

УДК 543.645.3

АМПЕРОМЕТРИЧЕСКИЙ АЦЕТИЛХОЛИНЭСТЕРАЗНЫЙ СЕНСОР ДЛЯ ОПРЕДЕЛЕНИЯ ФИЗОСТИГМИНА

Р.Р. Давлетишина, А.Н. Иванов, Г.А. Евтюгин

Казанский (Приволжский) федеральный университет, г. Казань, 420008, Россия

Аннотация

Разработан биосенсор на основе ацетилхолинэстеразы, иммобилизованной посредством карбодиимидного связывания на стеклоуглеродном электроде, модифицированном углеродной сажей и фталоцианином кобальта. Подобраны рабочие условия формирования поверхностного слоя биосенсора и предложен протокол измерения сигнала биосенсора, связанного с медиаторным окислением продукта ферментативного гидролиза ацетилтиохолина. Показано, что иммобилизация фермента не снижает сродства активного центра к субстрату. Установлена возможность определения физостигмина как модельного обратимого ингибитора в интервале концентраций от 0.3 нМ до 10 мкМ с пределом обнаружения $1.8 \cdot 10^{-10}$ М. Установлены кинетические параметры ферментативного гидролиза субстрата и конкурентного ингибирования фермента. Биосенсор может найти применение в контроле лекарственных препаратов антихолинэстеразного действия.

Ключевые слова: ацетилхолинэстераза, ингибитор фермента, биосенсор, определение обратимого ингибитора, фталоцианин кобальта, химически модифицированный электрод

Введение

Ферментативные методы анализа находят широкое применение в анализе токсических препаратов, таких как пестициды и тяжелые металлы, в объектах эколого-аналитического контроля [1, 2], а также в контроле лекарственных препаратов в медицине и фармакологии [3–5]. Количественная характеристика состава объектов анализа основана на изменении активности ферментов в присутствии аналитов за счет их ингибирующего действия. Таким образом, с помощью ферментативных методов анализа можно моделировать таргетные биохимические взаимодействия в организме человека и делать выводы о потенциальной опасности или фармакологическом действии тех или иных соединений. Среди ферментов, используемых для определения ингибиторов, особое внимание уделяется холинэстеразам, и в первую очередь ацетилхолинэстеразе (АХЭ). Данный фермент присутствует в синаптической щели, разделяющей нервные окончания нейронов большинства высших животных, и обеспечивает дискретность передачи нервных импульсов за счет каталитического гидролиза ацетилхолина – природного нейромедиатора [6]. Снижение активности АХЭ приводит к гипервозбуждению мышц и в случае острых отравлений – к летальному исходу. Поскольку антихолинэстеразные агенты производились как боевые отравляющие

вещества нервно-паралитического действия, ферментативные методы анализа ингибиторов АХЭ развивали первоначально для предотвращения потерь в условиях боевого применения отравляющих веществ [7]. Впоследствии биосенсоры на основе АХЭ нашли применение при анализе содержания фосфорорганических и карбаминатных пестицидов. Различные аспекты применения АХЭ в анализе пестицидов нашли отражение в нескольких обзорах [8–10].

В последнее время интерес к аналитическому применению АХЭ усилился в связи с большим вниманием, уделяемым нервно-дегенеративным заболеваниям. В частности, болезнь Альцгеймера сопровождается подавлением активности холин-ацетилтрансферазы, ответственной за синтез ацетилхолина, поэтому использование обратимых ингибиторов АХЭ восстанавливает концентрацию нейротрансмиттера и подавляет симптоматику заболевания [11, 12]. Отсюда актуальна задача создания быстрых и чувствительных сенсоров для определения обратимых ингибиторов АХЭ для контроля дозы лекарственных препаратов и предотвращения случайных отравлений в связи с приемом избыточных количеств лекарств. Хотя биосенсоры с иммобилизованной АХЭ хорошо изучены, они в основном ориентированы на определение необратимых ингибиторов фермента. Анализ обратимого ингибирования предъявляет более высокие требования к условиям иммобилизации фермента, поскольку взаимодействие фермент – ингибитор проходит в присутствии субстрата, и условия реакции более сложным образом влияют на чувствительность фермента к определяемому соединению.

В настоящей работе изучены условия иммобилизации АХЭ и проведен поиск рабочих условий определения модельного обратимого ингибитора АХЭ – физостигмина – с целью повышения чувствительности и снижения предела его обнаружения. Физостигмин (1) – алкалоид, выделяемый из семян калабарских бобов (*Physostigma venenosum*), который используется в медицине при лечении глаукомы для снижения внутриглазного давления и сужения зрачка и подкожно при лечении болезни Альцгеймера [13]. Его обратимое действие на фермент связано с присутствием в молекуле аминных фрагментов, замещающих ацетилхолин в фазе образования фермент-субстратного комплекса.



