

БИОСЕНЗОРИ С ЕЛЕКТРОХИМИЧНО ПРЕОБРАЗУВАНЕ НА СИГНАЛА. АМПЕРОМЕТРИЧНИ СЕНЗОРИ

ВАЛЕРИ КОЧЕВ

*Катедра "Атомна физика", група "Медицинска физика",
Физически факултет, Софийски университет „Св. Климент Охридски*

Валери Кочев. БИОСЕНЗОРИ С ЕЛЕКТРОХИМИЧНО ПРЕОБРАЗУВАНЕ НА СИГНАЛА. АМПЕРОМЕТРИЧНИ СЕНЗОРИ

В тази работа е направен преглед на амперометричните биосензори. Разгледани са техните основни елементи и принципи на действие. Изяснени са от биохимична и електрохимична гледна точка реакциите на най-често използваните ензими. Развитие на този тип биосензори е проследено във връзка с различните схеми на детектиране. Дискутирани са проблемите, възникващи поради стеричните затруднения на електронния пренос между ензима и работния електрод. Показани са някои възможности за директен пренос. Коментирани са областта на приложимост и някои бъдещи перспективи за развитие.

Valery Kochev. BIOSENSORS WITH ELECTROCHEMICAL TRANSDUCTION. AMPEROMETRIC SENSORS

This work is devoted to biosensors with amperometric signal transduction. In the previous first part, the attention was focused on the potentiometric sensors. Here some basic elements and concepts of operation of amperometric biosensors are regarded. The reactions of most commonly used enzymes are clarified from biochemical and electrochemical viewpoint. The evolution of the detecting schemes toward a generation of sensors with direct electron transfer is pointed out. Some features concerning construction and future implementation are discussed.

Keywords: amperometric biosensors, redox reactions, voltammetry, enzyme electrode, heterogeneous electron transfer, mediators

PACS numbers: 87.90.+y

За контакти: Валери Кочев, Катедра „Атомна физика, Физически факултет, Софийски университет “Св. Климент Охридски”, бул. "Джеймс Баучър", 5, София -1164, тел.: +359 2 8161317, факс: (+359 2) 962 5276; E-mail: konstvk@abv.bg

СПИСЪК НА СЪКРАЩЕНИЯТА

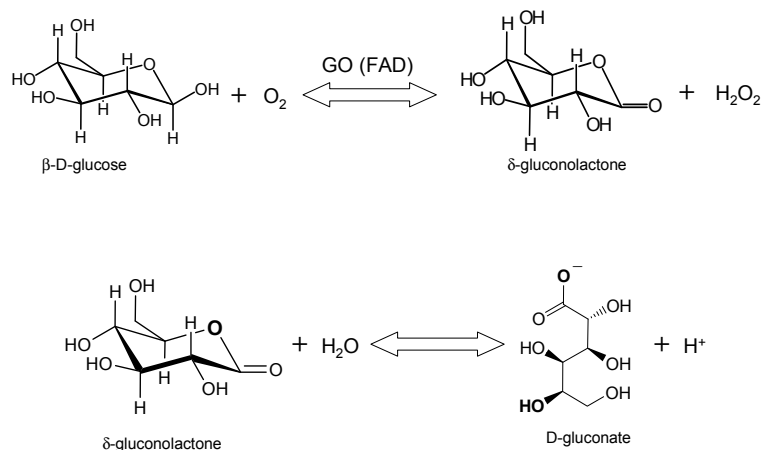
CV	–	циклична волтаметрия
DET	–	директен електронен пренос
FAD	–	флавинадениндинуклеотид
FMN	–	флавінмононуклеотид
GCE	–	стъкловъглероден електрод
Glc	–	глюкоза
GO	–	глюкозооксидаза
GSH	–	редуцирана форма на глутатиона
GSSG	–	окислена форма на глутатиона
HRP	–	пероксидаза от хрян
PQQ	–	пиролохинолин хинон
QRE	–	квазисравнителен електрод
RE	–	сравнителен електрод
WE	–	работен електрод
sADH	–	вторична алкохолдехидрогеназа

1. БИОЛОГИЧНИ РЕДОКС РЕАКЦИИ И ЕНЗИМИ

Биосензорите, включващи реакции на *хетерогенен електронен пренос*, са много широко развита група. От една страна, причината се крие във факта, че те са съвместими както с афинитетни, така и с метаболитни схеми за разпознаване на анализа. От друга страна, измерването на токове е по-стабилно, отколкото измерването на потенциали, тъй като не изисква високоомни уреди, податливи на външни смущения. Освен това трябва да се има предвид и голямата биологична роля на *оксидоредуктазите*, ензимите, катализиращи редокс реакциите, върху които се гради цялата енергетика на клетката и голяма част от останалите биохимични пътища [1-4]. Очевидно този клас доминиращи метаболитни ензими са най-подходящият биокомпонент, който може да бъде куплиран с волтаметрично преобразуване на сигнала. Въпреки че при тях понякога се използва и циклична волтаметрия (CV) или импулсно изменение на потенциала, на практика най-често се среща по-простият *амперометричен* вариант за регистрация на преноса на заряд през повърхността на електрода. С други думи, потенциалът на работния електрод WE е фиксиран спрямо сравнителния RE, а големината на тока служи като индикация за обменения заряд, който от своя страна е функция на концентрацията на анализа [5]. Първото сензорно устройство от този тип с ензима глюкозооксидаза GO (EC 1.1.3.4.), действаща като рецепторен елемент с амперометрично детектиране, е реализирано в началото на 60-те години на XX век благодарение на

усилията на изобретателя на кислородния електрод Л. Кларк мл. [6]. Естествено този електрод е в основата на разработката, чиято конфигурация в общи линии се спазва и до днес.

По принцип в глюкозния сензор, както и в останалите метаболитни (ензимни) сензори, катализираната реакция на интересувания ни анализ може да бъде отчетена по изменението на някой от участващите субстрати, на някой от продуктите или на вещество, електрохимично спрегнато с тях. В най-ранния прототип, докладван от Кларк и Лайънс, се следи например изчерпването на кислорода при тази реакция (фиг. 1).



