

Разработка микробиосенсоров на основе углеродных волокон для определения глюкозы, ацетилхолина и холина *in vivo*

О. Н. Щувайло, Л. В. Данилейко, В. Н. Архипова, С. В. Дзядевич,
А. В. Ельская, Р. Сеспуглио¹, А. П. Солдаткин

Институт молекулярной биологии и генетики НАН Украины
Ул. Академика Заболотного, 150, Киев, 03143, Украина

E. mail: a.soldatkin@yahoo.com

¹ Отдел экспериментальной медицины, INSERM U480, Университет Клода Бернара
Ул. Рокфеллера, 8, 69373, Лион Седекс, Франция

E. mail: cespuglii@univ-lyon1.fr

*В работе разработана новая улучшенная технология создания микроэлектродов на основе углеродных волокон. Произведенные по такой технологии датчики имеют длительное время жизни, устойчивы к электрохимической и химической преобработкам, а при электрохимической активации демонстрируют высокую чувствительность к H₂O₂. Минимально определяемая с помощью микроэлектродов концентрация перекиси водорода составляла 0,5 мкМ. Разработанные на основе указанных микроэлектродов биосенсоры для определения глюкозы, ацетилхолина и холина показывают высокую чувствительность при работе в модельных растворах. Минимально определяемые с помощью разработанных биосенсоров концентрации субстратов составляют для глюкозы 60 мкМ, для ацетилхолина и холина — 1 мкМ. Такая чувствительность микробиосенсоров позволяет использовать их *in vivo* для анализа указанных веществ в мозге млекопитающих.*

Введение. Для живых организмов глюкоза является очень важным компонентом энергетического метаболизма. В тканях (мозг, сердце) и биологических жидкостях (кровь, цереброспинальная жидкость) уровень глюкозы определяется гомеостатическим балансом, регулирующим его уровень в определенных, строго детерминированных пределах. Изменение уровня глюкозы в организме может иметь место, например, при таких патологиях, как диабет [1].

В случае церебрального метаболизма все аспекты, связанные с потреблением и производством энергии, имеют как чисто научный, так и прикладной медицинский интерес. Механизмы, регулирующие эти процессы, до сих пор до конца не изучены, поскольку исследования в основном проведены в *post-mortem* период [1, 2], а полученные таким

образом данные далеки от таковых, полученных в физиологических условиях *in vivo*. Прогресс же в этой области может быть достигнут только при прямых исследованиях глюкозы *in vivo*. Поэтому в последнее время значительные усилия исследователей направлены на разработку биосенсоров для определения глюкозы *in vivo* [3, 4], но, к сожалению, рабочие характеристики таких биосенсоров не всегда удовлетворяют практическим требованиям и нуждаются в улучшении.

Нейромедиаторы играют очень важную роль в функционировании организма, так как они являются ключевыми молекулами, обеспечивающими связь между нейронами. Непрерывное исследование уровня нейромедиаторов очень важно для изучения физиологии нервных клеток и детального понимания их функции. Ацетилхолин — один из наиболее важных нейромедиаторов, ответственных за передачу сигналов в нейронах головного и спинного мозга, где он локализован диффузно. Деталь-

ная информация о концентрации ацетилхолина и холина (предшественника ацетилхолина) в разных отделах мозга может быть важна для понимания их влияния на память, сон, бодрствование, а также их роли в таких заболеваниях, как эпилепсия, болезни Альцгеймера, Паркинсона и др. [5].

Для анализа ацетилхолина и холина в биологических жидкостях разработано и применено несколько методов, в частности, биохимический анализ с использованием радиоактивных меток [6, 7], вывокоэффективную жидкостную хроматографию с электрохимической детекцией [8], а также микродиализную технику с биосенсорной детекцией [9]. Основными недостатками перечисленных методов являются длительное время анализа и необходимость использования дорогого и сложного оборудования. Кроме того, они не могут быть использованы для исследований *in vivo*. Простейший путь для устранения этих недостатков — применение имплантируемых микробиосенсоров для прямого измерения ацетилхолина *in vivo*. Перспективным преобразователем в этом случае является электрод на основе углеродного волокна [3, 10, 11].

