

БІОСЕНСОРИ

BIOSENSORS

УДК: 543.06 + 577.15 + 543.553

DOI <http://dx.doi.org/10.18524/1815-7459.2018.2.136886>

РОЗРОБКА АМПЕРОМЕТРИЧНОГО БІОСЕНСОРА ДЛЯ ВИЗНАЧЕННЯ АЦЕТИЛХОЛІНУ В БІОЛОГІЧНИХ ЗРАЗКАХ

Д. В. Книжникова^{1,2}, І. С. Кучеренко¹, О. О. Солдаткін^{1,2}, С. В. Дзядевич^{1,2}, О. П. Солдаткін^{1,2}

¹Інститут молекулярної біології і генетики НАН України,
вул. Заболотного, 150, 03148, м. Київ, Україна

²Київський національний університет імені Тараса Шевченка,
вул. Володимирська, 64, 01003, м. Київ, Україна

e-mails: melonika5@gmail.com, kucherenko.i.s@gmail.com, alex_sold@yahoo.com,
dzyad@yahoo.com, a_soldatkin@yahoo.com

РОЗРОБКА АМПЕРОМЕТРИЧНОГО БІОСЕНСОРА ДЛЯ ВИЗНАЧЕННЯ АЦЕТИЛХОЛІНУ В БІОЛОГІЧНИХ ЗРАЗКАХ

Д. В. Книжникова, І. С. Кучеренко, О. О. Солдаткін, С. В. Дзядевич, О. П. Солдаткін

Анотація. Робота присвячена розробці амперометричного біосенсора для визначення ацетилхоліну в біологічних розчинах. В роботі було порівняно різні варіанти коїмобілізації холіноксидази та ацетилхолінестерази, та обрано двошаровий метод іммобілізації (першим шаром наносили мембрану з ацетилхолінестеразою, а другим шаром мембрану з холіноксидазою). Далі було досліджено вплив параметрів розчину (буферна ємність, іонна сила, рН) на аналітичні характеристики біосенсора. Показано, що біосенсор характеризується гарною відтворюваністю сигналу та операційною стабільністю. Також в роботі було перевірено селективність біосенсора на речовини, які можуть бути присутніми в біологічних зразках, та досліджено основні аналітичні характеристики біосенсора: чутливість, лінійний діапазон роботи, мінімальну межу визначення, шум, дрейф та ін. Доведено, що розроблений біосенсор можна використовувати для визначення концентрацій ацетилхоліну в біологічних зразках.

Ключові слова: амперометричний біосенсор, холін, ацетилхолін, холіноксидаза, ацетилхолінестераза

DEVELOPMENT OF AN AMPEROMETRIC BIOSENSOR FOR THE ACETYLCHOLINE DETERMINATION IN BIOLOGICAL SAMPLES

D. V. Knyzhnykova, I. S. Kucherenko, O. O. Soldatkin, S. V. Dzyadevych, A. P. Soldatkin

Abstract. The work is devoted to the development of amperometric biosensor for the determination of acetylcholine in biological samples. In the work, two different variants of co-immobilization of choline oxidase and acetylcholinesterase were compared, and two-layer method of immobilization was selected (acetylcholinesterase-based membrane was deposited as the first layer, and choline oxidase-based membrane – as the second layer). Next, influence of the solution properties (buffer capacity, ionic strength, pH) on the biosensor analytical characteristics was studied. It was shown that the biosensor is characterized by good signal reproducibility and operational stability. Selectivity of the biosensor towards substances, which can be present in biological samples, was evaluated. Main analytical characteristics of the biosensor (sensitivity, linear range, limit of detection, noise, drift, reproducibility of responses) were determined. It was proven that the developed biosensor could be used for the determination of acetylcholine concentrations in biological samples.

Keywords: amperometric biosensor, choline, acetylcholine, choline oxidase, acetylcholinesterase

РАЗРАБОТКА АМПЕРОМЕТРИЧЕСКОГО БИОСЕНСОРА ДЛЯ ОПРЕДЕЛЕНИЯ АЦЕТИЛХОЛИНА В БИОЛОГИЧЕСКИХ ОБРАЗЦАХ

Д. В. Книжникова, И. С. Кучеренко, О. О. Солдаткин, С. В. Дзядевич, А. П. Солдаткин

Аннотация. Работа направлена на разработку амперометрического биосенсора для определения ацетилхолина в биологических жидкостях. В работе сравнивались разные варианты коиммобилизации холиноксидазы и ацетилхолинэстеразы и выбрано двухслойный метод иммобилизации (первым слоем наносили мембрану с ацетилхолинэстеразой, а вторым слоем - мембрану с холиноксидазой). Далее было исследовано влияние параметров раствора (буферная емкость, ионная сила, рН) на аналитические характеристики биосенсора. Показано, что биосенсор характеризуется хорошей воспроизводимостью сигнала и операционной стабильностью. Также в работе проверено селективность биосенсора на вещества, которые могут содержаться в биологических образцах, и исследованы основные аналитические характеристики биосенсора: чувствительность, линейный диапазон работы, минимальную границу определения, шум, дрейф, воспроизводимость откликов биосенсора. Доказано, что разработанный биосенсор может быть использован для определения концентраций ацетилхолина в биологических образцах.