В литературе описаны единичные биосенсоры на физостигмин. Прямая регистрация комплекса АХЭ – физостигмин возможна при иммобилизации фермента в монослое на тонкопленочном золотом электроде с регистрацией поверхностного плазмонного резонанса, однако чувствительность определения невысока – определяемые концентрации превосходят 1 мМ [14]. АХЭ, иммобилизованную на графите, использовали для изучения механизма ингибирования фермента физостигмином [15]. Сигналом биосенсора служил ток окисления тиохолина, продукта гидролиза синтетического субстрата – ацетилтиохолина (АТХ). Доказан конкурентный механизм ингибирования и возможность регистрировать ингибирующее действие препарата в интервале концентраций

1 нМ – 10 мкМ. Предложено также регистрировать сигнал на физостигмин с помощью биосенсора с АХЭ и холиноксидазой, иммобилизованными совместно в биотинированные бис-липидные слои посредством авидин-биотинового связывания на платиновом микроэлектроде [16]. Описан биосенсор с иммобилизованным на поверхности стеклоуглерода фталоцианином кобальта как медиатором электронного переноса и АХЭ, закрепленной на медиаторе с помощью реакции диазотирования («клик-химии») [17]. Недостатком указанных работ является использование биосенсора для определения как обратимых, так и необратимых ингибиторов АХЭ, предъявляющих разные требования к условиям определения, и недостаточный контроль таких важных параметров, как рН и время инкубирования на стадии измерения концентрации ингибитора.

В настоящей работе получен биосенсор на основе АХЭ, иммобилизованной посредством карбодиимидного связывания на поверхности стеклоуглеродного электрода (СУЭ), модифицированного углеродной сажей (УС) и фталоцианином кобальта(II) (ФЦК) как селективным медиатором окисления тиохолина. Установлены рабочие условия проведения иммобилизации и измерения сигнала для достижения максимальной чувствительности отклика на физостигмин, использованного в качестве модели обратимого ингибитора АХЭ.

1. Экспериментальная часть

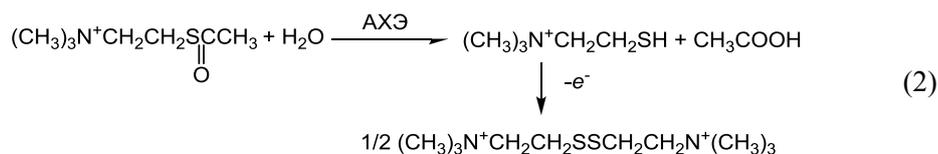
1.1. Приборы и реагенты. В работе использовали АХЭ из электрического угря, *N*-(3-диметиламинопропил)-*N'*-этилкарбодиимида хлорид (EDC), *N*-гидроксисукцинимид (NHS), АТХ (хлорид), этаноламин, ФЦК, 2-(*N*-морфолино)-этансульфоновую кислоту (MES), бычий сывороточный альбумин и физостигмин производства Sigma-Aldrich (США), а также УС, предоставленную для исследований компанией Cabot Norit Nederland B.V (Нидерланды). Водные растворы готовили на основе деионизированной воды Millipore® из солей квалификации ч.д.а. Электрохимические измерения проводили в фосфатном буферном растворе (ФБ), содержащем 0.05 М дигидрофосфат натрия и 0.1 М хлорида натрия; рН раствора корректировали гидроксидом натрия до 7.0. Растворы физостигмина и АТХ готовили, растворяя точную навеску твердых реактивов в этиловом спирте и далее разбавляя деионизированной водой и ФБ непосредственно перед использованием. Концентрированные растворы хранили при –20 °С. Дисперсии 1 мг/мл ФЦК и 1 мг/мл УС в диметилформамиде готовили путем ультразвуковой обработки в течение 30 мин. Полученные дисперсии хранили в течение месяца, подвергая их ультразвуковому воздействию в течение 10 мин непосредственно перед использованием. Растворы EDC и NHS готовили непосредственно перед использованием, растворяя точную навеску реактивов в MES, рН 5.5.

Электрохимические измерения проводили в нетермостатированной ячейке объемом 5 мл при комнатной температуре в ФБ. Вольтамперограммы и хроноамперограммы регистрировали с помощью потенциостата-гальваностата AUTOLAB PGSTAT 302N с программным обеспечением NOVA 1.11 (Metrohm Autolab B.V., Нидерланды). В качестве рабочих электродов использовали СУЭ, представляющие собой стержни из стеклоуглерода СУ 2000 («НИИГрафит», г. Москва) длиной 20 мм и площадью поперечного сечения 2.54 мм², вставленные в изолирующие трубки из политетрафторуглерода. Электрический контакт обеспечивали

токосъемником из нержавеющей стали, подсоединенным к стеклоуглеродному стержню с противоположной от рабочей поверхности стороны. Соединение между токосъемником и углеродным стержнем было выполнено при помощи электропроводящего клея на основе эпоксидной смолы и графита. Непосредственно перед использованием электроды механически полировали с помощью мелкозернистой шлифовальной бумаги до зеркальной поверхности, после чего промывали этиловым спиртом и дистиллированной водой. В качестве электрода сравнения использовали хлоридсеребряный (Ag/AgCl) электрод с 3 М внутренним раствором KCl (Metrohm Autolab B.V., Нидерланды). Вспомогательным электродом служил стеклоуглеродный стержень диаметром 5 мм.