Целью данного исследования была разработка технологии получения микроэлектродов на основе углеродного волокна и микробиосенсоров для определения глюкозы, холина и ацетилхолина *in vivo*.

Материалы и методы. В работе использовали: ферменты глюкозооксидазу (ГОД) из *Aspergillus niger* с активностью 181,6 ед. акт/мг; ацетилхолинэстеразу (АХЭ) из электрического угря с активностью 301 ед. акт/мг; холиноксидазу (ХО) из *Alcaligenes species* с активностью 12 ед. акт/мг производства фирмы «Sigma—Aldrich Chimie S.a.r.l.» (Франция).

Субстратами служили глюкоза, а также хлориды ацетилхолина и холина фирмы «Sigma—Aldrich Chimie S.a.r.l.».

Бычий сывороточный альбумин (БСА) и 50 %-й водный раствор глутарового альдегида (ГА) также получены от фирмы «Sigma—Aldrich Chimie S.a.r.l.».

Как рабочий использовали 10 мМ калий-фосфатный буфер ($\text{K}_2\text{PO}_4\text{-NaOH}$), pH 7,4, отечественного производства квалификации «ос. ч.». Все другие реактивы были отечественного и импортного производства квалификации «ос. ч.» и «х. ч.»

В работе применяли микроэлектроды собственного производства на основе углеродных моноволокон с диаметром 30 мкм и длиной рабочей части 500 мкм (AVCO тип, Lowel, MA). Перед работой микроэлектроды преобразовывали электрохимически [3]. В случае повторного использования микроэлектродов старые ферментные мембраны удаляли

с помощью хромовой смеси, отмывали большими объемами рабочего буфера и снова обрабатывали электрохимически [3].

В случае глюкозного и холинового биосенсоров для образования биоселективных мембран готовили смесь фермента и БСА в 10 мМ калий-фосфатном буфере, pH 7,4, с конечной концентрацией 150 мг/мл каждого. В случае ацетилхолинового биосенсора смесь для приготовления биоселективных мембран содержала БСА и ферменты АХЭ, ХО в 10 мМ калий-фосфатном буфере, pH 7,4, с конечной концентрацией 120, 20 и 80 мг/мл соответственно. Во все смеси добавляли глицерин до конечной концентрации 10 % для стабилизации ферментов при иммобилизации, а также для предотвращения преждевременного высыхания растворов и улучшения адгезии мембран к поверхности преобразователя. Смесь фермент(ы)—БСА наносили на рабочую поверхность электрода методом погружения. Для полимеризации мембран датчики помещали в атмосферу насыщенных паров ГА на 6 мин (17 °С), а потом подсушивали на воздухе в течение 10 мин.

Перед измерениями биосенсоры вымачивали некоторое время в 10 мМ калий-фосфатном буфере (pH 7,4) до получения стабильного базового сигнала. Измерения проводили с использованием модельных растворов субстратов в 10 мМ фосфатном буфере, pH 7,4, при температуре 36 °С. Необходимую концентрацию субстратов задавали введением определенных аликвот их концентрированных растворов.

Амперометрические измерения проводили в проточно-инжекционной системе (рис. 1) с помощью потенциостата. Измерения осуществляли по трехэлектродной схеме: рабочий электрод на основе углеродного моноволокон, хлорсеребряный электрод сравнения и вспомогательный платиновый электрод. Использовали циклическую треугольную развертку потенциала от 850 до 1100 мВ.