Ключевые слова: амперометрический биосенсор, холин, ацетилхолин, холиноксидаза, ацетилхолинэстераза

1. ВСТУП

Ацетилхолін – це органічна сполука, яка є складним ефіром оцтової кислоти та холіну. Ацетилхолін виступає нейромедіатором у нервовій системі багатьох тварин і синтезується в нейронах шляхом ацетилювання холіну ферментом холінацетилтрансферазою. Утворений ацетилхолін зв'язується зі специфічними білками-носіями, утворюючи комплекси, що не розщеплюються ацетилхолінестеразою. Під час проведення нервового імпульсу під дією іонів калію відбувається дисоціація комплексів і виділення ацетилхоліну. Вивільнений ацетилхолін взаємодіє з холінорецепторами постсинаптичної мембрани в синаптичній щілині і спричиняє виникнення нервового імпульсу. Після цього ацетилхолін розщеплюється ацетилхолінестеразою. Цей процес має досить важливе значення, оскільки накопичення ацетилхоліну негативно впливає на обмін речовин в організмі, спричинює сповільнення частоти серцевих скорочень, звуження альвеол бронхів та розширення артерійол, призводить до отруєння організму [1].

Ацетилхолін передає імпульси від одного нейрона до іншого. Головною функцією ацетилхоліна є стимуляція скелетно-м'язової системи. Саме він забезпечує скорочення та розслаблення м'язів. Також ацетилхолін впливає на пам'ять та здатність до навчання. Відсутність ацетилхоліну у певних ділянках головного мозку є причиною розвитку хвороб Альцгеймера, Паркінсона, епілепсії, деменції та інших, коли спостерігаються збої у роботі механізму міжсинаптичної передачі сигналів за участю ацетилхоліну. Для вироблення ацетилхоліну необхідний холін, тому при нестачі холіну виникає дефіцит ацетилхоліну і нервові розлади [2, 3]. Ацетилхолін відповідає за більшу частину стимуляції м'язів, в тому числі м'язів шлунково-кишкового тракту. Він також знаходиться в сенсорних нейронах і в вегетативній нервовій системі і має певну роль в плануванні швидкого руху очей під час сну.

Моніторинг рівня холіну і ацетилхоліну в сироватці крові є дуже важливим для виявлення нервово-м'язових захворювань, таких як міастенія, порушення холінергічної нейротрансмісії [4, 5].

Безпосередній моніторинг нейротрансмітерів у живих організмах, попри численні дослідження, проведені протягом двох останніх десятиріч, все ще не втрачає своєї актуальності. Розмаїття нейротрансмітерів у нейронній мережі мозку поряд з малою концентрацією, за якої вони виділяються у міжклітинному проміжку, становлять серйозну технічну перешкоду, коли йдеться про їхнє визначення. Ацетилхолін є добре відомим трансмітером завдяки його ролі у сигнальних зв'язках мозку. Синтезований у різних нейронних вузлах, від варолієвого мосту до стовбурових мозкових структур, він виділяється у специфічних місцях по-різному у відповідності до поведінкових ситуацій, в яких опиняються тварини (зміна стану від сну до пробудження, увага, стрес і т. ін.).

На теперішній час розроблено велику кількість методів визначення нейротрансмітерів, наприклад, біохімічний аналіз із застосуванням радіоактивних міток [6,7], хроматографічний аналіз (HPLC) [8-10], мас-спектрометрія, мікродіаліз з електрохімічним визначенням [11, 12] та інші. Проте, цим методам притаманні деякі недоліки, основними з яких є довготривалість аналізу, низька анатомічна розподільча здатність при *in vivo* дослідженнях і відносна складність необхідного технічного супутнього обладнання. Розумна альтернатива для подолання цих недоліків вбачається в застосуванні імплантованих до організму мікробіосенсорів.

Існує ряд амперометричних біосенсорів для визначення ацетилхоліну, в основі яких лежать ферменти ацетилхолінестераза і холіноксидаза, які іммобілізовані на платинові електроди [13, 14] чи вуглецеві електроди [15]. Також описано оптичні біосенсори для визначення ацетилхоліну [16]. Але всі описані біосенсори мали низьку стабільність при зберіганні, чутливість, або високу складність у виготовленні.

Метою даної роботи було створення простого у виготовленні та використанні амперометричного біосенсора для визначення концентрацій ацетилхоліну у біологічних рідинах.

2. МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ

2.1. МАТЕРІАЛИ

В роботі було використано ферменти холінооксидазу (ХО) із *Alcaligenes sp.* з активністю 15 од. акт./мг та ацетилхолінестеразу (АХЕ) із *Electrophorus electricus* з активністю 426 од. акт./мг фірми Sigma-Aldrich (США). Бичачий сироватковий альбумін (БСА, фракція V), гліцерол, НЕРЕС, 25 % водний розчин глутарового альдегіду (ГА), холін хлорид, ацетилхолін хлорид, глутамат натрію, лактат натрію, піруват натрію, глюкоза були отримані від фірми Sigma-Aldrich (США). KH_2PO_4 та інші сполуки, що використовувалися в роботі, були вітчизняного виробництва та мали ступінь чистоти „х.ч.“ та „ч.д.а.“.

