

ХИМИКОТЕХНОЛОГИЧЕН И МЕТАЛУРГИЧЕН УНИВЕРСИТЕТ

Факултет по химично и системно инженерство

Катедра „Биотехнология“

Инж. Нурелхода Медхат Махмуд Абас

А В Т О Р Е Ф Е Р А Т

на дисертация

**Оптичен биосензор с мултиензимни системи, имобилизирани върху
хибридни мембрани, за определяне на инхибитори на
ацетилхолинестеразата**

за придобиване на образователната и научна степен доктор

по научна специалност

**01.05.10 “Биоорганична химия, химия на природните и физиологично активните
вещества”**

Научен ръководител: проф. д-р инж. Любов Йотова

Научно жури:

- 1. доц.д-р инж. Силиян Чаушев**
- 2. проф.дбн Диана Петкова**
- 3. доц.д-р Иванка Стойнева**
- 4. доц.д-р Цветан Велинов**
- 5. проф.д-р инж. Любов Йотова**

София, 2012

Дисертационният труд е обсъден и насочен за защита на разширен катедрен съвет на катедра „Биотехнология” при Химикотехнологичен и металургичен университет-София.

Дисертационния труд е изложен на 141 страници, включва 54 фигури и 24 таблици. Използвани са 195 литературни източника.

Защитата на дисертационния труд ще се състои наг. от.....ч. в зала.....на сграда..... на Химикотехнологичния и металургичен университет-София, на заседание на Специализиран научен съвет по

Материалите по защитата са на разположение на интересуващите се в Научния отдел на Химикотехнологичния и металургичен университет-София, бул.”Св. Климент Охридски” №8.

Използвани съкращения

2-PAM	2-пиридиналдоксиммети йодид
AA/AN	съполимер на акрилонитрил с акриламид
ACh	ацетилхолин
AChE	ацетилхолинестераза
AChEIs	инхибитори на ацетилхолинестераза
CAB	целулозен ацетат бутират
CAPH	Целулозен ацетат пропионат с висока молекулна маса
CAPL	Целулозен ацетат пропионат с ниска молекулна маса
ChO	холиноксидаза
ETMS	Етилтриметоксисилан
GOx	глюкозооксидаза
HRP	пероксидаза от хрян
IC ₅₀	50 %- на инхибиторна активност
MTES	метилтриетоксисилан
R.S.D	възпроизводимост
TEOS	тетраетилортосиликат
TMOS	тетраметилортосиликат

ВЪВЕДЕНИЕ

През последните години бяха създадени различни видове биосензори, които се използват в широко в аналитичните среди, включително биомедицина, контрол на лекарства, мониторинг на околната среда; определяне на биологични, химични и токсични агенти, биотехнологии, физика и други изследователски дейности .

Ензимите се използват като биокатализатори в биотехнологичните процеси. Те са по-предпочитани от химичните катализатори, защото са по-селективни и по-ефикасни. Иммобилизацията на ензими се счита за важна техника, защото тя подобрява стабилността на ензимите.

Биосензорите представляват алтернативен метод за бързо определяне на невротоксини. От няколко години те са обект на активно изследване. Преобладаващата част от биосензорите за пестициди се основават на инхибирането на ензима ацетилхолинестераза (AChE), който е ензим отговорен за нервните функции. Основната биологична роля на AChE е прекратяването на предаването на импулси в холинергичните синапси чрез бърза хидролиза на невротрансмитера ацетилхолин (ACh), в нервната система. Създаването на ензимни сензори за определяне на инхибиторите на ацетилхолинестеразата (AChEIs) може да помогне за разработката на полезни лекарства за лечение на болестта на Алцхаймер. Освен това, те имат важно значение в мониторинга на околната среда и за определяне на пестициди.

Целта на настоящото изследване е създаването на биосензори на основата на оптични влакна, като се използва едновременно ковалентна имобилизация на мултиензимни системи върху нови хибридни мембрани . С помощта на зол-гел метод са създадени различни видове нови хибридни мембрани на основата на SiO_2 , които са подходящи за оптични биосензори. Мултиензимните системи представляват биоактивната компонента на оптичния биосензор. Определени са каталитичните свойства на ензимите, от които зависят и основните параметри на биосензорите.

Изследвани са факторите, оказващи влияние върху свойствата на създадените оптични биосензори. Конструирани биосензори предлагат добра точност, чувствителност, оперативна стабилност, възпроизводимост и линеен диапазон на измерванията. Освен това е изследвано инхибиращото влияние на карбофурановите (карбаматните) пестициди; параоксоновите (органофосфатните) пестициди; и новосинтезираните досега пептидни инхибиторни съединения, които са производни на галантамина и могат да се използват за лечение на болестта на Алцхаймер.

Цели на дисертационния труд

Целта на представеното изследване е създаването на биосензори на основата на оптични влакна и мултиензимни системи, имобилизирани върху новосинтезирани хибридни мембрани с цел определяне на ацетилхолинестеразни инхибитори. За изпълнение на тази цел, си поставихме следните по-конкретни задачи:

- Синтезиране на различни нови хибридни мембрани, подходящи за оптични биосензори, използващи зол-гелния метод.
- Изследване на каталитичните свойства на имобилизираната глюкозооксидаза (GOx) (която се подбира ,като моделен ензим) върху различните матрици, с цел да се изберат най-подходящите от тях за по-нататъшно приложение на оптичните биосензори.
- Изследване на каталитичните свойства на индивидуално и едновременно имобилизираните ацетилхолинестераза /AChE/, холиноксидаза /ChO/ и пероксидаза от хрян /HRP/ и сравнение на резултатите, получени с различните матрици.
- Конструирание на биосензори с оптични влакна на основата на мултиензимни системи и подбор на най-подходящите хибридни мембрани.
- Изследване на параметрите, оказващи влияние върху създадените оптични биосензори, и създаване на математически модел на действието им.
- Изследване на влиянието на инхибитори. Определяне на влиянието на карбамати и органофосфати върху мултиензимните системи и измерванията с биосензор.
- Определяне на влиянието на новосинтезираните производни на галантамина като инхибиращи съединения на ензима ацетилхолинестераза, които могат да се използват за лечението на болестта на Алцхаймер. Измерване на инхибиторните константи с оптичния биосензор.

Експериментална част

Реагенти :

Бяха използвани ензимите:

- 1- Ацетилхоменестераза; (AChE, EC 3.1.1.7, от Type VI-S от electric eel) доставени от Sigma, Германия.
- 2- Хоминоксидаза; (ChO, EC 1.1.3.17, от *Alcaligenes* sp.) доставени от Sigma, Германия.
- 3- пероксидаза от хрян, (HRP, EC 232-668-6), доставени от Sigma, Германия.

Всички останали реактиви бяха р.а.

Апаратура:

- 1- Avantec, Холандия, спектрофотометър. Модел № 2048 с оптични влакна и флуоресцентно оптично влакно за измерване на кислород.
- 2- pH – метър, HAANA instrument – Германия.
- 3- Спектрофотометър, SPEKOL 11– Германия.
- 4- Термостат W1 – Германия.

Резултати и Дискусия

1. Изследване на имобилизацията на ензима глюкозооксидаза (*GOx*)

Глюкозооксидаза е използвана, като моделен ензим. Относителните активности на имобилизирания ензим върху различни видове матрици са показани в Таблица 1. Резултатите, получени от сравнението на различни видове мембрани, показват че мембрана №11, съдържаща само чист CAB; мембрана №12, съдържаща чист съполимер AA/AN; мембрана №5, съдържаща ETMS, CAB и AA/AN; и мембрана №2, съдържаща TMOS, CAB и AA/AN, имат голям капацитет за имобилизация на ензима *GOx*. Мембрани №11 и №12 не са хибридни мембрани. Мембрани №5 и №2 са хибридни мембрани. Затова е направено сравнение между хибридните мембрани. Най-висока стойност на относителна активност на ензима има мембрана №5, която съдържа ETMS. Тя е най-прозрачната и най-гъвкавата мембрана.

Таблица 1. Относителни активности на имобилизираната *глюкозооксидаза*

№	Състав	Относителна активност на имобилизираната <i>GOx</i> , [%]
1	ETMS(1.5ml), CAB(3g), AA/AN (0.1g)	59.54
2	TMOS(5ml), CAB(3g), AA/AN (0.1g)	59.38
3	TEOS(10ml), CAB(3g), AA/AN (0.1g)	48.93
4	TMOS(5ml), CAB(3g), AA/AN (0.1g)	33.47
5	ETMS(5ml), CAB(3g), AA/AN (0.1g)	75.28
6	ETMS(5ml), CAB(3g), AA/AN (0.1g)	43.64
7	TMOS(10ml), CAB(3g), AA/AN (0.1g)	37.54
8	TEOS(10ml), PDMS(2ml), CAB(3g), AA/AN (0.1g)	30.51
9	TEOS(8ml), PDMS (2ml)	46.78
10	MTES (5ml), CAB (3g), AA/AN (0.1g)	20.03
11	CAB(3g) Pure membrane	77.91
12	AA/AN (0.1g) Pure membrane	74.20
13	TMOS(8ml), PDMS(2ml), CAB(3g), AA/AN (0.1g)	33.57

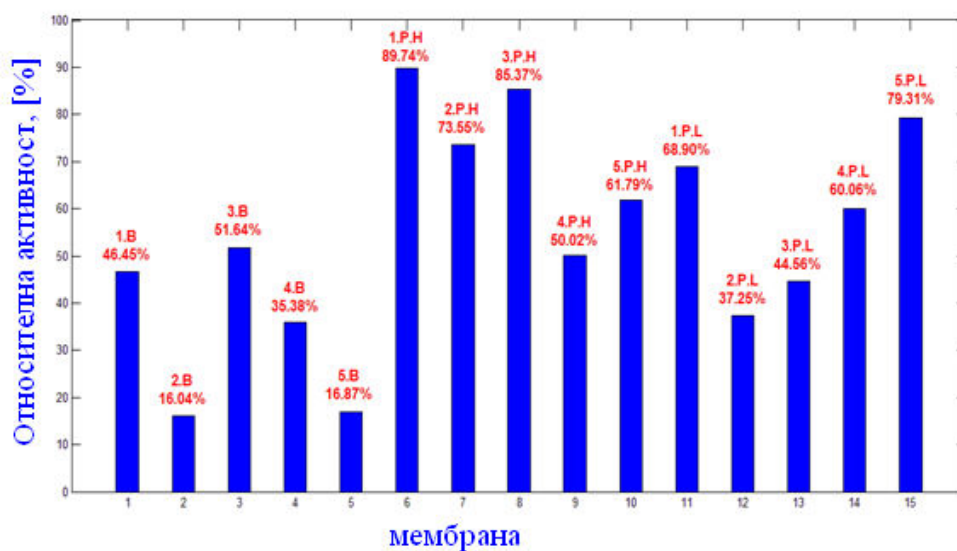
2. Изследване на имобилизацията на пероксидаза от хрян (*HRP*)

За имобилизация на *HRP* бяха използвани синтезираните нови видове мембрани за изследване на каталитичните свойства на *HRP* и сравнение на тези матрици, с цел да се избере най-подходящата от тях за по-нататъшно приложение за конструиране на оптичните биосензори.

