

УДК 543.9+544.6

## АЦЕТИЛХОЛИНЭСТЕРАЗНЫЙ СЕНСОР НА ОСНОВЕ КОМПОЗИТА ПИЛЛАР[6]АРЕНА И НАНОЧАСТИЦ СЕРЕБРА ДЛЯ ОПРЕДЕЛЕНИЯ ЛЕКАРСТВЕННЫХ ПРЕПАРАТОВ ДЛЯ ЛЕЧЕНИЯ БОЛЕЗНИ АЛЬЦГЕЙМЕРА

© 2022 г. Р. В. Шамагсумова<sup>а</sup>, \*, А. В. Васюк<sup>а</sup>, Д. Н. Шурпик<sup>а</sup>, В. Г. Евтюгин<sup>а</sup>,  
И. И. Стойков<sup>а</sup>, Г. А. Евтюгин<sup>а</sup>

<sup>а</sup>Казанский федеральный университет, Химический институт им. А.М. Бутлерова  
ул. Кремлевская, 18, Казань, 420008 Россия

\*e-mail: rezeda84190@mail.ru

Поступила в редакцию 19.08.2021 г.

После доработки 11.10.2021 г.

Принята к публикации 12.10.2021 г.

Разработан вольтамперометрический сенсор на основе стеклоуглеродного электрода, модифицированного углеродной чернью, пиллар[6]ареном и наночастицами серебра, для определения обратимых ингибиторов ацетилхолинэстеразы, используемых при лечении болезни Альцгеймера и других нейродегенеративных заболеваний. Наночастицы серебра формируются непосредственно в слое за счет восстановления ионов серебра гидрохиноновыми фрагментами макроцикла. Их образование подтверждено трансмиссионной электронной микроскопией. Фермент иммобилизовали поверх модифицирующего слоя с помощью карбодиимидного связывания. Установлены электрохимические характеристики компонентов покрытия. Определена зависимость токов пика окисления макроцикла и наночастиц серебра от способа формирования поверхностного слоя. Показано, что ток пика окисления пилларарена меняется при добавлении ацетилтиохолина в силу его включения в окисление продукта ферментативного гидролиза субстрата. В присутствии донепезила, гуперзина А, бербериона и галантамина скорость ферментативной реакции снижается. Изменение тока окисления, измеряемого в хроноамперометрическом режиме, зависит от концентрации ингибитора. Градуировочная зависимость для определения ингибиторов имеет сигмоидный характер и аппроксимируется логистической функцией. Пределы обнаружения, оцениваемые по концентрации, отвечающей 15%-ному ингибированию, составили для гуперзина А 1.2 нМ, галантамина 12.5 нМ, донепезила 2.5 нМ и бербериона 10 нМ. Разработанный биосенсор апробирован при определении остаточных содержаний галантамина в искусственной моче.

**Ключевые слова:** ацетилхолинэстеразный сенсор, пиллар[6]арен, углеродная чернь, наночастицы серебра, вольтамперометрия, определение обратимых ингибиторов.

**DOI:** 10.31857/S0044450222040132

Электрохимические ферментные биосенсоры находят применение при определении широкого круга соединений, используемых в качестве лекарственных препаратов, химических средств защиты растений, пищевых добавок, а также относящихся к метаболитам и биомаркерам заболеваний [1–3]. Значительная их часть выступает в качестве субстратов ферментативных реакций. Так, глюкоза окисляется до глюконолактона в присутствии глюкозооксидазы [4], а молочная кислота до пировиноградной — в присутствии лактатоксидазы [5]. Такие биосенсоры отличаются высокой специфичностью отклика, однако обеспечивают относительно низкую чувствительность определения аналитов. Альтернативой вы-

ступают биосенсоры, в которых определяемые вещества ингибируют целевую реакцию субстрата, снижая ферментативную активность [6, 7]. В этом случае определяемые концентрации могут находиться в нано- и даже пикомолярном диапазоне, что имеет значение при определении токсинов и остаточных количеств лекарственных препаратов [8–10]. Среди многочисленных компонентов таких биосенсоров наиболее известным и перспективным является фермент ацетилхолинэстераза (АХЭ, КФ 3.1.1.7) [11–13]. Он играет ключевую роль в переносе нервного импульса в синаптической щели, разделяющей окончания аксонов, благодаря быстрому и селективному гидролизу природного нейротрансмиттера — аце-

тилхолина. Снижение активности АХЭ влечет за собой мышечные судороги, миоз зрачка, нарушение сердечной деятельности, при тяжелых поражениях — летальный исход. Вещества нервнопаралитического действия, разработанные как химическое оружие, относятся к сильным необратимым ингибиторам АХЭ [12, 14].

После запрещения химического оружия фокус применения АХЭ сместился в сторону определения фосфорорганических и карбаминатных пестицидов, а в последнее время — лекарственных препаратов миорелаксантного действия, применяемых в офтальмологии [15], и лекарств против нейродегенеративных заболеваний, таких как болезнь Альцгеймера и старческая деменция [16]. В настоящее время терапия подобных заболеваний направлена на купирование основных симптомов путем компенсации снижения уровня ацетилхолина. Для этого применяют обратимые ингибиторы АХЭ, как правило, включающие в свой состав катионные или способные к протонированию центры, имитирующие триметиламмонийную группу природного субстрата — ацетилхолина. Взаимодействие таких препаратов с активным центром фермента снижает его доступность для взаимодействия с субстратом и тем самым снижает скорость ферментативной реакции.

Основное методическое отличие функционирования биосенсоров на основе АХЭ для определения необратимых и обратимых ингибиторов состоит в том, что в последнем случае измерение сигнала происходит в присутствии и субстрата, и ингибитора. Это снижает определяемые концентрации обратимых ингибиторов по сравнению с сильными необратимыми ингибиторами, а также ужесточает требования к устойчивости сигнала во времени и его воспроизводимости в серии измерений.

С учетом указанных особенностей возрастает внимание к совершенствованию конструкции биосенсоров с иммобилизованной АХЭ, которые должны обеспечивать высокую стабильность сигнала и чувствительность его регистрации. Ранее нами исследованы условия определения обратимых ингибиторов АХЭ, применявшихся в качестве лекарственных препаратов для лечения болезни Альцгеймера, с использованием методов физической иммобилизации фермента и традиционного в подобных биосенсорах медиатора электронного переноса фталоцианина кобальта в качестве модификатора [17–19].

В данной работе мы впервые использовали с той же целью новый перспективный медиатор — композит пиллар[6]арена с наночастицами се-

ребра. Необходимость применения медиатора электронного переноса обусловлена большим перенапряжением окисления тиохолина. Данный продукт образуется при ферментативном гидролизе тиааналога ацетилхолина и часто используется для вольтамперометрической и амперометрической регистрации сигнала биосенсора. Пиллар [6]арен — макроциклическое производное гидрохинона, в котором шесть его фрагментов соединены мостиковыми метиленовыми группами в *мета*-положении (схема 1) [20].

