

## СПЕЦІАЛЬНІ РОЗРОБКИ

УДК 615.9

**С.В. Дзядевич,**

доктор біологічних наук, с.н.с,

**В.М. Архипова,**

кандидат біологічних наук, с.н.с,

**В.Г. Мельник,**

кандидат технічних наук, с.н.с,

**С.В. Ленков,**

доктор технічних наук, професор

### МЕТОД ЕКСПРЕС-АНАЛІЗУ НЕРВОВО-ПАРАЛІТИЧНИХ ОТРУЙНИХ РЕЧОВИН З ВИКОРИСТАННЯМ КОНДУКТОМЕТРИЧНИХ БІОСЕНСОРІВ НА ОСНОВІ ХОЛІНЕСТЕРАЗ

*Наведено приклад інтелектуальної системи на основі кондуктометричних ферментних біосенсорів на основі холінестераз, що може бути застосована для експрес-аналізу нервово-паралітичних отруйних речовин у польових умовах. Така система є селективною завдяки використанню біологічного матеріалу, достатньо чутливою та стабільною.*

**Ключові слова:** біосенсори, бойові отруйні речовини, хімічні сполуки, нервово-паралітичні речовини.

*Приведен пример интеллектуальной системы на основе кондуктометрических ферментных биосенсоров на основе холинестераз, что может быть применена для экспресс-анализа нервно-паралитических отравляющих веществ в полевых условиях. Такая система является селективной благодаря использованию биологического материала, достаточно чувствительной и стабильной.*

**Ключевые слова:** биосенсоры, боевые отравляющие вещества, химические соединения, нервно-паралитические вещества.

*The example of intellectual system on the basis of conductometric fermental biosensors controls in terms of cholinesteraz is given. It can be applied to the express analysis of neuroparalytic poisonous substances in field conditions. Such system is selective thanks to the biological material, enough sensitive and stable.*

**Keywords:** biosensors, warfare agents, chemical compounds, neuroparalytic poisonous substances.

Виявлення складу та концентрації отруйних речовин є одним із найважливіших завдань для забезпечення безпеки навколишнього середовища і, що найважливіше, людини. Особливо гостро це питання постало для Збройних сил, підрозділів, що ліквідують надзвичайні події, у криміналістиці тощо.

Автори статті на основі багаторічних досліджень розробили інтелектуальну систему на основі кондуктометричних ферментних біосенсорів на основі холінестераз, що може бути застосована для експрес-аналізу нервово-паралітичних отруйних речовин у польових умовах [1]. Така система є селективною завдяки використанню біологічного матеріалу, достатньо чутливою та стабільною.

Нервово-паралітичні отруйні речовини (англ. *nerve agent*) головним чином відомі як нервово-паралітичні гази, хоча ці хімічні сполуки перебувають у рідкому стані при кімнатній температурі. Вони належать до класу фосфоровмісних органічних речовин (органофосфати), які порушують механізми, за допомогою яких нерви передають повідомлення до органів.

Порушення в організмі викликається блокуванням ацетилхолінестерази – фермента, який зазвичай зменшує активність ацетилхоліну, що є нейромедіатором.

Організація Об'єднаних Націй класифікує нервово-паралітичні отруйні речовини як зброю масового знищення відповідно до резолюції 687 (прийнятої у квітні 1991 року). Їх виробництво та накопичення запасів було заборонене Конвенцією про хімічну зброю 1993 року. Конвенція про хімічну зброю офіційно вступила в силу 29 квітня 1997 року.

Отруєння нервово-паралітичною речовиною призводить до сильного слиновиділення, звуження зіниць, зуду, мимовільного сечовипускання, дефекації і смерті від задухи, коли втрачається контроль над дихальними м'язами. Деякі нервово-паралітичні отруйні речовини легко випаровуються, інші – спеціально розпилюються, основний шлях потрапляння в організм пролягає через дихальну систему. Нервово-паралітичні речовини можуть також проникати в організм через шкіру.