Каталитичните свойства на свободна и имобилизирана пероксидаза върху различни матрици са показани в Таблица 2. Резултатите от синтеза на новите мембрани и сравнението на различни видове мембрани показват, че тези, съдържащи целулозен ацетат пропионат, са по-добри от мембраните, съдържащи целулозен ацетат бутират.

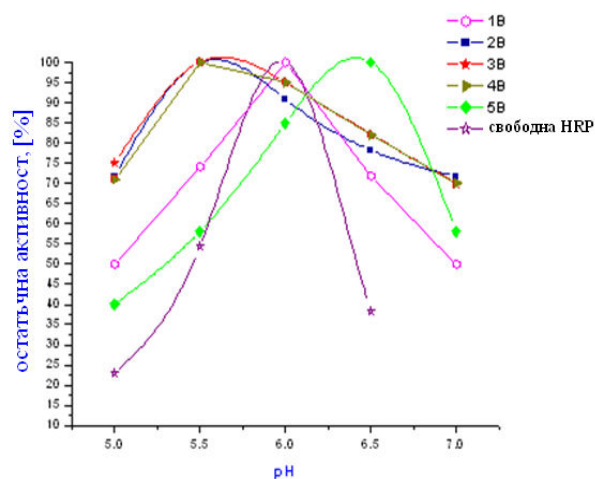
Таблица 2. Каталитични свойства на свободна и имобилизирана
пероксидаза върху различни матрици

№ на мембраната	код на мембраната	състав	количество на свързания белтък, [mg/g]	Специфична активност, [U/mg]	относителна активност, [%]	оптимално pH	оптимална температура, [°C]
		Free HRP	-	60.41	-	6	35
1	1.B	ETMS, CAB, AA/AN	2.31	28.18	46.65	6	35
2	2.B	TEOS, CAB, AA/AN	3.91	9.68	16.02	5.5	40
3	3.B	TMOS, CAB, AA/AN	1.60	31.19	51.63	5.5	40
4	4.B	MTES, CAB, AA/AN	1.94	21.64	35.82	5.5	30
5	5.B	CAB, AA/AN	3.68	10.19	16.87	6.5	40
6	1.P.H	ETMS, CAPH, AA/AN	1.37	54.21	89.74	6	30
7	2.P.H	TEOS, CAPH, AA/AN	1.51	44.43	73.55	6	30
8	3.P.H	TMOS, CAPH, AA/AN	1.42	51.57	85.37	6.5	35
9	4.P.H	MTES, CAPH, AA/AN	1.83	30.21	50.00	6.5	40
10	5.P.H	CAPH, AA/AN	1.70	37.32	61.78	6.5	40
11	1.P.L	ETMS, CAPL, AA/AN	1.63	41.62	68.90	5.5	35
12	2.P.L	TEOS, CAPL, AA/AN	1.92	22.51	37.26	5.5	40
13	3.P.L	TMOS, CAPL, AA/AN	2.10	26.91	44.55	6.5	35
14	4.P.L	MTES, CAPL, AA/AN	1.85	36.28	60.05	6	30
15	5.P.L	CAPL, AA/AN	1.47	47.91	79.30	6	40

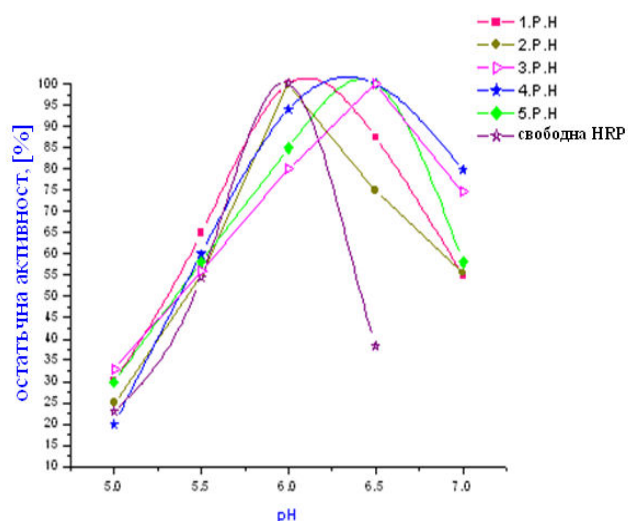


Фигура 1. Относителна активност на имобилизираната HRP върху различни матрици

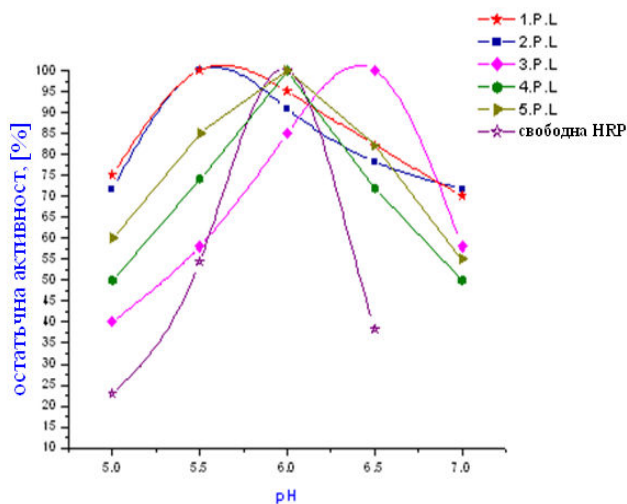
Изследвани са pH и температурен оптимум за свободен и имобилизиран ензим.



(A)



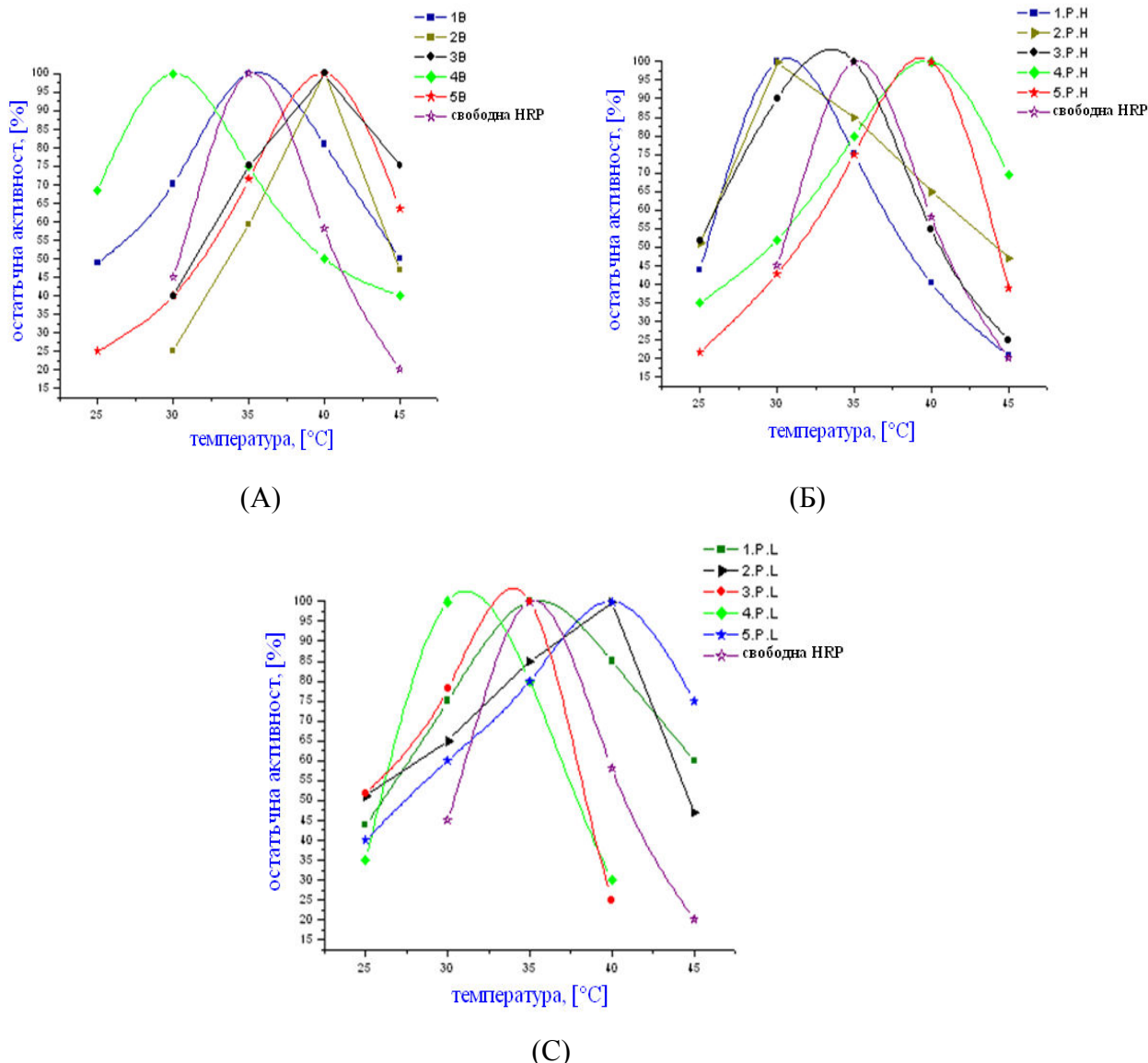
(Б)



(C)

Фигура 2. Зависимост между рН и активност на свободна и имобилизирана *HRP* върху различни матрици /
/А/- САВ: /Б/-САРН: /С/-САРЛ

Зависимостта между рН в диапазона от рН 5 до рН 7 и активността за свободна и имобилизирана *HRP* върху различни матрици е показана на Фигура 2. Оптималното рН за свободна *HRP* е рН 6, а за имобилизирана *HRP* върху различни матрици е в диапазона от рН 5.5 до рН 6.5.



Фигура 3. Зависимост между температура и активност на свободна и имобилизирана *HRP* върху различни матрици / / A/- CAB: /Б/-CAPH:/C/-CAPL

Зависимостта между температурата и активността за свободна и имобилизирана *HRP* върху различни матрици е показана на Фигура 3. Оптималната температура за свободна *HRP* е 35°C, а за имобилизирана *HRP* върху различни хибридни мембрани е в диапазона от 30°C до 40°C.