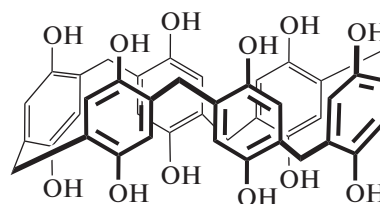


Схема 1. Структурная формула пиллар[6]арена.

Электрохимическая активность пиллар[*n*]аренов связана с обратимым окислением—восстановлением фрагментов гидрохинона, а реакционная способность в значительной степени зависит от внутримолекулярных водородных связей между соседними гидроксильными группами обоих ободов макроцикла. Включение наночастиц серебра, образующихся за счет химического восстановления ионов серебра пиллар[6]ареном, является перспективным приемом повышения эффективности медиаторного переноса электрона за счет способности металла к взаимодействию с тиольными группами органических соединений. Поскольку тиохоллин при этом может дополнительно накапливаться в приэлектродном слое, использование такого композита может повысить чувствительность биосенсора в отношении ацетилтиохолина и ингибиторов фермента.

## ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

**Реагенты.** Использовали АХЭ из электрического угря (156 Е/мг препарата или 224 Е/мг белка), углеродную чернь (N220, IMERIS, Бельгия), ацетилтиохоллин хлорид, 2-(*N*-морфолино)этансульфоновую кислоту (МЭС), *N*-гидроксисукцинимид (*N*-ГС), *N*-(3-диметиламинопропил)-*N*-этилкарбодиимида хлорид (ЭДХ), хлорид берберины, гидроклорид донепезила, гуперзин А, гидробромид галантамина (Sigma-Aldrich, США) (схема 2).

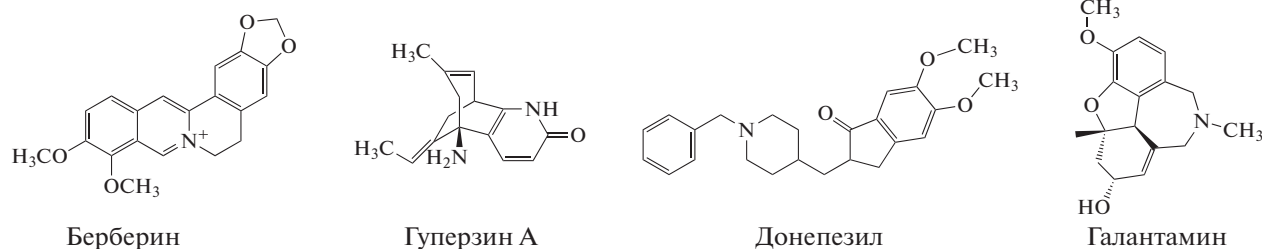


Схема 2. Структурные формулы обратимых ингибиторов ацетилхолинэстеразы.

Другие реагенты категории ч.д.а. и analytical grade использовали без дополнительной очистки. Буферные растворы и растворы реагентов для электрохимических измерений готовили на деионизованной воде (Millipore-Q, Франция). Концентрированные растворы АХЭ и ацетилтиохоллина хранили в замороженном виде при  $-20^{\circ}\text{C}$  и разводили до рабочей концентрации непосредственно перед использованием. Искусственную урину готовили путем растворения точных навесок компонентов, конечные концентрации составили 0.02 М КСl, 0.049 М NaCl, 0.015 М  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 0.01 М  $\text{CaCl}_2$ , 0.018 М  $\text{NH}_4\text{Cl}$  и 0.018 М мочевины.

Пиллар[6]арен синтезировали на кафедре органической и медицинской химии Казанского федерального университета по модифицированной методике [21]. Кратко, для этого проводили циклизацию 1,4-бис(2-бромэтокси)бензола в присутствии метансульфоновой кислоты в хлороформе сначала при  $0^{\circ}\text{C}$ , затем при  $35^{\circ}\text{C}$ . Продукт обрабатывали  $\text{VBr}_3$  для освобождения гидроксидных групп (схема 3). Структуру пиллар[6]арена подтверждали данными  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$  ЯМР-спектроскопии и MALDI-TOF масс-спектроскопии. Синтезированный пиллар[6]арен хранили в атмосфере аргона при  $-20^{\circ}\text{C}$ .

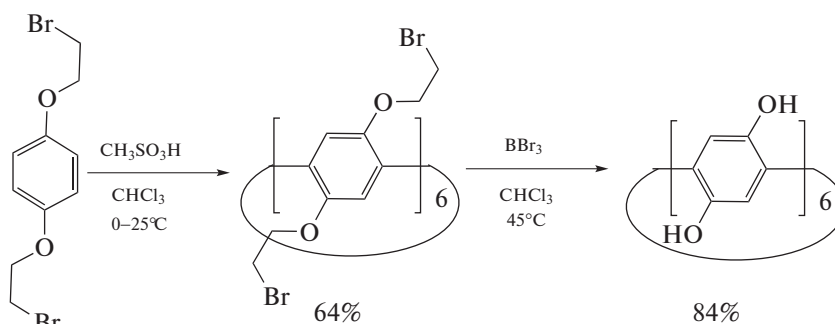


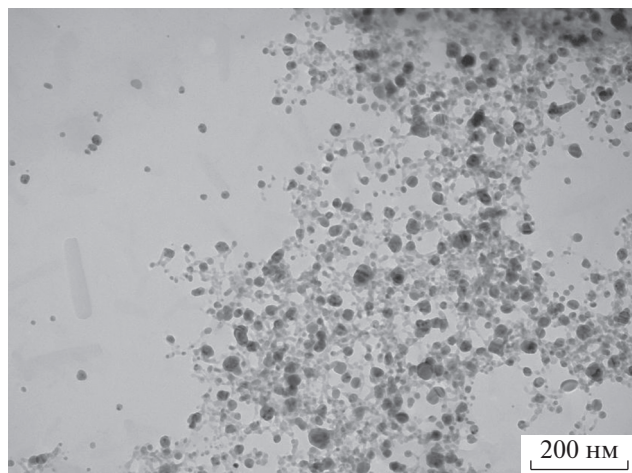
Схема 3. Общая схема синтеза пиллар[6]арена.

**Микроизображения с помощью трансмиссионной электронной микроскопии** получали с помощью микроскопа Hitachi HT7700 Exalens (Япония) при напряжении 120 кВ. Смесь пиллар[6]арена и нитрата серебра наносили на медную сетку 3 мм 200 меш, покрытую формваром и углеродом.

**Вольтамперометрические измерения** проводили в трехэлектродной ячейке в режиме постоянного тока вольтамперометрии и хроноамперометрии с помощью потенциостата-гальваностата AUTOLAB PGSTAT 302N (Metrohm Autolab, Нидерланды). В качестве рабочих электродов использовали стеклоуглеродный электрод (СУЭ) из стержней СУ2000 диаметром 1.7 мм (НИИГрафит, Москва) в оболочке из политетрафторэтилена со стальным токосъемником. Противоеlectродом служила платиновая проволока, электродом сравнения — хлоридсеребряный электрод ( $\text{Ag}/\text{AgCl}/3.0 \text{ M KCl}$ ;

Metrohm AG, Швейцария). Измерения проводили в нетермостатированной трехэлектродной ячейке объемом 5 мл.