Холінестераза – це один із багатьох ферментів, що відповідають за функціонування нервової системи як людей, так і тварин та комах. Якщо кількість цього ферменту знижується до критичного рівня, нервові імпульси, що йдуть до м'язів, не можуть довгочасно контролюватися, що може призвести до серйозних наслідків і навіть смерті [2]. При нормальному функціонуванні стимуляція рухового нерва (мотонейрона) звільняє нейромедіатор ацетилхолін, який передає імпульс до м'язів або органу. Після того як імпульс передався, фермент ацетилхолінестераза відразу ж блокує ацетилхолін, щоб м'язи або орган розслабилися. Отруйні речовини нервово-паралітичної дії порушують функціонування нервової системи, пригнічуючи функцію ацетилхолінестерази, утворюючи ковалентні зв'язки з ферментом у місці, де зазвичай проходить гідроліз ацетилхоліну. Потрапляючи в організм, вони зменшують кількість активних молекул холінестераз, необхідних для нормального функціонування організму ссавців.

Сучасні традиційні методи контролю малих концентрацій токсичних речовин використовують такі громіздкі та енергоємні способи реєстрації, як хроматографія і мас-спектроскопія. Такий аналіз потребує багато часу, є складним і високо-вартісним, до того ж неможливий у польових умовах. Тому розробка надійних, відтворюваних та простих методів аналізу, які можна використовувати за межами лабораторії для моніторингу довкілля, є вкрай важливим завданням. Подібне обладнання, що базується на традиційній сенсорній технології, є придатним для вимірювань розчиненого кисню, двоокису вуглецю, рН, замутнення тощо. Проте обладнання для експрес-аналізу в польових умовах токсичних речовин поки що не існує. Традиційна мікроелектронна технологія дозволяє створювати такі прилади, проте вона повинна бути поєднана з іншими сучасними технологіями – хімічною і біохімічною, які забезпечують молекулярне розпізнавання досліджуваних речовин.

Таким чином, створюються сучасні інтелектуальні системи, які можуть функціонувати автономно та в польових умовах [3].

Реальним втіленням такого синтезу сучасних технологій стали мікроелектронні біодатчики. Біосенсори на основі холінестераз знайшли своє застосування саме завдяки можливості їх використання для визначення слідових кількостей токсичних сполук, інгібіторів холінестераз у довкіллі.

У своїй роботі автори використовували ацетилхолінестеразу (АцХЕ) з електричного вугря з активністю 292 од.акт./мг; бутирилхолінестеразу (БуХЕ) з сироватки крові коня з активністю 13 од.акт./мг; альбумін сироватки бика, ацетилхолін хлорид (АцХ), бутирилхолін хлорид (БуХ) та глутаровий альдегід виробництва фірми Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Steinheim, Німеччина) [1, 4].

Як токсичні речовини для інактивації ферментів використовувалися: фосфорорганічні пестициди: трихлорфон [(dimethyl-2,2,2-trichlor-1-hydroxyethyl)-phosphonat], діізопропил-фторфосфат, параоксон-етил [diethyl-p-nitrophenyl phosphate], параоксон-метил [O,O-dimethyl-O-(4-nitrophenyl)-phosphate], паратіон-метил [(O,O-dimethyl-O-(4-nitrophenyl)-phosphorothiate] фірми Riedel-de-Haen (Швейцарія); карбаматний пестицид карбофуран [2,3-dihydro-2,2-dimethylbenzofuran-7-yl N-methylcarbamate] фірми Riedel-de-Haen (Швейцарія).

Як буферний розчин використовували калій-фосфатний розчин ( $\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot \text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ ) вітчизняного виробництва. Всі інші реактиви були вітчизняного та імпорного виробництва і мали кваліфікацію "ос.ч." чи "х.ч."

