

УДК 547.26.118:615.9

## Биосенсоры для анализа активности нейротоксичной эстеразы как биомаркера токсического действия нейрпатогенных фосфорорганических соединений

Л. В. Сиголаева, И. Н. Курочкин, А. В. Еременко, Л. Г. Соколовская, Г. Ф. Махаева, В. В. Малыгин, Р. Ричардсон, А. Маковер, Ф. Шеллер, И. В. Гачок, С. Д. Варфоломеев

*ЛАРИСА ВИКТОРОВНА СИГОЛАЕВА* — кандидат химических наук, научный сотрудник Химического факультета МГУ им. М.В. Ломоносова. Область научных интересов: биосенсоры для медицины и экологии, детекция нейротоксинов, многокомпонентный анализ.

*ИЛЬЯ НИКОЛАЕВИЧ КУРОЧКИН* — доктор химических наук, заведующий лабораторией экобиокатализа Химического факультета МГУ им. М.В. Ломоносова. Область научных интересов: биосенсоры и биоэлектроника, нанотехнология и наночастицы, детекция нейротоксинов.

*АРКАДИЙ ВЕНИАМИНОВИЧ ЕРЕМЕНКО* — кандидат биологических наук, старший научный сотрудник Химического факультета МГУ им. М.В. Ломоносова. Область научных интересов: биосенсоры и электрохимические анализаторы для медицины и экологии, детекция нейротоксинов, многокомпонентный анализ.

*ЛИДИЯ ГРИГОРЬЕВНА СОКОЛОВСКАЯ* — аспирант Химического факультета МГУ им. М.В. Ломоносова. Область научных интересов: биосенсоры для медицины и экологии, эстеразы и ингибиторы эстераз, многокомпонентный анализ.

*ГАЛИНА ФАЙВЕЛИЕВНА МАХАЕВА* — кандидат химических наук, старший научный сотрудник Института физиологически активных веществ РАН (г. Черноголовка, Московская обл.) Область научных интересов: биохимическая токсикология фосфорорганических соединений.

*ВЛАДИМИР ВАСИЛЬЕВИЧ МАЛЫГИН* — кандидат химических наук, заведующий лабораторией фармакологии Института физиологически активных веществ РАН (г. Черноголовка, Московская обл.). Область научных интересов: нейротоксикология и нейрофармакология.

*РУДИ РИЧАРДСОН* — профессор Мичиганского университета (г. Анн-Арбор, США). Область научных интересов: химия и нейротоксикология фосфорорганических соединений.

*АЛЕКСАНДР МАКОВЕР* — доцент Института биохимии и биологии Потсдамского университета (г. Гольм, Германия). Область научных интересов: аналитическая биохимия, биосенсоры.

*ФРИДЕР ШЕЛЛЕР* — профессор Института биохимии и биологии Потсдамского университета (г. Гольм, Германия). Область научных интересов: аналитическая биохимия, биосенсоры.

*ИРИНА ВЛАДИМИРОВНА ГАЧОК* — кандидат химических наук, научный сотрудник Химического факультета МГУ им. М.В. Ломоносова. Область научных интересов: биосенсоры для медицины и экологии, детекция нейротоксинов, многокомпонентный анализ.

*СЕРГЕЙ ДМИТРИЕВИЧ ВАРФОЛОМЕЕВ* — профессор, доктор химических наук, заведующий кафедрой химической энзимологии Химического факультета МГУ им. М.В. Ломоносова. Область научных интересов: ферментативная кинетика и катализ, биотехнология, аналитическая биохимия.

119992 Москва, Ленинские горы, Химический факультет МГУ им. М.В. Ломоносова, тел./факс (095)939-40-42, E-mail lsigolaeva@genebee.msu.su

### Введение

Применение фосфорорганических веществ (ФОС) сопряжено с высокой степенью риска, так как большинство из них — ингибиторы целого ряда жизненно важных эстераз нервной ткани. Наиболее серьезным является ингибирование ключевого фермента нервной

системы: ацетилхолинэстеразы и связанная с этим острая токсичность ФОС [1]. Не менее важна проблема так называемой отставленной нейротоксичности фосфорорганических соединений (ОНТФОС), вызываемой у человека и других восприимчивых видов животных целым рядом ФОС [2, 3]. Первые клинические симптомы проявляются на 7—8 день после отравления

и выражаются в расстройстве чувствительности и онемении конечностей, которое к 20–21-му дню может перейти в их частичный паралич. Это заболевание не связано с ингибированием ацетилхолинэстеразы. Обладать подобным токсическим эффектом могут ФОС с низкой острой токсичностью.

Фосфорилирование и последующее быстрое «старение» нейротоксичной эстеразы (НТЭ) [3] являются необходимыми условиями, инициирующими последующее развитие ОНТФОС. Корреляция между значительным ингибированием НТЭ головного мозга экспериментальных животных в течение нескольких часов после введения нейропатогенных ФОС (пороговая степень ингибирования НТЭ 70–80%) и развитием по прошествии 1–3 недель отложенной нейропатии позволяет использовать НТЭ нервной ткани в качестве биомаркера ОНТФОС [4–6]. Показано также, что в первые часы после введения модельных нейропатогенных ФОС параллельно с ингибированием НТЭ головного мозга наблюдается ингибирование НТЭ лимфоцитов и тромбоцитов крови [7, 8].

Объективные сложности с получением образцов нервной ткани человека не позволяют организовать медико-экологический мониторинг токсического действия нейропатогенных ФОС среди гражданского и военного персонала, задействованного в производстве, применении и утилизации ФОС. Измерение активности НТЭ в лимфоцитах и тромбоцитах крови [9–13] не нашло широкого применения, поскольку выделение форменных элементов крови — длительная, дорогостоящая и трудоемкая процедура, требующая больших объемов анализируемых образцов.

Проблема организации биомониторинга токсического воздействия нейропатогенных ФОС среди людей может быть решена при наличии:

— надежного и чувствительного метода измерения активности НТЭ в малых объемах цельной крови;

— доказательства того, что НТЭ цельной крови, как и НТЭ мозга, может служить биохимическим маркером ОНТФОС.

Традиционно используемый в настоящее время спектрофотометрический метод определения активности НТЭ основан на ферментативном гидролизе нейротоксичной эстеразой фенолвалерата (субстрата НТЭ) и последующем определении выделяющегося фенола по реакции с 4-аминоантипирином и  $K_4[Fe(CN)_6]$  [14]. Данный метод не обладает достаточной чувствительностью, непригоден для работы в мутных и непрозрачных средах, неудобен для использования в полевых (экспедиционных) условиях.