**Модификация стеклоуглеродного электрода.** Перед нанесением модифицирующего покрытия СУЭ механически полировали, промывали ацетоном, этанолом и деионизованной водой. После этого проводили циклирование его потенциала в 0.1 М фосфатном буферном растворе, содержащем 0.1 М  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ , в течение 10 мин или до постоянства токов в интервале потенциалов от  $-1.0$  до  $1.0 \text{ В}$  (приблизительно 10 циклов). Для нанесения суспензии углеродной черни электрод подсушивали на воздухе при комнатной температуре и закрепляли в штативе рабочей поверхностью вверх. Суспензию углеродной черни готовили, добавляя ее точную навеску в диметилформамид из расчета 1 мг/мл, с последующей ультразвуковой обработкой в течение 30 мин. Далее 3 мкл суспензии на-



**Рис. 1.** Микрофотографии, полученные из смеси пиллар[6]арена и нитрата серебра с помощью трансмиссионной микроскопии при 50000-кратном увеличении.

носили на электрод и высушивали при 60°C в течение 20 мин. Затем на слой углеродной черни капельно наносили 2 мкл 30 мкМ раствор пиллар[6]арена в этаноле и высушивали при комнатной температуре. После этого на ту же поверхность наносили 5 мкл 0.1 мМ раствора нитрата серебра, поверхность закрывали пластиковой пробиркой для предотвращения высыхания и оставляли на 10 мин. Поверхность электрода после этого промывали деионизованной водой. В ряде экспериментов нанесение растворов пиллар[6]арена и нитрата серебра повторяли 2–3 раза для увеличения концентрации наночастиц серебра в слое.

**Иммобилизация ацетилхолинэстеразы.** На поверхность СУЭ, модифицированного пиллар[6]ареном и наночастицами серебра, последовательно наносили 3 мкл раствора ЭДХ (3 мг/мл в 0.05 М МЭС, pH 5.5) и 3 мкл N-ГС (1 мг/мл в 0.05 М МЭС, pH 5.5). Электрод закрывали пластиковой пробиркой и оставляли на 30 мин. Далее поверхность промывали деионизованной водой и вносили 2 мкл раствора АХЭ (2.5–20 Е/мл в 0.005 М фосфатном буферном растворе с pH 7.2). После высушивания при комнатной температуре электроды промывали тем же фосфатным буферным раствором и хранили при необходимости при 4°C в сухом виде.

**Измерение сигнала биосенсора** проводили в измерительной ячейке, содержащей 5 мл 0.05 М фосфатного буферного раствора, в хроноамперометрическом режиме при 0–0.4 В. Регистрировали хроноамперограмму до и после введения в буферный раствор ацетилхолина (концентрация в ячейке 0.5 мМ). При определении концентрации ингибитора сначала регистрировали анодный ток

в течение 200 с в присутствии 0.5 мМ ацетилтиохолина, далее в ячейку добавляли раствор ингибитора и продолжали регистрацию тока в течение еще 200 с. Степень ингибирования ( $I$ , %) рассчитывали, исходя из изменения тока:

$$I(\%) = \Delta I / I_0, \quad (1)$$

где  $\Delta I$  — изменение тока при введении в раствор ингибитора и  $I_0$  — анодный ток, отвечающий исходной концентрации субстрата в отсутствие ингибитора.

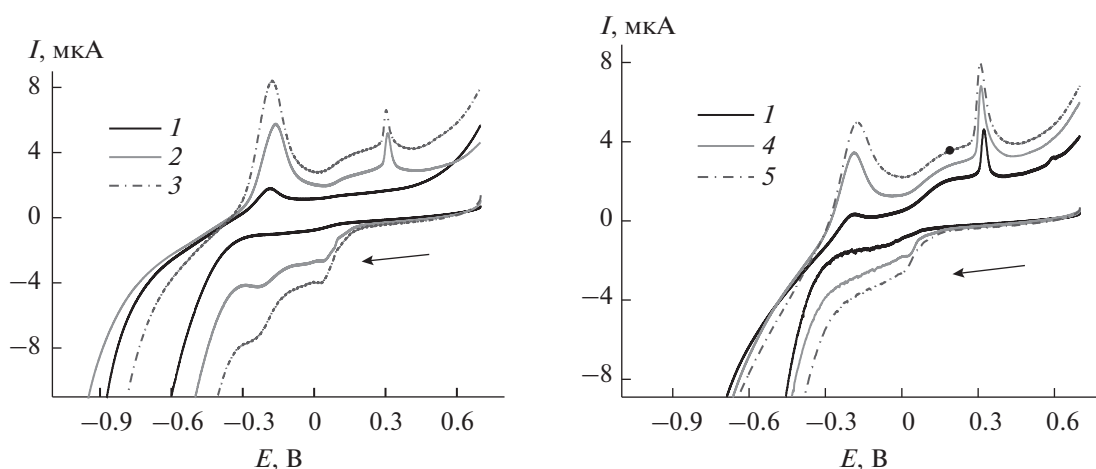
## РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

**Условия получения композита пиллар[6]арена и наночастиц серебра.** При модификации СУЭ, модифицированного углеродной чернью, пиллар[6]ареном и нитратом серебра на циклических вольтамперограммах наблюдали пики окисления–восстановления макроцикла и анодного окисления элементарного серебра, образующегося в слое за счет восстановления ионов  $\text{Ag}^+$  гидрохиноновыми фрагментами пиллар[6]арена. Образование наночастиц серебра независимо подтвердили данными трансмиссионной электронной микроскопии (рис. 1). Как видно, наночастицы серебра равномерно распределены в пленке пиллар[6]арена, с которым они образуют высокопористые сетчатые структуры.

Концентрации компонентов покрытия изменяли путем последовательного нанесения одинаковых аликвот растворов пиллар[6]арена и нитрата серебра (см. “Экспериментальную часть”). В целом вольтамперограммы имели сходный вид, однако токи растворения элементарного серебра (острый необратимый пик при 0.3 В) выражены сильнее для покрытий, в которых последним слоем был  $\text{AgNO}_3$  (рис. 2).

Исследовали влияние на сигналы на вольтамперограммах времени инкубирования электрода в растворе нитрата серебра и его концентрации при различном числе слоев реагентов (рис. 3). Из рисунка следует, что увеличение времени инкубирования приводит к регулярному возрастанию тока пика окисления наночастиц серебра, в то время как ток пика окисления пиллар[6]арена меняется менее регулярно с максимумом при времени инкубирования 10 мин. Последующее снижение тока пика может быть связано как с частичной инактивацией окисленных продуктов, склонных к хемосорбции, так и с увеличением сопротивления переноса заряда в слое. Оптимальная концентрация ионов серебра в процессе формирования поверхностного слоя составила 0.1 мМ. Ее увеличение снижает ток пика окисления пиллар[6]арена и слабо влияет на токи пика окисления самого серебра. Интересно отметить, что с формальной точки зрения увеличение коли-





**Рис. 2.** Циклические вольтамперограммы, полученные на стеклоуглеродном электроде, покрытом углеродной чернью, пиллар[6]ареном (1) и композитами состава пиллар[6]арен–Ag–пиллар [6]арен (2), (пиллар[6]арен–Ag)<sub>2</sub>–пиллар[6]арен (3), (пиллар[6]арен–Ag)<sub>2</sub> (4) и (пиллар[6]арен–Ag)<sub>3</sub> (5). Измерения в 0.1 М растворе NaNO<sub>3</sub>, 100 мВ/с. Время инкубирования в 0.1 мМ растворе AgNO<sub>3</sub> 10 мин. Стрелки обозначают направление сканирования потенциала.

