}$	0.9977	6.60
ПАА(0.1мг/мл)+ДНК+ПАА+АХЭ+ДНК	$1.35 (0.03) \cdot 10^{-6}$	$2.48 (0.21) \cdot 10^{-3}$	0.9969	5.40
ПАА(0.1мг/мл)+ДНК+ПАА+АХЭ+ПСС	$1.06 (0.02) \cdot 10^{-6}$	$1.64 (0.13) \cdot 10^{-3}$	0.9969	6.63
ПАА(0.1мг/мл)+ДНК+АХЭ+ПАА+ДНК	$0.41 (0.08) \cdot 10^{-6}$	$0.87 (0.08) \cdot 10^{-3}$	0.9944	4.56
ПАМАМ+ПСС+АХЭ (0.05 ЕА/мкл)	$1.20 (0.08) \cdot 10^{-6}$	$1.46 (0.30) \cdot 10^{-3}$	0.9367	8.57
ПАМАМ+ПСС+АХЭ (0.025 ЕА/мкл)	$0.85 (0.02) \cdot 10^{-6}$	$1.12 (0.08) \cdot 10^{-3}$	0.9880	7.72
ПАМАМ+ПСС+АХЭ (0.01 ЕА/мкл)	$0.33 (0.01) \cdot 10^{-6}$	$0.66 (0.11) \cdot 10^{-3}$	0.9560	4.71
ПАМАМ+ДНК+АХЭ (0.05 ЕА/мкл)	$0.72 (0.08) \cdot 10^{-6}$	$1.02 (0.34) \cdot 10^{-3}$	0.8971	7.20
ПАМАМ+ ДНК +АХЭ (0.025 ЕА/мкл)	$0.24 (0.01) \cdot 10^{-6}$	$0.49 (0.10) \cdot 10^{-3}$	0.9227	4.80
ПАМАМ+ ДНК +АХЭ (0.01 ЕА/мкл)	$0.06 (0.01) \cdot 10^{-6}$	$1.98 (0.56) \cdot 10^{-3}$	0.8455	0.32

Среди выявленных закономерностей можно отметить следующие: увеличение i_{\max} часто сопровождается также и увеличением K_M ; увеличение количества слоев полиэлектролитов приводит к снижению значений i_{\max} ; для ПЭК из ПАА/ПСС i_{\max} больше, когда поверхностным слоем является ПАА, для ПЭК из ПДДА/ПСС и ПАА/ДНК зависимость обратная; добавление дополнительного слоя полианиона поверх иммобилизованной АХЭ на слое поликатиона дополнительно стабилизирует

структуру комплексов и препятствует спонтанной десорбции фермента, при этом в случае ПЭК ПАА/ПСС существенным образом снижается K_M ; использование ПЭК из ПАА/ДНК по сравнению с ПАА/ПСС увеличивает значения как i_{\max} так и K_M ; сравнимые значения i_{\max} наблюдаются для ПЭК из ПАМAM/ПСС; в случае ПЭК из ПАМAM/ДНК значения i_{\max} меньше, чем для ПЭК из ПАМAM/ПСС; уменьшение концентрации раствора АХЭ, используемого при иммобилизации приводит к закономерному снижению i_{\max} , при этом также происходит снижение значений K_M .

Характеристика биосенсоров при определении обратимых ингибиторов АХЭ

При определении ингибиторов предел обнаружения определяли как концентрацию ингибитора, соответствующую степени ингибирования ($I, \%$) АХЭ, равной 15% (IC_{15}). Такая величина степени ингибирования принимается значимым минимально детектируемым значением, в соответствии с правилом 3σ , где в данном случае σ - стандартное отклонение величины измеряемых токов, которое в случае твердотельных электродов обычно не превышает 5%. Из-за нелинейного вида градуировочных зависимостей степени ингибирования от концентрации ингибитора для большинства биосенсоров, характеристика чувствительности биосенсоров по отношению к определяемым ингибиторам была выражена в виде концентрации ингибитора, вызывающей 50% степень ингибирования АХЭ (IC_{50}).