Удачную альтернативу спектрофотометрии представляют биосенсорные методы анализа активности НТЭ, основанные на комбинировании ферментативного гидролиза фенолвалерата до фенола в присутствии НТЭ и детекции фенола при помощи фенольных биосенсоров.

Данная статья суммирует результаты нашей работы по применению различных типов фенольных биосенсоров на основе тирозиназы для анализа активности нейротоксичной эстеразы (НТЭ) в биологических препаратах. Особое внимание уделено постановке методики анализа НТЭ в цельной крови. Представлены результаты сравнительного исследования ингибирования *in vitro* НТЭ из разных источников (мозг кур,

цельная кровь кур, лимфоциты человека, цельная кровь человека) рядом модельных нейропатогенных ФОС. Приведены результаты экспериментов *in vivo* (исследование дозозависимого ингибирования НТЭ мозга, лимфоцитов и крови кур модельным нейропатогенным ФОС), которые подтверждают обоснованность использования НТЭ цельной крови в качестве биомаркера ОНТФОС.

#### Материалы и методы

**Реактивы.** Грибная тирозиназа (монофенолмонооксидаза, ЕС 1.14.18.1), активность 4800 У/мг по L-тироzinу, графитовый порошок, параоксон (О,О-диэтил-4-нитрофенилфосфат), ди-изопропилфторфосфат (ДФФ), 1-метокси-5-метилфеназония метилсульфат (ММФМ), 4-аминоантипирин и  $K_3Fe(CN)_6$  фирмы Sigma (Германия), фенол фирмы Merck (Германия). Мипафокс (N,N'-диизопропиламидофторфосфат) и фенолвалерат фирмы Oyza Laboratory Inc. (США). О,О-ди-1-пропил-О-2,2-дихлорвинилфосфат (ПДХВФ) и О,О-ди-1-этил-О-2,2-дихлорвинилфосфат (ЭДХВФ) синтезированы и охарактеризованы в Институте физиологически активных веществ РАН, чистота препаратов > 99% (по спектральным характеристикам, данным хроматографии и элементного анализа). Биотинилированный салигенин циклофосфат любезно предоставлен проф. П. Глинном (Англия). Поливиниловый спирт (ПВС), м.м. 20000, производства фирмы Serva (США). Набор для определения белка по кумасси фирмы Sigma (США). Все остальные реактивы были марки не ниже ХЧ и использовались без предварительной очистки. Все водные растворы готовили на воде деионизованной с помощью аппарата MilliQ.

В качестве источника НТЭ нервной ткани использовали лиофилизированную мембранную фракцию ( $P_2 + P_3$ ) гомогената головного мозга кур обработанную параоксоном (40 мкМ, 45 мин). Препарат готовили по стандартной методике [15]. Удельная активность НТЭ данного препарата по фенолвалерату составляла примерно 40 нмоль/(мин · мг белка).

Лимфоциты крови человека выделяли по методике [16]. Клеточные мембраны разрушали в гомогенизаторе Поттера, суспензию замораживали при  $-20\text{ }^\circ\text{C}$  и использовали на следующий день для электрохимического анализа активности НТЭ. Лимфоциты крови курицы выделяли по методике [8]. Клеточные мембраны разрушали ультразвуком (10 мин при 50 Вт) и использовали для спектрофотометрического анализа активности НТЭ.

Цельную кровь, стабилизированную цитратом с ЭДТА, разбавляли в 10 раз буфером 50 мМ Трис-НСI — 0,2 мМ ЭДТА, рН 8,0, температура  $4\text{ }^\circ\text{C}$  и гомогенизировали 10 раз в гомогенизаторе Поттера.

Кислородный электрод Кларка, модифицированный иммобилизованной тирозиназой, готовили, смешивая  $2 \cdot 10^{-4}$  М раствор тирозиназы в 0,1 М фосфатном буфере (рН 6,5) с 20%-водным раствором ПВС в соотношении 1:1. Смесь наносили на инертную подложку в виде капель объемом 2 мкл, облучали УФ светом (365 нм) с расстояния 30 см в течение 30 мин. Полученные мембраны хранили при  $+4\text{ }^\circ\text{C}$ . Перед началом работы мембрану фиксировали при помощи кольцевых держателей между пленкой из ацетата целлюлозы (толщиной 10 мкм) и полипропиленовой

мембраной (толщиной 6 мкм) и помещали в электрохимическую ячейку. Все измерения проводили при  $-600$  мВ относительно Ag/AgCl референсного электрода в  $0,1$  М натрий фосфатном буфере, pH 6,5. За изменениями величины тока следили при помощи управляемого компьютером потенциостат-гальваностата (Институт физической химии РАН).

Тирозиназный пастовый электрод готовили, смешивая графитовый порошок, вазелиновое масло и тирозиназу в весовой пропорции 6:3:2, соответственно. Для медиаторных электродов пасту готовили, смешивая графитовый порошок, вазелиновое масло, ММФМ и тирозиназу в весовой пропорции 5:3:1:2, соответственно. Пасту плотно набивали в канал рабочего электрода, активную поверхность полировали. Рабочий электрод подсоединяли к проточной электрохимической ячейке, снабженной комбинированным Pt—Ag/AgCl электродом. Все измерения проводили при  $-150$  мВ относительно Ag/AgCl референсного электрода в  $0,05$  М натрий фосфатном буфере с  $0,1$  М NaCl, pH 7,0. Измерения величины тока проводили аналогично (см. выше).