Результаты и обсуждение. В последнее время для определения концентраций различных веществ *in vivo* очень часто разрабатываются биосенсоры на основе углеродных волокон. Наиболее распространенная технология изготовления микроэлектродов на основе углеродных волокон описана в работах [3, 10, 11]. Она состоит в следующем: кусочек углеродного волокна приклеивается к серебряной или посеребренной проволоке с помощью серебряного токопроводящего клея, затем помещается в стеклянный капилляр с таким образом оттянутым концом, чтобы наружная часть углеродного волокна, выполняющая функцию рабочей поверхности электрода, и конец проволоки, который использу-

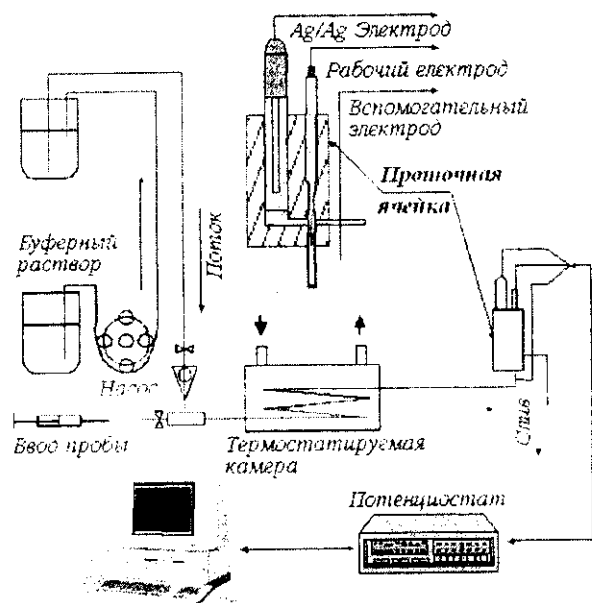


Рис. 1. Схематическое представление экспериментальной установки

ется для контакта с электродом, находились снаружи. Далее оба конца стеклянного капилляра заливаются эпоксидной смолой для герметизации электрода. При таком методе производства электродов затрачивается много ручной работы и технология трудно поддается адаптации к массовому производству. Кроме того, полученные подобным образом электроды плохо воспроизводимы, неустойчивы в агрессивных водных средах и нестабильны при длительном использовании (эпоксидная смола набухает и разрушается, нарушая герметичность). Поэтому свои исследования мы начали с усовершенствования технологии производства электродов на основе углеродных волокон, заключающегося в том, что использовался прижимной контакт между углеродным волокном и посеребренной медной проволокой, а герметичность между волокном и стеклянным капилляром достигалась сплавлением стекла и волокна (рис. 2). К другому концу проволоки припаивали стандартный разъем, а капилляр со стороны контакта заливали эпоксидной смолой. На стеклянный капилляр сверху дополнительно надевали полимерную пленку. Таким образом, достигали следующих преимуществ:

прямое сплавление углеродного волокна со стеклом увеличивало срок службы электрода, давало возможность применения сильных химических и электрохимических преобработок для увеличения его чувствительности, а также позволяло многократно использовать электроды;

прямой электрический контакт между углеродным волокном и посеребренной медной проволокой обеспечивал воспроизводимое внутреннее сопротивление электродов и упрощал процедуру их производства;

полимерное покрытие стеклянного капилляра увеличивало устойчивость электрода к физическим повреждениям при работе, а также позволяло использовать различные поддерживающие устройства (например, направляющие для электрода при погружении в проточную систему), что позволило уменьшить процент повреждений электрода при работе.

Приготовленные таким образом электроды проверяли на чувствительность к перекиси водорода. На рис. 3 представлено типичное изменение вольт-амперной характеристики микроэлектрода при внесении H_2O_2 в ячейку. Проверка чувствительности показала (рис. 4), что электроды без предварительной обработки характеризуются гораздо более низкой чувствительностью к H_2O_2 (минимально определяемая концентрация составляла около 50 мкМ), чем электрохимически преобработанные электроды. Последние демонстрировали минимально определяемую концентрацию перекиси водорода, равную 0,5 мкМ, но и эта величина ограничивалась в основном техническими характеристиками потенциостата и несовершенством системы измерения.