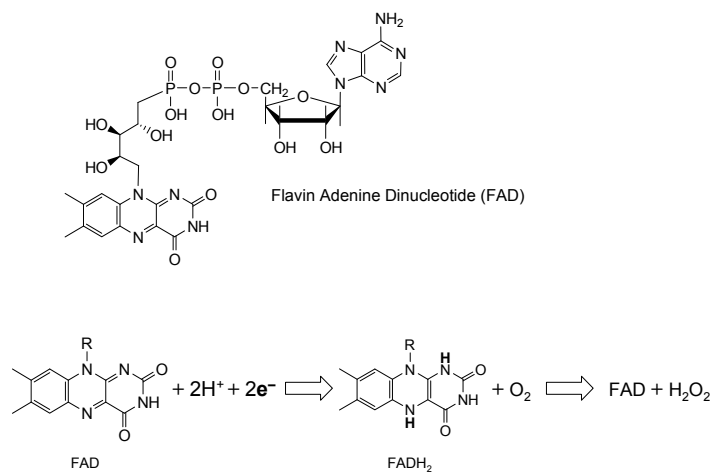
Фиг. 1. Ензимно катализирано окисление на глюкозата. Продуктът от окислението на глюкозата, глюконолактонът, образува във водна среда глюконова киселина

Флавинадениндинуклеотидът (FAD) е често срещан коензим, свързан здраво (понякога ковалентно) като простетична група с апопротеина [3, 4]. Много от оксидоредуктазите са флавопротеини, съдържащи FAD или FMN (флавинмононуклеотид) като активен център. В случая FAD се редуцира от субстрата до $FADH_2$, който на свой ред е реокислен от естествено присъстващия кислород (фиг. 2). Продуктът глюконолактон във водна среда образува глюконова киселина, с която е в равновесие (фиг. 1).

Тъй като обаче при окислението на глюкозата концентрацията $[O_2]$ силно се влияе от екзогенния (“външен”, стехиометрично невлизащ в анализираната реакция) кислород, скоро се възприема да се регистрира $[H_2O_2]$. Това става възможно, като на работния електрод се задават положителни потенциали (около +0,65 V спрямо Ag/AgCl), където пероксида се окислява.

Такава схема, в която се измерва концентрацията на реагентите, обикновено се разглежда като *първо поколение* ензимни амперометрични биосензори. При тях въпреки всичко остава проблемът, че за тези потенциали освен H_2O_2 към сигнала дават принос и други съвместно окисляващи се съединения (като аскорбат, глутатион, пикочна киселина и др.), които често присъстват в анализирания разтвор.

Разбира се, най-добре би било самият редуциран ензим да се реокислява върху електрода, т.е. да става директно прехвърляне на електрони от FADH_2 към WE. За съжаление обаче не само за глюкозооксидазата, но и за мнозинството останали ензими активният център е разположен във “вътрешността” на белтъчната макромолекула и при стандартните процедури за имобилизация няма близък контакт с WE. Поради тези стерични ефекти директният електронен пренос е силно затруднен.



Фиг. 2. Редукция и реокисление на протетичната група FAD на глюкозооксидазата. Активният център FAD на глюкозооксидазата се редуцира от глюкозата, а след това се реокислява от кислорода, присъстващ в разтвора

Във всички случаи е ясно, че независимо от това чия редокс реакция ще бъде регистрирана, се налага да се търсят средства, за да се избегне допълнителното окисление (или редукция) на странични вещества върху работния електрод. В тази насока са предприемани редица стъпки за елиминирането на съпътстващите реакции.

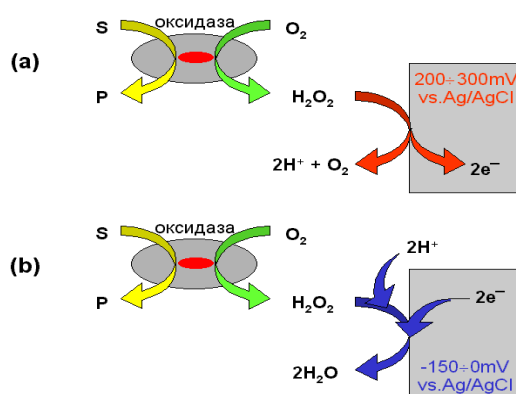
Едно от най-ранните решения е да се контролира достъпът на интерферентите до повърхността на WE. Това се осъществява с помощта на различни полупропускливи покрития. Тяхната селективност се извява по отношение на заряда и размера на химичните видове, които трябва да бъдат

спряни. В лабораторната практика например отдавна са намерили приложение филтърни мембрани, действащи на този принцип. Такива са целулозо-ацетатните (заряд и размер) и поликарбонатните (размер). Покритията от полимери също имат богата традиция. Електроди от проводящи и полупроводящи материали с модифицирана по този начин повърхност се използват не само за аналитични, но и за много други цели.

Очевидно отделянето на електродната повърхност от изследвания разтвор посредством какъвто и да е полупропусклив слой налага ограничения и върху движението на анализа, което води до намаляване на бързодействието и чувствителността. От друга страна обаче, това дава възможност за оптимизиране на сензорните параметри чрез подбор на скорост-лимитиращото стъпало измежду трите процеса (дифузия, ензимен катализ, електрохимично превръщане), оформящи неговия краен отговор. Теоретичният анализ на действието на биосензора показва, че ако преносът през изолиращата мембрана (зависещ от проницаемостта и дебелината ѝ) е най-бавният стадий, то се разширява обхватът от концентрации, в който характеристиката му е линейна и независеща от кинетиките на ензимната и редокс реакцията. Ето защо при достатъчно силен сигнал (ток) има смисъл да се използват по-слабо проницаеми мембрани. Обратно, когато е необходима висока чувствителност, мембраната трябва да притежава по-голяма пропускливост [7].

Като най-съществена мярка за отстраняване на нежелателните редокс реакции трябва да се отбележи стремежът към намаляване на работния потенциал. Имайки предвид стандартните потенциали на по-важните от биохимична гледна точка вещества, за оптимален може да се посочи интервалът приблизително между -200 и 0 mV (спрямо Ag/AgCl). В този диапазон редукцията на O_2 и окислението на аскорбата например са пренебрежими.

Един от начините за постигане на по-нисък потенциал е свързан с използването на катализатори на електрохимичните превръщания на H_2O_2 , които се нанасят върху повърхността на WE. Отдавна е известно, че такава роля играе платината (Pt). Метализирането на електрода се провежда чрез електроотлагане на подходящ химически инертен (благороден) метал. Засега успешни резултати са получени също с паладий (Pd), рутений (Ru) и родий (Rh). Освен намаляване на влиянието на интерферентите допълнителен положителен ефект се явява подобряване на отношението сигнал/шум заради увеличената електрохимично активна площ на електрода. Метализирането се оказва особено ефикасно при въглеродните електроди [8], фиг. 3. Стъкловъглерода (GCE), който нормално не катализира реакциите на H_2O_2 и изисква високи потенциали, след покриване с Pt, Pd, Ru или Rh дава почти линеен отговор до много ниски стойности.



Фиг. 3. Потенциали на окисление (а) и редукция (b) за H_2O_2 след метализиране на въглероден електрод. Дериватизирането на въглеродната повърхност намалява и двата потенциала и увеличава електрохимично активната площ на електрода

В практиката са познати и други вещества, които могат да действат като електрохимични катализатори. Такива са например някои багрила и техните производни, металоорганични съединения и т.н. [9]. При хексацианофератния комплекс “пруско синьо”, $\text{Fe}^{\text{III}}_4[\text{Fe}^{\text{II}}(\text{CN})_6]_3$, дори се наблюдава проява на селективност към H_2O_2 , каквато липсва при металните катализатори [10]. Недостатък в този случай обаче е влошаването на стабилността в алкални ($\text{pH} > 7,5$) разтвори.