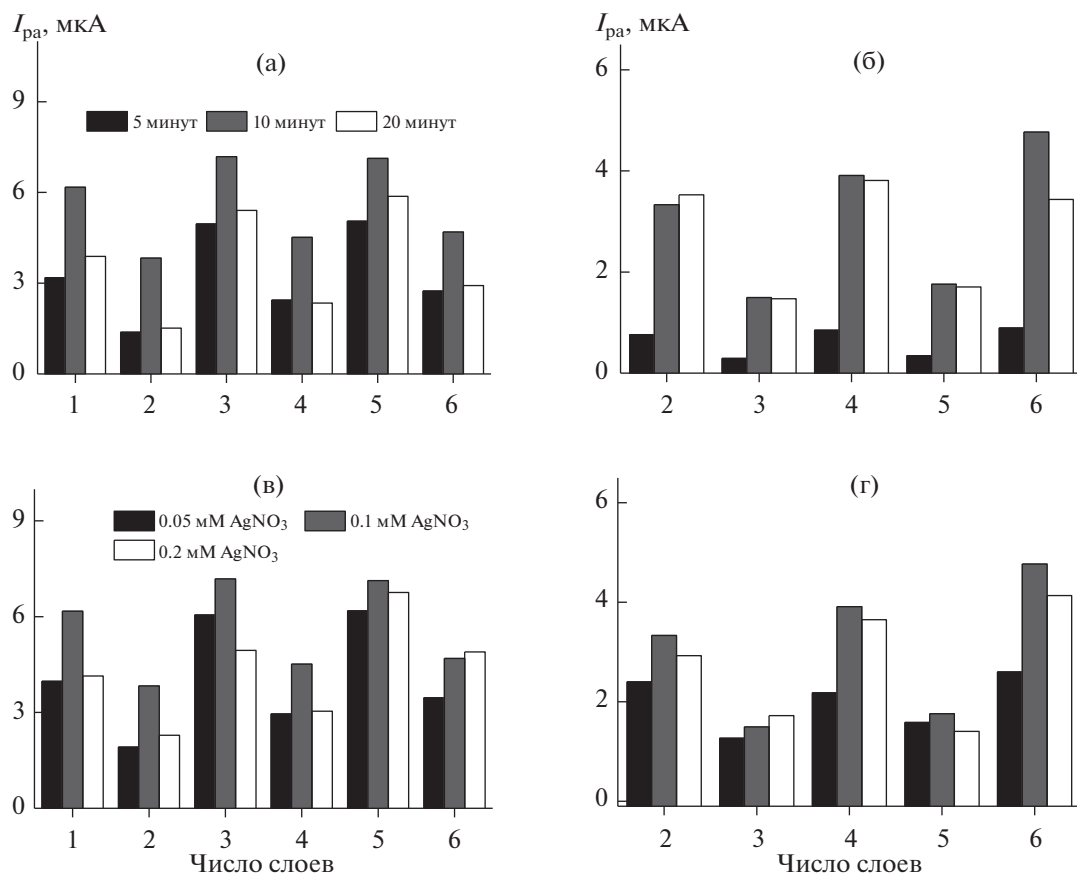
чества макроцикла, участвующего в окислении ионов Ag<sup>+</sup>, должно снижать поверхностную концентрацию гидрохиноновых фрагментов, а значит, и токи их окисления на электроде. Противоположное влияние при промежуточной концентрации AgNO<sub>3</sub> свидетельствует в пользу сложного механизма электродных реакций со взаимным влиянием обоих электрохимически активных компонентов слоя на процессы переноса заряда. Это подтверждается пилообразной зависимостью тока пика окисления пиллар[6]арена от природы внешнего слоя.

При последовательном добавлении к углеродной черни растворов пиллар[6]арена и нитрата серебра ток пика окисления макроцикла выше, когда он присутствует во внешнем слое, и снижается при нанесении в заключительной стадии модификации раствора AgNO<sub>3</sub>. При этом токи пика окисления пиллар[6]арена сохраняют постоянство в интервале pH 5.0–8.1 (рис. 4). Для пика окисления элементарного серебра столь регулярного изменения тока пика при pH 5.0 не наблюдали, а при более высоких значениях pH изменения противоположны наблюдаемым для макроцикла: токи пика снижались для внешнего слоя покрытия из пиллар[6]арена и увеличивались при внешнем слое из наночастиц серебра. Необходимо отметить, что во всех вариантах модификации электрода частицы, участвующие в переносе электрона, находились на поверхности стеклоуглерода, но не в растворе, поэтому указанные изменения не могут быть связаны с диффузионным переносом окисляющейся формы реагента из раствора. По-видимому, можно говорить об эффективности восстановления ионов Ag<sup>+</sup> и челночном механизме переноса электрона внутри

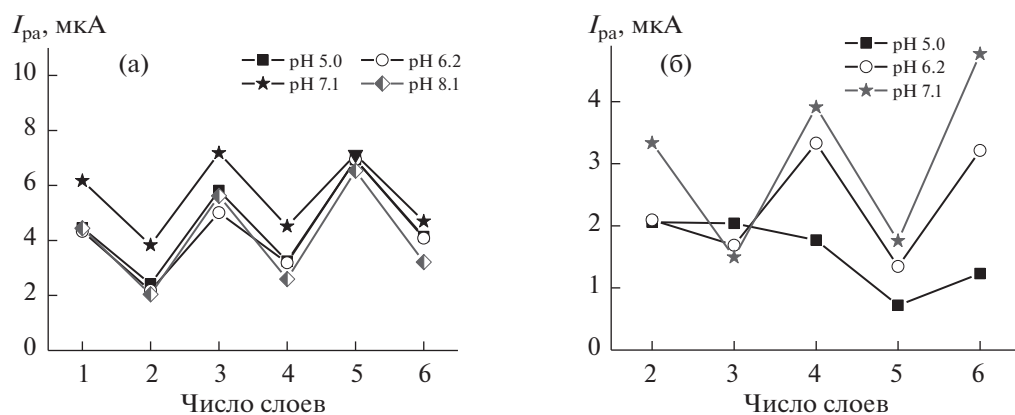
многослойного покрытия, испытывающего влияние регулярности строения слоя пиллар[6]арена и наночастиц серебра. Поскольку условия регистрации микроснимков в трансмиссионной электронной микроскопии радикально отличались от условий регистрации вольт-амперных кривых (пиллар[6]арен и нитрат серебра смешивали в гомогенных условиях, после чего их смесь наносили на медную сетку и высушивали), сопоставление полученных результатов не позволило оценить регулярность распределения частиц серебра на поверхности СУЭ в слое углеродной черни.