Дальнейшее усовершенствование измерительной схемы (применение полного экранирования измерительного блока, дополнительная стабилизация питания прибора), а также применение современных импульсных амперометрических методов измерений позволит увеличить чувствительность электродов к перекиси водорода и соответственно улучшить характеристики разрабатываемых биосенсоров. Высокая чувствительность электродов к малым концентрациям перекиси водорода абсолютно необходима при создании биосенсоров для определения холина и ацетилхолина, поскольку концентрация этих веществ в мозге составляет величины порядка десятка микромолей на килограмм массы мозга [12]. Предварительно обработанные электрохимически электроды и были использованы в дальнейшем как преобразователи для создания биосенсоров, специфичных к глюкозе, холину и ацетилхолину.

В основе работы амперометрических ферментных биосенсоров для определения глюкозы и холина лежат следующие реакции:

ГОД



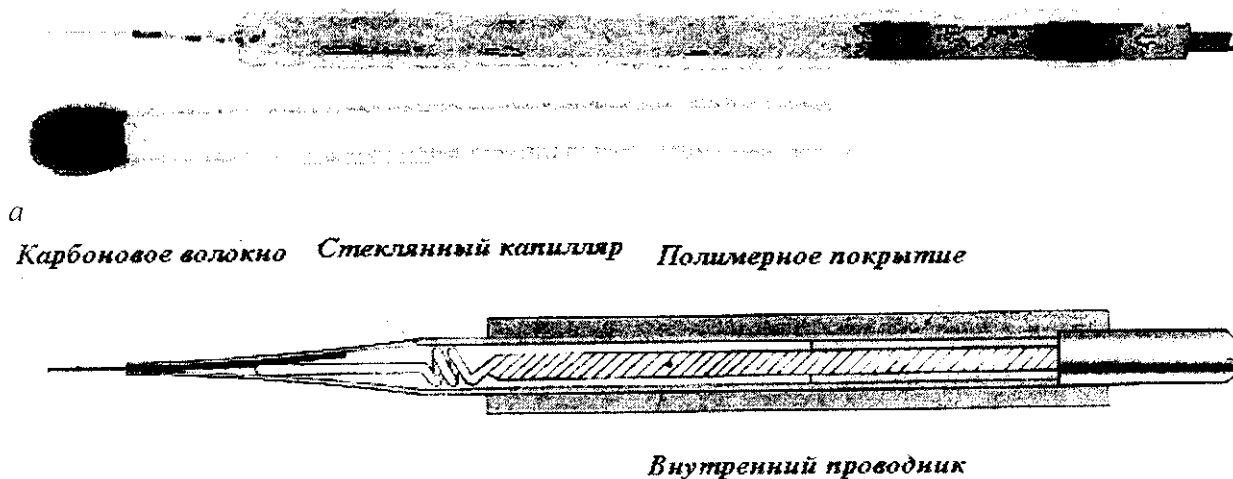


Рис. 2. Общий вид (а) и схематическое представление микроэлектрода на основе углеродного волокна (б)

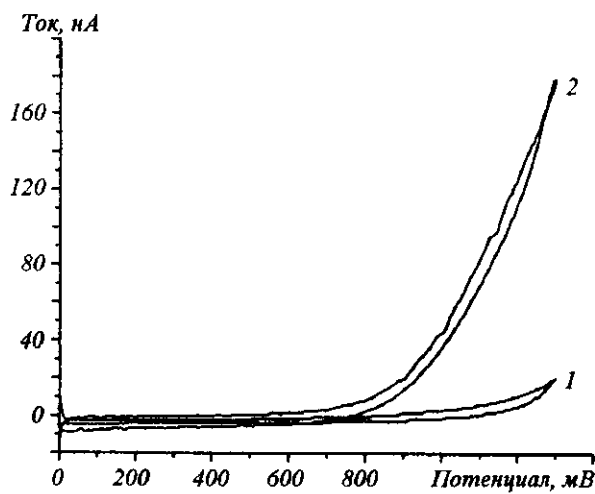


Рис. 3. Типичная вольт-амперная характеристика ультрамикроэлектрода на основе углеродного волокна в отсутствие (1) и присутствии (2) 0,25 мМ Н₂О₂ в растворе