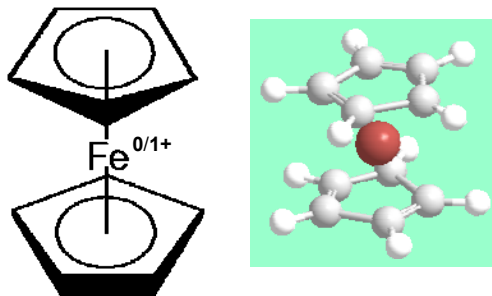
2. МЕДИАТОРИ НА ЕЛЕКТРОНЕН ТРАНСПОРТ. ОФОРМЛЕНИЕ НА РАБОТНИЯ ЕЛЕКТРОД. ПОКОЛЕНИЯ АМПЕРОМЕТРИЧНИ СЕНЗОРИ

Въвеждането на електронни посредници – *медиатори*, в процеса на детектирането също има пряко отношение към намаляване на потенциала.

Това са сравнително нискомолекулни електрохимически активни съединения, които са в състояние да прехвърлят електрони между редокс центъра на ензима и повърхността на WE, като по този начин улесняват техния контакт. Електронният пренос се осъществява чрез промяна в редокс състоянието на медиатора. Това направление в развитието на амперометричните биосензори се оказва едно от най-плодотворните и доведе до появата на т. нар. *второ поколение* сензори. Понастоящем повечето от търговските образци, намиращи място в клиничния анализ, са именно от този тип.

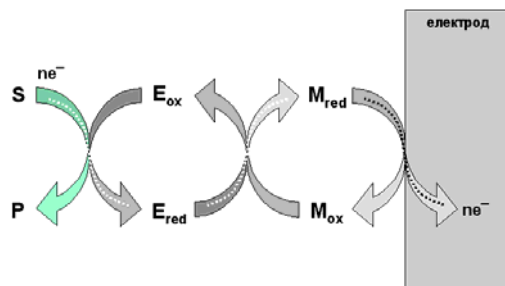
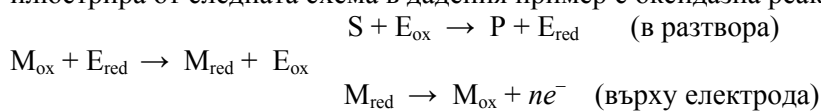
Медиаторите са хетерогенна химична група, в която се срещат съединения с най-разнообразни структури и свойства (фиг. 4). Те се

характеризират с голям разброс в стандартните потенциали, което позволява подходящо куплиране с ензима.



Фиг. 4. Фероценът и неговите производни са често използвани медиатори на хетерогенен електронен пренос. Преносът на електрони става за сметка на промяна в редокс състоянието на желязото, заловено с координационни връзки между две пентадиенилни групи

Ясно е, че медиаторите служат за регенерация на изчерпаната редокс форма на биологичния компонент в рецепторната част, като обменят с него електрони, след което на свой ред търпят електрохимично преобразуване върху повърхността на индикаторния електрод. Действието им (фиг. 5) се илюстрира от следната схема в дадения пример с оксидазна реакция:



Фиг. 5. Реокисление на ензима (оксидаза) чрез медиатор. Възстановеният от субстрата ензим се окислява от медиатора, който на свой ред се окислява от електрода

Най-общо веществата, играещи ролята на медиатори, трябва да отговарят на няколко изисквания.

1. Да реагират бързо с ензима. За тази цел е необходимо и стехиометрията, и относителните редокс потенциали да подпомагат електронния пренос. Важно е също така активният център да е достъпен за медиатора.

2. Хетерогенните им реакции да бъдат обратими, да протичат при сравнително ниски потенциали и да не зависят от рН.

3. Да са стабилни и в двете си форми M_{red} и M_{ox} и да не се окисляват от кислорода O_2 .

4. За някои изследвания е желателно да са нетоксични.

При условие, че M_{red} не реагира с кислорода, резултатите от измерването няма да зависят от неговото парциално налягане pO_2 в средата. Детектирането се извършва при потенциали, характерни за стандартния потенциал на медиатора, който обикновено е по-нисък от този на ензима, което отчасти елиминира страничните реакции. Освен това, ако при окислението на медиатора не участват протони, то сензорът не се влияе и от промените в рН.

Въпреки многообразието от съединения, които биха могли да изпълняват функцията на електронни посредници, в биоелектрохимията намират място главно пренасящите един или два електрона e^- (под формата на хидрид йон $:H^-$, т.е. $2e^-$ плюс H^+ , или на водородни атоми, т.е. $2e^-$ плюс $2H^+$). И двата вида имат своите предимства и недостатъци. При едоелектронните стандартният потенциал не се влияе от рН и не се образуват междинни радикали, тъй като редокс реакцията протича на един етап, в който не участват протони. За сметка на това обаче те реагират по-трудно с някои ензими и имат ниски скорости на електронен обмен с NAD(P)H. Другият тип медиатори показват обратното поведение. При тях възникването на междинни, силно активни химични видове създава сериозни затруднения и прави редокс реакциите нестабилни.

Очевидно основният момент в осъществяването на опосредстван електронен пренос е да се осигури колкото се може по-близък контакт между медиатора, ензима и работния електрод WE на молекулно ниво. В най-простия случай медиаторът е разположен свободно сред ензимните макромолекули и прехвърлянето на заряда става чрез дифузията му в разтвора между тях и повърхността на WE. Възможност за намаляване на дифузионните проблеми дава оформянето на активната матрица във вид на хомогенат с графитна паста, която играе ролята на свързваща проводяща среда.

Както бе дискутирано в [29] обаче, тези “обемни” решения страдат от редица недостатъци. Друг вариант е медиаторът да бъде нанесен като фино покритие върху повърхността на WE. Такива модифицирани електроди могат

да бъдат получени с различни процедури като адсорбция, електроотлагане, ковалентно свързване и т.н. [11]. Разбира се, те също не са идеални. Имобилизираният чрез адсорбция медиатор не е стабилно закрепен и електродите бързо губят качествата си. Ковалентните техники пък изискват сложна предварителна подготовка на повърхността или преносителя. Въпреки това тези методи продължават да са обект на активно изследване.

Като пример ще посочим един опит да бъдат подобрени характеристиките на медиаторния сензор посредством прилагането на нова конфигурация от ковалентни връзки [12]. Авторите Б. Хаслер и др. (Michigan State University, MSU, E. Lansing, MI, USA) предлагат вместо традиционната “линейна” конфигурация една разклонена структура на свързване между кофактора на ензима, медиатора и WE (в случая Au). Обикновено медиаторът трябва да има две специфични места за свързване, което силно ограничава класа от подходящи съединения. Прикачването на медиатора и кофактора към общо звено, заловено за електрода (фиг. 6), позволява да се разширят чувствително възможностите в тази насока.