**Условия измерения сигнала ацетилхолинэстеразы биосенсора.** Исходя из полученных данных о влиянии состава поверхностного слоя на электрохимические характеристики, для последующей иммобилизации фермента использовали электрод, покрытый четырьмя слоями модификаторов. Присутствие серебра во внешнем слое облегчало перенос электрона от тиохалина, образующегося в ферментативной реакции, а увеличение числа слоев до шести снижало абсолютную величину токов пика.

Иммобилизация фермента поверх модифицирующего слоя из углеродной черни, пиллар[6]арена и наночастиц серебра незначительно меняла морфологию пиков на вольтамперограммах. В частности, пики окисления–восстановления макроцикла становились более симметричными, а относительная величина пика окисления серебра снижалась. Введение в раствор фермента и ацетилтиохалина приводило к закономерным изменениям на циклических вольтамперограммах (рис. 5а): токи пика окисления снижались, а ток пика восстановления – увеличивался. Такие изменения связаны с участием окисленной формы пиллар[6]арена в химическом окислении



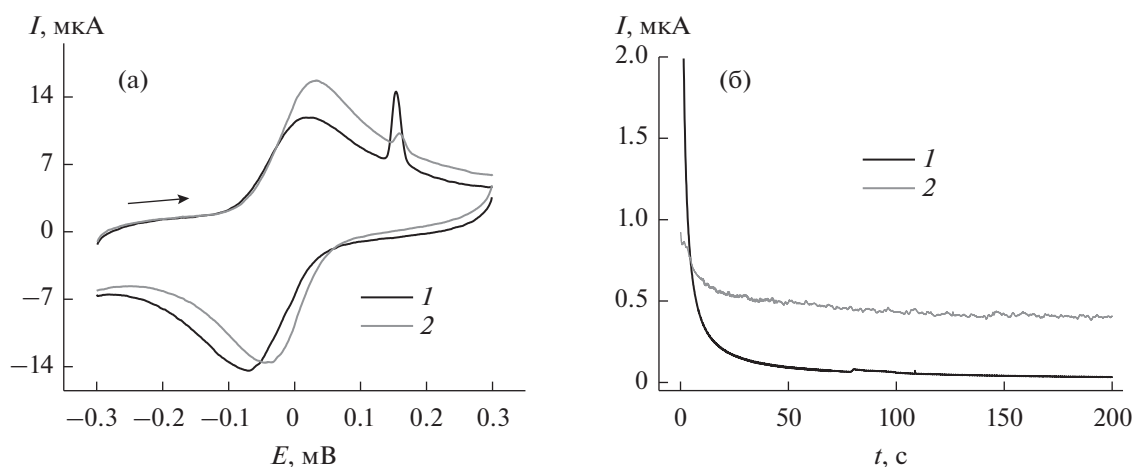
**Рис. 3.** Зависимость тока пика окисления пиллар[6]арена (а, в) и наночастиц серебра (б, г) от числа слоев модификаторов при варьировании времени инкубирования электрода в 0.1 мМ растворе  $AgNO_3$  (а, б) и концентрации раствора  $AgNO_3$  при времени инкубирования 10 мин (в, г).



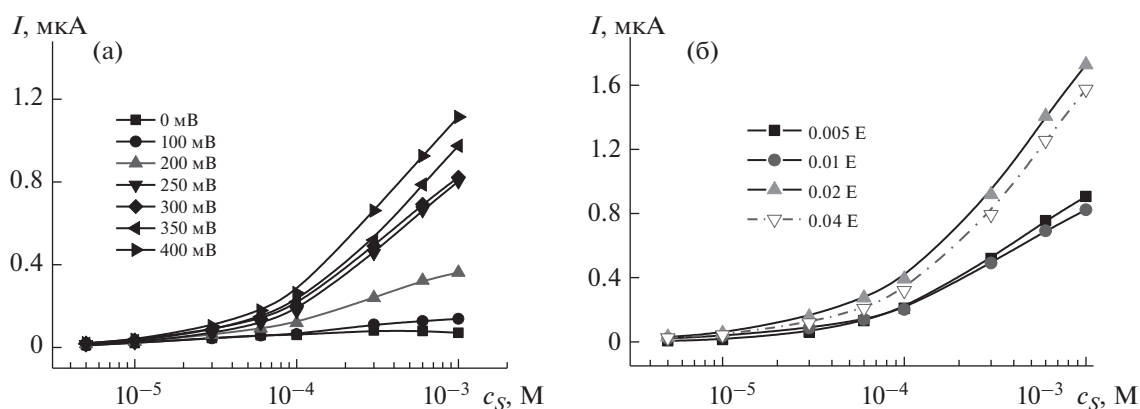
**Рис. 4.** Зависимость тока пика окисления пиллар[6]арена (а) и наночастиц серебра (б) от числа слоев модификаторов при варьировании pH. Измерения в 0.1 М растворе  $NaNO_3$ , 100 мВ/с. Время инкубирования в 0.1 мМ растворе  $AgNO_3$  10 мин.

тиохолина, что приводило к изменению соотношения бензохиноновых и гидрохиноновых фрагментов макроцикла. Изменения тока пика окисления серебра, по-видимому, связаны с их уча-

стием в переносе электрона внутри слоя, а также с частичным блокированием поверхности тиохолином, накапливающимся за счет самопроизвольного образования связей  $Ag-S$ . Аналогичное



**Рис. 5.** Циклические вольтамперограммы (а) и хроноамперограммы (б), полученные на стеклоуглеродном электроде, модифицированном углеродной чернью, композитом (пиллар[6]арен–Ag)<sub>2</sub> и ацетилхолинэстеразой (0.005 Е на электрод). Измерения в 0.1 М фосфатном буферном растворе, содержащем 0.1 М NaCl, до (1) и после добавления 1.0 мМ ацетилтиохолина (2). Потенциал электрода в хроноамперометрическом режиме 0.3 В.



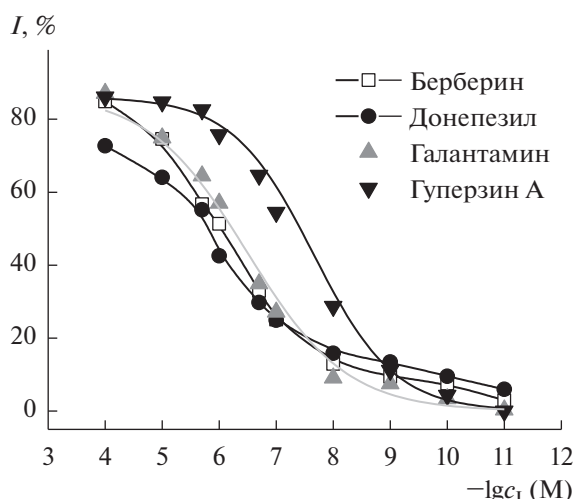
**Рис. 6.** Зависимость сигнала ацетилхолинэстеразных биосенсоров от концентрации субстрата, полученная при разных потенциалах электрода (а) (0.005 Е АХЭ на электрод) и количестве взятой для иммобилизации ацетилхолинэстеразы (б) (потенциал электрода 0.3 В). Измерения в 0.1 М фосфатном буферном растворе, содержащем 0.1 М NaCl.