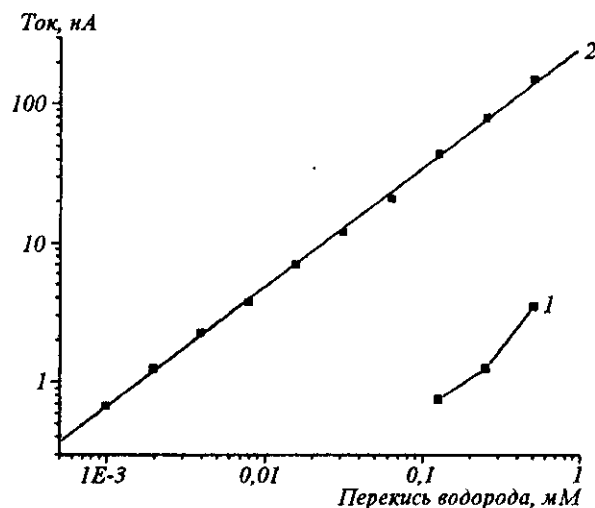


Рис. 4. Калибровочные кривые для определения перекиси водорода до (1) и после (2) электрохимической активации ультрамикроэлектрода



Превращение глюкозы и холина (реакции 1 и 2) сопровождается накоплением перекиси водорода, электрохимически активного вещества, что позволяет определять эти вещества амперометрическими биосенсорами на основе глюкозооксидазы и холи-

ноксидазы. На рис. 5 приведены типичные отклики глюкозного биосенсора на различные концентрации глюкозы в проточной системе. Из этого рисунка хорошо видно, что при увеличении концентрации глюкозы величины откликов пропорционально возрастают.

Полученная на основании таких результатов калибровочная кривая для определения concentra-

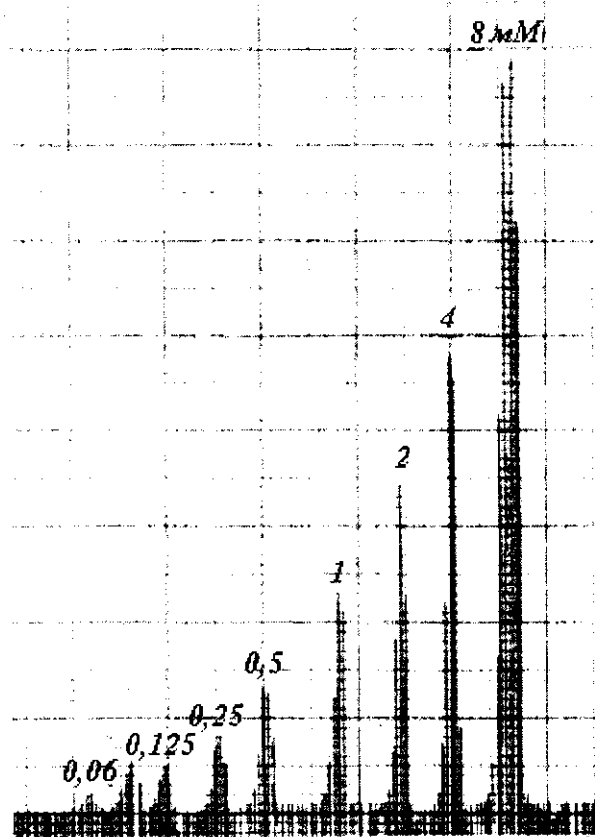


Рис. 5. Типичные отклики глюкозного микробiosенсора на изменение концентрации глюкозы в проточной системе. На этом рисунке и на рис. 6—8 измерения проводили в 25 мМ фосфатном буфере, содержащем 150 мМ NaCl, pH 7,4, при температуре 36 °С