Активность НТЭ определяли дифференциальным методом Джонсона [14] с небольшими модификациями. Образцы, содержащие НТЭ, разбавляли  $50$  мМ Трис-HCl —  $0,2$  мМ ЭДТА, pH 8,0 так, чтобы конечная концентрация белка составила  $0,07$ ,  $0,30$  и  $20$  мг/мл для препаратов НТЭ нервной ткани, лимфоцитов и крови, соответственно. Для определения активности НТЭ в лимфоцитах и крови каждый препарат инкубировали  $20$  мин при  $37$  °С в  $50$  мкМ растворе параоксона (Образец Б) или в  $50$  мкМ растворе параоксона и затем в  $250$  мкМ растворе мипафокса (Образец В). Далее ко всем образцам добавляли фенилвалерат (приготовленный из  $15$  мг/мл запасного раствора в этаноле разбавлением в  $30$  раз водным раствором Тритона X-100) до конечной концентрации  $0,68$  мМ и инкубировали при  $37$  °С еще  $30$  мин (для лимфоцитов время инкубации с фенилвалератом увеличивали до  $40$  мин). Затем реакцию останавливали добавлением  $10\%$ -ного водного раствора додецилсульфата натрия (SDS). Для препаратов НТЭ мозга кур образцы инкубировали при  $37$  °С в буфере ( $50$  мМ Трис-HCl —  $0,2$  мМ ЭДТА, pH 8,0) (Образец Б) или в  $250$  мкМ растворе мипафокса (Образец В) в течение  $20$  мин. Далее, как описано выше.

Для спектрофотометрического анализа фенола после остановки ферментативной реакции добавлением SDS  $100$  мкл каждой пробы инкубировали в течение  $5$  мин с  $50$  мкл водного  $2,43$  мМ раствора 4-аминоантипирина и  $50$  мкл  $0,4\%$ -ного водного раствора  $K_3Fe(CN)_6$ . Образовавшийся цветной продукт определяли в 96-луночных планшетах при длине волны  $492$  нм на микропланшетном спектрофотометре Anthos ht-1 (Австрия). Каждое измерение проводили трижды. Концентрацию фенола определяли по калибровочной зависимости, полученной в тех же условиях.

Для анализа фенола при помощи кислородного электрода Кларка, модифицированного иммобилизованной тирозиназой, после остановки ферментативной реакции добавлением SDS пробы вводили в проток ( $0,1$  М натрий фосфатный буфер, pH 6,5) через инжектор с  $100$  мкл петлей (Valve V-7, Pharmacia, Швеция). Для анализа фенола при помощи тирозиназного пастового электрода, после добавления SDS

образцы разбавляли в  $20$  раз  $0,05$  М Na-фосфатным буфером с  $0,1$  М NaCl, pH 7,0. Пробы вводились в проток ( $0,05$  М Na-фосфатный буфер с  $0,1$  М NaCl, pH 7,0) через инжектор с  $50$  мкл петлей. Скорость протока  $0,25$  мл/мин. Все измерения повторяли по три раза. Концентрацию фенола определяли по калибровочной зависимости, полученной в тех же условиях.

Для характеристики ингибирующей способности соединений использовали величину  $pI_{50} = -\lg(I_{50})$  ( $I_{50}$  — концентрация ингибитора, требуемая для подавления  $50\%$  ферментативной активности). Для определения  $I_{50}$  образцы биоматериала инкубировали при  $37$  °С в течение  $20$  мин с исследуемым соединением в концентрациях от  $10^{-10}$  до  $10^{-3}$  М, после чего определяли остаточную фенилвалератгидролизующую активность, как описано выше. Величины  $I_{50}$  вычисляли методом линейной регрессии по уравнению:

$$\ln((A - A_t)/A_s) = -kt/[I] \quad (1)$$

где  $A$  — активность при концентрации ингибитора равной  $[I]$ ,  $A_s$  — активность, чувствительная к данному ингибитору,  $A_t$  — активность, нечувствительная к данному ингибитору;  $k$  — константа скорости второго порядка для реакции ингибирования;  $t$  — время инкубации с ингибитором ( $20$  мин). Величину  $I_{50}$  вычисляли по формуле  $I_{50} = \ln(0,5)/(-kt)$ , которая следует из уравнения (1). Приведенные величины  $I_{50}$  рассчитывали на основании не менее двух независимых экспериментов.

Эксперименты на животных по дозозависимости проводили на белых курах породы Леггорн ( $18$  мес.,  $1,5$ — $2$  кг) Ногинской птицефабрики. Птицы содержались по  $3$  в клетке в условиях свободного доступа к пище и воде в помещении с  $12$ -часовым световым циклом и контролируемой температурой ( $20$ — $23$  °С). ПДХВФ вводили однократно, внутримышечно (в/м) в дозах  $0,316$ ,  $0,4$ ,  $0,56$ , и  $1,0$  мг/кг группам кур — по  $3$  курицы на каждую дозу. Все куры за  $20$  мин до введения ПДХВФ были обработаны атропина сульфатом ( $20$  мг/кг, в/м); контрольные животные получали только атропина сульфат. Через  $24$  часа после введения ПДХВФ кур декапитировали. Мозг каждой курицы быстро извлекали из черепа, гомогенизировали при  $+4$  °С в  $5$  объемах буфера ( $50$  мМ Трис-HCl —  $0,2$  мМ ЭДТА, pH 8,0) в гомогенизаторе Поттера и центрифугировали  $15$  мин при  $9000$  g ( $+4$  °С). Супернатант 9S использовали для определения активности НТЭ спектрофотометрическим методом. Сразу же после декапитации кровь каждой курицы собирали в емкость с антикоагулянтом. Часть крови использовали для выделения лимфоцитов (см. выше), активность НТЭ в которых определяли спектрофотометрически. Оставшуюся часть крови замораживали в жидком азоте и хранили при  $-20$  °С. После размораживания при комнатной температуре активность НТЭ в образцах цельной крови определяли электрохимически.

Для определения степени ингибирования, активность НТЭ в тканях кур, получавших атропин и ПДХВФ, сравнивали с активностью НТЭ в тканях кур, обработанных только атропином (контроль), и оценивали процент ингибирования фермента.

Белок в образцах определяли по кумасси, используя бычий сывороточный альбумин в качестве стандарта.

### Биосенсоры для анализа активности НТЭ

Для анализа активности НТЭ в биологических пробах (мозг, тканевые гомогенаты) в токсикологии принят метод дифференциального ингибирования. Это четко определенная процедура со строго фиксированными условиями, известная как метод Джонсона [14]. Активность НТЭ (рис. 1) вычисляется как разность между параоксон-резистентной активностью Б и параоксон-+мипафокс-резистентной активностью В. Соотношение между величинами Б и В может меняться в зависимости от источника НТЭ.