2.2. ВИГОТОВЛЕННЯ БІОСЕЛЕКТИВНИХ ЕЛЕМЕНТІВ

Біоселективні елементи біосенсорів отримували шляхом ковалентної зшивки ферментів з ГА на поверхні амперометричного перетворювача. Для виготовлення біоселективної мембрани для визначення ацетилхоліну використовували розчини холінооксидази та ацетилхолінестерази. Вихідний розчин ХО для приготування ферментної мембрани містив 8 % (тут і далі – масова частка) ХО, 4 % БСА, 10 % гліцеролу в 100 мМ фосфатному буферному розчині, рН 6,5. Розчин АХЕ гелю містив 0,5% АХЕ, 5% БСА, 10% гліцеролу в 100 мМ фосфатному буферному розчині, рН 6,5. Гліцерол додавали, щоб стабілізувати фермент впродовж іммобілізації та запобігти передчасному висиханню краплі розчину на перетворювачі і поліпшити адгезію мембрани до поверхні перетворювача. В роботі перевірявся найкращий варіант іммобілізації ХО та АХЕ в різних комбінаціях та послідовностях (коіммобілізація

або двошарове нанесення). Перед нанесенням кожного ферментного гелю на поверхню перетворювачів його змішували з водним розчином глутарового альдегіду (зшиваючого агенту) у співвідношенні 1:1. Одразу після цього отриману суміш наносили на робочі поверхні перетворювачів та тримали протягом 10 хв. на повітрі за кімнатної температури. Після іммобілізації, біосенсори відмивали в робочому буферному розчині від незв'язаних компонентів біоселективної мембрани та надлишку глутарового альдегіду протягом декількох хвилин.

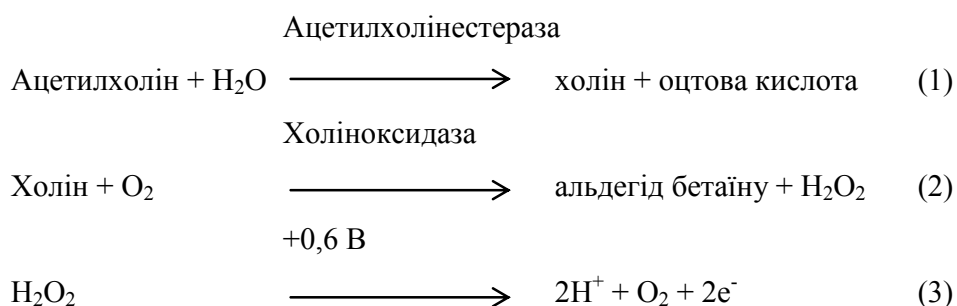
2.3. МЕТОДИКА ВИМІРЮВАННЯ

Для біосенсорних вимірювань використовувалась триелектродна схема амперометричного аналізу. Робочими перетворювачами для створення біосенсорів виступали платинові дискові електроди власного виробництва [17]. Біосенсор, допоміжний платиновий електрод та Ag/AgCl електрод порівняння під'єднували до потенціостату PalmSens (PalmInstruments BV, Нідерланди). Виміри проводили за кімнатної температури у відкритій вимірювальній комірці об'ємом 2,5 мл при постійному перемішуванні та при постійному потенціалі +0,6 В відносно Ag/AgCl електрода порівняння. Ми використовували робочий фосфатний буфер 5 мМ, рН 6,5. Усі дослідження проводились щонайменше у трьох повторностях. На графіках представлено середнє значення результатів \pm стандартне відхилення.

3. РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

3.1. ПРИНЦИП РОБОТИ БІОСЕНСОРА

В основі роботи амперометричного біосенсора для визначення ацетилхоліну лежать ферментативні реакції (1) і (2), які відбуваються в біоселективній мембрані. Під дією ацетилхо-



лінестрази, ацетилхолін розкладається на холін і оцтову кислоту. Після цього відбувається окиснення холіну холіноксидазою з утворенням електрохімічно-активного перекису водню. При прикладанні позитивного потенціалу (+0,6 В) на електроді відбувається реакція розкладу перекису водню (3), в результаті якої змінюється сила струму в електрохімічній комірці, яка реєструється виміральною установкою.

3.2. ПІДБІР ОПТИМАЛЬНИХ УМОВ ІММОБІЛІЗАЦІЇ БІОСЕЛЕКТИВНОГО ЕЛЕМЕНТУ

Робота біосенсора залежить від методики іммобілізації ферменту, використаній при створенні біосенсора, та співвідношення компонентів у біоселективній мембрані. Тому першим етапом нашої роботи був підбір оптимальних умов для створення біоселективної мембрани. Для дослідження було використано 3 варіанти іммобілізації ХО та АХЕ на перетворювачі: (1) іммобілізація ХО першим шаром, АХЕ – другим шаром; (2) іммобілізація АХЕ першим шаром, ХО – другим шаром; (3) коіммобілізація суміші ХО і АХЕ єдиним шаром. Важливими аналітичними характеристиками біосенсорів є мінімальна межа визначення, чутливість до субстрату та відтворюваність відгуків, тому для визначення найкращого варіанту іммобілізації ми проаналізували кількісні зміни цих характеристик для біосенсорів, виготовлених різними способами. Результати наведені в Табл. 1.

Як видно з таблиці, величина відгуку, а отже, і чутливість біосенсора до 1 мМ ацетилхоліну були найбільшими, у біосенсорів на основі двошарової мембрани (перший шар виготовляли змішуванням ферментного гелю з 0,5% АХЕ, а другий шар – 8% ХО). Також при цьому способі іммобілізації можна вимірювати найменші концентрації ацетилхоліну в зразках. Найменша похибка вимірювання спостерігалась при іммобілізації першим шаром 8% ХО, і другим шаром 0,5% АХЕ, але і чутливість до холіну і ацетилхоліну в цьому випадку були найменшими. Біосенсори, виготовлені шляхом ко-іммобілізації двох ферментів, також мали незадовільні аналітичні характеристики. Таким чином, в подальшій роботі біосенсори виготовляли шляхом іммобілізації 0,5% АХЕ в першому шарі мембрани та 8% ХО в другому шарі.