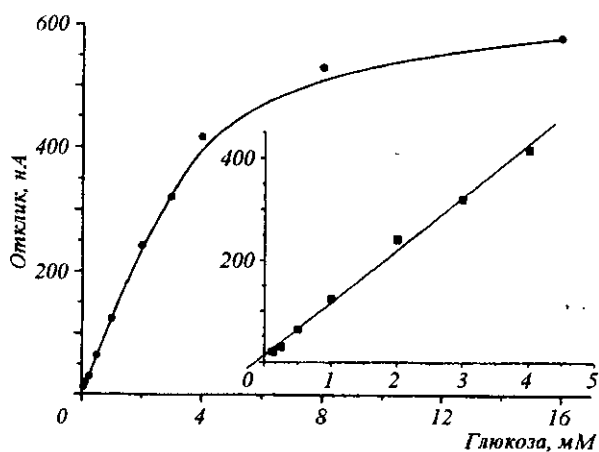


Рис. 6. Калибровочная кривая глюкозного микробiosенсора

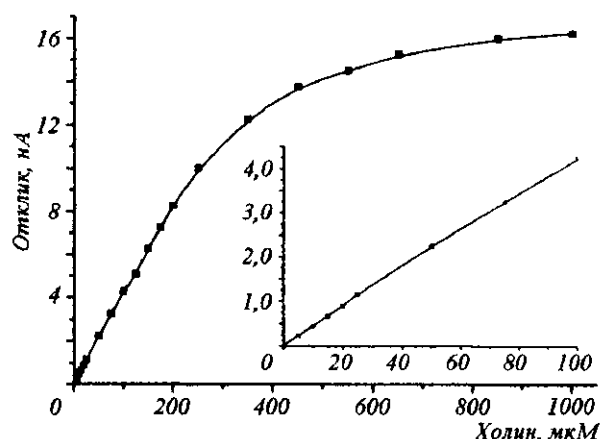
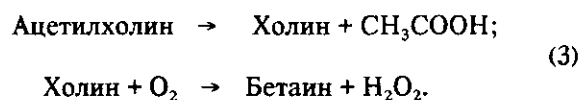


Рис. 7. Калибровочная кривая холинового микробiosенсора

ций глюкозы с помощью глюкозного микробiosенсора представлена на рис 6. Глюкозный микробiosенсор характеризовался линейной зависимостью величины отклика биосенсора от концентрации глюкозы в диапазоне 0—4 мМ и минимально определяемой концентрацией 0,06 мМ, что соответствует концентрациям глюкозы в мозге [3].

Микробiosенсор на основе холиноксидазы был более чувствительным к малым концентрациям холина в проточной ячейке. Калибровочная кривая для определения холина, полученная аналогично глюкозному биосенсору, представлена на рис. 7. Холиновый микробiosенсор характеризовался линейной зависимостью величины отклика биосенсора от концентрации холина в диапазоне 0—300 мкМ и минимально определяемой концентрацией 1 мкМ, что превышает диапазон изменения концентрации холина в мозге [12, 13].

В случае же ацетилхолинового сенсора ситуация сложнее, при его создании используется двухферментная мембрана с каскадом реакций:



Фермент ацетилхолинэстераза расщепляет субстрат до холина и ацетата, электрохимически неактивных веществ. Поэтому нужно было комбинировать две реакции, т. е. при разработке ацетилхолинового биосенсора биоселективную мембрану конструировали таким образом, что она содержала два фермента — АХЭ и ХО [14, 15], что предполагало чувствительность такого сенсора к двум суб-