поведение наблюдали ранее для сходных модифицирующих материалов, полученных из тиакваликсарена с пирокатехиновыми группами и нитрата серебра [22, 23].

Аналогичные изменения тока наблюдали в хроноамперометрическом режиме (рис. 5б) при поляризации электрода в интервале 50–400 мВ. Поскольку формат биосенсора лучше совместим с хроноамперометрическим режимом измерения сигнала, дальнейшие исследования проводили в указанных условиях. Зависимости стационарного тока, устанавливающегося при 100 с после введения субстрата, от концентрации субстрата и количества фермента, взятого для иммобилизации, приведены на рис. 6. Как видно, сигнал биосенсора закономерно увеличивается с потенциалом электрода, начиная с 200 мВ. Последующие изме-

рения проводили при потенциале 300 мВ, обеспечившим несколько меньший разброс результатов измерения (2.5% относительно 3.5% для 400 мВ в серии из пяти биосенсоров). Что касается влияния количества фермента, устойчивый сигнал зарегистрирован, начиная с 0.005 Е на электрод. Поскольку ингибитор рекомендовано определять при минимальной концентрации фермента [10, 12], в дальнейшем использовали 0.005 Е АХЭ на электрод.

**Определение обратимых ингибиторов ацетилхолинэстеразы.** Введение в рабочий раствор, содержащий субстрат, лекарственных препаратов — обратимых ингибиторов АХЭ приводило к снижению стационарного тока за счет уменьшения скорости гидролиза субстрата и, как следствие, — уменьшения количества тиохолина, реагирующе-



**Рис. 7.** Градуировочные зависимости для определения обратимых ингибиторов ацетилхолинэстеразы с помощью биосенсора на основе стеклоглеродного электрода, модифицированного углеродной чернью, композитом (пиллар[6]арен–Ag)<sub>2</sub> и ацетилхолинэстеразой (0.005 Е на электрод). Измерения в 0.1 М фосфатном буферном растворе, содержащем 0.1 М NaCl, тиохолин 1.0 мМ.

го на электроде. Градуировочные зависимости (рис. 7) имели сигмоидную форму, типичную для обратимых ингибиторов. Для ее аппроксимации применяли логистическую аппроксимирующую функцию (2), ранее успешно использованную в аналогичных исследованиях обратимого ингибирования АХЭ [17–19] и распространенную в иммунохимических исследованиях:

$$I\% = \frac{A_1 - A_2}{1 + (x/x_0)^p} + A_2. \quad (2)$$

Здесь  $I$  (%) – степень ингибирования АХЭ, рассчитанная по уравнению (1), исходя из относительного уменьшения тока окисления тиохolina при введении в раствор ингибитора;  $A_1$  и  $A_2$  – верхний и нижний пределы изменения степени ингибирования;  $x$  – мера содержания ингибитора (в данном случае  $x = -\lg(c_1, \text{М})$ ;  $x_0$  – точка перегиба графика, формально отвечающая 50%-ному ингибированию фермента (концентрация  $EC_{50}$ );  $p$  – параметр, определяющий крутизну

средней части графика, т.е. чувствительность определения ингибитора. Значения соответствующих параметров градуировочных зависимостей приведены в табл. 1. Концентрацию ингибитора, отвечающую 15%-ному ингибированию ( $EC_{15}$ ), выбрали в качестве предела обнаружения. Это связано с тем, что стандартное отклонение при измерении сигнала биосенсора обычно составляет 3–5%, что при соотношении сигнал/шум, равном 3, дает минимальный достоверный результат измерения ингибирования 15% [12, 14, 17–19]. В нашем случае в серии из пяти биосенсоров относительная дисперсия отклика на 0.5 мМ ацетилтиохолин составила 3.5%, в серии из пяти измерений с одним биосенсором – 2.5%, так что использованная оценка оказалась даже более строгой, чем следует из метрологических характеристик разработанного биосенсора.

Чувствительность определения аналитов с помощью разработанного биосенсора сопоставима или лучше характеристик АХЭ-биосенсоров, описанных в литературе. Так, при проточно-инжекционном определении донепезила с ферментом, иммобилизованным на наночастицах золота, значение  $EC_{50}$  составило 0.5 мкМ, берберина 6.45 мкМ [24]. Использование в качестве трансдьюсера нитрида углерода с частицами палладия и включение АХЭ в пленку хитозана позволило добиться предела обнаружения гуперзина А 1.3 нМ [25], проведение измерения в микрореакторе с АХЭ, адсорбированной на силикагеле, показало  $EC_{50}$  1.52 мкМ [26]. В той же системе значение  $EC_{50}$  галантамина составило 13 мкМ, для фермента, иммобилизованного в полиметилметакрилате, – 0.47 мкМ [27]. Предел обнаружения галантамина при его определении с помощью АХЭ, иммобилизованной на магнитных частицах, составил 1.5 мкМ [28], в колориметрическом сенсоре на основе смартфона в качестве измерительного инструмента и АХЭ, иммобилизованной в хитозане, – 1.3 мкМ [28]. При физической адсорбции фермента в полиэлектролитные комплексы значение  $EC_{50}$  берберина составило 0.6 мкМ гуперзина А – 0.05 мкМ [19], галантамина – 0.69 мкМ [18].

Попытки получить сигнал об ингибировании АХЭ с помощью сенсора, содержащего пил-

**Таблица 1.** Параметры логистической аппроксимационной модели (уравнение (2)) отклика АХЭ биосенсора на обратимые ингибиторы и значения  $EC_{15}$  и  $EC_{50}$  индивидуальных ингибиторов

| Ингибитор  | $A_1$ , %  | $A_2$ , % | $x_0$         | $p$           | $R^2$  | $EC_{15}$ , нМ | $EC_{50}$ , мкМ |
|------------|------------|-----------|---------------|---------------|--------|----------------|-----------------|
| Гуперзин А | $86 \pm 2$ | $2 \pm 1$ | $7.4 \pm 0.2$ | $3.0 \pm 0.2$ | 0.9920 | 1.2            | 0.04            |
| Галантамин | $91 \pm 2$ | $1 \pm 1$ | $6.2 \pm 0.2$ | $1.5 \pm 0.1$ | 0.9829 | 12.5           | 0.63            |
| Донепезил  | $72 \pm 1$ | $6 \pm 1$ | $6.0 \pm 2$   | $2.9 \pm 0.2$ | 0.9945 | 2.5            | 1.0             |
| Берберин   | $84 \pm 2$ | $6 \pm 1$ | $6.6 \pm 2$   | $2.2 \pm 0.1$ | 0.9855 | 10.0           | 0.25            |