Може да се направи изводът, че разликата между оптималното рН и оптималната температура за различните видове мембрани с имобилизиран ензим в сравнение със свободен ензим се дължи на влиянието на матриците и на структурни промени в белтъчната молекула, вследствие на създадената ковалентна връзка.

Сравнението на новите хибридни мембрани показва, че най-добрата мембрана с най-висока относителна активност (89.74%) е мембраната с ETMS, CAPH и AA/AN. Следователно, тя има големи възможности за имобилизация на ензими и приложение за създаването на оптичния биосензор.

3. Изследване на имобилизацията на ацетилхолинестераза

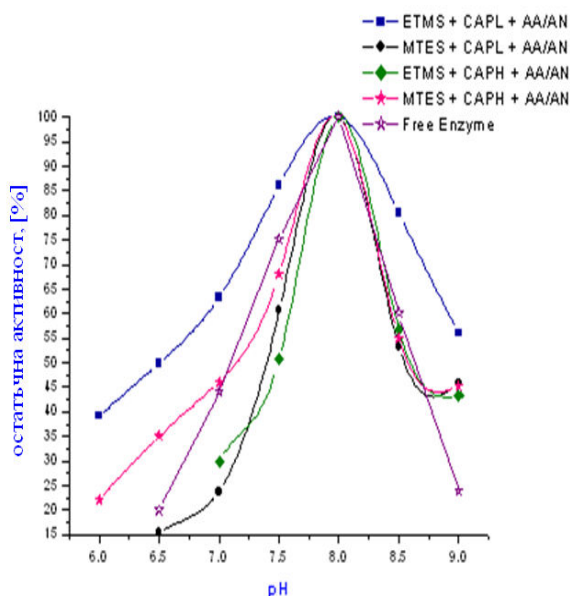
Каталитичните свойства на свободна и имобилизирана *AChE* ензим върху различни матрици са показани в Таблица 3.

Таблица 3. Каталитичните свойства на свободна и имобилизирана *AChE* върху различни матрици

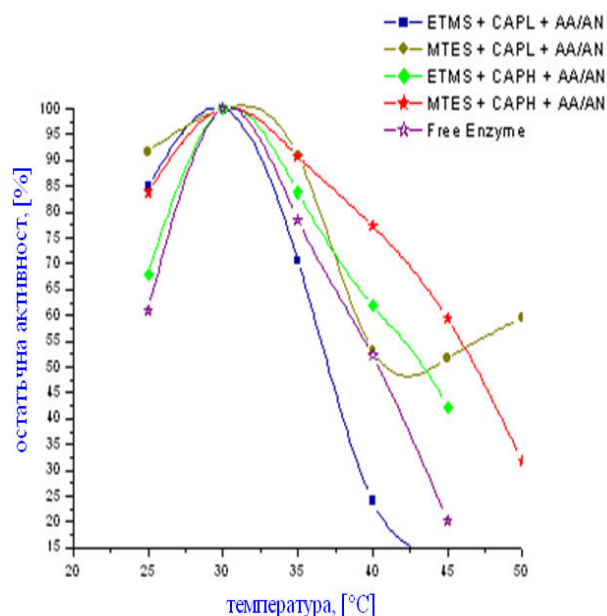
№ на мембраната	състав	количество на свързания белтък, [mg/g]	специфична активност [U/mg]	относителна активност, [%]	оптимално pH	оптимална температура, [°C]	K_m , [M]
	Free AChE	-	174.12	-	8	30	$3.412 \cdot 10^{-4} \pm 0.03$
1	ETMS, CAPL, AA/AN	2.02	116.48	66.90	8	30	$6.542 \cdot 10^{-4} \pm 0.16$
2	MTES, CAPL, AA/AN	1.53	131.42	75.48	8	30	$8.178 \cdot 10^{-4} \pm 0.21$
3	ETMS, CAPH, AA/AN	1.41	149.39	85.80	8	30	$5.617 \cdot 10^{-4} \pm 0.11$
4	MTES, CAPH, AA/AN	1.76	126.9	72.88	8	30	$13.340 \cdot 10^{-4} \pm 0.19$

Вижда се, че за имобилизирана *AChE* най-висока относителна активност (85.80%) има новата хибридна мембрана с ETMS и CAPH.

Изследвано е влиянието на различни pH стойности върху активността за свободна и имобилизирана *AChE*. Зависимостта между pH в диапазона от pH 6 до pH 9 и активността за свободна и имобилизирана *AChE* върху различни матрици е показана на Фигура 4. Тази фигура показва, че най-висока активност на свободния ензим се наблюдава при pH 8; следователно, оптималното pH за свободна *AChE* е pH 8. Освен това, се забелязва, че най-висока активност за всички имобилизации на *AChE* върху хибридни мембрани се наблюдава също при pH 8.



Фигура 4. Зависимост между pH и активност на свободна и имобилизирана *AChE* върху различни матрици



Фигура 5. Зависимост между температура и активност на свободна и имобилизирана *AChE* върху различни матрици

Зависимостта между температурата в диапазона от 20°C до 50°C и активността за свободна *AChE* и имобилизирана *AChE* върху различни матрици е показана на Фигура 5. Вижда се, че оптималната температура за свободна *AChE* е 30°C. Освен това, се вижда, че за всички имобилизации на *AChE* върху хибридните мембрани най-високата активност е при 30°C.

Сравнението на влиянието на различните pH и температурни стойности върху активността за имобилизиран ензим върху различни хибридни мембрани с това на свободен ензим показва, че то не се променя и в двата случая.

Сравнението между стойностите на константата на Михаелис K_m за имобилизиран и свободен ензим показва, че свободният ензим има най-ниска стойност $K_m = 3.412 \cdot 10^{-4} M$, което говори за наличието на добър афинитет на свързване между ензима и субстрата. Може да се направи изводът, че повишаването на K_m след имобилизиране на ензима е свидетелство за това, че имобилизиранят ензим очевидно има по-нисък афинитет към субстрата си, отколкото свободният ензим. Изчислените стойности на K_m за имобилизирана *AChE* са от два до четири пъти по-високи, отколкото за свободна ензим. Това увеличение в стойностите на K_m може да се дължи на конформационни промени в ковалентно свързания ензима, а също на дифузионни ограничения или масопреносни процеси, водещи до намаляване на възможността за образуване на ензим-субстратен комплекс, .

След сравнението на мембраните с имобилизиран ензим експериментите продължиха с мембрани с целулозен ацетат пропионат с високо молекулна маса (най-добрата група с най-висока относителна активност).

4. Изследване на имобилизацията на холиноксидаза *ChO*

Каталитичните свойства на свободна и имобилизирана *ChO* върху различни матрици са показани в Таблица 4. Вижда се, че за имобилизиранят ензим най-висока относителна активност (72.96%) има мембраната с ETMS и CAPH.

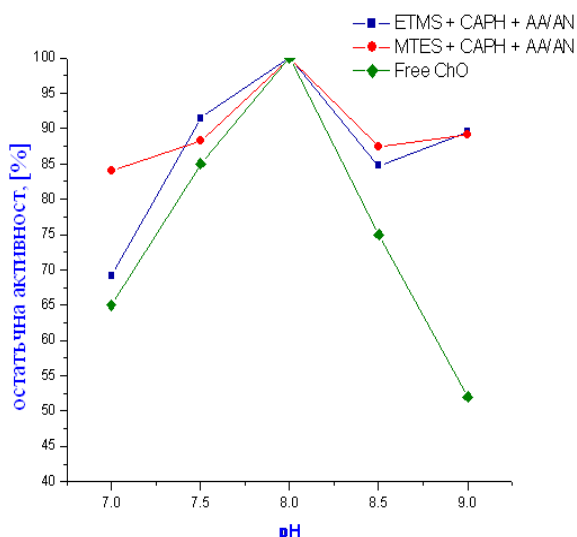
Таблица 4. Каталитичните свойства на свободен и имобилизиран *ChO* върху различни матрици

№ на мембраната	състав	количество на свързания белтък, [mg/g]	специфична активност [U/mg]	относителна активност, [%]	Оптимално pH	оптимална температура, [°C]	K_m , [M]
	Free ChO	-	12.8	-	8	35	$2.95 \cdot 10^{-3} \pm 0.06$
1	ETMS, CAPH, AA/AN	19.6	9.34	72.96	8	35	$25.51 \cdot 10^{-3} \pm 0.14$
2	MTES, CAPH, AA/AN	25.9	6.7	52.34	8	35	$56.48 \cdot 10^{-3} \pm 0.09$

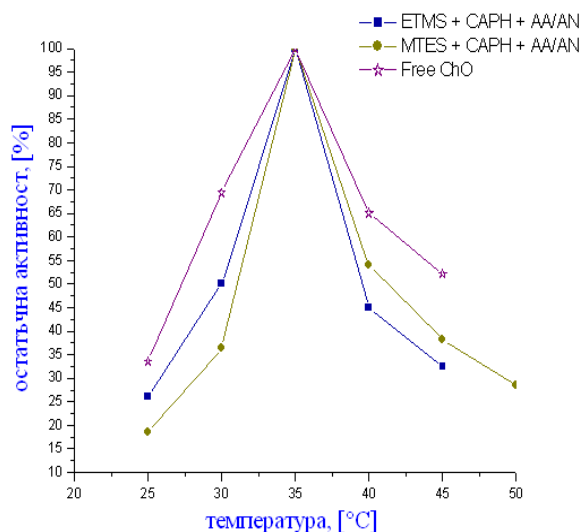
Изследвано е влиянието на различните стойности на pH върху активността за свободна и имобилизирана *ChO*. Зависимостта между pH в диапазона от pH 7 до pH 9 и активността за свободна и имобилизирана *ChO* върху различни матрици е показана на Фигура 6. Вижда се, че оптималното pH за свободна и имобилизирана *ChO* е pH 8.

Зависимостта между температурата в диапазона от 25°C до 50°C и активността за свободен и имобилизиран ензим върху мембраните е показана на Фигура 7. Вижда се, че оптималното рН за свободна *ChO* е при 35°C, а за всички имобилизации на *ChO* върху мембрани е при 35°C, т.е. имобилизираният и свободният ензим са с еднаква зависимост.

Резултатите, получени от други изследователи, показват че оптималното рН за свободен ензим е 8, а оптималната температура е 35°C.