Общепринятый спектрофотометрический метод определения активности НТЭ, обладая чувствительностью по фенолу в пределах 4÷250 мкМ, может быть успешно применен для анализа активности НТЭ в нервной ткани и в выделенных из крови лимфоцитах и тромбоцитах. Действительно, уровень активности НТЭ в головном мозге человека и стандартных экспериментальных животных (кур) составляет 2400 нмоль/(мин · г влажной ткани) или ~80 нмоль/(мин · мг белка) [15, 17]. Активность НТЭ в лимфоцитах и тромбоцитах по данным разных авторов колеблется в пределах 11÷17 [7, 9, 10, 13] и 8÷13 [10, 13] нмоль/(мин · мг белка), соответственно. Основываясь на приведенных цифрах, можно достаточно легко оценить диапазоны концентраций, в которых потребуются анализировать фенол в каждом из этих случаев. Так для НТЭ головного мозга это 10÷150 мкМ. Для той же концентрации НТЭ лимфоцитов и тромбоцитов это всего 2÷30 мкМ фенола, поэтому при проведении анализа используют большие количества НТЭ-содержащего препарата.

Поскольку лимфоциты и тромбоциты представля-

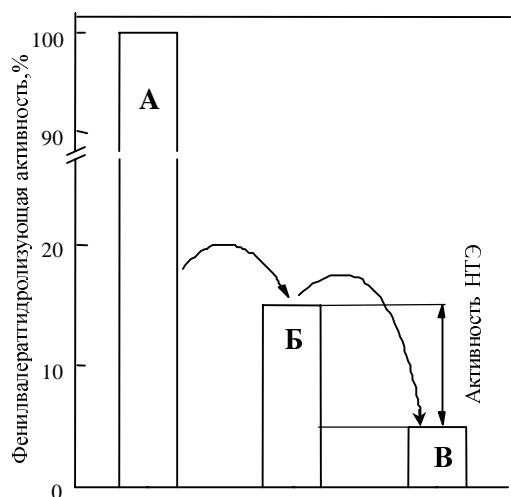


Рис. 1. Стандартная процедура определения активности нейротоксичной эстеразы (НТЭ):

А — общая фенилвалератгидролизующая активность препарата, Б — остаточная активность после инкубации в 50 мкМ растворе параоксона 20 мин при 37 °С, В — остаточная активность после инкубации в 50 мкМ растворе параоксона и в 250 мкМ растворе мипафокса по 20 мин при 37 °С

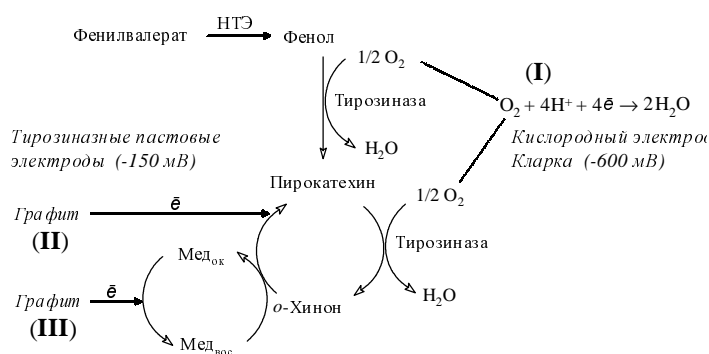


Рис. 2. Принципы электрохимического анализа фенола различными типами тирозиназных биосенсоров:

Мед<sub>ок</sub> — медиатор окисленный;  
Мед<sub>вос</sub> — медиатор восстановленный

ют лишь небольшую часть от общего числа форменных элементов крови, то ожидаемый уровень активности НТЭ в цельной крови может оказаться более чем на порядок ниже, чем в лимфоцитах и тромбоцитах, то есть не более чем 0,2÷3 мкМ фенола. Работа с высокими концентрациями крови не позволяет надежно определять активность НТЭ из-за высокой величины фонового сигнала (оптическая плотность даже разбавленной в 10 раз крови по нашим данным приблизительно равна 0,75—0,8 при 492 нм в оптимуме спектрофотометрической детекции фенола). Очевидно, что для измерения активности НТЭ в цельной крови требуется метод с чувствительностью по фенолу в субмикромольном диапазоне и ниже.

Электрохимическое определение фенола на основе тирозиназных биосенсоров представляют собой одну из наиболее чувствительных измерительных систем [18—20]. Кроме того, оптическая плотность среды не оказывает существенного влияния на результаты электрохимического анализа. Реализованный нами анализ НТЭ основан на биосенсорном определении фенола, выделяющегося в результате ферментативного гидролиза фенилвалерата, протекающего под действием НТЭ. В этих сенсорах тирозиназа, входящая в состав активной поверхности сенсора, катализирует окисление кислородом фенола через пирокатехин в *o*-хинон [21]. Для определения фенола были исследованы возможности различного типа тирозиназных биосенсоров (рис. 2).

Возможность биосенсорного анализа активности НТЭ нервной ткани впервые была нами продемонстрирована в работе [22], в которой для анализа выделяющегося фенола использовался электрод Кларка, модифицированный иммобилизованной тирозиназой, и детекция фенола основывалась на измерении потребления кислорода. В отсутствие фенола на поверхности электрода Кларка при заданном потенциале (−600 мВ vs Ag/AgCl) генерируется электрический ток, так как протекает электродная реакция электровосстановления растворенного кислорода (рис. 2, I). В присутствии фенола часть кислорода потребляется в процессе окисления фенола, при этом уменьшение тока электровосстановления кислорода пропорционально снижению концентрации кислорода [18, 23].

Таблица 1

Сравнительные аналитические характеристики биосенсоров для электрохимической детекции фенола

Параметр	Электрод Кларка, модифицированный иммобилизованной тирозиназой	Тирозиназный пастовый электрод	Тирозиназный пастовый электрод, модифицированный ММФМ
Линейный диапазон концентраций	2–100 мкМ	0,1±20 мкМ	0,025±20 мкМ
Предел детекции (сигнал/шум = 3)	2 мкМ	100 нМ	25 нМ
Объем пробы	100 мкл	50 мкл	50 мкл
Время анализа	3 мин	3 мин	3 мин
Рабочая стабильность электродов	Потеря 3–5% активности в день	90% активности в течение 6±7 дней	90% активности в течение 21 дня
Стабильность при хранении	> 8 мес.	> 12 мес.	> 12 мес.
Воспроизводимость методики изготовления электродов	20%	25%	25%

Образующийся при окислении *o*-хинон, будучи сам по себе электроактивным продуктом, способен при небольших отрицательных потенциалах восстанавливаться обратно в пирокатехин на поверхности графитового электрода [24]. Ток электровосстановления *o*-хинона пропорционален концентрации фенола и формирует аналитический сигнал сенсора, причем образующийся циклический процесс (рис. 2, II) позволяет значительно повысить чувствительность определения фенола. Применение работающих по такому принципу тирозиназных пастовых электродов для анализа активности НТЭ описано в работе [25].