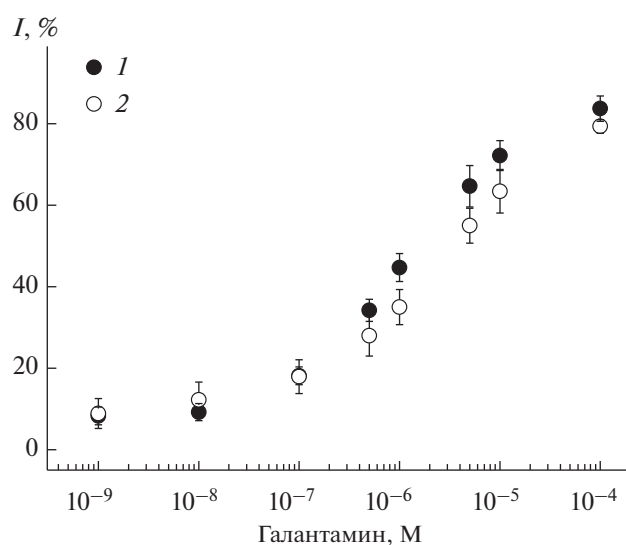


лар[6]арен без наночастиц серебра, показали значительно меньшую чувствительность определения аналитов. Так, для гуперзина А предел обнаружения составил 10 нМ, галантамина — 50 нМ, донепезила — 12 нМ и берберина — 120 нМ. Возможно, это частично связано с неустойчивостью отклика на макроцикл, который даже в отсутствие фермента имеет тенденцию к уменьшению в серии последовательных измерений из одного раствора. Такое поведение может быть обусловлено хемосорбцией промежуточных продуктов окисления пиллар[6]арена и недостаточной его стабилизацией в частицах углеродной черни. Возможно, аккумуляция тиохolina, обладающего свойствами восстановителя, на наночастицах серебра дополнительно стабилизирует медиатор в составе биосенсора. Для дальнейшего применения пиллар[6]арена в составе АХЭ-биосенсора может понадобиться оптимизация матрицы для включения макроцикла.

**Операционные характеристики и анализ реального объекта.** Биосенсор показал высокую устойчивость сигнала при хранении в рабочем буферном растворе и в сухом виде. Так, при использовании в течение дня при комнатной температуре сигнал на 0.5 мМ ацетилтиохоллин практически не менялся, в течение двух недель он снижался на 20–25% от исходной величины, но при этом его чувствительность в отношении обратимых ингибиторов не менялась. Реактивация биосенсора после его контакта с ингибитором достигалась путем промывки рабочим буферным раствором. Степень реактивации оценивали по воспроизводимости отклика на субстрат. Каждый биосенсор позволял проводить до 50 циклов измерения ингибирования—реактивации без потери чувствительности сигнала к ингибитору в изученном интервале его концентраций.

При хранении биосенсора в сухом виде при 4°C 50% исходного сигнала сохранялось после трех месяцев хранения. Значение  $EC_{50}$  изученных ингибиторов при этом несколько возрастало, поскольку инактивации подвергались в первую очередь молекулы фермента, наиболее доступные для ингибитора. Указанные изменения слабо влияют на возможности использования разработанного биосенсора для определения остаточных количеств лекарственных препаратов в моче. По результатам фармакокинетических исследований, с мочой выделяются в неизменном виде 30–40% принимаемых препаратов [29–31], при этом их концентрация в случае суточного приема 3–5 мг составляет 0.8 мкМ (расчет для донепезила).

Для оценки возможности применения разработанного биосенсора в терапевтической практике при лечении больных нейродегенеративными заболеваниями протестировали искусственную мочу (состав приведен в “Экспериментальной



**Рис. 8.** Градуировочные зависимости для определения галантамина в фосфатном буферном растворе (●) и в искусственном образце урины (○). Измерения при рН 7.8, концентрации ацетилтиохоллина 0.5 мМ. Приведены средние значения для трех биосенсоров.

части”), содержащую переменные количества галантамина. Мочу предварительно разбавляли в 10 раз и корректировали рН до 7.8. Как следует из рис. 8, в пределах погрешности измерений установленные значения концентрации не отличались от полученных в стандартных условиях. Степень открытия, рассчитанная по графикам, составляла 92–98%. Следует отметить, что воспроизводимость результатов измерений в моче ниже, чем в фосфатном буферном растворе, и составила в среднем 5%. Полученные результаты свидетельствуют о возможности применения разработанного биосенсора для контроля остаточных количеств изученных лекарственных препаратов в моче пациентов.

Действие обратимых ингибиторов на АХЭ неселективно, регистрируемая степень ингибирования АХЭ не дает информации о природе и числе ингибиторов в анализируемом образце. Однако, учитывая близость полученных характеристик ингибирования, снижение сигнала биосенсора можно рассматривать как оценку общего содержания препаратов антихолинэстеразного действия в образце. Возможно, в перспективе можно повысить селективность определения остаточных количеств лекарственных препаратов, используя мультисенсорный подход с варьированием природы и способа модификации электрода-трансдьюсера, а следовательно, и индивидуальных характеристик определения аналитов.

*Работа выполнена при поддержке Российского научного фонда (проект 17-13-01208).*