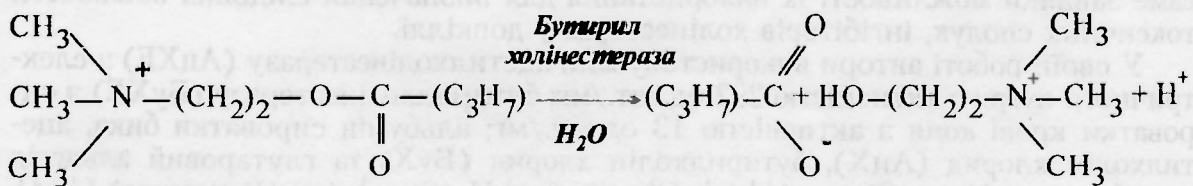
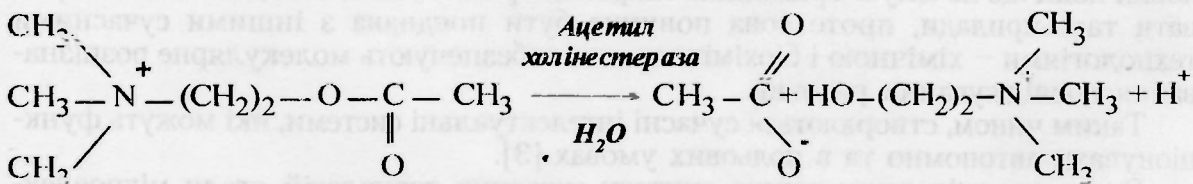
У роботі були використані кондуктометричні перетворювачі виробництва Інституту фізики напівпровідників НАН України. Вони склалися з двох ідентичних пар золотих гребінчастих електродів і виготовлялися вакуумним напиленням на керамічну основу (спечений алюмінієвий оксид товщиною 0,5 мм, розміри 5×40 мм). Чутлива поверхня кожної електродної пари була приблизно 1×1,5 мм.

Біологічно активні мембрани формували зшиванням ферменту з БСА на поверхні перетворювача в атмосфері насичених парів глютарового альдегіду. Суміш 5 % (w/v) ферменту, 5 % (w/v) БСА і 10 % (w/v) гліцерину в 20 мМ фосфатному буфері (рН 7,4) наносили краплями на чутливу поверхню одного з перетворювачів, а суміш 10 % (w/v) БСА і 10 % (w/v) гліцерину в 20 мМ фосфатному буфері (рН 7,4) – на референтний перетворювач. Потім сенсорний чип поміщали в атмосферу насичених парів глютарового альдегіду і після витримки впродовж 30 хв мембрани висушували упродовж 15 хв у повітрі за кімнатної температури.

Усі вимірювання проводилися при денному освітленні за кімнатної температури у відкритій комірці, заповненій 5 мМ розчином фосфатного буфера, рН 7,4, що активно переміщувався. Потрібні концентрації субстрату отримували додаванням визначеної кількості вихідного розчину 200 мМ АцХ чи 200 мМ БуХ. Розчини токсичних субстратів готували в дистильованій воді і використовували для інгібування ферменту в спеціальній комірці.

Диференціальний вихідний сигнал між вимірювальним і референтним сенсорами ресструвався за допомогою виготовленого в Інституті електродинаміки кондуктометричного приладу [5].

В основі роботи біосенсорів на основі холінестераз лежать такі ферментативні реакції:



У ході цих двох реакцій генеруються протони, що спричиняє зміну провідності всередині мембрани, тому ми можемо використовувати кондуктометричні датчики для визначення зміни провідності.

Калібрувальні криві кондуктометричного АцХЕ біосенсора для різних токсичних речовин представлені на рис. 1. Вони були лінійні в напівлогарифмічному масштабі для всіх токсинів, що аналізувались. Мінімальна межа визначення була:  $5,0 \cdot 10^{-11}$  М – для діізопропілфторфосфату,  $1,0 \cdot 10^{-8}$  М – для параоксон-етилену,  $5,0 \cdot 10^{-7}$  М – для параоксон-метилу,  $3,0 \cdot 10^{-7}$  М – для трихлорфону,  $5,0 \cdot 10^{-6}$  М – для паратіон-метилу і  $2,0 \cdot 10^{-6}$  М – для карбофурану.