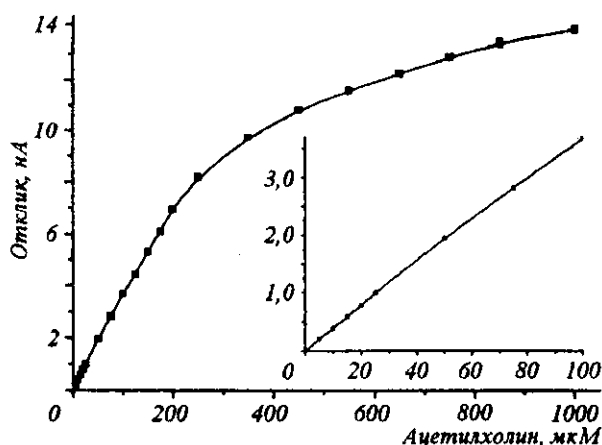


Рис. 8. Калибровочная кривая ацетилхолинового микробiosенсора

стратам, ацетилхолину и холину. Поэтому для определения концентраций ацетилхолина необходимо использовать два микробiosенсора: один — на основе двух ферментов (АХЭ и ХО) и другой — на основе ХО. Разница в силе сигналов этих двух сенсоров будет пропорциональна величине концентрации ацетилхолина. Кроме вспомогательной роли, холиновый сенсор имеет и самостоятельную ценность, так как с его помощью можно следить за концентрацией холина.

Ацетилхолиновый микробiosенсор, созданный на основе углеродного волокна и коиммобилизованных ферментов АХЭ и ХО, также демонстрировал высокую чувствительность к малым концентрациям ацетилхолина. Калибровочная кривая для определения ацетилхолина (рис. 8) показывает, что сенсор имеет линейную зависимость величины отклика от концентрации субстрата в диапазоне 0—300 мкМ, а минимально определяемая концентрация ацетилхолина составляет 1 мкМ, что также покрывает диапазон изменения его концентраций в мозге [12, 13].

Таким образом, разработанные на основе углеродных волокон микробiosенсоры проверены в модельных условиях работы при определении глюкозы, ацетилхолина и холина. Они показали высокую чувствительность к соответствующим субстратам и могут быть использованы для работы *in vivo* в мозге крыс, что и планируется на ближайшее будущее. Но, кроме этого, хорошо известно, что в мозге животных могут находиться в значительных концентрациях различные электрохимически активные вещества, такие как аскорбиновая и мочевиная кислоты, допамин, серотонин и др. Именно поэто-

му до начала экспериментов *in vivo* необходимо изучить специфичность и селективность разработанных микробiosенсоров, на что и будут направлены дальнейшие исследования.

Часть данной работы выполнена в рамках грантов NATO (LST.CLG.977826), INTAS (N 00-0751), а также совместной украинско-французской программы «Дніпро» и авторы благодарят NATO, INTAS и Министерство образования и науки Украины за финансовую помощь.

O. M. Schuvailo, L. V. Danyleyko, V. M. Arkhypova, S. V. Dzyadevych, A. V. El'skaya, R. Cespuglio, A. P. Soldatkin

Development of microbiosensors based on carbon fibres for *in vivo* determination of glucose, acetylcholine and choline

Summary

A new improved technology for manufacturing microelectrodes based on carbon fibres has been developed. The microelectrodes produced are long living, stable to electrochemical and chemical treatment. The electrochemically activated microelectrodes demonstrated high sensitivity to H_2O_2 with the detection limit for hydrogen peroxide of $0.5 \mu M$. The microbiosensors based on carbon fibre microelectrodes have been developed for the determination of glucose, acetylcholine and choline concentration. They demonstrate high sensitivity in model solutions. The detection limits for glucose, acetylcholine and choline are of $60 \mu M$, $1 \mu M$ and $1 \mu M$ respectively, that permits these microbiosensors to be applied for *in vivo* analysis of these substrates in mammalian brain.

O. M. Шувайло, Л. В. Данилейко, В. М. Архипова, С. В. Дзядевич, Г. В. Ельська, Р. Сеспуглио, О. П. Солдаткін

Розробка микробiosенсорів на основі вуглецевих волокон для визначення глюкози, ацетилхолину та холину *in vivo*