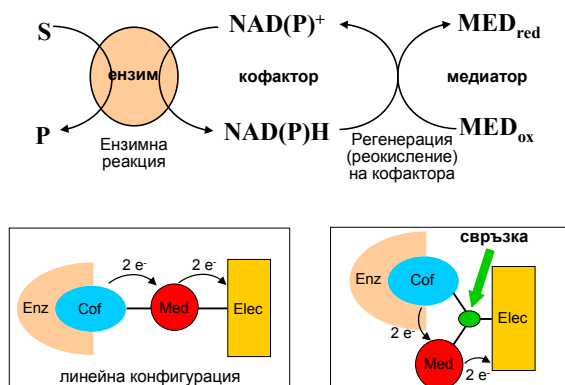
В докладваната работа, като общ трифункционален агент за връзка е използвана аминокиселината цистеин Cys. Цистеинът образува ковалентни връзки с медиатора (ТВО) и кофактора (NAD⁺), респективно чрез аминокиселинната група и карбоксилната си група (с добавена фенилборна киселина PhB(OH)₂). Допълнително страничната тиолна група –SH му позволява да се прикрепи към повърхността на WE за сметка на добре известните координационни взаимодействия между сярата S и златото Au.

При това положение с ензима вторична алкохолдеhidрогеназа (sADH), катализираща окислението на изопропанол до ацетон, В. Hassler et al. получават много добра линейна зависимост на тока през сензора от концентрацията на анализа. Регистрацията е направена с циклична волтаметрия CV, като за индикация служи пиковият ток.

По-горе бе споменато голямото разнообразие от полимерни покрития, с които се модифицират работните електроди за най-различни цели. Естествено, правени са опити такива покрития да бъдат използвани като проводяща среда на молекулно ниво и за нуждите на амперометричните устройства. Образувайки тънки слоеве от линейни молекули, играещи ролята на своеобразни проводници, те подобряват прехвърлянето на електрони между ензима и WE.

Тук ще цитираме работата на Ръслинг и негови сътрудници [13], в която върху графитен електрод са нанасяни последователно свръхфини слоеве от проводящ полимер, редуващи се с ензим – пероксидаза от хрян, HRP (фиг. 7). По този начин могат да бъдат изградени многослойни покрития от полимерни нишки, “оплитащи” ензимните макромолекули, образувайки стабилна детектираща матрица. Резултатите от измерванията с така получените пероксидазни филми недвусмислено доказват, че те са в

състояние ефективно да катализират редукцията на водороден пероксид H_2O_2 , а полимерното “опроводяване” значително улеснява хетерогенния електронен пренос.



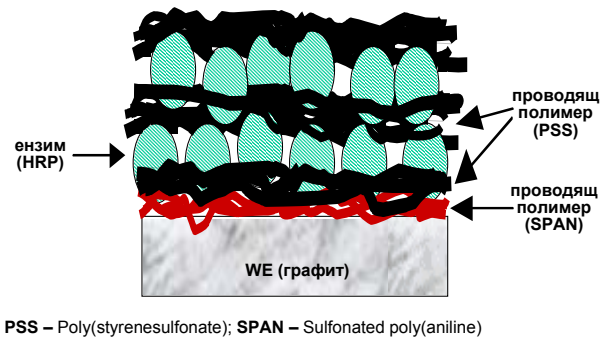
Фиг. 6. Медиаторен сензор с дехидрогеназа и разклонена ковалентна структура на свързване с работния електрод. Предимствата на тази схема са по-широк кръг от медиатори и по-близко разположение до WE

Този тип полимерни медиатори, наричани понякога редокс жици (редокс проводници), също могат да бъдат едно- или двуелектронни преносители, което се определя от страничната електроактивна група, с която е модифициран полимерът. Показаният полимер на фиг. 8 например прехвърля един електрон от ензима към WE за сметка на промяната в степените на окисление на метала (Os) комплекс-образувател при сравнително нисък потенциал $E'^{\circ} \approx + 100 \text{ mV}$ (спрямо Ag/AgCl).

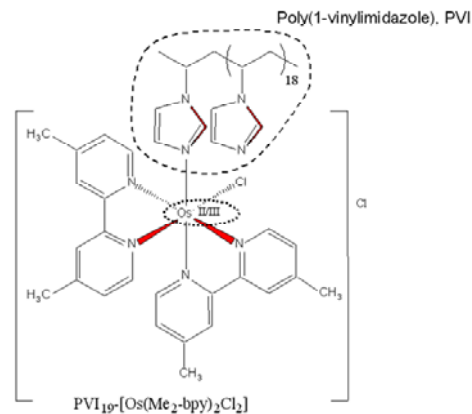
Интерес представлява въпросът какъв тип редокс белтъци са най-пригодни за куплиране с медиаторите. Оксидоредуктазите, както казахме, са много голям клас ензими от първостепенно значение за конструирането на електрохимични сензори по простата причина, че основната им функция е да катализират различни окислително-възстановителни реакции. Вече бе изтъкната тяхната главна роля за редица биохимични процеси в организма. Този клас (номер 1 съгласно ензимната номенклатура на IUPAC) включва няколко широки групи, чиито представители отдавна привличат вниманието на специалистите, занимаващи се с биосензорни разработки. Тук ще се спрем на една малка част от тях като илюстрация на взаимодействията с медиаторите.

Оксидази (респ. оксигенази), са ензимите, участващи в преноса на заряд в комбинация с кислород O_2 като акцептор на e^- , който се внедрява ковалентно в крайния продукт. Такава е дискутираната по-горе

глюкозооксидаза (EC 1.1.3.4.), окисляваща глюкозата до глюконолактон и водороден пероксид H_2O_2 .



Фиг. 7. Схема на ензимен електрод с проводящ полимер. Технологиата на редуващи се слоеве от ензим и проводящ полимер позволява по-ефективно куплиране с WE

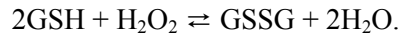


Фиг. 8. Едноелектронен редокс полимер, чиито проводящи свойства се дължат на метала с преходна валентност $Os^{II/III}$

Пероксидазите са важни ензими, имащи задачата да обезвреждат силно активните радикални съединения, възникващи естествено в хода на някои метаболитни превръщания или под въздействие на външни фактори (токсични вещества, радиация и т.н.). Като донори на електрони (под формата на водородни атоми, т.е. $2e^-$ плюс $2H^+$) обикновено служат силни редутори

от рода на аскорбиновата киселина, глутатиона и др. Например глутатион пероксидазата катализира превръщането на H_2O_2 във H_2O . Тя е забележителна с това, че съдържа рядката аминокиселина селеноцистеин (със селенов атом – Se, вместо сяра).

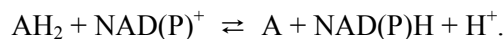
Глутатион пероксидазата катализира реакцията:



Редуцираната форма на глутатиона GSH представлява трипептид, състоящ се от аминокиселините глутамат Glu (образуващ пептидна връзка посредством γ вместо α -карбоксилната си група), цистеин Cys и глицин Gly, а в окислената GSSG две молекули са свързани с дисулфиден мост.