Медиаторная модификация электродов позволяет ускорить процесс электрохимического восстановления хинона и, тем самым, дополнительно улучшить чувствительность фенольных биосенсоров (рис. 2, III) [19, 20]. В этих целях нами был успешно использован 1-метокси-5-метилфеназона метилсульфат (ММФМ), что привело к дополнительному понижению предела обнаружения НТЭ и улучшило операционную стабильность сенсора.

Аналитические характеристики параметров определения фенола для сенсоров всех трех типов приведены в таблице 1. Сравнение данных показывает, что по чувствительности анализа фенола электрод Кларка, модифицированный иммобилизованной тирозиназой, не превосходит спектрофотометрический метод, в то время как чувствительность тирозиназных пастовых электродов в десятки раз выше.

Для верификации амперометрических методик измерения активности НТЭ были получены кривые титрования мипафоксом параоксон-резистентной фенилвалератгидролизующей активности лиофилизованного препарата НТЭ головного мозга кур. На рис. 3 приведены типичные кривые титрования, полученные спектрофотометрическим методом и амперометрически при помощи тирозиназного пастового электрода. Аналогичные зависимости были получены для электрода Кларка, модифицированного иммобилизованной тирозиназой [22]. Остаточная фенилвалератгидролизующая активность (%*A*) в каждом образце, определяемая амперометрически, была связана с активностью НТЭ,

определяемой в тех же образцах спектрофотометрически, следующими уравнениями:

$$\text{для электрода Кларка} \\ \%A_{\text{амп}} = -(0,04 \pm 0,04) + (1,08 \pm 0,06) \cdot \%A_{\text{спектр}} \quad (2) \\ (R = 0,985, SD = 0,066, N = 13, P < 0,0001)$$

$$\text{для пастового электрода} \\ \%A_{\text{амп}} = -(7,4 \pm 2,5) + (1,07 \pm 0,03) \cdot \%A_{\text{спектр}} \quad (3) \\ (R = 0,995, SD = 2,60, N = 14, P < 0,0001)$$

Приведенные корреляционные уравнения подтверждают адекватность применения амперометрических методов для анализа активности НТЭ.

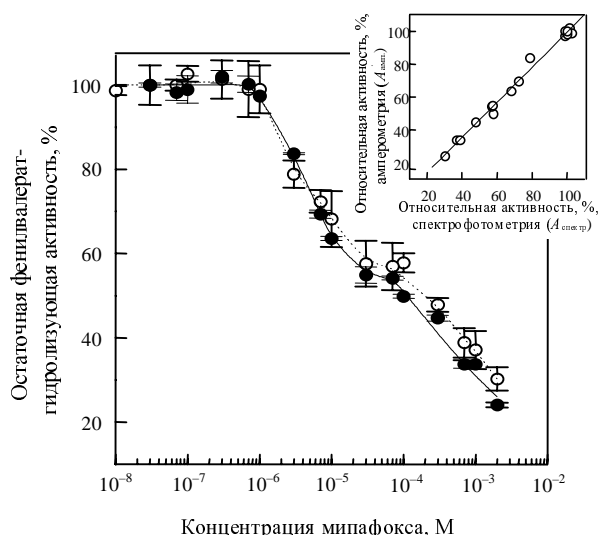


Рис. 3. Титрование параоксон-резистентной фенилвалератгидролизующей активности лиофилизованного гомогената головного мозга кур мипафоксом:

спектрофотометрический метод (○—○); амперометрический метод (●—).

На вставке показана корреляция между двумя методами

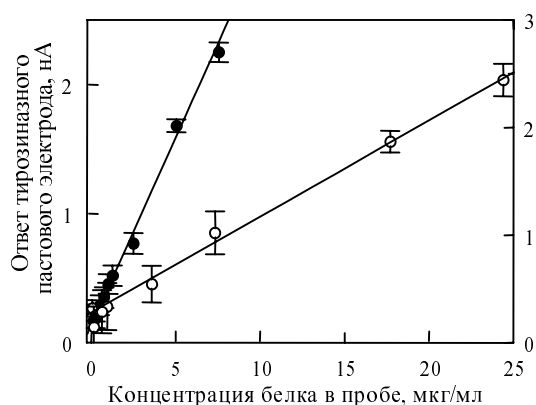


Рис. 4. Зависимости наблюдаемой активности НТЭ лиофилизованного гомогената головного мозга кур от количества добавленного препарата.

Электрод Кларка (—○—); пастовый электрод (—●—)

В соответствии с процедурой определения активности НТЭ, в работах [22, 25] были получены зависимости наблюдаемой активности НТЭ лиофилизованного гомогената головного мозга кур от количества добавленного препарата фермента — калибровочные зависимости по ферменту (рис. 4). Пределы детекции (сигнал, равный  $2 \times SD$ ) по НТЭ, активность которой измерялась как электродом Кларка, модифицированным иммобилизованной тирозиназой, так и тирозиназным пастовым электродом, составили 0,5 и 5 мкг/мл (по белку), соответственно. Полученные данные показывают, что электрод Кларка, модифицированный иммобилизованной тирозиназой, может быть полезен лишь для работы с высокоактивными препаратами НТЭ нервной ткани и, отчасти, с НТЭ лимфоцитов. В то же время продемонстрированные выше очевидные преимущества тирозиназных пастовых электродов, модифицированных и немодифицированных медиатором, позволили перейти к разработке методики электрохимического анализа активности НТЭ в цельной крови [25].