Резюме

Розроблено нову покращену технологію створення мікроелектродів на основі вуглецевих волокон. Виготовлені за такою технологією датчики мають довгий час життя, стійкі до електрохімічної та хімічної передобробки, а при електрохімічній активації демонструють високу чутливість до H_2O_2 . Мінімальна концентрація перекису водню, що визначається, складає $0,5 \mu M$. Створені на основі цих мікроелектродів біосенсори для визначення глюкози, ацетилхолину та холину також є високочутливими при роботі в модельних розчинах. Мінімальні концентрації субстратів, які можна визначити за допомогою розроблених біосенсорів, складають для глюкози — $60 \mu M$, для ацетилхолину і холину — $1 \mu M$. Така чутливість микробiosенсорів дозволяє використовувати їх *in vivo* для аналізу згаданих речовин у мозку ссавців.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Norberg K. Changes in the cerebral metabolism induced by hyperventilation at different blood glucose levels // J. Neurochem.—1976.—26.—P. 353—359.
2. Oldendorf W. H., Stoller B. E. Rat brain free glucose and lactate measurement by novel method using bisecting decapitation-extrusion and enzyme denaturation at five seconds // J. Neurochem.—1991.—56.—P. 611—614.
3. Netchiporouk L. I., Shram N. F., Jaffrezic-Renault N., Martelet C., Cespuglio R. *In vivo* brain glucose measurements:

- differential normal pulse voltammetry with enzyme-modified carbon fiber microelectrodes // *Anal. Chem.*—1996.—68, N 24.—P. 4358—4364.
4. *Kenausis G., Chen Q., Heller A.* Electrochemical glucose and lactate sensors based on «wired» thermostable soybean peroxidase operating continuously and stably at 37 °C // *Anal. Chem.*—1997.—69.—P. 1054—1060.
 5. *Fisher A., Hanin I., Lachman C.* Alzheimer's and Parkinson's diseases: Strategies for research and development.—New York: Plenum press, 1986.
 6. *Guyenet P. G., Agid Y., Javoy F., Beaujouan J. C., Rossier J., Glowinski J.* Effect of dopaminergic receptor agonists and antagonists on the activity of the neo-striatal cholinergic system // *Brain Res.*—1975.—84.—P. 227—244.
 7. *Haubrich D. R., Gerber N., Pflueger A. B., Zweig M.* Tissue choline studied using a simple chemical assay // *J. Neurochem.*—1981.—36.—P. 1409—1417.
 8. *Roisin M. P., Brassart J. L., Charton G., Crepel V., Ben Ari Y.* A new method for the measurement of endogenous transmitter release in localized regions of hippocampal slices // *J. Neurosci. Meth.*—1991.—37.—P. 183—189.
 9. *Kissinger P. T.* Microdialysis in Neuroscience / Eds T. E. Robinson, J. B. Justice.—Amsterdam: Elsevier, 1991.—P. 103—115.
 10. *Tamiya E., Sugiura Y., Navera E. N., Mizoshita S., Nakajima K., Akiyama A., Karube I.* Ultramicro acetylcholine sensor based on an enzyme-modified carbon-fiber electrode // *Anal. chim. acta.*—1991.—251.—P. 129—134.
 11. *Shram N. F., Netchiporouk L. I., Martelet C., Jaffrezic-Renault N., Bonnet C., Cespluglio R.* In vivo voltammetric detection of rat brain lactate with carbon fibre microelectrodes coated with lactate oxidase // *Anal. Chem.*—1998.—70.—P. 2618—2622.
 12. *Rogers K. J., Slater P.* Brain acetylcholine and monoamines during experimental catatonia // *J. Pharm. Pharmacol.*—1970.—23D.—P. 135—137.
 13. *Tucek S.* Problems in the organization and control of acetylcholine synthesis in brain neurons // *Progr. Biophys. and Mol. Biol.*—1984.—44.—P. 1—44.
 14. *Larsson N., Ruzgas T., Gorton L., Kokaia M., Kissinger P., Csoregi E.* Design and development of an amperometric biosensor for acetylcholine determination in brain microdialysates // *Electrochim. acta.*—1998.—43.—P. 3541—3554.
 15. *Niwa O., Horiuchi T., Kurita R., Torimitsu K.* On-line electrochemical sensor for selective continuous measurement of acetylcholine in cultured brain tissue // *Anal. Chem.*—1998.—70.—P. 1126—1132.

УДК 577.15; 573.6
Надійшла до редакції 27.09.01