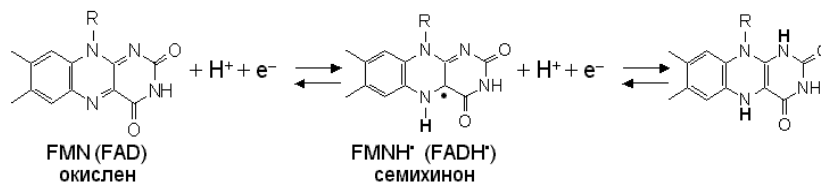
Пероксидазите могат да съдържат освен главния си коензим (най-често хем) също и други кофактори като метални йони (Ca^{2+} , $\text{Fe}^{2+/3+}$), които участват в преноса на електроните.

Дехидрогеназите са окислителни ензими, прехвърлящи електрони и протони (т.е. водородни атоми) подобно на оксидазите, но без вграждане на кислород. Те са едни от най-многобройните. Известни са над 200 от тях с NAD(P)^+ като акцептор, т.нар. *NAD(P)-зависими дехидрогенази*:



При тези ензими кофакторът NAD(P) е свързан слабо с апопротеина и може да дифундира от един ензим към друг, играейки ролята на водоразтворим преносител на електрони. Той се помещава в една специфична белтъчна структура, наричана нагъване на Росман (Rossmann fold, PDB ID 3LDH), представляваща нещо като “пазва”, в която NAD се сгъшва (напр. при лактатдехидрогеназата, LDH, EC 1.1.1.27).

Флавиновите дехидрогенази (както и много други оксидоредуктази) използват флавинмононуклеотид (FMN) или флавинадениндинуклеотид (FAD) като коензими. Тяхната редокс реакция протича на два етапа:



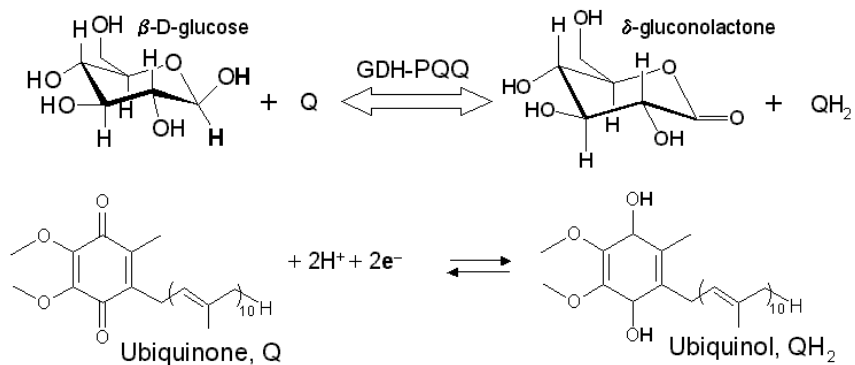
Когато окислената форма FMN (FAD) приеме един e^- плюс H^+ , тя се превръща в семихинон, който е свободен радикал (притежава електрон с несдвоен спин) и се означава като FMNH• (FADH•). Напълно редуцираният

флавин FMNH₂ (FADH₂) се получава с приемане на еквивалент от два водородни атома. Тъй като флавопротеините могат да участват в реакции на едно- или двуелектронно прехвърляне, то очевидно те ще бъдат ангажирани в доста по-широк кръг от редокс процеси за разлика от NAD(P)-зависимите дехидрогенази.

Флавиновият нуклеотид по принцип е свързан доста здраво (в някои случаи ковалентно) с апопротеина и не може да се отдели от него. Този тип коензими пренасят електроните не чрез дифузия, а по-скоро катализирайки прехвърлянето им от някакъв редуциран субстрат към акцептор, което става в реакционния център. Тяхна характерна черта е зависимостта на стандартния потенциал E° от конкретния флавопротеин, към който са прикачени, често твърде различен от този на свободния нуклеотид в разтвор. За сукцинат дехидрогеназата например E° е близък до 0,0 V, в сравнение с $-0,219$ V за свободния FAD. Флавиновите ензими са сложно устроени протеини. Те обикновено са съставени от няколко субединици, съдържащи различни кофактори, или са неразривна част от огромни мултиензимни комплекси, както е пируватдехидрогеназният (с над 100 субединици, ~ 50 nm в диаметър).

PQQ-зависими дехидрогенази. През 60-те години на XX век е открит нов клас дехидрогенази, съдържащи непознат до момента кофактор. Неговата структура е установена по-късно и му е дадено работното наименование *пиролахинолин хинон* (pyrroloquinoline-quinone, PQQ), а за ензимите, които го използват, е възприето названието *хинопротеини* [14, 15]. При някои ензими PQQ-кофакторът е свързан ковалентно, докато при други се задържа от нековалентни взаимодействия, но във всички случаи е прикрепен по-здраво от NAD(P) и остава в областта на активния център.

Глюкозодехидрогеназата GDH-PQQ (EC 1.1.5.2) е например такъв ензим, катализиращ окислението на глюкозата с убихинона като акцептор:



Връщайки се към въпроса за ефективността на взаимодействието между редокс белтъците и медиаторите, би могло да се каже, че поради редица съображения NAD(P)-зависимите дехидрогенази се разглеждат като не особено подходящи за целта. Основните причини за това мнение са: 1) както NAD(P)⁺, така и NAD(P)H демонстрират силна електрохимична необратимост (редокс реакциите, в които участват, не са от нернстов тип); 2) ензимът е зависим от разтворим кофактор; 3) за повечето субстрати равновесието на реакцията е отместено наляво към субстрата, а не към продукта (т.е. NAD⁺ има ниска окислителна сила, $E'^{\circ} = -560 \text{ mV vs. SCE}$ при pH7).

Изследванията показват, че дехидрогеназите със сравнително здраво свързан кофактор, който не напуска апопротеина, се изявяват като по-ефективни в реакцията с медиатора [16]. Това обстоятелство подбуди интерес към използване на генното инженерство за "прекрояване" на белтъчната структура и производство на ензими с отнапред зададени свойства. Напоследък в тази насока са постигнати успехи с GDH-PQQ [17]. Нещо повече, оказва се, че така конституираните ензими притежават различна селективност и различен рН-интервал на максимална активност, което позволява да се търсят пътища за получаването на оптимален вариант.

От направените дотук разглеждания се вижда, че главният проблем в реализацията на амперометричните биосензори е преносът на заряд между електроактивния център на белтъците и работния електрод WE. В това отношение редокс ензимите могат, грубо казано, да бъдат разделени на два класа [18]. При едните реакцията със субстрата протича в строго дефинирана област от тримерната структура на белтъка, обикновено локализирана във вътрешността на глобулата. Тяхната функционална определеност не изисква необходимост от придвижване на e^- към повърхността на протеиновата макромолекула. Ето защо куплирането им с WE налага някои ограничения, като например: местата за каталитиза да бъдат разположени в близост до повърхността, молекулата да е достатъчно гъвкава без загуба на активност или да позволява модификации, чрез които да се подобри проводимостта ѝ.