1.2. Изготовление ацетилхолинэстеразного биосенсора. Полированные и очищенные СУЭ модифицировали дисперсиями УС и ФЦК в диметилформамиде, смешанными в объемном соотношении 4:1, из расчета 1 мкл полученной смеси на электрод, сушили 30 мин при 70 °С. Далее на модифицированный электрод последовательно наносили 10 мкл свежеприготовленного раствора 0.05 М NHS и 0.2 М EDC в 0.05 М MES, pH 5.5. Электроды через 10 мин ополаскивали деионизированной водой и сразу наносили 1.5 мкл раствора АХЭ с требуемой концентрацией фермента в 0.05 М MES с pH 5.5. Электрод оставляли на воздухе при комнатной температуре до полного высыхания раствора. Затем на электрод наносили 15 мкл 0.1 М раствора этаноламина в деионизированной воде для нейтрализации непрореагировавших функциональных групп. Через 10 мин электрод промывали деионизированной водой. В заключение на поверхность электрода наносили 3 мкл 50 мг/мл раствора альбумина в деионизированной воде и высушивали на воздухе при комнатной температуре. Полученные ацетилхолинэстеразные биосенсоры хранили в сухом виде при +4 °С.

1.3. Измерение сигнала биосенсора на субстрат и ингибитор. Активность АХЭ определяли в режиме хроноамперометрии, измеряя ток окисления тиохолина – продукта ферментативного гидролиза АТХ (2).



Для этого электрод с иммобилизованной АХЭ поляризовали при +200 мВ и регистрировали анодный ток в стационарных условиях без перемешивания раствора в течение 180 с до установления стационарного значения тока i_B . Далее в ячейку добавляли раствор АТХ, содержимое перемешивали и повторяли измерение тока i_S , соответствующего окислению тиохолина, образующегося в ферментативной реакции. Аналитическим сигналом, отвечающим активности фермента при определенной концентрации субстрата, служила разность токов, измеренных в присутствии и в отсутствие субстрата $i_0 = i_S - i_B$.

Степень ингибирования иммобилизованной АХЭ устанавливали после измерения хроноамперометрического отклика на субстрат и промывки сенсора

водой. Электрод с иммобилизованной АХЭ помещали на определенное время (время инкубирования) в раствор физостигмина в ФБ с различными значениями рН. Далее биосенсор переносили в раствор субстрата и регистрировали отклик, как описано выше. Степень ингибирования рассчитывали по уравнению $I, \% = 100 \cdot (i - i_0) / i_0$, где i_0 и i – токи окисления тиохолина, измеренные до и после инкубирования биосенсора в растворе ингибитора.

2. Результаты и их обсуждение

2.1. Определение АТХ. Оптимум каталитической активности АХЭ при гидролизе эфиров (тио)холина обычно находится в слабощелочной среде (рН 7.6–8.0). Поэтому для регистрации отклика на субстрат использовали ФБ с рН 7.8. В экспериментах с количеством АХЭ для иммобилизации, составляющим 0.026 ЕА/мм^2 , зависимость тока окисления тиохолина от концентрации АТХ линейна в интервале концентраций субстрата $1.0 \cdot 10^{-6} - 1.0 \cdot 10^{-3} \text{ М}$. Этому интервалу соответствует градуировочное уравнение:

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

где $C_{\text{АТХ}}$ – концентрация субстрата. Кажущуюся константу Михаэлиса K_m (каж.) для реакции ферментативного гидролиза АТХ вычисляли методом Лайнуивера – Берка путем построения зависимости в двойных обратных координатах ($1/i$, $1/C_{\text{АТХ}}$). Полученное значение K_m (каж.) 0.67 мМ оказалось несколько больше характеристики нативного фермента (K_m 0.11 мМ , рН 7.3 [18]), что свидетельствует о меньшей аффинности активного центра иммобилизованного фермента к субстрату. Ряд других описанных в литературе ацетилхолинэстеразных сенсоров имеет сходные значения константы Михаэлиса. Так, для АХЭ, включенной в гидрофильную полимерную пленку, $K_m = 0.67 \text{ мМ}$ [19], в случае применения аффинной иммобилизации с конканавалином А $K_m = 0.22 \text{ мМ}$ [20], в случае иммобилизации кросс-сшивкой глутаровым альдегидом $K_m = 0.84 \text{ мМ}$ [21], при аналогичной иммобилизации в матрице нафтона – 2.0 мМ [21]. Это говорит о том, что выбранный способ иммобилизации в целом не меняет реакционной способности фермента и сопоставим с литературными аналогами по доступности активного центра АХЭ для взаимодействия с субстратом. Подобный режим функционирования иммобилизованного фермента считается благоприятным для регистрации ингибирования, поскольку оно в этом случае определяется природой субстрата и ингибитора, а не способом иммобилизации фермента в составе биосенсора.

2.2. Оптимизация условий определения физостигмина. Несмотря на то что физостигмин считается обратимым ингибитором АХЭ, диссоциация фермент-ингибиторного комплекса происходит медленно, период полураспада комплекса в гомогенных условиях проведения реакции оказался близким к 27 мин [22]. Это приводит к тому, что степень ингибирования иммобилизованной АХЭ существенным образом зависит от времени инкубирования биосенсора в растворе ингибитора. Рис. 1 демонстрирует изменение степени ингибирования АХЭ при увеличении времени инкубирования с 5 до 60 мин. В процессе взаимодействия происходит накопление фермент-ингибиторного комплекса и уменьшение доли активной формы фермента, способной катализировать гидролиз АТХ.