Фигура 6. Зависимост между рН и активността за свободна и имобилизирана *ChO* върху различни матрици



Фигура 7. Зависимост между температурата и активността за свободна и имобилизирана *ChO* върху различни матрици

Направено е сравнение на кинетичните параметри за различни имобилизирани ензими с параметрите на свободна ензим. Резултатите показват, че свободният ензим има най-ниска стойност на K_m ($2.95 \cdot 10^{-3} M$), следователно, налице е добър афинитет на свързване между ензима и субстрата. Изчислените стойности на K_m за имобилизираната *ChO* са повече от десет пъти (един порядък) по-големи от тези за свободния ензим. Това увеличение в стойностите на K_m може да се дължи на структурни промени в ензима, водещи до намаляване на възможността за образуване на комплекссубстрат ензим.

5. Изследвания върху едновременното свързване върху матрици на *AChE* и *ChO*

Специфичните активности на едновременно имобилизирани *AChE* и *ChO* върху различни матрици са показани в Таблица 5. Вижда се, че специфичната активност на едновременно имобилизираните *AChE* и *ChO* върху различни матрици е по-ниска от специфичната активност на индивидуално имобилизираните *AChE* и *ChO* върху тези матрици.

Таблица 5. Специфични активности на едновременно имобилизирани *AChE* и *ChO* върху различни матрици

№ на мембраната	състав	специфична активност, [E/mg]
1	ETMS, CAPH, AA/AN	119.8832 (AChE) 6.815914 (ChO)
2	MTES, CAPH, AA/AN	93.3634 (AChE) 5.141412 (ChO)

6. Изследване върху едновременната имобилизация на *AChE*, *ChO* и *HRP*

Специфичните активности на едновременно имобилизирани *AChE*, *ChO* и *HRP* върху различни матрици са показани в Таблица 6.

Таблица 6. Специфичните активности на едновременно имобилизирани *AChE*, *ChO* и *HRP* върху различни матрици

№ на мембраната	състав	специфична активност, [E/mg]
1	ETMS, CAPH, AA/AN	126.982 (AChE) 4.1388 (ChO) 38.69 (HRP)
2	MTES, CAPH, AA/AN	89.538 (AChE) 3.6291 (ChO) 32.11 (HRP)

7. Конструирание на биосензори за определяне на инхибитори на ацетилхолинестеразата

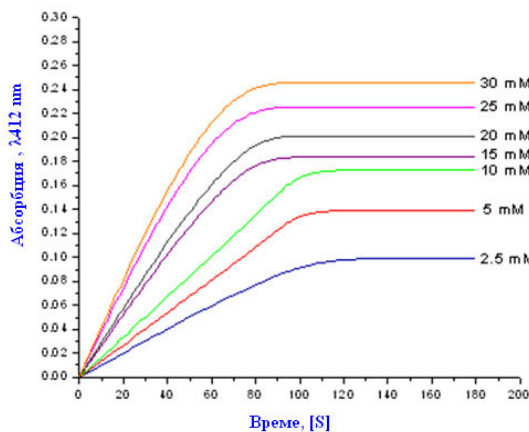
Създадени бяха оптични биосензори на базата на едновременна ковалентна имобилизация на *AChE* и *ChO* и на *AChE*, *ChO* и *HRP* върху новосинтезираните хибридни мембрани. С помощта на оптично влакно за определяне на кислород с прибор AvantesSpec 2048 бяха определени промените в консумацията на O_2 , вследствие на ензимнокатализираните реакции.

7.1 Параметри и характеристики на оптичните биосензори

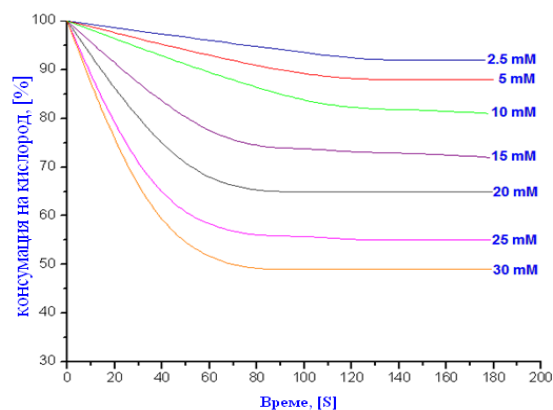
7.1.1 Параметри на оптичния биосензор с мултиензимната система (*AChE* и *ChO*)

За конструирание на оптичен биосензор е подбрана мембрана с най-висока активност на мултиензимната система. Това е хибридна мембрана, получена от ETMS, CAPH и AA/AN, като по отношение на ацетилхолинестеразата е 119.88E/мг, а по отношение на холиноксидазата е 6.81E/мг по отношение на *ACh*.

След създаването на биосензора първата стъпка беше да се изследва неговата чувствителност. От кривите при различни концентрации на ацетилхолин на Фигура 8 са показани кривите на зависимостта за времето на отговор на биосензора при различни концентрации на *ACh*. В зависимост от концентрацията на субстрата времето за отговор на оптичния биосензор е около 90 s с данни за статичен режим на измерване, а оперативната му стабилност е 25 дни. Линейният диапазон за субстрата е $2.5 \cdot 10^{-3}$ – $30 \cdot 10^{-3}$ M. Стандартните криви, получени от създадения биосензор, са показани на Фигура 9.

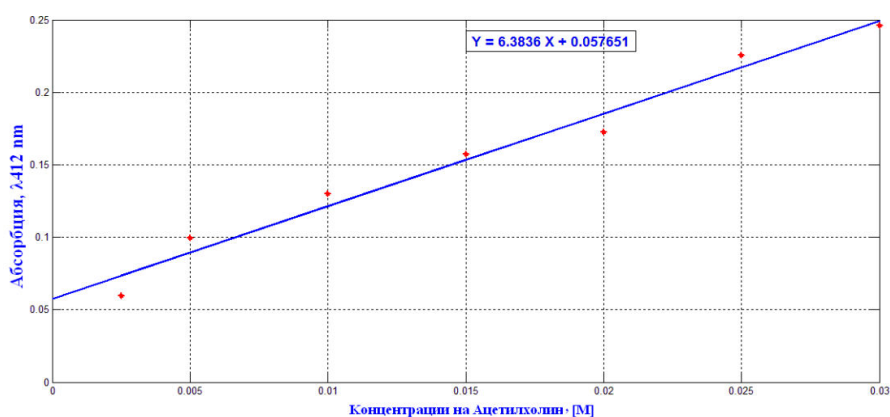


(A)

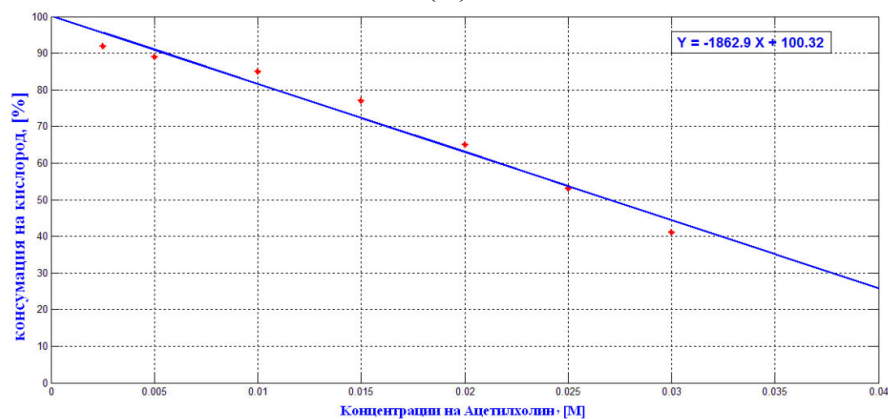


(Б)

Фигура 8. Време за отговор за различни концентрации на *ACh*, получени от биосензор с оптично влакно за кислород чрез измерване на абсорбцията /А/ и изчислената консумация на кислород /Б/ с едновременно имобилизирани *AChE* и *ChO*



(A)



(Б)

Фигура 9. Стандартни криви за *ACh*, получени от биосензор с оптично влакно за измерване на кислород и чрез измерване на абсорбцията /А/ и изчислената консумация на кислород /Б/ с едновременно имобилизирани *AChE* и *ChO*

Таблица 7. Параметри и характеристики на оптичните биосензори за мултиензимната система *AChE* и *ChO*

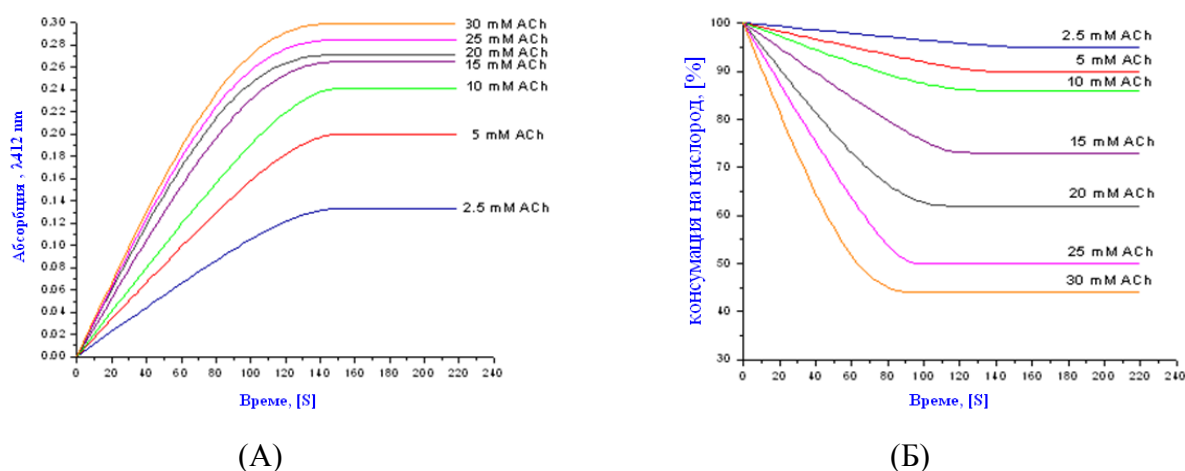
Параметри	Биосензор във видимата област	кислороден биосензор
Линеен диапазон за <i>ACh</i> , [$M \cdot 10^{-3}$]	2.5 – 30	2.5 – 30
функционалната стабилност, [дни]	25	25
възпроизводимост (R.S.D $_{n=10}$), [%]	3.78	4.74
Време за отговор, [s]	90	90

Мултиензимната система дава възможност за добра възпроизводимост на оптичния биосензор с помощта на спектрофотометър и кислородна сонда. След измерване на поглъщането коефициентът на вариация е R.S.D = 3.78%, $n=10$, за $2.5 \cdot 10^{-3} M$ *ACh*. След измерване на консумацията на кислород коефициентът на вариация е R.S.D = 4.74%, $n=10$, за $2.5 \cdot 10^{-3} M$ *ACh*.