Таким чином, максимальна чутливість біосенсорів на основі АцХЕ та БуХЕ була отримана для діізопропілфторфосфату, тоді як мінімальна для паратіон-метилу (табл. 1).

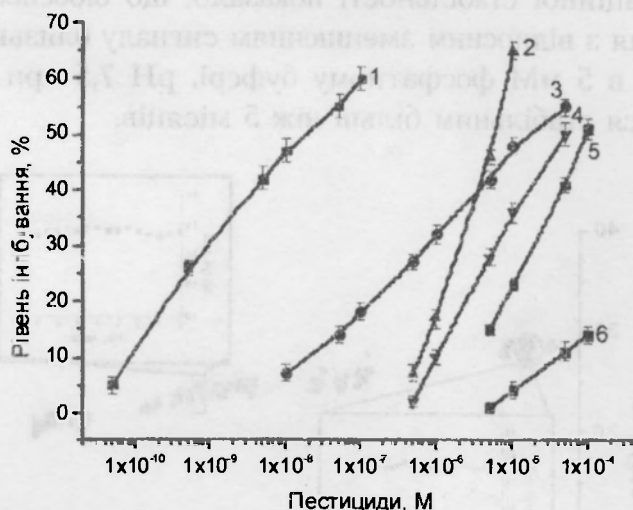


Рис. 1. Калібрувальні криві кондуктометричного АцХЕ біосенсора для визначення діізопропілфторфосфату (1), трихлорфону (2), параоксон-етилену (3), параоксон-метилу (4), карбофурану (5) та паратіон-метилу (6). Вимірювання були проведені в 5 мМ фосфатному буфері, рН 7,5, час інкубації фермента з інгібітором 20 хв, концентрація АцХ 2 мМ

Таблиця 1

#### Динамічний діапазон роботи розроблених біосенсорів для визначення деяких токсичних речовин

Тип токсину	Діапазон визначення	
	АцХЕ	БуХЕ
Діізопропілфтор-фосфат	$5,0 \times 10^{-11} - 1,0 \times 10^{-7}$	$5,0 \times 10^{-11} - 5,0 \times 10^{-7}$
Параоксон-етил	$1,0 \times 10^{-8} - 5,0 \times 10^{-5}$	$5,0 \times 10^{-7} - 5,0 \times 10^{-5}$
Параоксон-метил	$5,0 \times 10^{-7} - 5,0 \times 10^{-5}$	$5,0 \times 10^{-6} - 5,0 \times 10^{-5}$
Трихлорфон	$3,0 \times 10^{-7} - 1,0 \times 10^{-5}$	$5,0 \times 10^{-7} - 1,0 \times 10^{-5}$
Паратіон-метил	$5,0 \times 10^{-6} - 1,0 \times 10^{-4}$	$1,0 \times 10^{-5} - 1,0 \times 10^{-4}$
Карбофуран	$2,0 \times 10^{-6} - 1,0 \times 10^{-4}$	$1,0 \times 10^{-6} - 1,0 \times 10^{-4}$

Досліджені токсичні речовини можна розмістити за силою їх інгібування в наступний ряд: діізопропілфторфосфат > параоксон-етил > трихлорфон > параоксон-метил > карбофуран > паратіон-метил.

Відтворюваність біосенсорів, операційна стабільність та стабільність при зберіганні також були всебічно досліджені. Комбіновані результати такого дослідження представлено на рис. 2. При цьому відтворюваність та операційна стабільність аналізувались протягом дня, потім біосенсор зберігався в робочому буферному розчині при кімнатній температурі протягом ночі чи кількох днів, і потім знову аналізувалась його відтворюваність та операційна стабільність. Така процедура повторювалась декілька разів. Відгуки біосенсора були добре відтворювані, відносне стандартне відхилення дорівнювало близько 3 %. Дослідження операційної стабільності показало, що біосенсор був стабільним протягом цілого дня з відносним зменшенням сигналу близько 1 % в день. При зберіганні сенсора в 5 мМ фосфатному буфері, рН 7,5 при температурі 4 °С, біосенсор залишався стабільним більш ніж 5 місяців.