3.3. ДОСЛІДЖЕННЯ ВПЛИВУ ПАРАМЕТРІВ РОЗЧИНУ НА РОБОТУ БІОСЕНСОРА

Оскільки реальні зразки біологічних розчинів зазвичай мають високу іонну силу та буферну ємність, що може ускладнити проведення біосенсорного аналізу, було досліджено вплив основних параметрів розчину на роботу біосенсора для визначення концентрацій ацетилхоліну.

Для перевірки впливу буферної ємності на величину відгуків біосенсорів був використаний робочий буферний розчин HEPES в діапазоні концентрації від 1 мМ до 50 мМ. Ре-

Таблиця 1.

Порівняння аналітичних характеристик біосенсорів для різних методів іммобілізації

Метод іммобілізації	Відгук на 1 мМ ацетилхоліну, нА	Відгук на 1 мМ холіну, нА	Відтворюваність відгуків на ацетилхолін, %	Мінімальна межа визначення ацетилхоліну, мкМ
I шар: ХО 8% II шар: АХЕ 0,5%	13,8	25	10,7	10,3
I шар: АХЕ 0,5% II шар: ХО 8%	65,4	74	13,4	4,6
Ко-іммобілізація: 0,5% АХЕ + 8% ХО	1,6	2,6	18,8	103,9

зультати експерименту представлені на Рис. 1. Експеримент показав, що зміна значення буферної ємності незначною мірою впливає на роботу біосенсора.

У складі біологічних розчинів можуть бути присутні катіони одно- та двовалентних металів, а також аніони органічних та неорганічних кислот. Також, іонна сила розчину змінюється при зміні концентрації буферного розчину. Відповідно, дослідження величин відгуків біосенсорів в умовах різної іонної сили розчину проводили з використанням робочого буферного розчину, що містив KCl в концентрації від 0 мМ до 100 мМ (Рис. 2). З графіку можна зробити висновок, що різні концентрації хлориду калію в розчині суттєво не впливають на чутливість біосенсора до ацетилхоліну.

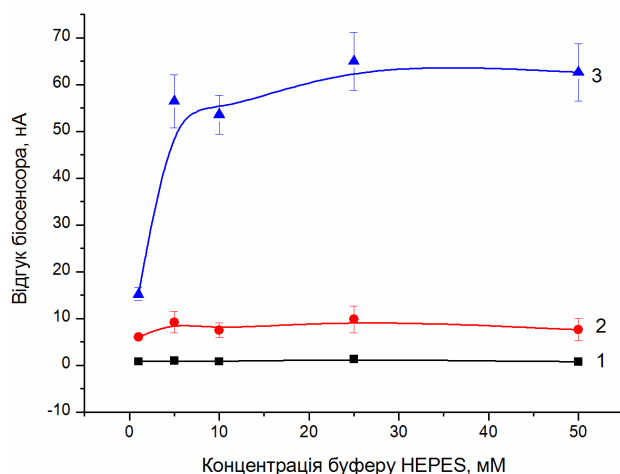


Рис. 1. Залежність величини відгуку біосенсора від концентрації буферного розчину. Концентрації ацетилхоліну – 10 мкМ (1), 100 мкМ (2) та 1000 мкМ (3). Вимірювання проводились в буферному розчині HEPES за різних концентрацій, рН 7,4, за постійного потенціалу +0,6 В відносно Ag/AgCl електрода порівняння.

Отже, з отриманих даних можна вважати, такі властивості розчину як буферна ємність та іонна сила майже не мають впливу на роботу біосенсора, що є типовим для амперометричних біосенсорів. Відповідно, біосенсор може використовуватися для аналізу біологічних зразків різного складу.

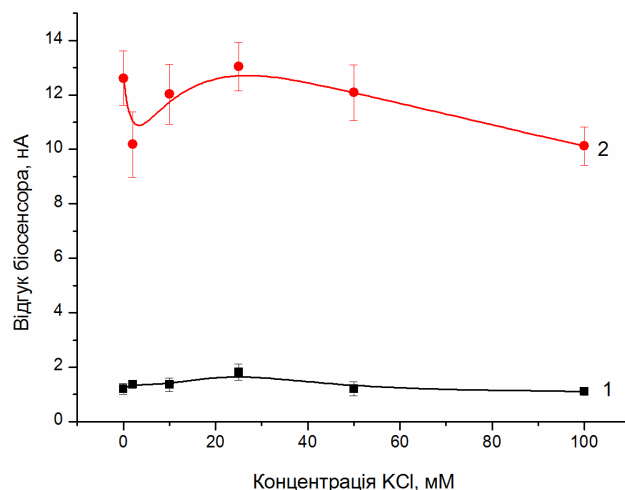


Рис. 2. Вплив іонної сили розчину на величину відгуку біосенсора. Концентрації ацетилхоліну – 10 мкМ (1) та 100 мкМ (2). Вимірювання проводились в 25 мМ буферному розчині HEPES, рН 7,4, за постійного потенціалу +0,6 В відносно Ag/AgCl електрода порівняння.

3.4. ЗАЛЕЖНІСТЬ РОБОТИ БІОСЕНСОРА ВІД рН

Відомо, що швидкість ферментативної реакції залежить від значення рН розчину. Відповідно, необхідно було дослідити вплив рН буферу на роботу розробленого біосенсора, оскільки внаслідок іммобілізації ферменту може змінюватись рН оптимум його роботи. Тому було проведено дослідження впливу рН робочого буферного розчину на роботу біосенсора для визначення ацетилхоліну. Для проведення експерименту було використано універсальний буферний розчин (50 мМ лимонної кислоти, тріс-НСІ, калію дигідрофосфату, та тетраборату натрію), який має однакову буферну ємність у широкому діапазоні значень рН. Дослідження проводились у діапазоні рН від 6,16 до 8,69. Результати експерименту наведено на Рис. 3.