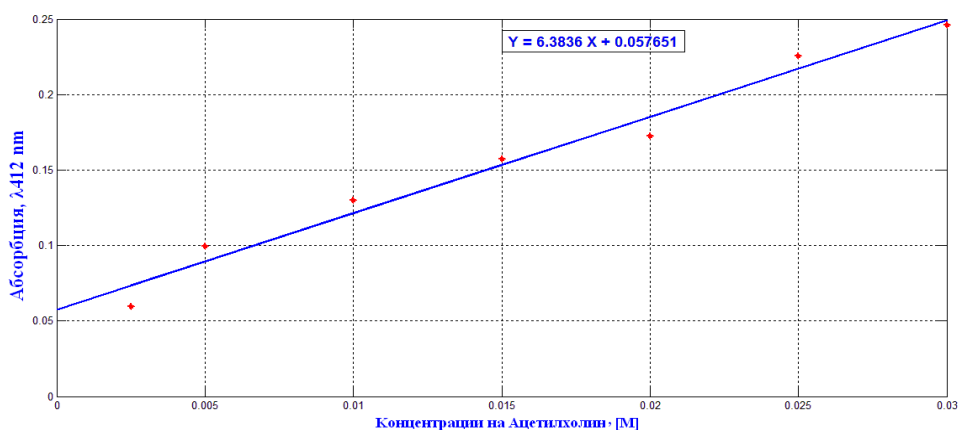
7.1.2 Определяне на параметри на оптичния биосензор с мултиензимна система (*AChE*, *ChO* и *HRP*)

Най-добрата хибридна мембрана с мултиензимите с най-висока специфична активност (126.98 U/mg) за *AChE*, най-висока специфична активност (4.13 E/mg) за *ChO* и най-висока специфична активност (38.69 E/mg) за *HRP* е ETMS с CAPH и AA/AN, поради което тази хибридна мембрана е избрана за създаване на оптичния биосензор.

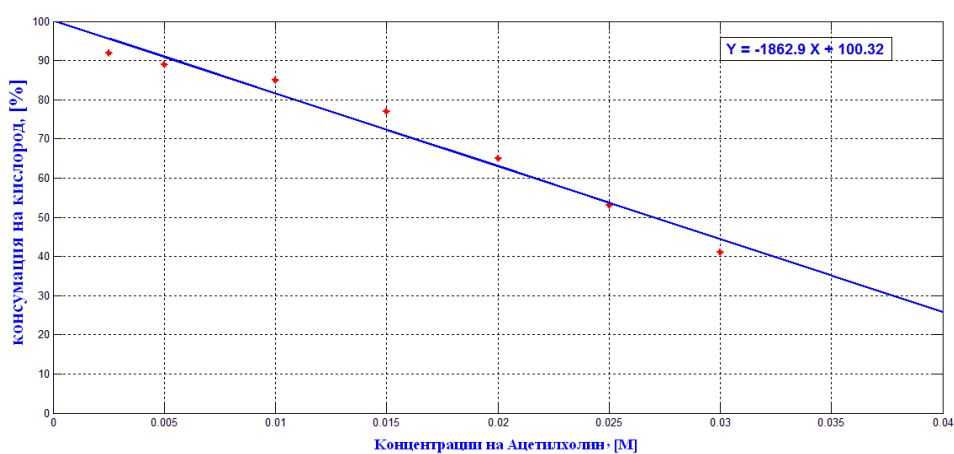
Времето за отговор за различни концентрации на *ACh*, получено за кислородния оптичен биосензор за оптичния биосензор във видимата област на основата на едновременно имобилизирани *AChE-ChO-HRP*, е показано на Фигура 10. В зависимост от концентрацията на субстрата времето за отговор на биосензора във видимата област е около 100 s при достигане на статично състояние, а оперативната стабилност е 34 дни. Работният диапазон на субстрата е $2.5 \cdot 10^{-3}$ – $30 \cdot 10^{-3} M$. Времето за отговор на кислородния оптико-влакнест биосензор е около 120 s.



Фигура 10. Време за отговор за различни концентрации на *ACh*, оптичния биосензор във видимата област на базата на едновременно имобилизирани *AChE-Ch-HRP/A/* и получени от оптичния кислороден биосензор /Б/



(А)



(Б)

Фигура 11. Стандартни криви за измерване на *ACh*, получени от кислородния биосензор /А/ и биосензор във видимата област на основата едновременно имобилизирани *AChE*, *ChO* и *HRP* /Б/

Стандартните криви, получени от кислородния биосензор този във видимата област при излагане на въздействието на различни концентрации на *ACh*, са показани на Фигура 11.

Таблица 8. Параметри и характеристики на оптичните биосензори за мултиензимната система *AChE*, *ChO* и *HRP*

Параметри	оптичен биосензор във видимата област	Оптичен кислороден биосензор
Линеен диапазон за <i>ACh</i> , [$M \cdot 10^{-3}$]	2 – 30	2 – 30
функционалната стабилност, [дни]	34	34
възпроизводимост (R.S.D. $n=10$), [%]	3.9	4.4
Време за отговор, [s]	100	120

Експериментално получените резултати доказват, че мултиензимната система дава възможност за добра възпроизводимост на биосензори с оптични влакна и във видимата област и за кислород.

Може да се направи извода, че нашите оптични биосензори предлагат добра точност и възпроизводимост на измерванията; а получената нова хибридна мембрана и метод на имобилизация са приложени успешно за конструиране на биосензор с оптични влакна. Освен това, може да се направи изводът, че за кислородни измервания флуоресцентните оптични биосензори са по-подходящи, отколкото електрохимичните биосензори поради гъвкавия си дизайн и предаване на сигнала. Оптичните сензори имат предимства по отношение на времето за отговор, разходите за тяхното изготвяне и размера им.

Таблица 9. Сравнение на различни видове *AChE* биосензори по данни от други автори

Вид на биосензора	Линеен диапазон, [M]	Време за отговор, s	възпроизводимост, R.S.D %	n	Оперативна стабилност, дни	Лит. източник
Оптичен биосензор с мултиензимна система от <i>AChE</i> и <i>ChO</i> (измервания на абсорбцията при 412nm)	$2.5 \cdot 10^{-3} - 30 \cdot 10^{-3}$	90	3.78	10	25	Настоящ. работа
Оптичен биосензор с мултиензимна система от <i>AChE</i> и <i>ChO</i> (измерване на консумацията на кислород)	$2.5 \cdot 10^{-3} - 30 \cdot 10^{-3}$	90	4.74	10	25	Настоящ. работа
Оптичен биосензор с мултиензимна система от <i>AChE</i> , <i>ChO</i> и <i>HRP</i> (измервания на абсорбцията при 412nm)	$2 \cdot 10^{-3} - 30 \cdot 10^{-3}$	100	3.95	10	34	Настоящ. работа
Оптичен биосензор с мултиензимна система от <i>AChE</i> , <i>ChO</i> и <i>HRP</i> <i>AChE</i> , <i>ChO</i> и <i>HRP</i> (консумация на кислород)	$2 \cdot 10^{-3} - 30 \cdot 10^{-3}$	120	4.43	10	34	Настоящ. работа
Белязан оптофлуиден пръстеновиден резонаторен (label-free opto-fluidic ring resonator [OFRR]) биосензор за детекция на пестициди на основата на омрежаваща имобилизация (имобилизация с образуване на напречни връзки) на <i>AChE</i> .	-	30	3.5 %	5	-	[49]
Оптичен биосензор получен по зол-гел метода с капсуловани pH – чувствителни флуорофор – <i>AChE</i> конюгати/съединения за определянето на <i>ACh</i>	$0.5 \cdot 10^{-3} - 20 \cdot 10^{-3}$	-	3.5	8	-	[144]
Преносим оптичен пестициден биосензор с оптични влакна не имобилизирана на холинестеразата и зол-гел включен бромкрезол пурпур чрез омрежаване с глутаров алдехид в трислоен сандвичов материал	-	120	3-5	5	21	[176]
Оптичен пестициден биосензор на базата на ковалентно имобилизиран <i>AChE</i> и тимол синьо	$2.5 \cdot 10^{-3} - 30 \cdot 10^{-3}$	78 – 150	1.83	12	-	[142]

Амперометричен биосензор за определяне на органофосфорни пестициди с омрежаване на <i>AChE</i> с глутаров алдехид	-	70	-	-	-	[157]
Хибриден електрохимичен биосензор за определяне на органофосфорни пестициди на базата на имобилизация на <i>AChE</i> и <i>ChO</i>	-	200	< 3 %	5	14	[105]
Амперометричен биосензор с ковалентна имобилизация на ацетилхолинестераза и холин оксидаза върху валеролактон съполимер	$2.5 \cdot 10^{-3} - 30 \cdot 10^{-3}$	60 - 120	-	-	20	[107]
Кварцово-кристална микровезна (quartz crystal microbalance [QCM]) биосензор за определяне на пестициди на базата на промяната в резонансната честота	-	300	-	-	-	[129]

7.1.3 Математически модел на времето за отговор на оптични биосензори

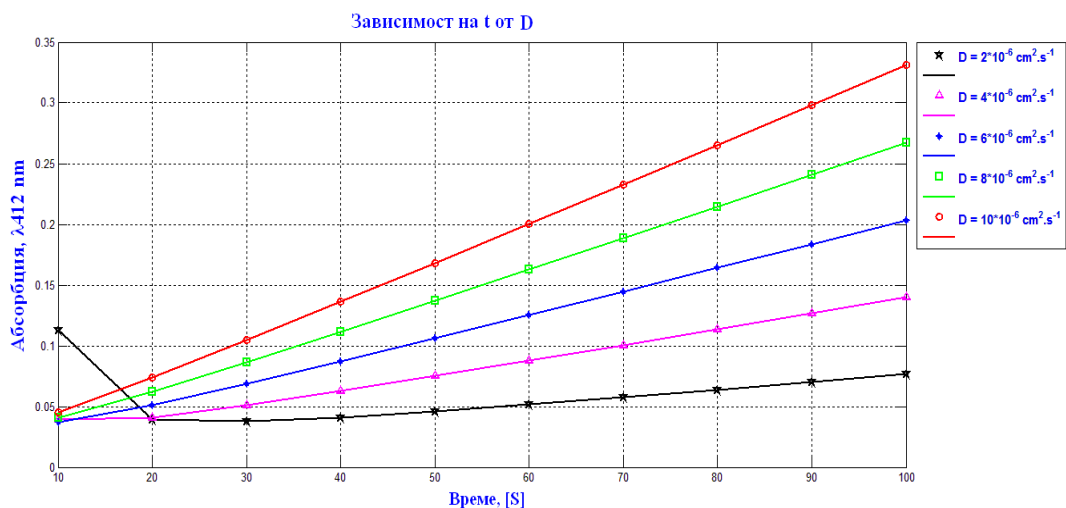
Един от най-важните параметри на един биосензор е времето за отговор неговата оптимизация. Съгласно уравнението на модела времето за отговор зависи от различни параметри, съгласно уравнението:

$$A_{\lambda}(t) = \int_0^l \left(\varepsilon_1 \frac{K_m \cdot E_0}{K_m + \frac{S_0}{4\pi D t} \exp\left[-\frac{V_{\max}}{K_m} t - \frac{r^2}{4Dt}\right]} \right) dx$$

Където: K_m е константата на Михаелис, $V_{\max}$ е максималната скорост, S_0 начална субстратна концентрация, E_0 е ензимна концентрация, t е време, l е дебелина на мембраната, r , ε_1 е моларен екстинкционен коефициент, D е дифузионен коефициент.