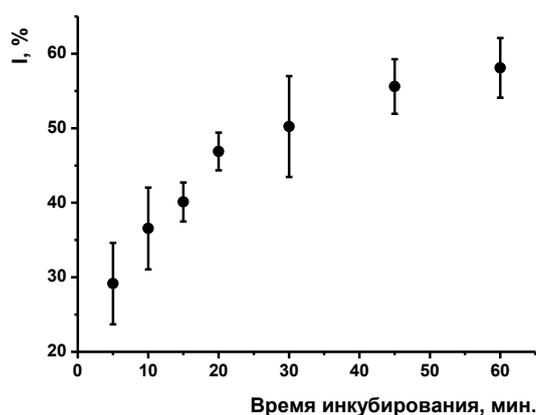


Рис. 1. Зависимость степени ингибирования от времени инкубирования биосенсора в растворе физостигмина. Концентрация физостигмина 0.01 мкМ, рН раствора физостигмина 7.8, концентрация АХЭ на поверхности биосенсора 0.0024 ЕА/мм². Приведены средние значения и ошибки измерения для шести биосенсоров

Начальный участок зависимости степени ингибирования от времени инкубирования может быть аппроксимирован линейной регрессией. Далее наклон зависимости постепенно уменьшается. Вся кривая может быть описана логистической функцией, в соответствии с которой верхний предел изменения степени ингибирования составил 60–65%. Это характерно для обратимого ингибирования, поскольку фермент-ингибиторный комплекс диссоциирует и высвобождает часть активных центров фермента даже при высокой концентрации ингибитора.

В случае необратимого ингибирования при отсутствии спонтанной реактивации верхний предел ингибирования обычно близок к 100%. Для сокращения времени измерения все последующие эксперименты были выполнены с 15-минутным инкубированием.

Для определения влияния рН среды на чувствительность и предел обнаружения физостигмина была изучена зависимость степени ингибирования АХЭ от рН раствора физостигмина, в котором производили инкубирование биосенсора. Соответствующая зависимость представлена на рис. 2. Максимальная степень ингибирования наблюдается вблизи рН 7.0. Это значение не совпадает с оптимумом каталитической активности фермента, что требует использования различных буферных сред для инкубирования биосенсора в растворе физостигмина и для последующего измерения каталитической активности АХЭ при гидролизе АТХ. В дальнейших экспериментах при ингибировании биосенсоров в растворе физостигмина было использовано значение рН 7.0, отвечающее максимуму ингибирующего действия модельного токсиканта.

На рис. 3 представлены сигналы биосенсора на субстрат и физостигмин, полученные для различных количеств иммобилизованного фермента. При увеличении количества иммобилизованной АХЭ наблюдается увеличение тока окисления тиохалина, сопряженное со снижением чувствительности сенсора по отношению к физостигмину. Исходя из соотношения погрешности измерения и величины полученной при этом степени ингибирования признано целесообразным последующие измерения проводить с биосенсорами, приготовленными с использованием 0.0024 ЕА/мм² АХЭ.

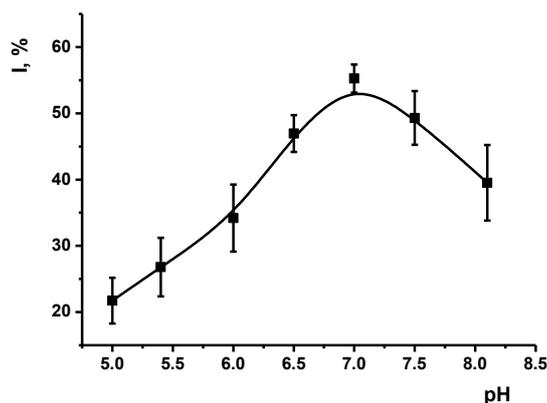


Рис. 2. Зависимость степени ингибирования от pH раствора физостигмина. Концентрация физостигмина 0.1 мкМ, время инкубирования 15 мин, концентрация АХЭ на поверхности биосенсора 0.0024 ЕА/мм². Приведены средние значения и ошибки измерения для шести биосенсоров

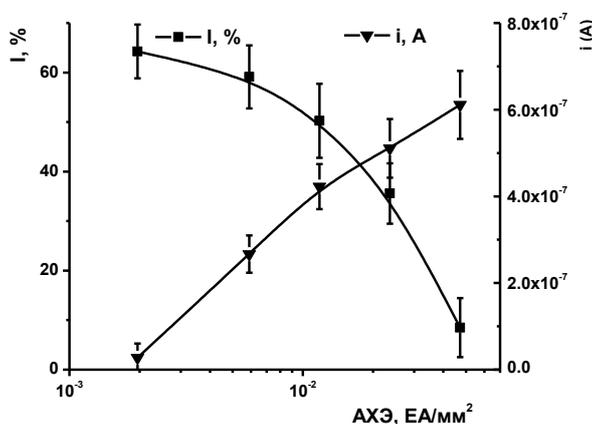


Рис. 3. Зависимость степени ингибирования и анодного тока окисления тиохolina от количества фермента, использованного при иммобилизации АХЭ. Концентрация физостигмина 0.1 мкМ, pH 7.0, время инкубирования 15 мин, АТХ 5 мМ. Приведены средние значения и ошибки измерения для шести биосенсоров

Указанный биосенсор был использован для установления аналитических характеристик определения физостигмина в ФБ при pH 7.0 и времени инкубирования 15 мин.