Другият тип обикновено са белтъци, служещи като звена от вериги за електронен транспорт. По силата на нормалното си предназначение те притежават естествено вградени пътища за пренос на e^- към външната част на молекулата, където става свързването със съседни компоненти от веригата. Тези редокс ензими могат да участват в електрохимични реакции с директно прехвърляне на e^- (DET) от активния център към електрода, ако бъдат подходящо ориентирани върху повърхността му. Така се заговори за *трето поколение* амперометрични биосензори. Засега такива възможности са регистрирани за някои ензими, съдържащи Fe-S кластери, Cu или хем. Няколко примера са дадени в табл. 1.

Таблица 1. Редокс ензими с директен пренос на електрони (DET)

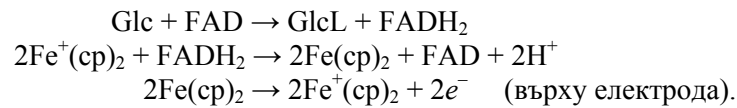
Ензим	Кофактор	Субстрат	Реакция
Аскорбат оксидаза	4Cu	O ₂	редукция
Супероксид дисмутаза	Cu - Zn	O ₂ [•]	редукция
Пероксидаза	хем	H ₂ O ₂	редукция
Целобиозодехидрогеназа	FAD - хем	целобиоза	окисление
D-фруктозодехидрогеназа	PQQ - хем	фруктоза	окисление
Сукцинат дехидрогеназа	FAD, Fe-S	сукцинат	окисление
D-глюконат дехидрогеназа	FAD, хем, Fe-S	D-глюконат	окисление

В таблицата е показан преносът на електрони и отчитането на реакцията на редокс ензима с анализа при трите поколения биосензори. В първото поколение се регистрират субстратите или продуктите на ензимната реакция. При второто поколение се отчита редокс реакцията на медиатора. Третото поколение биосензори разчита на директен електронен пренос между ензима и WE.

3. ПРИЛОЖЕНИЕ НА АМПЕРОМЕТРИЧНИТЕ БИОСЕНЗОРИ. ГЛЮКОМЕТРИ

Амперометричният глюкозен сензор в момента е един от най-разпространените. Недостатъците, свързани с измерване на концентрацията на реагентите (първо поколение), бяха преодоляни посредством окисляване на глюкозооксидазата GO от медиатори вместо от кислорода. Първите успешно работещи образци са реализирани с фероцен Fe(cp)₂ (фиг. 4) и негови производни, получени с добавяне на различни заместители в някой от пръстените. В окислената си форма тези съединения са доста ефективни електронни акцептори за FADH₂ (редуцирания флавин) в разтвор. На работния електрод те се реокисляват при няколко високи положителни

потенциали от порядъка на 100–200 mV, при което се генерира фероцениев йон $\text{Fe}^+(\text{cp})_2$. Общата схема може да се представи с поредицата от реакции:

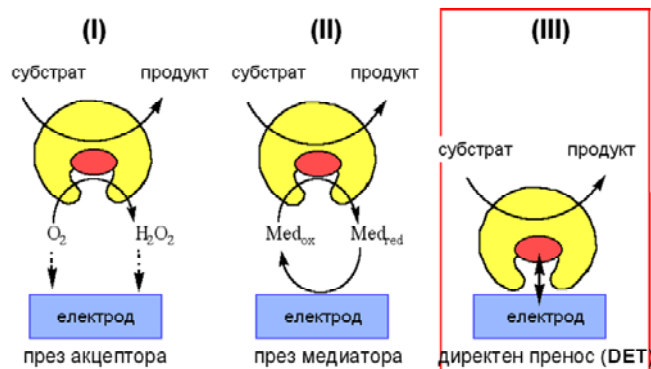


При това положение редуцираното състояние на ензима се поддържа от присъствието на глюкоза Glc, а скоростта на образуване на редуцираната форма на медиатора се измерва амперометрично при реокислението му върху WE. Тази скорост обаче е равна на скоростта на изчерпване на Glc, така че в крайна сметка токът през работния електрод е пропорционален на нейната концентрация. Фероценензимният електрод притежава линеен отговор по ток за концентрации на глюкоза в диапазона 1–30 mM, който е типичен при анализа на кръв от диабетно болни. Той е относително нечувствителен към други електроактивни вещества в изследваната среда поради ниското напрежение на индикаторния електрод, необходимо за протичане на фероценовата редокс реакция. Тъй като в тази реакция не се ангажира пренос на протони, методът не зависи и от pH на разтвора.

Глюкозният биосензор, както казахме, засега е най-разработеният и най-популярният, което е следствие от изискванията на клиничната практика. Неговата важност произтича от необходимостта за перманентно наблюдение на пациентите, страдащи от диабет, а също и от ред други заболявания, за които съдържанието на глюкоза в телесните течности представлява ценна диагностична информация. Получаването на такава информация *in situ* (на място) допринася много за определянето на бърз и ефикасен курс на лечение. Във връзка с това десетки фирми предлагат разнообразни конструктивни решения, включително и портативни измерителни уреди, които се използват в домашни условия от неспециалисти (фиг. 10). Естествено, подробностите в техния дизайн са секрет на производителя, но общо взето всички се базират на разглежданите тук принципи на регистрация. Прилагането на сменяеми детектиращи елементи в тях се оказва удачна алтернатива, спомагаща за решаване на проблема с дълготрайността и стабилността на сензора. Това е от особен интерес при изследване на цялостни (с неразделени съставки) биологични флуиди, в които винаги присъстват различни белтъчни компоненти, активно адсорбиращи се върху електродите и увреждащи реакцията им.

Самият сензорен елемент е оформен във вид на лентичка (най-често пластмасова), върху която са монтирани два електрода – работен WE и сравнителен RE. Работният съдържа ензима и медиатора, поместени в проводяща среда (обикновено графитова паста), докато RE е традиционният

Ag/AgCl. Електродите са покрити с предпазна мрежичка, под която благодарение на капиларен ефект се задържа изследваният флуид (фиг. 11).

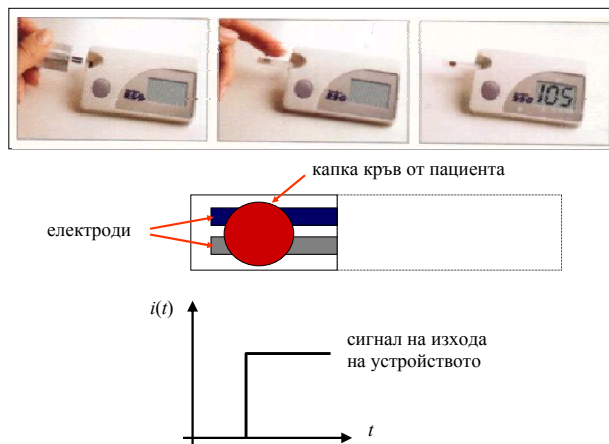


Фиг. 10. Общ вид на преносим амперометричен глюкометър и детектиращи елементи (лентички) за еднократна употреба. Миниатюризацията на интегралните чипове и сравнително простите електронни схеми за регистриране на електрохимичния сигнал позволяват да се разработват устройства с много малки габарити, които могат да се ползват и от пациенти неспециалисти

В едно проведено от нас изследване направихме опит да установим някои от по-важните електрохимични характеристики на детектиращите елементи за еднократна употреба от новите поколения портативни глюкометри. Макар това предварително проучване да не може да претендира за пълнота (поради недостатъчната статистика), получените резултати все пак позволяват да се поставят някои дискуссионни въпроси относно определянето на кръвната захар при диабетно болни с този вид уреди.