Зависимост на времето за отговор от коефициента на дифузия на мембраната D:

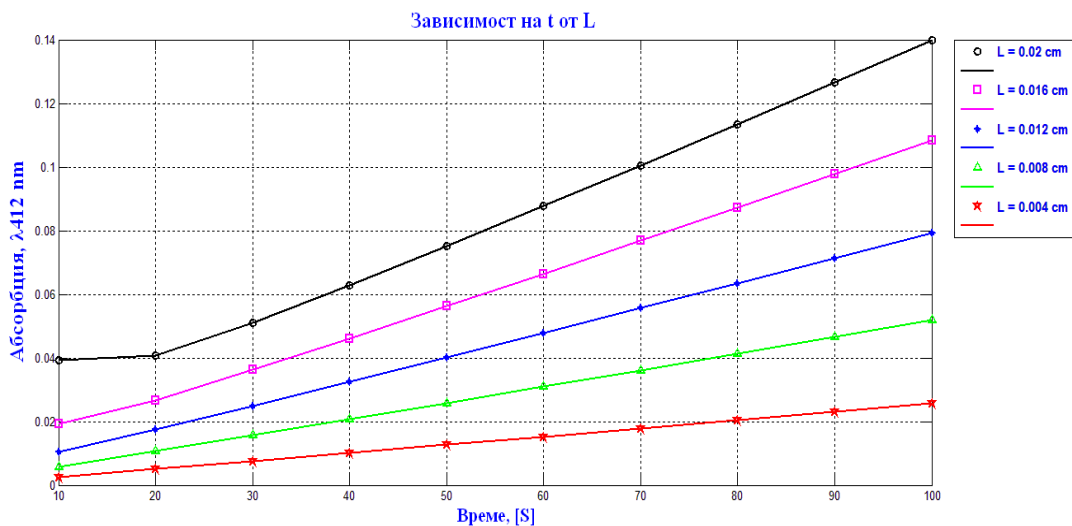
То беше водещо серията от симулации на процеса, с промяна на стойностите на D в интервала $10^{-8} - 10^{-5} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$. Установено е, че с увеличаване на стойността на D времето за отговор намалява. Уравнението на модела показва, че времето за отговор е обратно пропорционално на коефициента на дифузия (Фигура 12).



Фигура 12. Времето за отговор като функция на коефициента на дифузия на мембраната D (данни получени от измервания при $A_{412} \text{ nm}$)

Зависимост на времето за отговор от дебелината на мембраната L :

Съгласно теоретичните изследвания (уравнението на модела) времето за отговор е пропорционално на стойността на дебелината на мембраната, повдигната на степен 2. Това е важно от гледна точка на технологията за изготвяне на мембраната. Зависимостта е силно чувствителна, защото е нелинейна и мембраните с различна дебелина оказват максимално влияние върху изходния сигнал (Фигура 13).

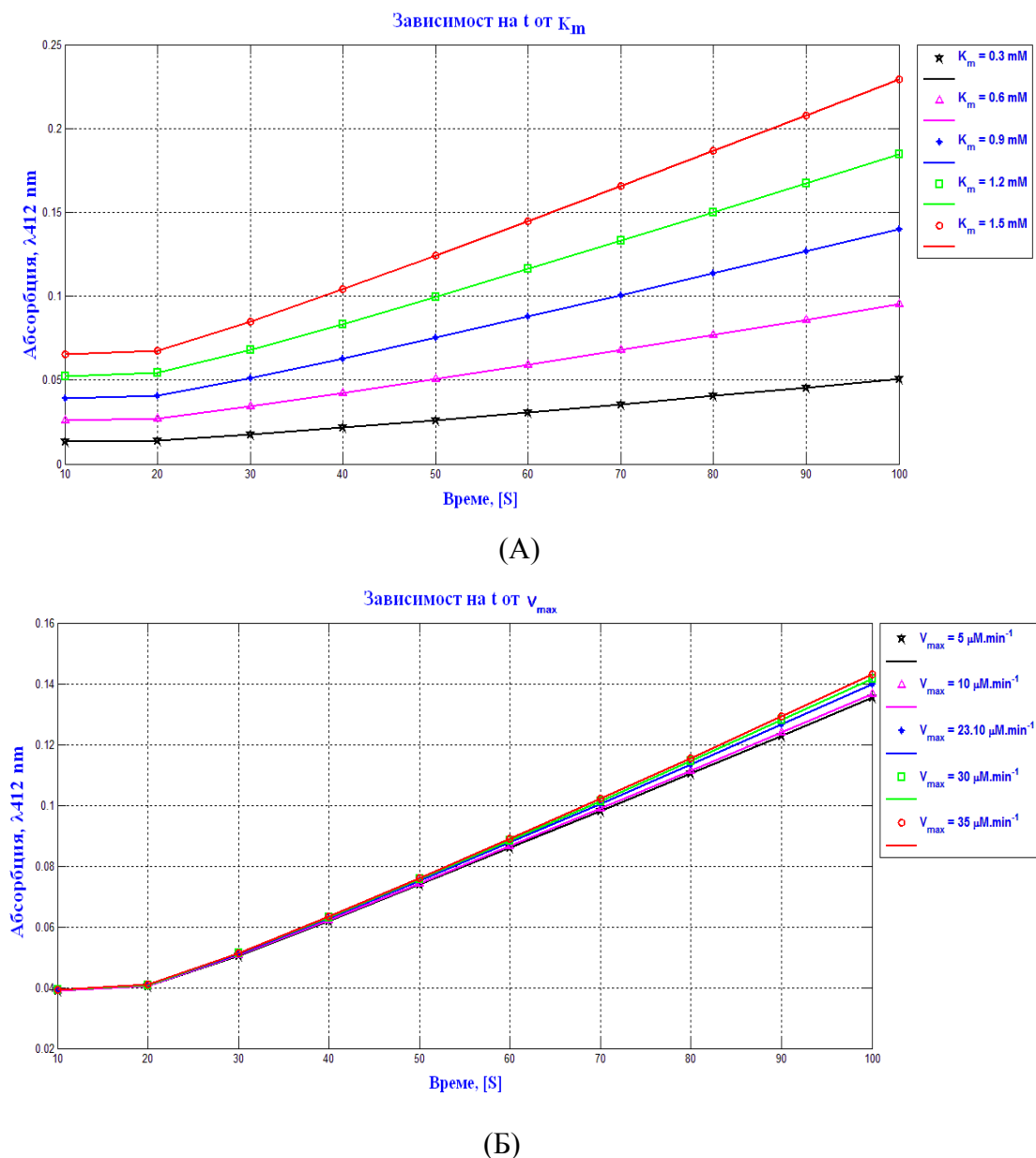


Фигура 13. Времето за отговор като функция на дебелината на мембраната L

Зависимост на времето за отговор от кинетичните параметри:

Съгласно теоретичните изследвания (уравнението на модела) времето за отговор е пропорционално на константата на Михаелис–Ментен K_m и не зависи от V_{max} . Установено е, че с увеличаване на стойността на K_m времето за отговор се

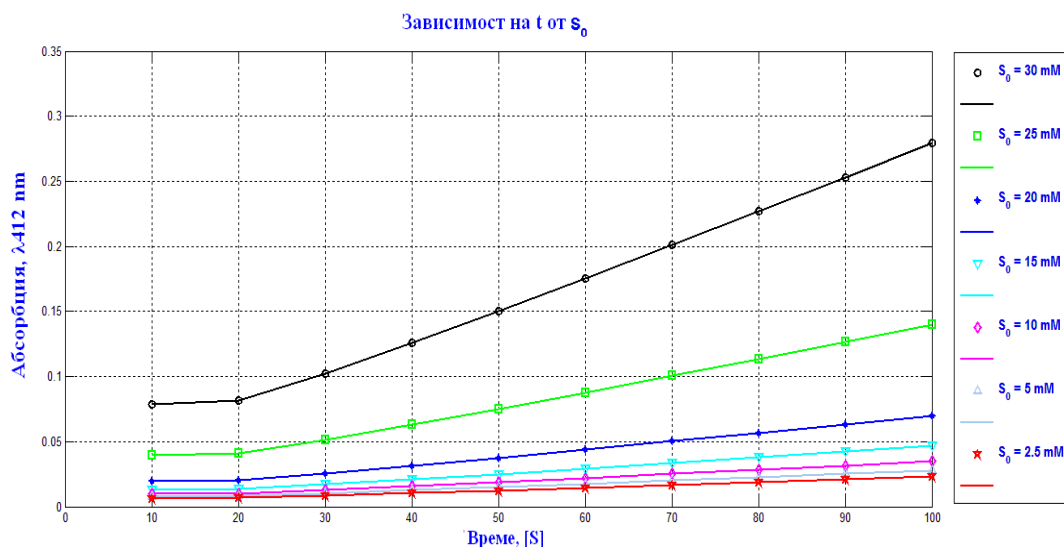
увеличава, а с увеличаване на стойността на V_{max} времето за отговор е приблизително близко (Фигура 14).