Відомо, що для нативних ферментів АцХЕ та ХО рН оптимум лежить в діапазоні від 8 до 8,5. В наших експериментах максимальне значення відгуку біосенсора спостерігалось при рН 8,29, що свідчить про те, що рН-оптимум роботи ферментів практично не змінився після іммобілізації, що ще раз підтверджує адекватність підібраної методики іммобілізації.

Але наш біосенсор в подальшому планується використовувати для вимірювання аце-

тилхоліну в крові, тому наступні експерименти проводились при значенні рН, яке має кров, – 7,4, за якого відгуки біосенсора ще були достатньо високими.

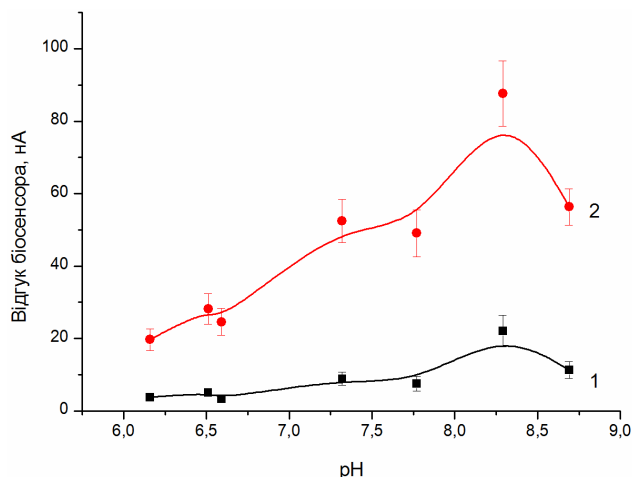


Рис. 3. Залежність величини відгуку біосенсора від рН буферного розчину. Концентрації ацетилхоліну – 100 мкМ (1) та 1000 мкМ (2). Вимірювання проводились у 50 мМ універсальному буферному розчині при різних значеннях рН за постійного потенціалу +0,6 В відносно Ag/AgCl електрода порівняння.

3.5. ОПЕРАЦІЙНА СТАБІЛЬНІСТЬ БІОСЕНСОРА

Для перевірки можливості стабільної роботи і зберігання біосенсора було перевірено операційну стабільність розробленого біосенсора для визначення ацетилхоліну. Для цього впродовж дня отримували 3 відгуки на дві різні концентрації ацетилхоліну (100 мкМ та 1000 мкМ), після чого біосенсор зберігали в сухому вигляді за температури -18°C до наступного використання. Далі, через кілька діб, експеримент повторювався: знову отримували відгуки біосенсорів на ті ж самі концентрації ацетилхоліну. Сумарний термін зберігання біосенсора становив 7 діб. Результати дослідження представлено на Рис. 4. Як видно з рисунку, відгуки біосенсора поступово зменшувались протягом всього періоду вимірювань, але через 7 діб біосенсор все ще був придатним для використання за умови його додаткового калібрування. За цей час величина відгуків біосенсора впала на 25% або 50%, в залежності від доданої концентрації ацетилхоліну (відповідно, 100 мкМ або 1000 мкМ).

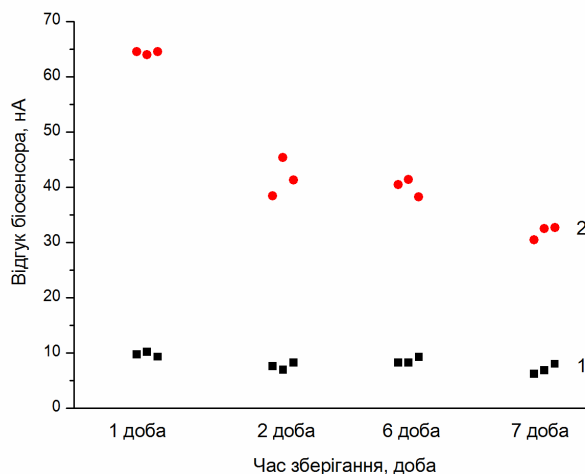


Рис. 4. Операційна стабільність відгуків біосенсора впродовж 7 днів. Концентрації ацетилхоліну – 100 мкМ (1) та 1000 мкМ (2). Вимірювання проводились в 25 мМ буферному розчині HEPES, рН 7,4, за постійного потенціалу +0,6 В відносно Ag/AgCl електрода порівняння.

3.6. ВІДТВОРЮВАНІСТЬ ВІДГУКІВ БІОСЕНСОРА

Для того щоб перевірити наскільки в процесі безперервного використання біосенсора, відбувається вимивання іммобілізованого ферменту і наскільки зменшується активність ферментів, провели перевірку відтворюваності відгуків біосенсора при безперервній роботі. Для цього впродовж одного робочого дня ми отримали 18 відгуків на концентрації ацетилхоліну 100 мкМ та 1000 мкМ (Рис. 5). При цьому біосенсор протягом всього дня знаходився у робочому буферному розчині з перемішуванням. Помітного падіння відгуків за 18 вимірювань не відбувалось: активність впала на 3%, при цьому відносне стандартне відхилення відгуків біосенсора становило 3,5%.

3.7. ДОСЛІДЖЕННЯ СЕЛЕКТИВНОСТІ БІОСЕНСОРА

Оскільки біологічні зразки можуть містити у своєму складі сполуки, що можуть впливати на роботу біосенсора для визначення ацетилхоліну, необхідно було показати специфічність біосенсора саме до ацетилхоліну. Тому було перевірено чутливість біосенсора до деяких можливих інтерферуючих субстратів, таких як піруват, лактат, глутамат, холін та глюкоза. На Рис. 6 показано, що біосенсор на основі ХО та АХЕ не реагує на додавання даних сполук

у вимірювану комірку, і дає відгук лише при додаванні холіну та ацетилхоліну. Реакція на холін, є логічною оскільки в складі біосенсорної мембрани присутня холін оксидаза.