Холинэстеразный сенсор для определения физостигмина (ФИЗ). Для определения ФИЗ был использован биосенсор с ковалентной точечной иммобилизацией АХЭ. Несмотря на то, что ФИЗ считается обратимым ингибитором АХЭ, диссоциация фермент-ингибиторного комплекса происходит медленно. Полученная зависимость степени ингибирования АХЭ при увеличении времени инкубирования с 5 до 60 мин может быть описана логистической функцией, в соответствии с которой верхний предел изменения степени ингибирования составил 60-65 %. Квазиобратимый характер ингибирования позволяет проводить инкубирование сенсора в отдельном растворе ФИЗ. Полученная зависимость $I, \%$ от pH раствора ФИЗ выявила оптимум ингибирования в области $pH = 7.0$. Полученный биосенсор был использован для установления аналитических характеристик определения физостигмина в ФБ при $pH = 7.0$ и времени инкубирования 15 мин. Зависимость степени ингибирования АХЭ ($I, \%$) от концентрации физостигмина (C_I), полученная в этих условиях, линейна в полулогарифмических координатах $I, \%$ - $\lg C_I$ в диапазоне концентраций физостигмина 0.3 нМ – 10.0 мкМ. Линейный участок зависимости может быть описан уравнением $I, \% = 175.0 + 16.42 \cdot \lg(C_I, M)$ ($R = 0.9991$, $n = 6$). В соответствии с этим уравнением предел обнаружения физостигмина $IC_{15} = 1.8 \cdot 10^{-10}$ М, при этом $IC_{50} = 2.5 \cdot 10^{-8}$ М. Найден-

ное значение кажущейся константы бимолекулярного взаимодействия составило $0.63 \text{ мкМ}^{-1} \cdot \text{мин}^{-1}$.

Холинэстеразные сенсоры для определения донепезила и берберина.

Для определения донепезила (ДОН) и берберина (БЕР) были использованы холинэстеразные сенсоры с нековалентной иммобилизацией АХЭ со схемой иммобилизации (ПАА+ПСС+ПАА+АХЭ+ПСС) на ПЭК, сформированных из растворов полиэлектролитов с концентрациями 0.5 мг/мл . Выбор обусловлен низким значением K_M ($5.05 \cdot 10^{-4} \text{ М}$) и тем, что слой ПСС, адсорбированный поверх иммобилизованной АХЭ, дополнительно стабилизировал структуру комплексов и препятствовал спонтанной десорбции фермента. Зависимость $I, \%$ от времени инкубирования сенсора в растворе с ингибитором отсутствует как для ДОН, так и для БЕР, что свидетельствует о полностью обратимом характере ингибирования. Вследствие этого измерение ингибирования необходимо проводить в одном растворе в присутствии и субстрата, и ингибитора. Полученные зависимости $I, \%$ от pH растворов для обоих ингибиторов показывают, что оптимум наблюдается вблизи pH 7.8. Это значение совпадает с оптимумом каталитической активности фермента. Согласно кинетике конкурентного обратимого ингибирования, степень ингибирования фермента в одних и тех же условиях должна зависеть от соотношения в растворе концентраций ингибитора и субстрата. Для установления оптимальной концентрации субстрата были получены зависимости $I, \%$ и регистрируемого тока окисления тиюхолина от концентрации субстрата. Исходя из соотношения погрешности измерения и величины полученной при этом степени ингибирования, признано целесообразным последующие измерения проводить с концентрацией АТХ, равной 0.2 мМ . Созданный биосенсор был использован для установления аналитических характеристик определения ДОН и БЕР в ФБ.