Фигура 14. Времето за отговор като функция на
кинетичните параметри K_m /А/ и V_{max} /Б/

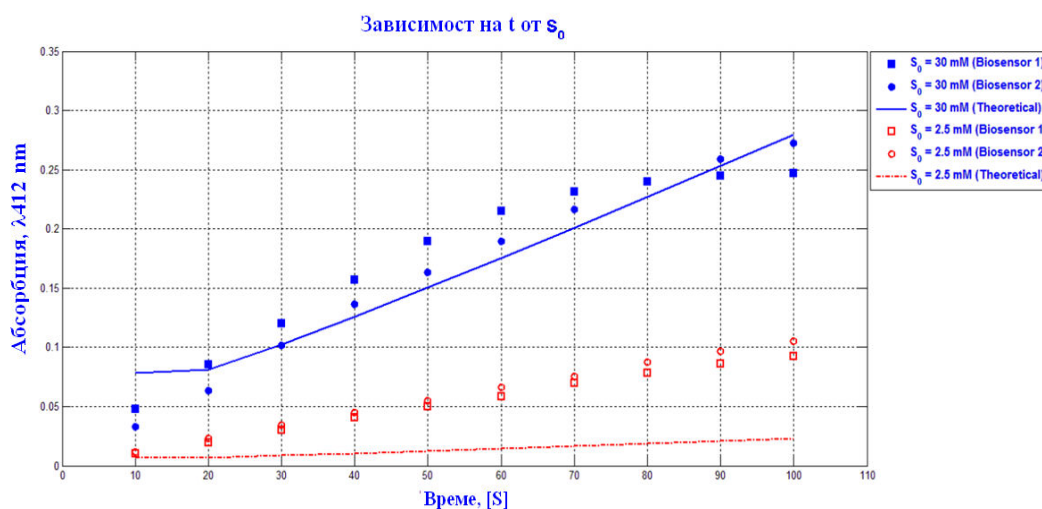
Зависимост на времето за отговор от началната концентрация на субстрата S_0 :

Съгласно уравнението на модела, за теоретични и експериментални изследвания времето за отговор е пропорционално на концентрацията на субстрата и вида на продукта/ например ако е инхибитор/ в ензимната мембрана. Следователно, в зависимост от концентрацията на субстрата, времето за отговор е пропорционално на концентрацията на субстрата (Фигура 15).

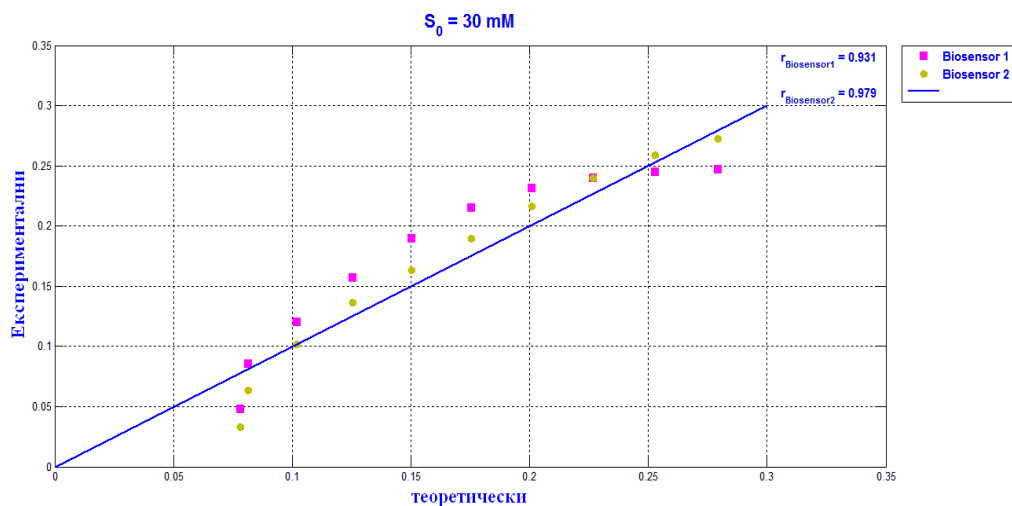


Фигура 15. Времето за отговор като функция на началната концентрация на субстрата S_0

Експерименталните резултати, получени от Фигура 8 (за биосензор 1, който се основава на едновременно имобилизирани *AChE-ChO*), и Фигура 10 (за биосензор 2, който е с едновременно имобилизирани *AChE-ChO-HRP*) са сравнени с изчислените резултати, получени от теоретичния модел, получен от Фигура 16 с помощта на прост регресионен анализ. Сравнението на експерименталните резултати и резултатите, изчислени от модела, е показано на Фигура 16 (А). Резултатите са показани върху регресионна линия на Фигура 16 (Б). Ако приемем $S_0 = 30 \text{ mM}$, полученото регресионно уравнение за биосензор 1 е: $Y = 0.936 X + 0.0213$, корелацията (r) = 0.931, $r^2 = 0.865$, а уравнението за биосензор 2 е: $Y = 1.129 X - 0.0217$, корелацията (r) = 0.979, $r^2 = 0.959$. Установена беше добра корелация между експерименталните резултати и данните, изчислени от нашия модел. Данните от всички статистически изчисления потвърдиха точността на предложения модел за биосензор 1 и биосензор 2.



(A)



(Б)

Фигура 16. Корелация между експерименталните резултати изчислените данни за времето за отговор на биосензора /А/ - за различни концентрации и /Б/ корелация за една концентрация.

Числото на *Дамкьолер* (D_a) е мярка за отношението на максималната скорост на отговор към максималната скорост на масов пренос [68]. То е безразмерна величина, която дава бърза оценка за скоростта на конверсия на субстрата (*скорост на конверсия* X), която може да се постигне в системи с непрекъснат поток [37].

$$D_a = \frac{\text{maximum reaction rate}}{\text{maximum mass transfer rate}} = \frac{V_{\max}}{\left[\frac{D}{\delta}\right] \cdot K_m}$$

Където K_m е константата на Михаелис: $V_{\max}$ е максималната скорост: D е дифузия: $[D/\delta]$ е дебелина на мембраната.

Ако $D_a < 0.1$, то $X < 0.1$; в този случай реакцията се намира под чисто кинетичен контрол. Когато $D_a > 10$, то $X > 0.9$; в този случай действието на биосензора се намира под контрола на масовия пренос. Числото на *Дамкьолер* (D_a) представлява отношението на времето на дифузия към времето, необходимо за завършване на реакцията. След изчисляването на D_a от експерименталните данни беше получена стойност $D_a = 5.775$, което означава, че действието на биосензора се намира под кинетичен контрол, а контрол на масовия пренос не се постига. Следователно, степента на конверсия на субстрата е $X = 85\%$. Може да се приеме, че е налице разумна степен на конверсия.

7.2 Карбофуранът като инхибитор на едновременно имобилизирани *AChE* и *ChO*

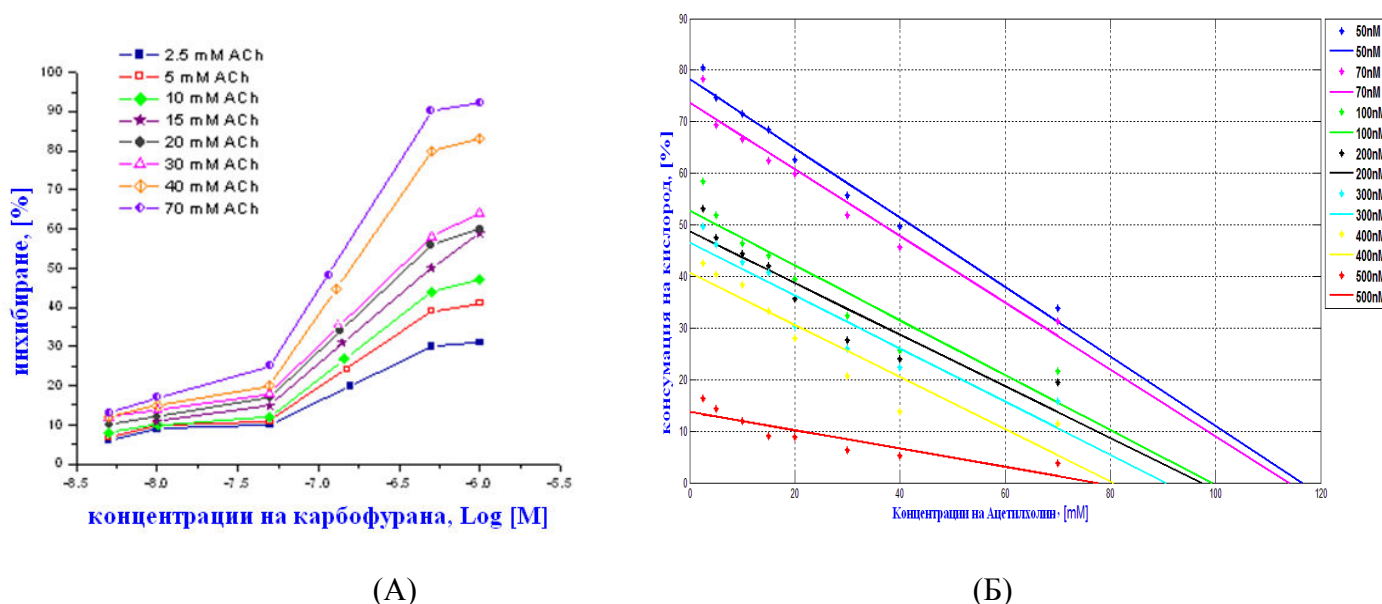
Този стъпка беше осъществена на два етапа, първият от които е оценка на ефекта на инхибиране според консумацията на кислород, а вторият е ефектът на инхибиране като следствие от вариацията за активността на ензима. За експериментално изследване на посочените по-горе два етапа беше избрана най-добрата мембрана (ETMS с CAPH и AA/AN) с мултиензимна система *AChE* и *ChO*.

За оценка на влиянието на инхибиторната константа бяха избрани мембрана със свободен ензим и две хибридни мембрани (ETMS с CAPH и AA/AN; и MTES с CAPH и AA/AN) с мултиензимна система.

Изследвания за определяне концентрацията на карбофуран:

Беше определен отговорът на оптичен биосензор с *AChE* спрямо различни концентрации на карбамата (карбофурана).

Стандартните криви за карбофуран и ACh получена от *AChE-ChO* биосензор е показана на Фигура 17. Съответната стандартната крива за карбофурана при различни концентрации на *ACh* е показана на Фигура 18. Вижда се, че работният диапазон на субстрата е $2.5 \cdot 10^{-3}$ – $30 \cdot 10^{-3}$ M. Фигура 17 (а) има S-образна форма и показва линеен отговор за концентрации на карбофурана в диапазона $5 \cdot 10^{-8}$ – $5 \cdot 10^{-7}$ M в присъствието на различни концентрации на *ACh*. Границата на детекция (приета за равна на стойността, при която задържането е 10%) за карбофурана е $2.1 \cdot 10^{-8}$ M.



Фигура 17. Стандартна криви за карбофуран /А/ и ACh /Б/ получена от *AChE-ChO* биосензор

Стойностите на инхибиторната константа K_i за различни концентрации на карбофурана за свободна и имобилизирана *AChE* са показани на Фигура 17 (b). Резултатите показват, че карбофуранът действа като неконкурентен инхибитор на свободната и имобилизираната *AChE*. Може да се види, че свободната *AChE* показва най-ниска стойност на K_i , което означава, че свободната *AChE* притежава по-висок афинитет към карбофурана, отколкото имобилизираната *AChE*.