Зависимость степени ингибирования АХЭ (I , %) от концентрации физостигмина (C_1), полученная в этих условиях, линейна в полулогарифмических координатах I , % – $\lg C_1$ в диапазоне концентраций физостигмина 0.3 нМ – 10.0 мкМ. Линейный участок зависимости может быть описан уравнением I , % = 175.0 + 16.42 $\lg(C_1, M)$ ($R = 0.9991$, $n = 6$). В соответствии с этим уравнением предел обнаружения физостигмина, отвечающий степени ингибирования 15%, равен $1.8 \cdot 10^{-10}$ М. Была проведена также оценка показателя I_{50} , соответствующего 50%-ной степени ингибирования, который является критерием чувствительности сигнала биосенсора к ингибитору независимо от механизма ингибирования ($I_{50} = 2.5 \cdot 10^{-8}$ М).

Чувствительность разработанного биосенсора существенно превосходит чувствительность аналогов, описанных в литературе. Так, при использовании сигнала поверхностного фотонапряжения на тиохолин при иммобилизации АХЭ достигнут интервал определяемых концентраций физостигмина 10 нМ – 10 мМ [23]. Другие характеристики определения физостигмина приведены во введении.

Для оценки взаимодействия иммобилизованного фермента с физостигмином была рассчитана кажущаяся константа бимолекулярного взаимодействия фермент – ингибитор. Для этого использовали уравнение Олдриджа [24] (4), принимая регистрируемый ток окисления тиохолина мерой скорости ферментативной реакции:

$$\ln \frac{i_0}{i} = k_{II} C_1 \tau, \quad (4)$$

где i_0 и i – сигнал биосенсора до и после инкубирования в растворе ингибитора, k_{II} – кажущаяся константа бимолекулярного взаимодействия, τ – время инкубирования. Для оценки величины k_{II} строили линейную регрессию вида $\ln(i_0/i) = bC_1$ по результатам измерений сигнала биосенсора при постоянном времени инкубирования 15 мин и вычисляли параметр b . После этого находили $k_{II} = b/\tau$. Рассчитанное таким образом значение k_{II} составило $0.63 \text{ мкМ}^{-1} \cdot \text{мин}^{-1}$. Линеаризация графиков в координатах Олдриджа косвенно подтверждает конкурентный обратимый механизм ингибирования фермента.

Таким образом, установлена возможность высокочувствительного определения физостигмина с помощью ацетилхолинэстеразного амперометрического сенсора, в котором низкие определяемые концентрации аналита достигнуты подбором рабочих условий формирования поверхностного слоя и pH среды, где проводится инкубирование фермента и последующее измерение его сигнала.

Биосенсор показал хорошую устойчивость сигнала при хранении при пониженной температуре и работоспособность по крайней мере в течение трех недель хранения. Поскольку физостигмин относится к лекарственным препаратам с близкими характеристиками фармакологического и токсического действия, разработанный биосенсор может найти применение для контроля его применения и обоснованного выбора индивидуальной дозы в случае комплексной терапии. Аналогичные измерения можно проводить и с другими антихолинэстеразными препаратами, используемыми при лечении нейродегенеративных заболеваний.

Благодарности. Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проект № 17-03-00381).

Литература

1. *Arduini F., Amine A., Moscone D., Paleschi G.* Biosensors based on cholinesterase inhibition for insecticides, nerve agents and aflatoxin B1 detection (review) // *Microchim. Acta.* – 2010. – V. 170, No 3–4. – P. 193–214. – doi: 10.1007/s00604-010-0317-1.
2. *Domínguez-Renedo O., Alonso-Lomillo M.A., Arcos-Martínez M.J.* Determination of metals based on electrochemical biosensors // *Crit. Rev. Environ. Sci. Technol.* – 2013. – V. 43, No 10. – P. 1042–1073. – doi: 10.1080/10934529.2011.627034.
3. *Gil E.D., de Melo G.R.* Electrochemical biosensors in pharmaceutical analysis // *Braz. J. Pharm. Sci.* – 2010. – V. 46, No 3. – P. 375–391. – doi: 10.1590/S1984-82502010000300002.