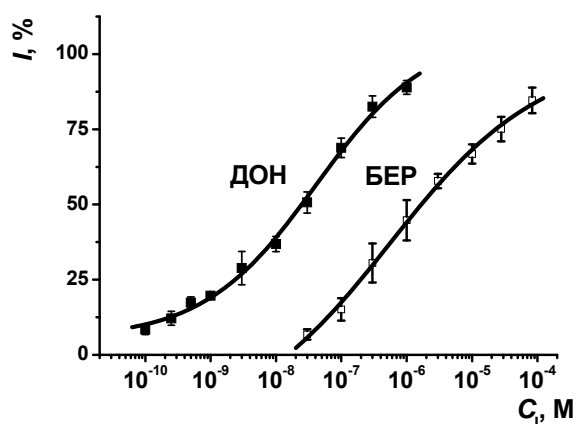


Рисунок 4 - Зависимости степени ингибирования АХЭ от концентрации ДОН и БЕР в ФБ. Концентрация АТХ 0.2 мМ .

На рис. 4 точками представлена зависимость степени ингибирования от концентрации ДОН и БЕР в ФБ. Линии представляет собой результат параметрической идентификации параметров аппроксимирующей модели согласно выражению (4), которая достаточно полно характеризует полученные зависимости. Значения параметров выражения (4) и их стандартная ошибка для

полученной зависимости следующие. Для ДОН: $A_1 = 5.53$ (3.65), $A_2 = 107.3$ (9.2), $b = 4.07 \cdot 10^{-8}$ ($1.42 \cdot 10^{-8}$), $p = 0.5068$ (0.0866), коэффициент детерминации $R^2 = 0.9964$, $IC_{15} = 0.46$ нМ, $IC_{50} = 24.72$ нМ. Для БЕР: $A_1 = -25.95$ (22.01), $A_2 = 99.89$ (11.53), $b = 5.48 \cdot 10^{-7}$ ($3.51 \cdot 10^{-7}$), $p = 0.3756$ (0.1167), коэффициент детерминации $R^2 = 0.9972$, $IC_{15} = 78.8$ нМ, $IC_{50} = 1.68$ мкМ.

$$I, \% = \frac{A_1 - A_2}{1 + (C_I / b)^p} + A_2 \quad (4)$$

Полученная модель была использована для определения ДОН в растворе искусственной урины (ИУ) методом введения - найдено. В раствор искусственной урины добавляли аликвоту раствора донепезила, получая концентрацию ингибитора 1.2 нМ. В полученном растворе рН доводили до значения 7.8 и разбавляли ФБ в соотношении 1:1 и в нем производили измерение степени ингибирования. Определенная концентрация ДОН в исходном растворе ИУ составила 1.24 ± 0.36 нМ ($n=5$, $p=0.95$), что в процентном выражении от концентрации исходного раствора составляет 103 ± 30 %. Таким образом, обнаружено незначительное влияние матрицы ИУ, приводящее к усилению ингибирующего действия ДОН. Значительная величина ошибки связана с пологим участком градуировочного графика при низких концентрациях ДОН, где небольшие изменения степени ингибирования связаны со значительными вариациями концентрации ингибитора. При определении БЕР исходный раствор ИУ с 0.40 мкМ БЕР разбавляли ФБ в соотношении 1:3 и в нем производили измерение степени ингибирования. Определенная концентрация БЕР в исходном растворе ИУ составила 0.42 ± 0.048 нМ ($n=5$, $p=0.95$), что в процентном выражении от концентрации исходного раствора составляет 105 ± 12 %. Вывод из организма берберина в моче не является основным и осуществляется как в виде исходного вещества, так и в виде метаболитов, среди которых основными являются берберрубин и талифендин, причем берберрубин обладает даже несколько большим антихолинэстеразным действием. Таким образом, разработанный биосенсор может быть использован для полуколичественного обнаружения берберина.

Холинэстеразные сенсоры для определения ГУП и ГАЛ. Для ГУП и ГАЛ были использованы ацетилхолинэстеразные сенсоры на основе ПЭК, имеющих в своем составе ПАА, ПАММ, ПСС и ДНК. Для сенсоров были получены зависимости степени ингибирования АХЭ от концентрации ГУП и ГАЛ. Как и в случае зависимостей степени ингибирования от концентрации донепезила и берберина они описываются логистической функцией (4). Параметры модели и аналитические характеристики

сенсоров с различным составом ПЭК при определении ГУП и ГАЛ представлены в таблицах 2 и 3 соответственно.