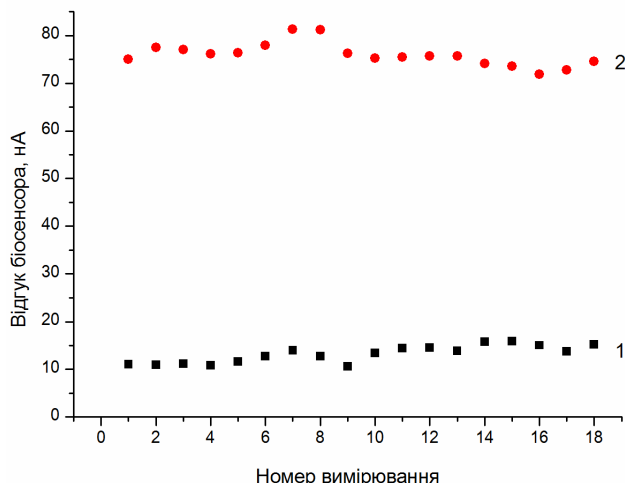


Рис. 5. Відтворюваність відгуків біосенсора на основі ХО та АХЕ при безперервній роботі. Концентрації ацетилхоліну – 100 мкМ та 1000 мкМ. Вимірювання проводились у 25 мМ буферному розчині НЕРЕС, рН 7,4, за постійного потенціалу +0,6 В відносно Ag/AgCl електрода порівняння.

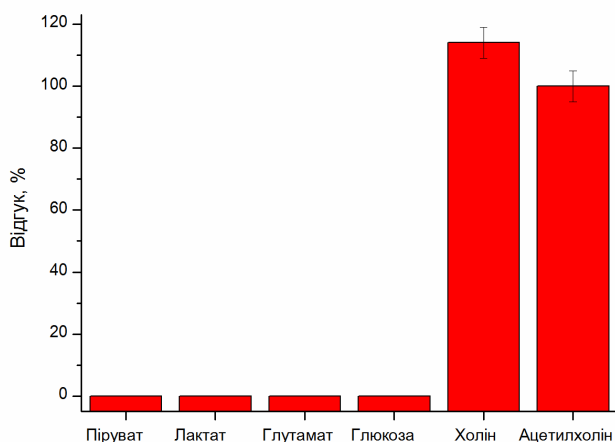


Рис. 6. Відгуки амперометричного біосенсора при додаванні до робочої комірки різних речовин; всі концентрації були по 1 мМ. Вимірювання проводились в 25 мМ буферному розчині НЕРЕС, рН 7,4, за постійного потенціалу +0,6 В відносно Ag/AgCl електрода порівняння.

3.8. АНАЛІТИЧНІ ХАРАКТЕРИСТИКИ БІОСЕНСОРА

За оптимізованих умов виготовлення та роботи розробленого біосенсора була побудована типова калібрувальна крива біосенсора для визначення ацетилхоліну (Рис. 7) та було визначено основні аналітичні характеристики біосенсора. Лінійна ділянка даної калібрувальної кривої описується рівнянням $I = 1376,5 \cdot C + 2,6$ ($R^2=0,999$), де C – концентрація ацетилхоліну (мМ).

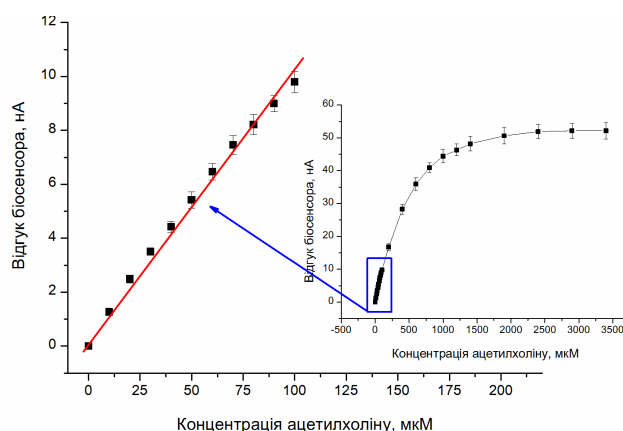


Рис. 7. Калібрувальна крива біосенсора на основі ХО та АХЕ для визначення ацетилхоліну. Вимірювання проводились в 25 мМ буферному розчині НЕРЕС, рН 7,4, за постійного потенціалу + 0,6 В відносно Ag/AgCl електрода порівняння.

Основні аналітичні характеристики біосенсора для визначення АцХ наведено у Табл. 2. З отриманих даних, можна зробити висновок, що біосенсор характеризується високою чутливістю до субстрату за стабільної відтвореної роботи, а також має досить малий шум та дрейф сигналу, що дає змогу визначати мікромольні концентрації АцХ.

4. ВИСНОВКИ

В роботі розроблено новий біосенсор для визначення АцХ. Для створення біоселективного елементу було перевірено декілька спо-

Таблиця 2.

Основні аналітичні характеристики біосенсора для визначення ацетилхоліну.