4. *Arduini F., Amine A., Moscone D., Palleschi G.* Reversible enzyme inhibition-based biosensors: Applications and analytical improvement through diagnostic inhibition // *Anal. Lett.* – 2009. – V. 42, No 9. – P. 1258–1293. – doi: 10.1080/00032710902901913.
5. *Lenigk R., Lam E., Lai A., Wang H., Han Y., Carlier P., Renneberg R.* Enzyme biosensor for studying therapeutics of Alzheimer's disease // *Biosens. Bioelectron.* – 2000. – V. 15, No 9–10. – P. 541–547. – doi: 10.1016/S0956-5663(00)00078-6.
6. *Čolović M.B., Krstić D.Z., Lazarević-Pašti T.D., Bondžić A.M., Vasić V.M.* Acetylcholinesterase inhibitors: Pharmacology and toxicology // *Curr. Neuropharmacol.* – 2013. – V. 11, No 3. – P. 315–335. – doi: 10.2174/1570159X11311030006.
7. *Гайнуллина Э.Т., Гуликова Д.К., Корнеев Д.О., Орешкин Д.В., Рыжиков С.Б., Фатеенков В.Н.* Биосенсоры как средство мониторинга объектов окружающей среды на содержание фосфорорганических соединений нервно-паралитического действия // *Журн. аналит. хим.* – 2015. – Т. 70, Вып. 7. – С. 675–685.
8. *Pohanka M.* Electrochemical biosensors based on acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase. A review // *Int. J. Electrochem. Sci.* – 2016. – V. 11. – P. 7440–7452. – doi: 10.20964/2016.09.16.
9. *Amine A., Arduini F., Moscone D., Palleschi G.* Recent advances in biosensors based on enzyme inhibition // *Biosens. Bioelectron.* – 2016. – V. 76. – P. 180–194. – doi: 10.1016/j.bios.2015.07.010.
10. *Pinto T., Lanctôt K.L., Herrmann N.* Revisiting the cholinergic hypothesis of behavioral and psychological symptoms in dementia of the Alzheimer's type // *Ageing Res. Rev.* – 2011. – V. 10, No 4. – P. 404–412. – doi: 10.1016/j.arr.2011.01.003.
11. *Bentué-Ferrer D., Tribut O., Polard E., Allain H.* Clinically significant drug interactions with cholinesterase inhibitors // *CNS Drugs* – 2003. – V. 17, No 13. – P. 947–963.
12. *Munoz-Torrero D.* Acetylcholinesterase inhibitors as disease-modifying therapies for Alzheimers disease // *Curr. Med. Chem.* – 2008. – V. 15, No 24. – P. 2433–2455. – doi: 10.2174/092986708785909067.
13. *Singh M., Kaur M., Kukreja H., Chugh R., Silakari O., Singh D.* Acetylcholinesterase inhibitors as Alzheimer therapy: From nerve toxins to neuroprotection // *Eur. J. Med. Chem.* – 2013. – V. 70. – P. 165–188. – doi: 10.1016/j.ejmech.2013.09.050.
14. *Milkani E., Lambert C.R., McGimpsey W.G.* Direct detection of acetylcholinesterase inhibitor binding with an enzyme-based surface plasmon resonance sensor // *Anal. Biochem.* – 2011. – V. 408, No 2. – P. 212–219. – doi: 10.1016/j.ab.2010.09.009.
15. *Stoycheva M., Zlatev R.* Bioelectrocatalytical studies of the effect of some pharmaceuticals on the acetylcholinesterase activity // *Electroanalysis.* – 1996. – V. 8, No 7. – P. 676–679. – doi: 10.1002/elan.1140080714.
16. *Rehák M., Šnejdárková M., Hianik T.* Acetylcholine minisensor based on metal-supported lipid bilayers for determination of environmental pollutants // *Electroanalysis.* – 1997. – V. 9, No 14. – P. 1072–1077. – doi: 10.1002/elan.1140091408.
17. *İpek Y., Dinçer H., Koca A.* Selective electrochemical pesticide sensor modified with “click electrochemistry” between cobalt phthalocyanine and 4-azidoaniline // *J. Electrochem. Soc.* – 2014. – V. 161, No 9. – P. B183–B190. – doi: 10.1149/2.0671409jes.
18. *Jung D.I., Shin Y.J., Lee E.S., Moon T., Yoon C.N., Lee B.H.* Acetylcholinesterase (AChE)-catalyzed hydrolysis of long-chain thiocholine esters: Shift to a new chemical mechanism // *Bull. Korean Chem. Soc.* – 2003. – V. 24. – P. 65–69.
19. *Andreescu S., Barthelmebs L., Marty J.-L.* Immobilization of acetylcholinesterase on screen-printed electrodes: Comparative study between three immobilization methods and applications to the detection of organophosphorus insecticides // *Anal. Chim. Acta.* – 2002. – V. 464, No 2. – P. 171–180. – doi: 10.1016/S0003-2670(02)00518-4.

20. Bucur B., Danet A.F., Marty J.-L. Versatile method of cholinesterase immobilisation via affinity bonds using Concanavalin A applied to the construction of a screen-printed biosensor // *Biosens. Bioelectron.* – 2004. – V. 20, No 2. – P. 217–225. – doi: 10.1016/j.bios.2004.02.024.
21. Suprun E., Evtugyn G., Budnikov H., Ricci F., Moscone D., Palleschi G. Acetylcholinesterase sensor based on screen-printed carbon electrode modified with prussian blue // *Anal. Bioanal. Chem.* – 2005. – V. 383, No 4. – P. 597–604. – doi: 10.1007/s00216-005-0002-0.
22. Goldstein A. The mechanism of enzyme-inhibitor-substrate reactions. Illustrated by the cholinesterase-physostigmine-acetylcholine system // *J. Gen. Physiol.* – 1944. – V. 27, No 6. – P. 529–580.
23. Fedosseeva O.V., Uchida H., Katsube T., Ishimaru Y., Iida T. Novel type cholinesterase sensor based on SPV measurement technique // *Sens. Actuators B.* – 2000. – V. 65, No 1–3. – P. 55–57. – doi: 10.1016/S0925-4005(99)00437-2.
24. Aldridge W.N., Reiner E. Acetylcholinesterase. Two types of inhibition by an organophosphorus compound: One the formation of phosphorylated enzyme and the other analogous to inhibition by substrate // *Biochem. J.* – 1969. – V. 115, No 2. – P. 147–162.