Таблица 2. Параметры аппроксимирующей модели (4) и показатели IC15, IC50 для сенсоров с различным составом ПЭК при определении ГУП в ФБ. Концентрации растворов полиэлектролитов при формировании ПЭК ПАА/ДНК: ПАА 0.1мг/мл и ДНК 0.02мг/мл, при формировании ПЭК ПАМАМ /ДНК и ПАМАМ/ПСС: ПАМАМ 0.5 мг/мл, ПСС 0.5 мг/мл, ДНК 0.02 мг/мл. Концентрация раствора АХЭ использованного при иммобилизации 0.05 ЕА/мкл, если не указано в скобках.

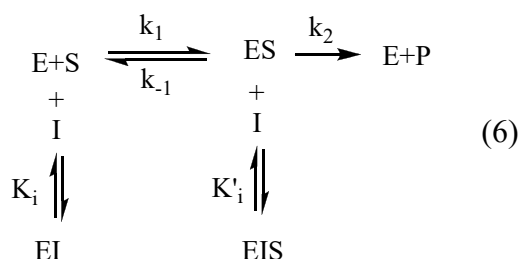
Состав покрытия	A ₁	A ₂	b·10 ⁷	p	R ²	IC15, нМ	IC50, нМ
ПАА+ДНК+АХЭ	11	100	2.7	0.83	0.9977	8	198
ПАА+ДНК+ПАА+АХЭ	9	98	1.6	1.12	0.9990	15	138
ПАА+ДНК+ПАА+АХЭ+ДНК	5	96	4.0	1.19	0.9995	70	398
ПАА+ДНК+ПАА+АХЭ+ПСС	12	98	2.4	1.09	0.9961	13	199
ПАА+ДНК+АХЭ+ПАА+ДНК	8	95	1.7	1.21	0.9981	24	166
ПАМАМ+ДНК+АХЭ (0.05)	4	108	5.2	1.02	0.9991	65	422
ПАМАМ+ДНК+АХЭ (0.025)	4	96	2.0	1.25	0.9994	39	198
ПАМАМ+ДНК+АХЭ (0.01)	0	149	10.4	0.59	0.9999	25	324
ПАМАМ+ПСС+АХЭ (0.05)	11	98	2.2	1.28	0.9989	20	187
ПАМАМ+ПСС+АХЭ (0.025)	10	98	1.9	1.11	0.9973	15	163
ПАМАМ+ПСС+АХЭ (0.01)	8	107	1.8	0.86	0.9988	9	125

Таблица 3. Параметры аппроксимирующей модели (4) и показатели IC15, IC50 для сенсоров при определении ГАЛ в ФБ2. Концентрации растворов полиэлектролитов при формировании ПЭК: ПАМАМ и ПСС 0.5 мг/мл, ДНК 0.02 мг/мл. Концентрация раствора АХЭ, использованного при иммобилизации 0.025 ЕА/мкл.

Состав покрытия	A ₁	A ₂	b·10 ⁷	p	R ²	IC15, нМ	IC50, нМ
ПАМАМ+ДНК+АХЭ	0	96	5.4	0.94	0.9987	89	587
ПАМАМ+ПСС+АХЭ	0	88	4.8	1.07	0.9999	107	607

Использование ПАМАМ вместо ПАА в сенсорах с ДНК при определении ГУП существенным образом увеличивает значения IC15 и IC50. При этом, сенсоры на основе ПЭК ПАМАМ/ПСС показывают значения IC15 и IC50 сравнимые с сенсорами

на основе ПАА/ДНК. Напротив, в случае ГАЛ сенсоры на основе ПАМAM/ДНК показывают меньшие значения IC15 и IC50 в сравнении с сенсорами на основе ПАМAM/ПСС. Наименьший предел обнаружения ГУП показал сенсор с составом ПЭК ПАА+ДНК+АХЭ. Этот сенсор был использован для установления механизма ингибирования ГУП.