#### Анализ активности нейротоксичной эстеразы в цельной крови

В крови присутствует множество соединений фенольной природы, служащих субстратами для иммобилизованной тирозиназы. Нами были исследованы величины аналитических откликов тирозиназных пастовых электродов при введении в систему образцов крови (рис. 5а). Видно, что при малых степенях разведения образцов крови фоновые сигналы могут достигать значительной величины, и только при разбавлении крови не менее чем в 100 раз ее фоновыми сигналами можно пренебречь. Было исследовано влияние адсорбции компонентов крови на поверхности электрода на его аналитические характеристики. Для этого в измерительную среду попеременно вводили пробы, содержащие или разбавленную кровь, или стандартные концентрации фенола (рис. 5б). Как видно из представленных данных, контакт крови с поверхностью тирозиназного пастового электрода не приводит к какой-либо заметной адсорбции ее компонентов на электроде, на что указывает воспроизводимость отве-

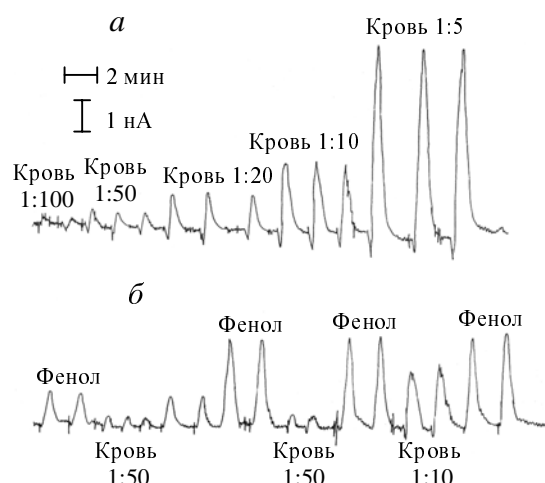


Рис. 5. Ответы тирозиназного пастового электрода на добавление в систему гомогенизированной крови (а) и попеременно: гомогенизированной крови и разных концентраций фенола (б).

Условия измерения: 0,05 М фосфат натрия с 0,1 М NaCl, рН 7,0, комнатная температура, скорость потока 0,25 мл/мин

тов электрода по фенолу после его контактов с кровью. Работа электрода тестировалась также в условиях, когда в анализируемой пробе одновременно присутствовали и фенол и кровь. Показано, что чувствительность определения фенола заметно снижается, если в анализируемой пробе одновременно присутствует более 0,5% (по объему) крови (рис. 6). Таким образом, было показано, что для корректного определения

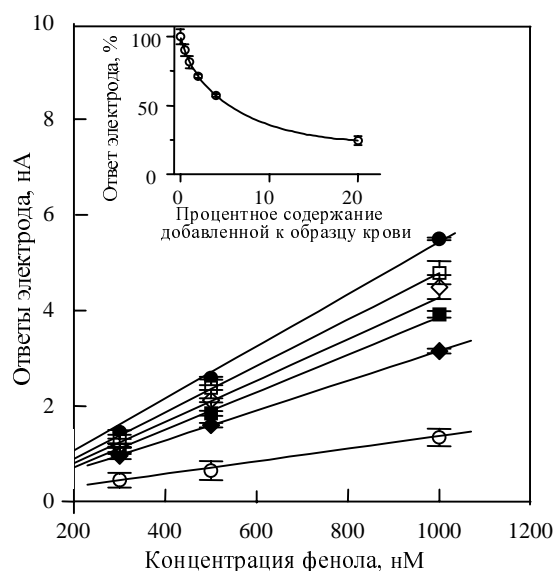


Рис. 6. Калибровочные зависимости по фенолу, полученные в присутствии крови:

фенол (—●—); фенол в присутствии крови, разбавленной: в 200 раз (— —); в 100 раз (—◇—); в 50 раз (—■—); в 25 раз (—◆—); в 5 раз (—○—).

Условия: 0,1 М NaCl с 0,05 М фосфатом натрия, рН 7,0, комнатная температура, скорость потока 0,25 мл/мин.

На вставке показана зависимость ответа электрода на 1 мкМ фенола (в процентах по отношению к контролю) от процентного (объем/объем) содержания крови в образце

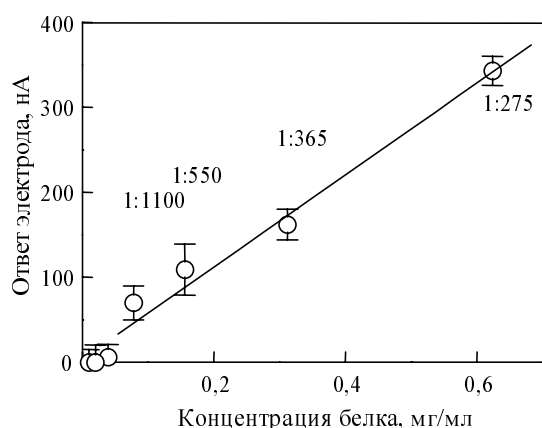


Рис. 7. Зависимости наблюдаемой активности НТЭ в крови человека от количества добавленного препарата гомогенизированной крови.

Указаны степени конечного разбавления препаратов крови

фенола в пробах, содержащих кровь, необходимо, чтобы в конечных образцах кровь была разбавлена не менее чем в 200 раз.

Учитывая все сказанное выше, в соответствии с процедурой определения активности НТЭ была получена зависимость наблюдаемой активности НТЭ крови от количества добавленного образца — калибровочная зависимость по НТЭ в крови (рис. 7). Для данной работы был использован тирозиназный пастовый электрод, модифицированный ММФМ медиатором. Как видно из рисунка, данный электрод позволяет проводить измерения активности НТЭ в образцах, разбавленных в 200—500 раз, в которых влияние крови на анализ фенола пренебрежимо мало, и ее присутствие не искажает линейность калибровочной зависимости по НТЭ. Таким образом, было продемонстрировано, что, применяя данный подход, можно измерять активность НТЭ в образцах цельной крови.