Доколкото електрохимичното преобразуване на сигнала се извършва със сравнително прости електронни схеми, не би трябвало да има съмнения по отношение на измерителното устройство. От него се изисква да подава някакво постоянно напрежение на електродите и да регистрира тока през тях, една задача, която е прекалено елементарна за съвременната електроника. Въпреки това като пропуск може да се посочи липсата на възможност за редовно калибриране на уреда. В упътването на глюкометъра Accu-Chek® например е описана процедура за проверка на показанията, която не може да се нарече калибриране в истинския смисъл на думата. За целта се използват два стандартни разтвора с различна глюкозна концентрация в очаквания диапазон от 0,5 до 20g/l. Ако отчетената стойност е в рамките на предвидения

толеранс, уредът дава индикация, че е годен за работа. Не е указано обаче колко е допустимата грешка.



Фиг. 11. Принципно устройство на еднократен детектиращ елемент. Показаният тук е “класически тип”, съдържащ сравнителен и работен електрод

От друга страна, трябва да се обърне внимание на прецизността на самите *датчици* (лентичките). Първо, в по-новите модели прави впечатление намаленият размер на двата електрода. Освен това съществено се различава и самото им оформление. Второ, ясно е, че методът за имобилизация на ензима (и евентуално медиатора) са други – те не са нанесени както при старите, във вид на паста с хомогенна консистенция върху работния електрод WE. Трето, съвсем очевидно е, че количеството използван ензим е по-малко. Макар всички тези нововъдения да правят лентичките по-компактни, по-удобни за манипулиране и да снижават тяхната себестойност, те биха могли да бъдат и причина за по-голям разброс в параметрите им, водещ до неточност в измерванията. Действително, нашите данни показват, че работният интервал на лентичките не е много широк и грешката е по-висока за малките концентрации. Като цяло стойностите са занижени, което е предпоставка за фалшиви индикации на хипогликемия, един факт в съзвучие с резултатите от други доста по-акуратни тестове [19].

Конструкцията на изследваните лентички (Accu-Chek[®] Sensor Comfort Test Strip) се оказва много по-опростена от старите варианти, макар методът на регистрация да е същият. Детекторът се състои от два еднакви тънкослойни метални електрода (1,5×3,0 mm), разположени в празното пространство, което се образува между подложката и ламиниращото покритие. По всичко личи, че не е използван някакъв специален метод за

имобилизация на ензима (и медиатора). Разтвореният ензим просто се накапва в отвора и лентичката се оставя да изсъхне. При това положение ензимът се адсорбира и върху двата електрода. Когато се добави тестваният флуид, ролята на работен електрод WE ще играе този, на който е подаден положителен потенциал спрямо другия, който от своя страна ще изпълнява функцията на квази-сравнителен (quasi-reference electrode, QRE). Така положителният потенциал позволява протичането на аноден (окислителен) ток през WE. Естествено ензимът много бързо се отмива след накапването на изследвания разтвор и поради това лентичката е пригодна за измерване в рамките до 15 s (според упътването). Веднага след това тя става неизползваема (явно, че толкова трае и самото измерване, което се отброява от кодовия ключ; след 50 измервания уредът изисква нов код).

В крайна сметка скромният ни опит в работата с преносимите глюкометри ни дава мотивация да се придържаме към по-широко разпространеното мнение, че на тези уреди трябва да се гледа като на спомагателни устройства, допълващи картината за състоянието на пациента [20]. Въпреки че могат да служат като ориентировъчни индикатори, те все още не са в състояние да дадат категорично предложение относно спешни терапевтични мерки. Впрочем такова гледище не се оспорва и от самите фирми производителки.

4. ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Накрая е редно да се кажат няколко думи (макар и от лична гледна точка) за бъдещото развитие на това направление. По принцип възможностите за усъвършенстване на амперометричните биосензори, както впрочем и на всички останали видове сензори, могат да се търсят в две насоки: 1) подобрене в параметрите на детектиращата (рецепторна) част на базата на нови принципи за регистрация на анализите и/или нови конструктивни решения; и 2) повишаване на прецизността на преобразувателния елемент (трансдюсера).

Що се отнася до първата възможност, уверено може да се твърди, че тук ситуацията се развива почти взривообразно. Стотици статии всяка година описват най-различни рецепторни модификации. Положението е разбираемо, като се вземе предвид бумът в приложните области на физиката, химията и биологията, водещ до непрекъснатата поява на нови материали и технологии. Да се направи цялостен подробен обзор по тази линия в една статия е немислимо. Такова разглеждане би могло да бъде предмет за сборник, написан от голям научен колектив.

Въпреки това могат да се набележат някои тенденции. Като най-важна от тях считам не толкова използването на нови материали, колкото промените в

структурата на рецепторната част. Имам предвид *интегрирането* на биосензорите. В последно време, разбира се пак на базата на CMOS технологиите от твърдотелната микроелектроника, стана възможно в детектора да се съвместят повече от един сензорен елемент. Например в допълнение към глюкозния могат да се добавят сензори за рН, рО₂, рСО₂, К⁺, Na⁺ и т.н. Перманентното снижение на себестойността на специализираните микрочипове позволява дори изпълнение във вид на елементи за еднократна употреба. Нещо повече, на пазара вече се появиха такива комбинирани портативни глюкометри. Тема за друг разговор е доколко те са необходими, тъй като данните за рН, оксигенацията на кръвта (рО₂) или калемията (съдържанието на калий) едва ли могат да бъдат осмислени от пациенти неспециалисти.

Естествено, приложението на нови твърдотелни материали също заслужава голямо внимание. Техен основен източник са модерните нанотехнологии, които разкриха цял един нов свят от свойства на аморфните и кристалните твърди тела с намаляване на размерите им под 1µm. По отношение на сензорите трябва да се споменат преди всичко разнообразните форми на въглерода, използвани за направа на WE. Една от тях, аморфния стъкловъглерод GC, бе разгледана по-горе в текста. От няколко години насам обаче голям напредък бе отбелязан в получаването на тънкослойни въглеродни материали, в чиято кристална структура могат да бъдат вграждани и други елементи. Като типичен пример ще посочим бор-легираните поликристални покрития (т.нар. Boron-Doped Diamond, BDD) с размер на зърната, вариращ от няколко µm до под 100 nm. Ангажирането им в електроаналитичната техника разкри някои техни безспорни предимства пред GC електродите [21-23]. Благодарение на лесното дериватизиране на тези повърхностни слоеве, приложението им за конструиране на амперометрични биосензори също звучи обещаващо [24], дори в някои случаи се твърди, че се постига директен електронен пренос [25].