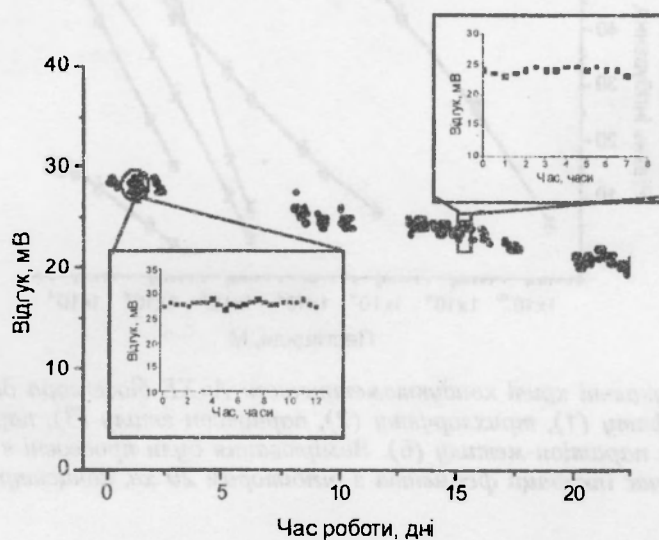


Рис. 2. Відтворюваність, операційна стабільність та стабільність при зберіганні БуХЕ біосенсора. Вимірювання були проведені в 5 мМ фосфатному буфері, рН 7,2, концентрація БуХ – 1 мМ

Розроблені авторами кондуктометричні біосенсори на основі холінестерази пропонується застосовувати для експрес-аналізу нервово-паралітичних отруйних речовин (у тому числі і системах раннього попередження). Такі біосенсори є конкурентноспроможними і водночас комплементарними з іншими аналітичними методами. Наприклад, після отримання за допомогою біосенсорів попередніх результатів про наявність у зразках токсичних речовин у лабораторії можуть бути виконані більш докладні і детальні вимірювання за допомогою традиційних класичних аналітичних методів. Це може забезпечити збереження часу і коштів при прийнятті термінових рішень з локальних проблем екологічної безпеки і криміналістики.

## СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

1. *Lenix Я. І.* Створення мікроелектронних датчиків нового покоління для інтелектуальних систем: Монографія / Я.І. Леніх, Ю.О. Гордієнко, С.В. Дзяевич, А.О. Дружинін, А.А. Євтух, С.В. Ленков, В.Г. Мельник, В.О. Романов. – Одеса : Астропринт, 2010. – 296 с.
2. *Massoulé J., Pezzementi L., Bon S., Krejci E., Vallette F.M.* Molecular and cellular biology of cholinesterases // *Prog. Neurobiol.* – 1993. – Vol. 41. – P. 31–91.
3. *Ленков С.В., Леніх Я.І., Мельник В.Г., Дзяевич С.В.* Мікроелектронні датчики для інформаційних (інтелектуальних) систем спеціального призначення / *С.В. Ленков, Я.І. Леніх, В.Г. Мельник, С.В. Дзяевич* // *Наука і оборона.* – К., 2010. – № 3. – С. 54–55.
4. *Архипова В.М.* Дослідження та оптимізація кондуктометричних перетворювачів на основі планарної технології / *В.М. Архипова, А.Л. Бережецький, О.А. Шул'га, Ж.-М. Шовелон, О.П. Солдаткін, С.В. Дзяевич* // *Сенсорная электроника и микросистемные технологии.* – 2005. – № 2. – С. 48–54.
5. *Dzyadevich S.V., Shul'ga A.A., Soldatkin A.P., Nyamsi Hendji A.M., Jaffrezic-Renault N., Martelet C.* Application of conductometric for sensitive detection of pesticides biosensor based on the cholinesterases // *Electroanalysis.* – 1994. – Vol. 6. – P. 752–758.

Отримано 06.04.2011