Активность НТЭ в крови, рассчитанная как разность между активностями образцов Б и В, составила  $0,10 \pm 0,03$  нмоль/(мин · мг белка) в куриной крови и  $0,19 \pm 0,02$  нмоль/(мин · мг белка) в человеческой крови (среднее  $\pm$  SE) [25]. На основе известных величин активности НТЭ в лимфоцитах и тромбоцитах крови человека и данных о составе крови была оценена величина активности НТЭ в цельной крови человека [25]. Вычисление этой величины легко может быть сделано по следующей формуле:

$$A_{\text{крови}} = \frac{(A_{\text{лимф.}} \cdot m_{\text{лимф.}} \cdot n_{\text{лимф.}} + A_{\text{тромб.}} \cdot m_{\text{тромб.}} \cdot n_{\text{тромб.}})}{C_{\text{крови}}} \quad (4)$$

где:  $A_{\text{крови}}$  — активность НТЭ в крови;  $C_{\text{крови}}$  — концентрация белка в крови (мг/мл);  $A_{\text{лимф.}}$  — активность НТЭ в лимфоцитах ( $14 \pm 3$  нмоль/(мин · мг белка) (наши данные));  $A_{\text{тромб.}}$  — активность НТЭ в тромбоцитах ( $8,4 \pm 1,5$  нмоль/(мин · мг белка) [10] или  $13,2 \pm 0,2$  нмоль/(мин · мг белка) [13]);  $n_{\text{лимф.}}$  и  $n_{\text{тромб.}}$  — общее число лимфоцитов и тромбоцитов, приходящееся на 1 мл крови ( $2,2 \cdot 10^6$  и  $2,5 \cdot 10^8$  клеток на мл крови для лимфоцитов и тромбоцитов, соответственно [26]);  $m_{\text{лимф.}}$  и  $m_{\text{тромб.}}$  — масса белка в мг, приходящаяся на клетку лимфоцита и тромбоцита, соответственно

( $m_{\text{лимф.}} = 1,3 \cdot 10^{-7}$  мг (наши данные);  $m_{\text{тромб.}}$  вычислялась из предположения, что количество белка в клетке примерно пропорционально ее объему, при этом объем одного тромбоцита принимали равным  $9 \cdot 10^{-15}$  л, а объем лимфоцита —  $230 \cdot 10^{-15}$  л [26]). По сделанным таким образом оценкам активность НТЭ в крови человека должна лежать в пределах  $0,06 \pm 0,26$  нмоль/(мин · мг белка), что хорошо согласуется с реально измеренной нами величиной.

### Ингибирование нейротоксичной эстеразы *in vitro* и *in vivo*

Используя ряд модельных нейропатогенных ФОС, мы провели сравнительное *in vitro* исследование ингибиторной специфичности НТЭ из разных источников (мозг кур, цельная кровь кур, лимфоциты человека, цельная кровь человека). Данные, представленные в таблице 2, показывают хорошее соответствие между ингибированием НТЭ в крови и в мозге кур. Эти же величины, определенные нами в образцах цельной крови человека в работе [25] (см. табл. 3), хорошо соответствовали величинам  $I_{50}$  для лимфоцитов крови человека, а также литературным данным для НТЭ мозга человека. Таким образом, специфичность НТЭ цельной крови к нейропатогенным ФОС оказалась близкой к ингибиторной специфичности НТЭ нервной ткани (мозга) и лимфоцитов.

Таблица 2

Сравнительная специфичность к нейропатогенным ингибиторам препаратов НТЭ мозга и крови кур

Соединение	$pI_{50}$ (амперометрия)	
	Цельная кровь	Мозг
Мипафокс	$5,4 \pm 0,1$	$5,4 \pm 0,1$
ПДХВФ	$7,2 \pm 0,2$	$7,3 \pm 0,2$
ЭДХВФ	$5,9 \pm 0,4$	$6,0 \pm 0,3$
Биотинилированный салигенин циклофосфат	$7,7 \pm 0,1$	$7,3 \pm 0,3$

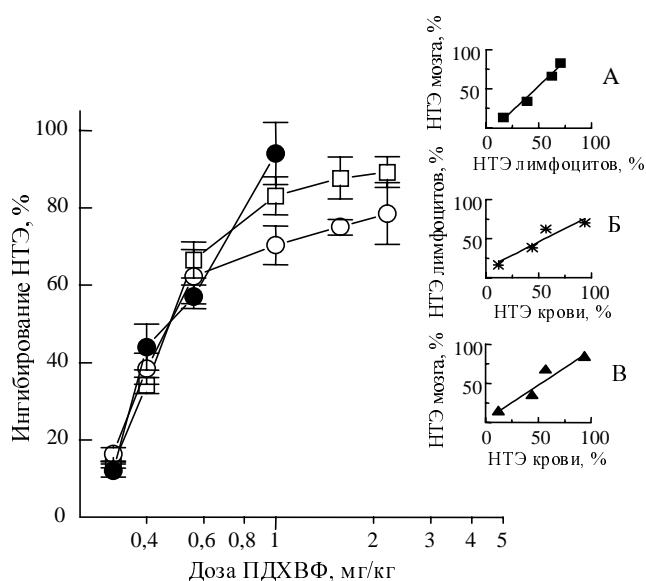
Таблица 3

Сравнительная специфичность к нейропатогенным ингибиторам препаратов нейротоксичной эстеразы цельной крови, лимфоцитов и мозга человека

Соединение	$pI_{50}$		
	Цельная кровь <sup>a</sup>	Лимфоциты	Мозг
Мипафокс	$5,2 \pm 0,1$	$5,1 \pm 0,1^a$	$4,7 \div 4,9$ [27]
		$5,0 \pm 0,1$ [13]	$3,9 \div 5,4$ [28]
ДФФ	$6,3 \pm 0,1$	—	$6,2 \div 6,3$ [27]
			$6,0 \div 6,5$ [28]

<sup>a</sup> — Амперометрия

Серьезным доказательством того, что НТЭ в крови может служить маркером ОНТФОС и отображает ингибирование фермента в мозге, служит корреляция между ингибированием фермента в мозге и в крови. Данная корреляция была подтверждена в экспериментах *in vivo* при исследовании дозозависимого ингиби-



**Рис. 8.** Ингибирование нейротоксичной эстеразы (НТЭ) в мозге, лимфоцитах и цельной крови кур *O,O*-ди-1-пропил-*O*-2,2-дихлорвинилфосфатом (ПДХВФ) (24 ч после введения после в/м введения):

НТЭ мозга (—■—), лимфоцитов (—●—) и цельной крови (—○—).

На вставках приведены: А — корреляция между ингибированием НТЭ в мозге и лимфоцитах кур ( $R = 0,991$ ,  $SD = 5,02$ ,  $N = 4$ ,  $P = 0,00857$ ); Б — корреляция между ингибированием НТЭ в лимфоцитах и цельной крови кур ( $R = 0,946$ ,  $SD = 9,73$ ,  $N = 4$ ,  $P = 0,05444$ ); В — корреляция между ингибированием НТЭ в мозге и цельной крови кур ( $R = 0,982$ ,  $SD = 6,11$ ,  $N = 4$ ,  $P = 0,01825$ )

рования НТЭ мозга, лимфоцитов и крови кур модельным нейротоксичным ФОС — *O,O*-ди-1-пропил-*O*-2,2-дихлорвинилфосфатом (ПДХВФ). Основные результаты этой работы отражены в публикациях [29,30]. В данной серии экспериментов остаточную активность НТЭ определяли спектрофотометрически (мозг, лимфоциты) и амперометрически (цельная кровь) через 24 ч после однократного в/м введения курам возрастающих доз ПДХВФ.