Поступила в редакцию
07.11.17

Давлетшина Регина Рудисовна, аспирант кафедры аналитической химии

Казанский (Приволжский) федеральный университет
ул. Кремлевская, д. 18, г. Казань, 420008, Россия
E-mail: luckydav@mail.ru

Иванов Алексей Николаевич, кандидат химических наук, старший научный сотрудник отдела аналитической химии

Казанский (Приволжский) федеральный университет
ул. Кремлевская, д. 18, г. Казань, 420008, Россия
E-mail: Alexey.Ivanov@kpfu.ru

Евтюгин Геннадий Артурович, доктор химических наук, профессор, заведующий кафедрой аналитической химии

Казанский (Приволжский) федеральный университет
ул. Кремлевская, д. 18, г. Казань, 420008, Россия
E-mail: Gennady.Evtugyn@kpfu.ru

ISSN 2542-064X (Print)
ISSN 2500-218X (Online)

UCHENYE ZAPISKI KAZANSKOGO UNIVERSITETA. SERIYA ESTESTVENNYE NAUKI
(Proceedings of Kazan University. Natural Sciences Series)

2018, vol. 160, no. 1, pp. 5–16

Amperometric Acetylcholinesterase Biosensor for Physostigmine Determination

R.R. Davletshina^{*}, *A.N. Ivanov*^{**}, *G.A. Evtugyn*^{***}

Kazan Federal University, Kazan, 420008 Russia

E-mail: ^{*}luckydav@mail.ru, ^{**}Alexey.Ivanov@kpfu.ru, ^{***}Gennady.Evtugyn@kpfu.ru

Received November 7, 2017

Abstract

A biosensor based on acetylcholinesterase immobilized by carbodiimide binding on glassy carbon electrode modified with carbon black and Co(II) phthalocyanine has been developed. The working conditions for assembling of the surface layer and measurement protocol have been specified for mediated oxidation

of the product formed in the enzymatic hydrolysis of acetylthiocholine. It has been demonstrated that immobilization of the enzyme does not decrease the affinity of the active site to the substrate. The possibility for determination of physostigmine as a model reversible inhibitor in the concentration range from 0.3 nM to 10 μ M and the detection limit of $1.8 \cdot 10^{-10}$ M has been established. The kinetic parameters of enzymatic hydrolysis of the substrate and those of competitive inhibition of the enzyme have been calculated. The developed biosensor can find application for the monitoring of anticholinesterase drugs.

Keywords: acetylcholinesterase, enzyme inhibitor, biosensor, determination of reversible inhibition, cobalt(II) phthalocyanine, chemically modified electrode

Acknowledgments. The study was supported by the Russian Foundation for Basic Research (project no. 17-03-00381).

Figure Captions

- Fig. 1. Dependence of the inhibition degree on the time of biosensor incubation in physostigmine solution. Physostigmine concentration – 0.01 μ M, pH of physostigmine solution – 7.8, AChE concentration on the biosensor surface – 0.0024 AU/mm².
- Fig. 2. Dependence of the inhibition degree on the pH value of physostigmine solution. Physostigmine concentration – 0.1 μ M, incubation time – 15 min, AChE concentration on the biosensor surface – 0.0024 AU/mm².
- Fig. 3. Dependence of the inhibition degree and the anode current of thiocholine oxidation on the amount of the enzyme used for AChE immobilization. Physostigmine concentration – 0.1 μ M, pH 7.0, incubation time – 15 min, ATC – 5 mM. Mean values and measurement errors for six biosensors are provided.

References

1. 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, vol. 170, nos. 3–4, pp. 193–214. doi: 10.1007/s00604-010-0317-1.
2. Domínguez-Renedo O., Alonso-Lomillo M.A., Arcos-Martínez M.J. Determination of metals based on electrochemical biosensors. *Crit. Rev. Environ. Sci. Technol.*, 2013, vol. 43, no. 10, pp. 1042–1073. doi: 10.1080/10934529.2011.627034.
3. Gil E.D., de Melo G.R. Electrochemical biosensors in pharmaceutical analysis. *Braz. J. Pharm. Sci.*, 2010, vol. 46, no. 3, pp. 375–391. doi: 10.1590/S1984-82502010000300002.
4. Arduini F., Amine A., Moscone D., Palleschi G. Reversible enzyme inhibition-based biosensors: Applications and analytical improvement through diagnostic inhibition. *Anal. Lett.*, 2009, vol. 42, no. 9, pp. 1258–1293. doi: 10.1080/00032710902901913.
5. Lenigk R., Lam E., Lai A., Wang H., Han Y., Carlier P., Renneberg R. Enzyme biosensor for studying therapeutics of Alzheimer's disease. *Biosens. Bioelectron.*, 2000, vol. 15, nos. 9–10, pp. 541–547. doi: 10.1016/S0956-5663(00)00078-6.
6. Čolović M.B., Krstić D.Z., Lazarević-Pašti T.D., Bondžić A.M., Vasić V.M. Acetylcholinesterase inhibitors: Pharmacology and toxicology. *Curr. Neuropharmacol.*, 2013, vol. 11, no. 3, pp. 315–335. doi: 10.2174/1570159X11311030006.
7. Gainullina E.T., Gulikova D.K., Korneev D.O., Oreshkin D.V., Ryzhikov S.B., Fateenkov V.N. Biosensors as tools of environmental monitoring for organophosphorus nerve agents. *J. Anal. Chem.*, 2015, vol. 70, no. 7, pp. 771–780. doi: 10.1134/S1061934815070047.
8. Pohanka M. Electrochemical biosensors based on acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase. A review. *Int. J. Electrochem. Sci.*, 2016, vol. 11, pp. 7440–7452. doi: 10.20964/2016.09.16.
9. Amine A., Arduini F., Moscone D., Palleschi G. Recent advances in biosensors based on enzyme inhibition. *Biosens. Bioelectron.*, 2016, vol. 76, pp. 180–194. doi: 10.1016/j.bios.2015.07.010.
10. Pinto T., Lanctôt K.L., Herrmann N. Revisiting the cholinergic hypothesis of behavioral and psychological symptoms in dementia of the Alzheimer's type. *Ageing Res. Rev.*, 2011, vol. 10, no. 4, pp. 404–412. doi: 10.1016/j.arr.2011.01.003.
11. Bentué-Ferrer D., Tribut O., Polard E., Allain H. Clinically significant drug interactions with cholinesterase inhibitors. *CNS Drugs*, 2003, vol. 17, no. 13, pp. 947–963.