Във връзка с използването на нови (все по-екзотични) материали за имобилизация на рецепторния биоматериал, бих искал отново да наблегна на един основен въпрос в разработването на детекторната част. Очевиден е стремежът на много изследователи да намерят такъв субстрат (подложка), който да отговаря най-добре на изискванията за биосъвместимост и стабилност. За съжаление обаче здравето свързване със субстрата и чувствителността се оказват противоречиви. На тези проблеми се спряхме малко по-подробно в първата част на обзора [29]. Продължавам да поддържам становището, че рецепторните макромолекули в детектора трябва да бъдат организирани по начин, колкото се може по-близък до естествения дизайн. С други думи, трябва да се изграждат биомиметични системи, имитиращи природните не само в структурно, но и във функционално отношение. Подобие то да бъде разглеждано не просто като статична молекулно-

архитектурна аналогия, а и като динамика на компонентите, от която се определя функционалната специфичност и биологичната роля. Като най-близки до природните сензорни системи се сочат различни аналози на биологичните мембрани, модифицирани със съответните биомакромолекулни рецептори. Някои от тях изглеждат особено подходящи за куплиране с електрохимично преобразуване на сигнала [12, 26-28]. От друга страна, не бива да забравяме, че нанотехнологиите все още не са слезли до пространствените мащаби на субклетъчните молекулни ансамбли. Достатъчно е да обърнем поглед освен към биомембраните и към още едни такива супрамолекулни образувания – компонентите на цитоскелета [1-4]. И в двата случая взаимодействията са съсредоточени в области с размери от порядъка на не повече от стотици ангстрьоми, т.е. на порядък по-малки от скалата на нанотехнологиите. Освен това тези уникални структури могат да бъдат интересни за целите на биосензорния дизайн с тяхната вътрешно присъща способност за самоорганизация.

Обръщайки се към усъвършенстването на преобразувателния елемент, оказва се (колкото и да е странно), че границите на възможностите на конвенционалната електроника все още не са достигнати. Има какво още да се желае за подобряване на отношението сигнал/шум например. В тази насока съществуват някои хипотези и нови идеи за изнасяне на предварителното усиление на сигнала в самия сменяем детекторен елемент. На тях обаче можем да се спрем само след щателна експериментална проверка. Засега ще се задоволим с това, което предлагат реномираните фирми производителки.

ЛИТЕРАТУРА

- [1] Албертс, Б., Д. Брей, Дж. Льюис, М. Рэфф, К. Робертс, Дж. Уотсон. Молекулярная биология клетки. 5 т. Москва, 1986.
- [2] Ангелов, А., Е. Гачев, К. Данчева, А. Кършовас, Т. Николов, Л. Сираков. Биохимия. София, 1995.
- [3] Mathews, C.K., K.E. van Holde, K.-G. Ahern. Biochemistry. 3rd ed. San Francisco, 2000.
- [4] Nelson, D.L., M.M. Cox, Lehninger Principles of Biochemistry. 4th ed. New York, 2005.
- [5] Bard A.J., L.R. Faulkner. Electrochemical Methods: Fundamentals and Applications. 2nd ed. New York, 2001.
- [6] Clark L.C.Jr., C. Lyons. *Ann. NY Ac. Sci.*, 1962, **102**, 29.
- [7] Turner, A.P.F. Biosensors: fundamentals and applications. New York, 1987.
- [8] O'Connell, P.J., C.K. O'Sullivan, G.G. Guilbault. *Anal. Chim. Acta*, 1998, **373**, 2-3, 261.
- [9] deMattos, I.L., L. Gorton. *Quimica Nova*, 2001, **24**, 2, 200.
- [10] Karyakin, A.A. *Electroanalysis*, 2001, **13**, 10, 813.
- [11] Murray, R.W. (ed.) Molecular Design of Electrode Surfaces, New York, 1992.
- [12] Hassler, B., R. Mark Worden, A. Mason, P. Kim, N. Kohli, J.G. Zeikus, M. Laivenieks, R. Ofoli, 2004, 3rd IEEE Conference on Sensors, Vienna, Austria, Oct. 24-27,

- [13] Xin Yu, G.A. Sotzing, F. Papadimitrakopoulos, J.F. Rusling. *Anal. Chem.*, 2003, **75**, 4565.
- [14] Duine, J.A., J. Frank, J. Westerling. *Biochim. Biophys. Acta*, 1978, **524**, 277.
- [15] Salisbury, S.A., H.S. Forrest, W.B.T. Cruse, O. Kennard. *Nature*, 1979, **280**, 843.
- [16] Ye, L., M. Hämmerle, A.J.J. Olsthoorn, W. Schuhmann, H.-L. Schmidt, J.A. Duine, A. Heller. *Anal. Chem.*, 1993, **65**, 238.
- [17] Yoshida, H., N. Araki, A. Tomisaka, K. Sode. *Enzyme Microb. Technol.*, 2002, **30**, 3, 312.
- [18] Guo, L.-H., H.A.O. Hill. *Adv. Inorg. Chem.*, 1991, **36**, 341.
- [19] Jungheim, K., K. J. Wientjes, L. Heinemann, V. Lodwig, T. Koschinsky, A.J. Schoonen. *Diabetes Care*, 2001, **24**, 1696.
- [20] Metzger, M., G. Leibowitz, J. Wainstein, B. Glaser, I. Raz. *Diabetes Care*, 2002, **25**, 1185.
- [21] Compton, R.G., J.S. Foord, F. Marken. *Electroanalysis*, 2003, **15**, 1349.
- [22] Ivandini, T.A., R. Sato, Y. Makide, A. Fujishima, Y. Einaga. *Diamond Relat.Mater.*, 2004, **13**, 2003.
- [23] Panizza, M., G. Cerisola. *Electrochim. Acta*, 2005, **51**, 191.
- [24] Notsu, H., T. Tatsuma, A. Fujishima. *J. Electroanal. Chem.*, 2002, **523**, 86.
- [25] Marken, F., C.A. Paddon, D. Asogan. *Electrochem. Commun.*, 2000, **4**, 62.
- [26] Knoll, W., C.W. Frank, C. Heibel, R. Naumann, A. Offenhäusser, J. Ruhe, E.K. Schmidt, W.W.Shen, A. Sinner. *Rev. Mol. Biotechnol.*, 2000, **74**, 3, 137.
- [27] Fabianowski, W., L.C. Coyle, B.A. Weber, R.D. Granata, D.G. Castner, A. Sadownik, S.L. Regen. *Langmuir*, 1989, **5**, 35.
- [28] Kochev, V., M. Karabaliev. *Adv. Coll. Interf. Sci.*, 2004, **107**, 1, 9.
- [29] Кочев, В. *Годишник на СУ, Физ.фак.*, 2009, **102**, 5.