Как показали результаты исследования, ПДХВФ ингибирует НТЭ в мозге, периферических лимфоцитах и крови кур дозозависимым образом (рис. 8). При этом наблюдается хорошая корреляция между ингибированием НТЭ в мозге и лимфоцитах, в лимфоцитах и цельной крови, а также, что наиболее важно, между ингибированием НТЭ в мозге и цельной крови (рис. 8, вставки). Полученные данные позволяют рассматривать НТЭ цельной крови в качестве биохимического маркера воздействия нейротоксичных ФОС.

\*\*\*

Таким образом, продемонстрировано, что НТЭ цельной крови, анализ которой стал возможным благодаря использованию высокочувствительных фенольных биосенсоров, может служить биохимическим маркером ОНТФОС. В настоящее время это единственная методика, позволяющая проводить подобного рода анализы. Принимая во внимание маленький объем и простоту приготовления образца крови для биосенсорного анализа НТЭ, полученные результаты

можно рассматривать как весьма перспективные не только для оценки степени токсического воздействия нейротоксичных ФОС на живой организм, но и для прогноза развития ОНТФОС, для ее ранней диагностики, а также для организации биомониторинга.

Выполнение данной работы финансировалось Международным Научно-техническим Центром (МНТЦ), проект № 1055.2; Российской программой «Новейшие методы биоинженерии», подпрограммой «Биокаталитические системы», проект № 2-34; Американским фондом гражданских исследований и развития (АФГИР), проект № RB2-2035.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. *Ecobichon D.J.* In: Casarett and Doull's Toxicology, The Basic Science of Poisons. Ed. M.O. Amdur, J. Doull, C.D. Klaassen. N.Y.: Pergamon, 1991, p. 562—622.
2. *Davis C.S., and Richardson R.J.* In: Experimental and Clinical Neurotoxicology. Ed. S. Spencer, H.H. Schaumburg. Baltimore: Williams & Wilkins, 1980, p. 527—544.
3. *Johnson M.K.* In: Reviews in Biochemical Toxicology. Ed. E. Hodgson, J.R. Bend, R.M. Philpot. Amsterdam, N.Y.: Elsevier, 1982, v. 4, p. 141—212.
4. *Johnson M.K.* Tox. Appl. Pharm., 1990, v. 102, p. 385—399.
5. *He F.* Int. Arch. Occup. Environ. Health., 1993, v. 65, p. S69—S76.
6. *Costa L.G.* Environ. Health Persp., 1996, v. 104, Suppl. 1, p. 55.
7. *Lotti M., Moretto A., Zoppellari R.* e.a. Arch. Toxicol., 1986, v. 59, p. 176—179.
8. *Schwab B.W., Richardson R.J.* Toxicol. Appl. Pharmacol., 1986, v. 83, p. 1—9.
9. *Bertoncin D., Russolo A., Caroli S., Lotti M.* Arch. Environ. Health, 1985, v. 40, p. 221—230.
10. *Maroni M., Bleeker M.L.* J. Appl. Toxicol., 1986, v. 6, p. 1—7.
11. *Lotti M.* Toxicol. Lett., 1986, v. 33, p. 167—172.
12. *Wilson B.W., Henderson J.D.* Rev. Environ. Contam. Toxicol., 1992, v. 128, p. 55—69.
13. *Richardson R.J., Dudek B.R.* In: Pesticide Chemistry: Human Welfare and the Environment. Ed. J. Miyamoto, P.C. Kearny. Oxford: Pergamon, 1983, p. 491—496.
14. *Johnson M.K.* Arch. Toxicol., 1977, v. 67, p. 113—115.
15. *Makhaeva G.F., Malygin V.V.* Chem.-Biol. Interact., 1999, v. 119—120, p. 751—757.
16. *Boyum A.* Scand J. Lab. Clin. Invest., 1968, v. 21, Suppl. 97, p. 9.
17. *Махаева Г.Ф., Малегин В.В., Мартынов И.В.* Агрохимия, 1987, т. 12, с. 103—124.
18. *Makower A., Eremenko A.V., Streffer K.* e.a. J. Chem. Technol. Biotechnol., 1996, v. 65, p. 39—44.
19. *Kotte H., Gründig B., Vorlop K.* -D. e. a. U. Anal. Chem., 1995, v. 67, p. 65—70.
20. *Wang G., Xu J., Ye L. e. a.* Bioelectrochemistry, 2002, v. 57, p. 33.
21. *Burton S.G.* Catalysis Today, 1994, v. 22, p. 459—487.
22. *Sigolaeva L.V., Eremenko A.V., Makower A. e. a.* Chem.-Biol. Interact., 1999, v. 119—120, p. 559—565.
23. *Uchiyama S., Hasebe Y., Shimizu H., Ishihara H.* Anal. Chim. Acta., 1993, v. 276, p. 341—345.
24. *Skladal P.* Collect. Czech. Chem. Commun., 1991, v. 56, p. 1427.
25. *Sigolaeva L.V., Makower A., Eremenko A.V. e. a.* Anal. Biochem., 2001, v. 290, p. 1—9.
26. Physical Chemistry Composition of Blood. Hematology. Somatometric Data. In: Geigy Scientific Tables. Ed. C. Lentner. Basle: CIBA-GEIGY, 1984, v. 3, p. 205.
27. *Moretto A., Lotti M.* Biochem. Pharm., 1988, v. 37, p. 3041.
28. *Ehrlich M., Correll L., Veronezi B.* Fundam. Appl. Toxicol., 1997, v. 38, p. 55—63.
29. *Makhaeva G.F., Sigolaeva L.V., Zhuravleva L.V. e. a.* Proc. of CBMTS-Industry II: The First World Congress on Chemical and Biological Terrorism, 2002, p. 327—336.
30. *Makhaeva G.F., Sigolaeva L.V., Zhuravleva L.V. e. a.* J. Tox. Env. Health, 2003, Part A, v. 66, p. 599—610.