Значения констант диссоциации ферментингибиторного (K_i) и ферментингибиторно-субстратного комплекса (K'_i), соответствующие схеме 6, составили $K_i = (4.52 \pm 0.85) \cdot 10^{-7}$ М, $K'_i = (2.24 \pm 0.79) \cdot 10^{-7}$ М

($n = 3$, $P = 0.95$). Это может свидетельствовать о неконкурентном типе ингибирования с преобладанием бесконкурентного типа (при котором $K_i \gg K'_i$).

Также сенсор с составом ПЭК ПАА+ДНК+АХЭ был использован для установления аналитических характеристик определения ГУП и ГАЛ в растворе фосфатного буфера с составом 20 мМ KH_2PO_4 , 10 мМ CaCl_2 , 6 мМ MgCl_2 , 16 мМ Na_2SO_4 , 21 мМ KCl , 18 мМ NH_4Cl с pH 7.8 (ФБ2). Соответствующие градуировочные зависимости представлены на рисунке 5.

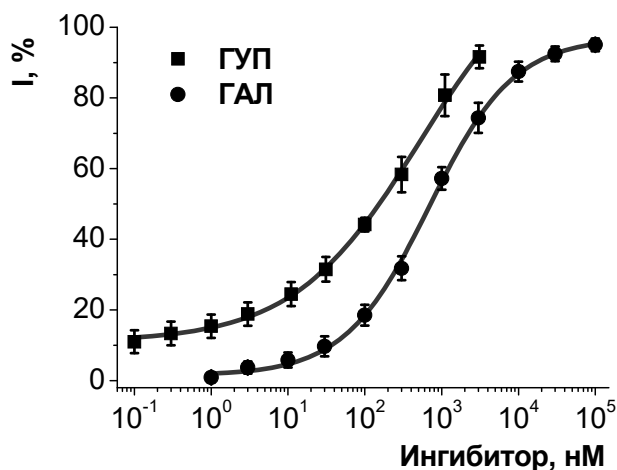


Рисунок 5 - Зависимости степени ингибирования АХЭ от концентрации ДОН и БЕР в ФБ2, полученные с сенсором с ПЭК ПАА+ДНК+АХЭ. Концентрация АТХ 0.2 мМ.

Значения параметров выражения (4) и их стандартная ошибка для полученной зависимости следующие. Для ГУП: $A_1 = 11.00$ (1.15), $A_2 = 124.1$ (9.4), $b = 5.170$ ($1.736 \cdot 10^{-7}$), $p = 0.5287$ (0.0484), коэффициент детерминации $R^2 = 0.9988$, IC15 = 1.0 нМ, IC50 = 15.3 нМ. Для ГАЛ: $A_1 = 1.436$ (0.637), $A_2 = 97.12$ (1.10), $b = 6.885$ ($0.503 \cdot 10^{-7}$), $p = 0.7903$ (0.0420), коэффициент детерминации $R^2 = 0.9995$, IC15 = 70.5 нМ, IC50 = 715 нМ.

Этот же сенсор был использован для определения ГУП и ГАЛ в растворе ИУ методом введения - найдено. В раствор ИУ добавляли аликвоту раствора ингибитора. В полученном растворе pH довели до значения 7.8 и разбавляли его раствором ФБ2 в соотношении 1:1. В полученном рас-