Чутливість, нА/мМ	Лінійний діапазон роботи, мкМ	Мінімальна межа вимірювання, мкМ	Шум базової лінії, нА	Відтворюваність відгуків, %	Дрейф базової лінії, нА/с
98	10-200	3,8	0,3	3,5	0,1

собів виготовлення біоселективної мембрани біосенсора. Найкращим методом виявився двошаровий метод іммобілізації ХО та АХЕ: в першому шарі іммобілізували АХЕ, в другому – ХО. Показано, що параметри робочого буферного розчину (буферна ємність та іонна сила) суттєво не впливають на характеристики біосенсора. Максимальні відгуки біосенсора спостерігались при рН 8,29 Біосенсор характеризується гарною відтворюваністю сигналу та операційною стабільністю, з похибкою відтворюваності 3,5%. Перевірено селективність біосенсора відносно речовин, які можуть бути присутніми в біологічних зразках, чутливість до них не виявлено. Визначено основні аналітичні характеристики біосенсора: чутливість – 98 нА/мМ, лінійний діапазон роботи - 10-200 мкМ, мінімальну межу визначення - 3,8 мкМ, шум сигналу – 0,3 нА, дрейф - 0,1 нА/с. Запропонований біосенсор на основі ХО та АХЕ в подальшому можна використати для вимірювання концентрацій ацетилхоліну в реальних біологічних зразках та як складову частину масиву біосенсорів для одночасного вимірювання декількох речовин.

ПОДЯКА

Робота виконана за фінансової підтримки НАН України в рамках цільової програми наукових досліджень НАН України «Розумні» сенсорні прилади нового покоління на основі сучасних матеріалів та технологій».

СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

[1]. К. М. Sitnik, V. O. Topachevsky. *Biologichniy slovnyk. Golovna Redaktsiya Ukrainiis`koi Raianskoi Entsiklopedii*, K. 680 s. (1986).

[2]. J. R. Cooper, F. E. Bloom, R. H. Roth. *The Biochemical Basis of Neuropharmacology*. Oxford University Press, USA (2003).

[3]. I. Torshin, A. Gromova. *Ekspertnyy analiz dannykh v molekulyarnoy farmakologii*. МС-НМО, М. 688 s. (2015).

[4]. D. D. Wise, T. V. Barkhimer, P. -A. Brault, J. R. Kirchhoff, W. S. Messer, R. A. Hudson. Internal standard method for the measurement of choline and acetylcholine by capillary electrophoresis with electrochemical detection // *J.*

Chromatogr. B., 775(1), pp. 49-56 (2002).

[5]. S. Upadhyay, G. R. Rao, M. K. Sharma, B. K. Bhattacharya, V. K. Rao, R. Vijayaraghavan. Immobilization of acetylcholinesterase–choline oxidase on a gold–platinum bimetallic nanoparticles modified glassy carbon electrode for the sensitive detection of organophosphate pesticides, carbamates and nerve agents // *Biosens. Bioelectron.*, 25(4), pp. 832-838 (2009).

[6]. P. G. Guyenet, A. F. Javory, J. C. Beaujouan, B. J. Rossier, J. Glowinski. Effects of dopaminergic receptor agonists and antagonists on the activity of the neo-striatal cholinergic system // *Brain Res.*, 84, pp. 227-244 (1975).

[7]. D. R. Haubrich, N. Gerber, A. B. Pflueger, M. Zweig. Tissue Choline Studied Using a Simple Chemical Assay // *J. Neurochem.*, 36, pp. 1409-1417 (1981).

[8]. R. Bullock, S. P. Butcher, M. H. Chen, L. Kendall, J. McCulloch. Correlation of the extracellular glutamate concentration with extent of blood flow reduction after subdural haematoma in the rat // *J. Neurosurg.*, 74, pp. 794-802 (1991).

[9]. S. Murai, H. Saito, Y. Masuda, O. Itsukaichi, T. Itoh. Basal levels of noradrenaline, dopamine, 5-hydroxytryptamine, and acetylcholine in the submandibular, parotid, and sublingual glands of mice and rats // *Arch. Oral Biol.*, 40, pp. 663- 668 (1995).

[10]. Y. Izaki, K. Hori, M. Nomura. Dopamine and acetylcholine elevation on lever-press acquisition in rat prefrontal cortex // *Neurosci. Lett.*, 258, pp. 33-36 (1998).

[11]. P. Wester, S. Eriksson, A. Forsell, G. Puu, R. Adolfsson. Monoamine metabolite concentrations and cholinesterase activities in cerebrospinal fluid of progressive dementia patients: relation to clinical parameters // *Acta Neurol. Scand.*, 77, pp. 12-21 (1988).

[12]. I. Hanin. *Choline and acetylcholine: handbook of chemical assay methods*. Raven, New York (1974).

[13]. G. Guerrieri, V. Lattanzio, F. Palmisano, P. G. Zamboni. Electrosynthesized poly(pyrrole)/poly(2-naphthol) bilayer membrane as an effective anti-interference layer for simultaneous determination of acetylcholine and choline by a dual electrode amperometric biosensor // *Biosens. Bioelectron.*, 21, pp. 1710–1718 (2006).

[14]. K. M. Mitchell. Acetylcholine and choline amperometric enzyme sensors characterized in vitro and in vivo // *Anal. Chem.*, 76, pp. 1098-1106 (2004).

[15]. O. N. Schuvailo, S. V. Dzyadevych, A. V. El'skaya, S. Gautier-Sauvigne, E. Csoregi, R. Cespuglio, A. P. Soldatkin. Carbon-fibre-based microbiosensors for in vivo measurements of acetylcholine and choline // *Biosens. Bioelectron.*, 21, pp. 87-94 (2005).