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Ispas C.R., Crivat G., Andreescu S.* Review: Recent developments in enzyme-based biosensors for biomedical analysis // *Anal. Lett.* 2012. V. 45. P. 168. <https://doi.org/10.1080/00032719.2011.633188>
2. *Nigam K.V., Shukla P.* Enzyme based biosensors for detection of environmental pollutants – A review // *J. Microbiol. Biotechnol.* 2015. V. 25. № 11. P. 1773. <https://doi.org/10.4014/jmb.1504.04010>
3. *Yang H.* Enzyme-based ultrasensitive electrochemical biosensors // *Curr. Opin. Chem. Biol.* 2012. V. 16. № 3–4. P. 422. <https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2012.03.015>
4. *Wang H.-C., Lee A.-R.* Recent developments in blood glucose sensors // *J. Food Drug Anal.* 2015. V. 23. № 2. P. 191. <https://doi.org/10.1016/j.jfda.2014.12.001>
5. *Rattu G., Khansili N., Maurya V.K., Krishna P.M.* Lactate detection sensors for food, clinical and biological applications: A review // *Environ. Chem. Lett.* 2021. V. 19. P. 1135. <https://doi.org/10.1007/s10311-020-01106-6>
6. *Budnikov H.C., Evtugyn G.A.* Electrochemical biosensors for inhibitor determination: Selectivity and sensitivity control // *Electroanalysis.* 1996. V. 8. № 8–9. P. 817. <https://doi.org/10.1002/elan.1140080821>
7. *Bucur B., Purcarea C., Andreescu S., Vasilescu A.* Addressing the selectivity of enzyme biosensors: solutions and perspectives // *Sensors.* 2021. V. 21. № 9. Article 3038. <https://doi.org/10.3390/s21093038>
8. *Kurbanoglu S., Ozkan S.A., Merkoçi A.* Nanomaterials-based enzyme electrochemical biosensors operating through inhibition for biosensing applications // *Biosens. Bioelectron.* 2017. V. 89. P. 886. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2016.09.102>
9. *Tortolini C., Bollella P., Antiochia R., Favero G., Mazzei F.* Inhibition-based biosensor for atrazine detection // *Sens. Actuators B.* 2016. V. 224. P. 552. <https://doi.org/10.1016/j.snb.2015.10.095>
10. *Amine A., Mohammadi H., Bourais I., Palleschi G.* Enzyme inhibition-based biosensors for food safety and environmental monitoring // *Biosens. Bioelectron.* 2006. V. 21. № 8. P. 1405. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2005.07.012>
11. *Pundir C.S., Chauhan N.* Acetylcholinesterase inhibition-based biosensors for pesticide determination: A review // *Anal. Biochem.* 2012. V. 429. № 1. P. 19. <https://doi.org/10.1016/j.ab.2012.06.025>
12. *Arduini F., Amine A., Moscone D., Palleschi G.* Biosensors based on cholinesterase inhibition for insecticides, nerve agents and aflatoxin B1 detection (review) // *Microchim. Acta.* 2010. V. 170. P. 193. <https://doi.org/10.1007/s00604-010-0317-1>
13. *Pohanka M.* Cholinesterases in biorecognition and biosensors construction: A review // *Anal. Lett.* 2013. V. 46. № 12. P. 1849. <https://doi.org/10.1080/00032719.2013.780240>
14. *Pohanka M., Adam V., Kizek R.* An acetylcholinesterase-based chronoamperometric biosensor for fast and reliable assay of nerve agents // *Sensors* 2013. V. 13. № 9. P. 11498. <https://doi.org/10.3390/s130911498>
15. *Pohanka M.* Diagnoses of pathological states based on acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase // *Curr. Med. Chem.* 2020. V. 27. № 18. P. 2994. <https://doi.org/10.2174/0929867326666190130161202>
16. *Caratelli V., Ciampaglia A., Guiducci J., Sancesario G., Moscone D., Arduini F.* Precision medicine in Alzheimer's disease: An origami paper-based electrochemical device for cholinesterase inhibitors // *Biosens. Bioelectron.* 2020. V. 165. № 1. Article 112411. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2020.112411>
17. *Ivanov A., Davletshina R., Sharafieva I., Evtugyn G.* Electrochemical biosensor based on polyelectrolyte complexes for the determination of reversible inhibitors of acetylcholinesterase // *Talanta.* 2019. V. 194. P. 723. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2018.10.100>
18. *Davletshina R., Ivanov A., Evtugyn G.* Acetylcholinesterase sensor based on polyelectrolyte complexes with DNA inclusion for the determination of reversible inhibitors // *Electroanalysis.* 2020. V. 32. № 2. P. 308. <https://doi.org/10.1002/elan.201900507>
19. *Davletshina R., Ivanov A., Shamagsumova R., Evtugyn V., Evtugyn G.* Electrochemical biosensor based on polyelectrolyte complexes with dendrimer for the determination of reversible inhibitors of acetylcholinesterase // *Anal. Lett.* 2021. V. 54. P. 1709. <https://doi.org/10.1080/00032719.2020.1821700>
20. *Ogoshi T., Yamagishi T.* Pillararenes: Versatile synthetic receptors for supramolecular chemistry // *Eur. J. Org. Chem.* 2013. V. 15. P. 2961. <https://doi.org/10.1002/ejoc.201300079>
21. *Cao D., Kou Y., Liang J., Chen Z., Wang L., Meier H.* Eine leichte und effiziente Herstellung von Pillararenen und einem Pillarchinon // *Angew. Chem.* 2009. V. 121. P. 9901. <https://doi.org/10.1002/ange.200904765>
22. *Evtugyn G.A., Shamagsumova R.V., Sitdikov R.R., Stoiakov I.I., Antipin I.S., Ageeva M.V., Hianik T.* Dopamine sensor based on a composite of silver nanoparticles implemented in the electroactive matrix of calixarenes // *Electroanalysis.* 2011. V. 23. № 10. P. 2281. <https://doi.org/10.1002/elan.201100197>
23. *Kuzin Yu., Porfireva, A., Stepanova V., Evtugyn V., Stoiakov I., Evtugyn G., Hianik T.* Impedimetric detection of DNA damage with the sensor based on silver nanoparticles and neutral red // *Electroanalysis.* 2015. V. 27. № 12. P. 2800. <https://doi.org/10.1002/elan.201500312>
24. *Vandeput M., Parsajoo C., Vanheuverzwijn J., Patris S., Yardim Y., le Jeune A., Sarakbi A., Mertens A., Kauffmann J.-M.* Flow-through enzyme immobilized amperometric detector for the rapid screening of acetylcholinesterase inhibitors by flow injection analysis // *J. Pharm. Biomed. Anal.* 2015. V. 102. P. 267. <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2014.09.012>
25. *Wang B., Ye C., Zhong X., Chai Y., Chen S., Yuan R.* Electrochemical biosensor for organophosphate pesticides and huperzine-A detection based on Pd wormlike nanochains/graphitic carbon nitride nanocomposites and acetylcholinesterase // *Electroanalysis.* 2016. V. 28. P. 304. <https://doi.org/10.1002/elan.201500339>

26. *da Silva J.I., de Moraes M.C., Vieira L.C.C., Corrêa A.G., Cass Q.B., Cardoso C.L.* Acetylcholinesterase capillary enzyme reactor for screening and characterization of selective inhibitors // *J. Pharm. Biomed. Anal.* 2013. V. 73. P. 44.  
<https://doi.org/10.1016/j.jpba.2012.01.026>
27. *Kostelnik A., Pohanka M.* Superficially bound acetylcholinesterase based on a chitosan matrix for neurotoxic compound assay by a photographic technique // *Anal. Lett.* 2018. V. 51. P. 1622.  
<https://doi.org/10.1080/00032719.2017.1381846>
28. *Kostelnik A., Kopel P., Cegan A., Pohanka M.* Construction of an acetylcholinesterase sensor based on synthesized paramagnetic nanoparticles, a simple tool for neurotoxic compounds assay // *Sensors.* 2017. V. 17. P. 676.  
<https://doi.org/10.3390/s17040676>
29. *Jia J., Zhao Q., Liu Y., Gui Y., Liu G., Zhu D., Yu C., Hong Z.* Phase I study on the pharmacokinetics and tolerance of ZT-1, a prodrug of huperzine A, for the treatment of Alzheimer's disease // *Acta Pharmacol. Sin.* 2013. V. 34. P. 976.  
<https://doi.org/10.1038/aps.2013.7>
30. *Lin P.P., Li X.N., Yuan F., Chen W.L., Yang M.J., Xu H.R.* Evaluation of the in vitro and in vivo metabolic pathway and cytochrome P450 inhibition/induction profile of Huperzine A // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2016. V. 11. P. 248.  
<https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2016.10.039>
31. *Mannens G.S.J., Snel C.A.W., Hendrickx J., Verhaeghe T., le Jeune L., Bode W., van Beijsterveldt L., Lavrijsen K., Leempoels J., van Osselaer N., van Peer A., Meuldermans W.* The metabolism and excretion of galantamine in rats, dogs, and humans // *Drug Metab. Dispos.* 2002. V. 30. P. 553.  
<https://doi.org/10.1124/dmd.30.5.553>