творе производили измерение степени ингибирования, регистрируя ток окисления тиохалина в присутствии АТХ и ингибитора. Сама матрица разбавленного раствора ИУ в отсутствии ингибитора не оказывала ингибирующего действия на иммобилизованную АХЭ. При исходной концентрации 10.00 нМ, определенная концентрация ГУП в исходном растворе ИУ составила 10.27 ± 1.53 нМ ($n = 5$, $P = 0.95$), что в процентном выражении от исходной концентрации составляет 102.7 ± 15.3 %. При исходной концентрации 0.200 мкМ, определенная концентрация ГАЛ в исходном растворе ИУ составила 0.205 ± 0.012 мкМ ($n = 5$, $P = 0.95$), что в процентном выражении от исходной концентрации составляет 102.5 ± 6.0 %. Таким образом, матрица ИУ незначительно увеличивает ингибирующее действие ГУП и ГАЛ. Значительная величина ошибки при определении ГУП связана с пологим участком градуировочного графика при низких концентрациях ГУП, где небольшие изменения степени ингибирования связаны со значительными вариациями концентрации ингибитора. При более высоких концентрациях ингибитора ошибка определения существенно снижается. При концентрации ГУП равной 100 нМ, ошибка его определения в растворе ИУ не превышает 7%. Для концентрации ГАЛ равной 1 мкМ ошибка его определения снижается до 4%. Пределы обнаружения ГУП (1 нМ) и ГАЛ (70 нМ) разработанных сенсоров существенно ниже ожидаемых концентраций данных препаратов в моче при регулярном терапевтическом применении, которые составляют 385 нМ и 8500 нМ соответственно. Это дает возможность использовать большую степень разбавления исходных образцов, снижая, таким образом, мешающее влияние матрицы.

Разработанные биосенсоры на основе ПЭК позволяют производить до 15 измерений в день, сохраняя более 70% исходной активности АХЭ, при этом измеряемые значения степени ингибирования остаются практически неизменными при уменьшении исходной активности АХЭ вплоть до 50%. Хранении изготовленных сенсоров в сухом виде при температуре 4°C в течение 5-6 недель не изменяет исходную активность АХЭ, после чего активность АХЭ снижается от 5 до 10% за неделю.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Как показали результаты исследования, использование противоположно заряженных полиэлектролитов позволяет формировать ПЭК в виде тонких пленок на поверхности электродов-трансдьюсеров и осуществлять нековалентную иммобилизацию АХЭ на поверхности ПЭК или внутри слоев полиэлектролитов. Использование компонентов комплексов, отличающихся длиной и жесткостью полимерной цепи, гидрофильностью и плотностью заряда, значительным образом влияет на количество и свойства иммобилизуемого фермента посредством изменения характеристик среды вблизи глобулы фермента и непосредственно вблизи активного центра. Состав и строение ПЭК на поверхности амперометрических сенсоров также существенным образом, посредством стерических ограничений и электростатического отталкивания, влияет на процессы диффузии заряженного АТХ к активному центру фермента и заряженного продукта ферментативной реакции тioxолина к поверхности электрода, что формирует аналитический сигнал в виде тока окисления тioxолина. Эти же факторы играют роль при взаимодействии фермента и его обратимых ингибиторов, особенно учитывая то обстоятельство, что определение обратимых ингибиторов проводится в присутствии субстрата. Воздействие вышеупомянутых факторов отражается в виде изменения операционных и кинетических характеристик определения субстрата и, в конечном счете, в виде изменения аналитических характеристик определения обратимых ингибиторов ацетилхолинэстеразы, являющихся основными объектами анализа в данной работе. Различия в аналитических характеристиках определения обратимых ингибиторов АХЭ, отраженные в значениях предела обнаружения и чувствительности сенсора, могут быть использованы в мультисенсорных системах при определении ингибиторов для повышения селективности таких систем. Можно ожидать дифференциации откликов отдельных сенсоров системы в отношении различных аналитов. Разработанные сенсоры могут быть использованы для контроля вносимых препаратов антихолинэстеразного действия, используемых в терапии нейродегенеративных заболеваний, в моче при терапевтическом приеме и предотвращения случайных отравлений в связи с приемом избыточных количеств лекарств. На основании проведенных исследований были сделаны следующие **выводы**:

1. Измерение методом ППР количества фермента, сорбируемого на поверхности ПЭК, показало, что в ряду использованных при формировании ПЭК поликатионов ПДДА, ПАА, ПАМАМ эффективность иммобилизации фермента увеличивается. Использование ДНК в сравнении с ПСС увеличивает эффективность иммобилизации АХЭ на поверхности ПЭК с ПАА, и уменьшает на поверхности ПЭК с ПАМАМ. Уве-

личение слоев полиэлектролитов одинакового состава приводит к снижению количества иммобилизуемого фермента. Из всех изученных комбинаций компонентов комплексов наибольшая эффективность иммобилизации АХЭ наблюдается на поверхности ПЭК, полученных с использованием растворов ПАМАМ (0.5 мг/мл) и ПСС (0.5 мг/мл).