[16]. G.-R. Han, C. -H. Jang. Liquid crystal sensor for the detection of acetylcholine using acetylcholinesterase immobilized on a nanostructured polymeric surface // *Colloid Polym. Sci.*, 293(10), pp. 2771-2779 (2015).

[17]. I. S. Kucherenko, D. Yu. Didukh, O. O. Soldatkin, A. P. Soldatkin. Amperometric biosensor system for simultaneous determination of adenosine-5'-triphosphate and glucose // *Anal. Chem.*, 86, pp. 5455-5462 (2014).

Стаття надійшла до редакції 25.04.2018 р.

UDC: 543.06 + 577.15 + 543.553

DOI <http://dx.doi.org/10.18524/1815-7459.2018.2.136886>

DEVELOPMENT OF AN AMPEROMETRIC BIOSENSOR FOR THE ACETYLCHOLINE DETERMINATION IN BIOLOGICAL SAMPLES

D. V. Knyzhnykova^{1,2}, I. S. Kucherenko¹, O. O. Soldatkin^{1,2}, S. V. Dzyadevych^{1,2}, A. P. Soldatkin^{1,2}

¹Institute of Molecular Biology and Genetics of NAS of Ukraine,
Zabolotnogo Str. 150, Kyiv, 03148, Ukraine.

²Taras Shevchenko National University of Kyiv,
Volodymyrska Str. 64, Kyiv, 01003, Ukraine.

Summary

Aim: the development of a biosensor based on immobilized enzymes for the determination of acetylcholine in biological samples, selection of the optimal conditions for biosensor work and study of its analytical characteristics.

Methods. The biosensor based on platinum disk electrodes with immobilized acetylcholinesterase and choline oxidase. Immobilization of the enzymes on the sensitive surface of the amperometric transducer was performed using glutaraldehyde. As a result of the enzymatic reactions, hydrogen peroxide was generated, which was determined by chronoamperometric method using three-electrode measuring setup (biosensor, auxiliary platinum electrode, and Ag/AgCl reference electrode).

Results. Several methods of the enzymes immobilization were tested. An optimal one was two-layer immobilization: acetylcholinesterase in the first layer and choline oxidase in the second layer. Influence of the properties of working buffer (buffer capacity, ionic strength, pH) on the biosensors work was studied. Selectivity of the biosensor to the substances that can be present in biological samples (pyruvate, lactate, glutamate, choline and glucose) was examined. Main analytical characteristics of the biosensor (sensitivity, linear range, limit of detection, noise, drift, reproducibility of responses) were studied. A calibration curve for acetylcholine determination was plotted.

Conclusions. An amperometric biosensor for acetylcholine determination was developed. It was characterized by good reproducibility of signal and operational stability. The proposed biosensor

could be further used for the analysis of acetylcholine concentrations in real biological samples and as a part of biosensor array for the simultaneous determination of several substances.

Keywords: amperometric biosensor, choline, acetylcholine, choline oxidase, acetylcholinesterase

УДК: 543.06 + 577.15 + 543.553

DOI <http://dx.doi.org/10.18524/1815-7459.2018.2.136886>

РОЗРОБКА АМПЕРОМЕТРИЧНОГО БІОСЕНСОРА ДЛЯ ВИЗНАЧЕННЯ АЦЕТИЛХОЛІНУ В БІОЛОГІЧНИХ ЗРАЗКАХ

Д. В. Книжникова^{1,2}, І. С. Кучеренко¹, О. О. Солдаткін^{1,2}, С. В. Дзядевич^{1,2}, О. П. Солдаткін^{1,2}

¹Інститут молекулярної біології і генетики НАН України,
вул. Заболотного, 150, 03148, м. Київ, Україна

²Київський національний університет імені Тараса Шевченка,
вул. Володимирська, 64, 01003, м. Київ, Україна

Реферат

Мета: створення біосенсора на основі іммобілізованих ферментів для визначення ацетилхоліну в біологічних розчинах, підбір оптимальних умов його роботи і дослідження його аналітичних характеристик.

Методи дослідження. Біосенсор базується на платинових дискових електродах з іммобілізованими ацетилхолінестеразою та холіноксидазою. Іммобілізація ферментів на чутливій поверхні амперометричного перетворювача здійснювалась за допомогою плутарового альдегіду. В процесі ферментативних реакцій продукувався пероксид водню, який визначали хроноамперометричним методом із використанням триелектродної схеми підключення (біосенсор, допоміжний платиновий електрод та хлорсрібний електрод порівняння).

Результати дослідження. Перевірено декілька способів іммобілізації ферментів для створення біосенсора; найкращим виявився двошаровий метод іммобілізації ферментів: ацетилхолінестераза у першому шарі та холіноксидаза у другому шарі. Досліджено вплив параметрів робочого буферного розчину (буферна ємність, іонна сила, рН) на характеристики біосенсора. Перевірено селективність біосенсора до речовин, які можуть бути присутніми в біологічних зразках (пірувату, лактату, глутамату, холіну та глюкози). Досліджено основні аналітичні характеристики біосенсора: чутливість, лінійний діапазон роботи, мінімальну межу визначення, шум, дрейф, відтворюваність відгуків біосенсора. Побудовано калібрувальну криву для визначення ацетилхоліну.

Висновки. Розроблено амперометричний біосенсор для визначення ацетилхоліну, що характеризується гарною відтворюваністю сигналу та операційною стабільністю. Запропонований біосенсор в подальшому можна використати для вимірювання концентрацій ацетилхоліну в реальних біологічних зразках та як складову частину масиву біосенсорів для одночасного вимірювання декількох речовин.

Ключові слова: амперометричний біосенсор, холін, ацетилхолін, холіноксидаза, ацетилхолінестераза