12. Munoz-Torrero D. Acetylcholinesterase inhibitors as disease-modifying therapies for Alzheimers disease. *Curr. Med. Chem.*, 2008, vol. 15, no. 24, pp. 2433–2455. doi: 10.2174/092986708785909067.
13. Singh M., Kaur M., Kukreja H., Chugh R., Silakari O., Singh D. Acetylcholinesterase inhibitors as Alzheimer therapy: From nerve toxins to neuroprotection. *Eur. J. Med. Chem.*, 2013, vol. 70, pp. 165–188. doi: 10.1016/j.ejmech.2013.09.050.
14. Milkani E., Lambert C.R., McGimpsey W.G. Direct detection of acetylcholinesterase inhibitor binding with an enzyme-based surface plasmon resonance sensor. *Anal. Biochem.*, 2011, vol. 408, no. 2, pp. 212–219. doi: 10.1016/j.ab.2010.09.009.
15. Stoycheva M., Zlatev R. Bioelectrocatalytical studies of the effect of some pharmaceuticals on the acetylcholinesterase activity. *Electroanalysis*, 1996, vol. 8, no. 7, pp. 676–679. doi: 10.1002/elan.1140080714.
16. Reháč M., Šnejdárková M., Hianik T. Acetylcholine minisensor based on metal-supported lipid bilayers for determination of environmental pollutants. *Electroanalysis*, 1997, vol. 9, no. 14, pp. 1072–1077. doi: 10.1002/elan.1140091408.
17. İpek Y., Dinçer H., Koca A. Selective electrochemical pesticide sensor modified with “click electrochemistry” between cobalt phthalocyanine and 4-azidoaniline. *J. Electrochem. Soc.*, 2014, vol. 161, no. 9, pp. B183–B190. doi: 10.1149/2.0671409jes.
18. Jung D.I., Shin Y.J., Lee E.S., Moon T., Yoon C.N., Lee B.H. Acetylcholinesterase (AChE)-catalyzed hydrolysis of long-chain thiocholine esters: Shift to a new chemical mechanism. *Bull. Korean Chem. Soc.*, 2003, vol. 24, pp. 65–69.
19. Andreescu S., Barthelmebs L., Marty J.-L. Immobilization of acetylcholinesterase on screen-printed electrodes: Comparative study between three immobilization methods and applications to the detection of organophosphorus insecticides. *Anal. Chim. Acta*, 2002, vol. 464, no. 2, pp. 171–180. doi: 10.1016/S0003-2670(02)00518-4.
20. Bucur B., Danet A.F., Marty J.-L. Versatile method of cholinesterase immobilisation via affinity bonds using Concanavalin A applied to the construction of a screen-printed biosensor. *Biosens. Bioelectron.*, 2004, vol. 20, no. 2, pp. 217–225. doi: 10.1016/j.bios.2004.02.024.
21. Suprun E., Evtugyn G., Budnikov H., Ricci F., Moscone D., Palleschi G. Acetylcholinesterase sensor based on screen-printed carbon electrode modified with prussian blue. *Anal. Bioanal. Chem.*, 2005, vol. 383, no. 4, pp. 597–604. doi: 10.1007/s00216-005-0002-0.
22. Goldstein A. The mechanism of enzyme-inhibitor-substrate reactions. Illustrated by the cholinesterase-physostigmine-acetylcholine system. *J. Gen. Physiol.*, 1944, vol. 27, no. 6, pp. 529–580.
23. Fedosseeva O.V., Uchida H., Katsube T., Ishimaru Y., Iida T. Novel type cholinesterase sensor based on SPV measurement technique. *Sens. Actuators, B*, 2000, vol. 65, nos. 1–3, pp. 55–57. doi: 10.1016/S0925-4005(99)00437-2.
24. Aldridge W.N., Reiner E. Acetylcholinesterase. Two types of inhibition by an organophosphorus compound: One the formation of phosphorylated enzyme and the other analogous to inhibition by substrate. *Biochem. J.*, 1969, vol. 115, no. 2, pp. 147–162.

Для цитирования: Давлетшина Р.Р., Иванов А.Н., Евтюгин Г.А. Амперометрический ацетилхолинэстеразный сенсор для определения физостигмина // Учен. зап. Казан. ун-та. Сер. Естеств. науки. – 2018. – Т. 160, кн. 1. – С. 5–16.

For citation: Davletshina R.R., Ivanov A.N., Evtugyn G.A. Amperometric acetylcholinesterase biosensor for physostigmine determination. *Uchenye Zapiski Kazanskogo Universiteta. Seriya Estestvennye Nauki*, 2018, vol. 160, no. 1, pp. 5–16. (In Russian)