2. Использование УС совместно со ФЦК для модификации СУЭ позволяет снизить ток потенциал окисления тиохалина до 200 мВ. Исходя из данных циклических вольтамперограмм, полученных в присутствии редокс-индикатора, и данных СЭИ, увеличивается эффективная площадь электрода и снижается сопротивление переноса заряда. Последующее формирование ПЭК снижает скорость диффузии из объема раствора как молекул тиохалина, так и молекул редокс-индикатора. После всех стадий модификации поверхности СУЭ проницаемость покрытия для небольших заряженных молекул остается достаточно большой.

3. При иммобилизации АХЭ в ПЭК увеличение максимального тока окисления тиохалина в присутствии АТХ сопровождается увеличением кажущейся константы Михаэлиса вследствие гетерогенного характера ферментативной реакции. Увеличение числа полиэлектролитных слоев в ПЭК снижает максимальные токи окисления тиохалина, вследствие уменьшения количества иммобилизуемого фермента, что соответствует данным измерения ППР, и усиления диффузионных ограничений переноса тиохалина к поверхности электрода через слои ПЭК. Использование ДНК в качестве полианиона при формировании ПЭК делает предпочтительной иммобилизацию АХЭ на слое полианиона. Максимальные токи окисления тиохалина существенно выше при иммобилизации АХЭ на поверхности ПЭК, сформированных из ПАМАМ с ПСС, чем для комплексов, сформированных из ПАМАМ с ДНК.

4. Ингибирование АХЭ физостигмином является квазиобратимым, что позволяет проводить инкубирование сенсора без субстрата в отдельном растворе с оптимальным для ингибирования значением $\text{pH} = 7.0$. Сенсоры с ковалентно иммобилизованной АХЭ на поверхности СУЭ, модифицированных УС и ФЦК, позволяют определять физостигмин в модельном растворе с пределом обнаружения 0.18 нМ и диапазоном определяемых концентраций 0.3 нМ – 10.0 мкМ.

5. Сенсоры с нековалентно иммобилизованной АХЭ на поверхности СУЭ, модифицированных УС, ФЦК и ПЭК на основе ПАА и ПСС, позволяют определять дофамин и берберин в модельном растворе с пределом обнаружения 0.46 нМ и 78 нМ соответственно. Измерения возможны в растворе искусственной урины с определяемыми концентрациями, существенно меньшими, чем ожидаемые концентрации дан-

ных веществ в моче при регулярном терапевтическом применении лекарственных препаратов.

6. Сенсоры с нековалентно иммобилизованной АХЭ на поверхности СУЭ, модифицированных УС, ФЦК и ПЭК на основе ПАА и ДНК, позволяют определять гуперзин А и галантамин в модельном растворе с пределом обнаружения 0.99 нМ и 70 нМ соответственно, а также в растворе искусственной урины с концентрациями существенно меньшими, чем ожидаемые концентрации данных веществ в моче при регулярном терапевтическом применении.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ АВТОРОМ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

Статьи в научных журналах:

1. **Давлетшина Р.Р.** Амперометрический ацетилхолинэстеразный сенсор для определения физостигмина / Р.Р. Давлетшина, А.Н. Иванов, Г.А. Евтюгин // Ученые записки Казанского университета. Серия Естественные науки. - 2018.- Т.160, кн.1. - С.5-16. (автора - 0,10 п.л.)
2. **Davletshina R.** Electrochemical biosensor based on polyelectrolyte complexes for the determination of reversible inhibitors of acetylcholinesterase / R. Davletshina, A. Ivanov, I. Sharafieva, G. Evtugyn // Talanta. - 2019. - V.194. - P.723-730. (автора - 0,15 п.л.)
3. **Davletshina R.** Acetylcholinesterase Sensor Based on Polyelectrolyte Complexes with DNA inclusion for the Determination of Reversible Inhibitors / R. Davletshina, A. Ivanov, G. Evtugyn // Electroanalysis. – 2020. – V. 32, №2. – P. 308-316. (автора - 0,13 п.л.)
4. **Davletshina R.** Electrochemical Biosensor Based on Polyelectrolyte Complexes with Dendrimer for the Determination of Reversible Inhibitors of Acetylcholinesterase / R. Davletshina, A. Ivanov, R. Shamagsumova, V. Evtugyn, G. Evtugyn // Analytical Letters - 2020. – P.1-20. <https://doi.org/10.1080/00032719.2020.1821700> (автора - 0,21 п.л.)

Материалы конференций:

1. **Давлетшина Р.Р.** Амперометрический биосенсор для определения обратимых ингибиторов ацетилхолинэстеразы / Р.Р. Давлетшина, А.Н.Иванов, Г.А. Евтюгин / Третий съезд аналитиков России. Тезисы докладов (8-13 октября, 2017 г., Москва). - М: ГЕОХИ РАН, 2017. – С.104. (автора - 0,03 п.л.)
2. **Давлетшина Р.Р.** Амперометрический биосенсор для определения обратимых ингибиторов ацетилхолинэстеразы / Р.Р. Давлетшина / Материалы Международного молодежного научного форума «Ломоносов-2018» (9-13 апреля 2018, Москва) / отв. ред.

И.А.Алешковский, А.В. Андриянов, Е.А. Антипов [Электронный ресурс] – М.: МАКС Пресс, 2018. – Секция «Инновации в химии», подсекция «Аналитическая химия», № 25. (автора - 0,02 п.л.)

3. **Давлетшина Р.Р.** Биосенсор для определения лекарственных препаратов для лечения болезни Альцгеймера на основе полиэлектролитных комплексов с включением ацетилхолинэстеразы / Р.Р.Давлетшина, А.Н.Иванов, Г.А.Евтюгин / Сборник тезисов докладов Четвёртого междисциплинарного симпозиума по медицинской, органической и биологической химии и фармацевтике (23-26 сентября 2018 г., Новый свет, Крым). – М.: «Перо», 2018. – С.119. (автора - 0,05 п.л.)

4. **Давлетшина Р.Р.** Амперометрический биосенсор на основе полиэлектролитных комплексов для определения обратимого ингибитора ацетилхолинэстеразы берберина / Р.Р. Давлетшина, А.Н.Иванов, Г.А.Евтюгин // Материалы и технологии XXI века: сборник тезисов III Международной школы-конференции студентов, аспирантов и молодых ученых (29-31 октября 2018 г., г.Казань). – Казань, 2018. – С.229. (автора - 0,03 п.л.)

5. **Давлетшина Р.Р.** Биосенсор для определения обратимых ингибиторов ацетилхолинэстеразы на основе полиэлектролитных комплексов с включением ДНК / Р.Р. Давлетшина, А.Н. Иванов, Г.А. Евтюгин / XXI Менделеевский съезд по общей и прикладной химии (9-13 сентября 2019, г. Санкт-Петербург). В 6 т. Т.4. Химия ископаемого и возобновляемого углеводородного сырья. Аналитическая химия: новые методы и приборы для химических исследований и анализа. Химическое образование: тезисы докладов. - Санкт-Петербург, 2019. – С.257. (автора - 0,04 п.л.)

6. **Давлетшина Р.Р.** Биосенсор для определения обратимых ингибиторов ацетилхолинэстеразы на основе полиэлектролитных комплексов с включением полиамидоаминного дендримера / Р.Р. Давлетшина, А.Н. Иванов / X Юбилейная всероссийская конференция по электрохимическим методам анализа «ЭМА-2020» (16-20 ноября 2020, Казань): тезисы докладов. – Казань: Издательство Казанского университета, 2020. - С.82-83. (автора - 0,06 п.л.)