Gabriela et al. [45] са разработили амперометрични биосензори с *AChE* за измерване на пестицидите карбофуран, карбарил, метилпараоксон. Измерената стойност на K_i за тяхния *AChE* биосензор е $4 \cdot 10^{-6}$ M. Тази стойност е по-висока от нашите резултати, което означава, че нашият биосензор притежава по-висок афинитет към карбофурана. Това се дължи основно на ковалентната имобилизация и

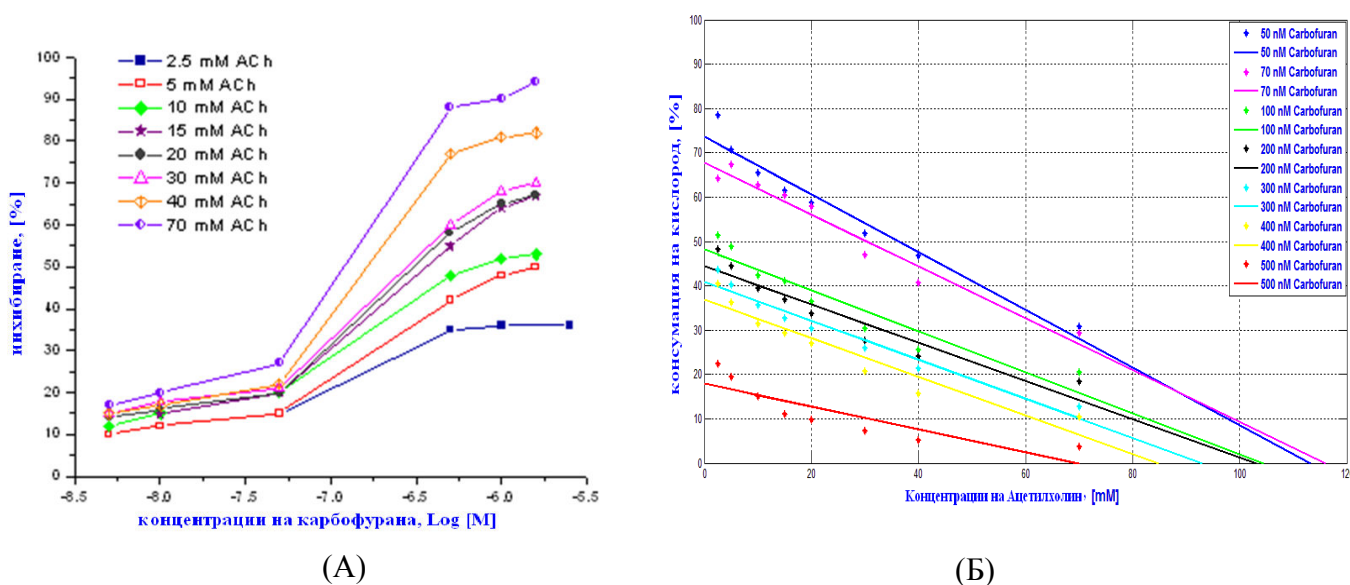
на минимизацията на процеса на масовия пренос, за разлика от методите на имобилизация с адсорбция върху преобразувателя.

Таблица 10. Стойности на инхибиторната константа K_i за различни концентрации на карбофурана за свободна и имобилизирана *AChE* (за *AChE*-*ChO* биосензор)

концентрации на карбофурана, $[M \cdot 10^{-9}]$	K_i MTES $[M \cdot 10^{-6}]$	K_i ETMS $[M \cdot 10^{-6}]$	K_i свободен ензим $[M \cdot 10^{-6}]$
100	-	1.852	0.8709
200	10.37	2.173	0.9515
300	11.88	2.335	1.0670
400	11.79	2.485	1.4827
500	12.58	2.831	1.9886

7.3. Измервания на карбофуран с едновременно имобилизирани *AChE*, *ChO* и *HRP*

За тази стъпка беше избрана най-добрата мембрана (ETMS с CAPH и AA/AN) с мултиензимна система. Съответната стандартна крива за карбофурана при различни концентрации на *ACh* е показана на Фигура 18. Вижда се, че работният диапазон на субстрата е $2.5 \cdot 10^{-3}$ – $30 \cdot 10^{-3}$ M. Фигура 18(A) показва линеен отговор за концентрации на карбофурана в диапазона $5 \cdot 10^{-8}$ – $5 \cdot 10^{-7}$ M в присъствието на различни концентрации на *ACh*. Границата на чувствителност за карбофурана е $1.6 \cdot 10^{-8}$ M. Установено беше, че линейният диапазон е подобен на диапазона ($5 \cdot 10^{-8}$ – $5 \cdot 10^{-7}$ M) на създадения от нас оптичен биосензор с *AChE* и *ChO*, но създаденият *AChE*-*ChO*-*HRP* оптичен биосензор е по-чувствителен към карбофурана, отколкото оптичен биосензор с мултиензимна система *AChE*-*ChO*.



Фигура 18. Калибровъчни криви за карбофуран /А/ и *ACh* /Б/ получена от *AChE*-*ChO*-*HRP* биосензор

Стойностите на K_i за $100 \cdot 10^{-9} M$ карбофуран за имобилизираната и свободната *AChE* са съответно $1.993 \cdot 10^{-6} M$ и $0.9478 \cdot 10^{-6} M$. Може да се види, че свободната *AChE* показва най-ниската стойност за K_i , което означава, че свободната *AChE* притежава по-висок афинитет към карбофурана, отколкото имобилизираната *AChE*.

Таблица 11. Стойности на инхибиторната константа K_i за различни концентрации на карбофурана за свободна и имобилизирана *AChE* (за *AChE-ChO-HRP* биосензор)

концентрации на карбофурана, $[M \cdot 10^{-9}]$	K_i , ETMS $[M \cdot 10^{-6}]$	K_i , свободен ензим $[M \cdot 10^{-6}]$
100	1.993	1.3478
200	2.015	1.6723
300	2.399	2.0916
400	3.514	2.8184
500	4.722	3.4487

Инхибиторните константи, получени отсъздадените оптични биосензори на базата на едновременната имобилизация на ензимите *AChE*, *ChO* и *HRP*, са по-добри от резултатите, получени от Herzsprung et al. [62], които съобщават стойности на K_i , равни на $1.8 \cdot 10^{-6} M$ за разтворимата *AChE* и $0.7 \cdot 10^{-6} M$ за имобилизиран ензим. Нашите резултати показват, че свободната *AChE* показва най-ниска стойност за K_i , което означава, че свободната *AChE* притежава по-висок афинитет към карбофурана. За имобилизираната *AChE* техните K_i стойности намаляват. Това намаление в стойностите на K_i се дължи или на конформационни промени на ензима, водещи до формирането на комплекс инхибитор–ензим, или на характеристиката на различните матрици, свързана с масопреносни процеси.

Математически модел описващ IC_{50} : за карбофуран

Стойностите на IC_{50} за карбофуран, получени от експерименталната работа, са сравнени със стойностите, получениот математическия модел

$$(\text{уравнение: } IC_{50} = \frac{K_i}{[S]} * ([S] + K_m)).$$

Таблица 12. Стойности на IC_{50} от експериментите и решение от модела за карбофуран за едновременно имобилизирани *AChE-ChO-HRP* върху ETMS хибридна мембрана

Ach концентрации, $[M \cdot 10^{-3}]$	IC_{50} , $[M \cdot 10^{-6}]$ експериментални данни	IC_{50} , $[M \cdot 10^{-6}]$ модел
2.5	3.804	2.4407
5	3.182	2.2168
10	2.146	2.1049
15	1.865	2.0676
20	1.004	2.0489

25	0.982	2.0377
30	0.907	2.0303

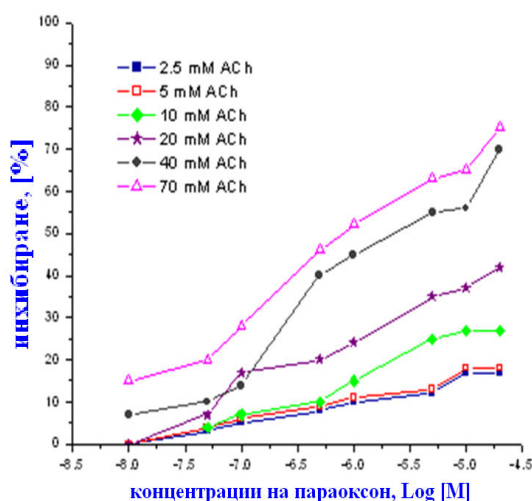
Резултатите, получени от експерименталните и теоретичните методи, бяха сравнени с помощта на прост регресионен анализ. Полученото регресионно уравнение е: $Y = 0.12034 X + 1.8965$, корелация (r) = 0.927, $r^2 = 0.859$. Може да се приеме, че има добра корелация между резултатите от експерименталния метод и изчислените данни от нашия модел.

7.4. Измерване на концентрацията на параоксон като инхибитор с биосензор с едновременно имобилизирани *AChE* и *ChO*

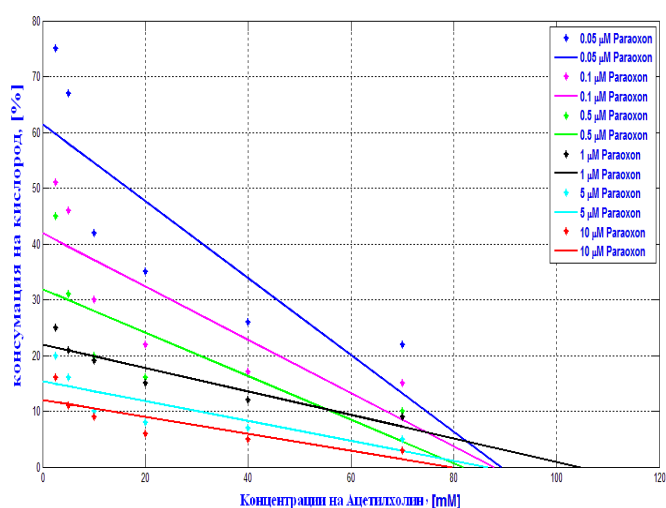
Тази стъпка беше осъществена на два етапа, първият от които е оценка на ефекта на инхибиране според консумацията на кислород, а вторият е ефектът на инхибиране върху активността на ензима. За тази стъпка беше избрана най-добрата мембрана (ETMS с CAPH и AA/AN) с мултиензимна система.

Изследвания за определяне на параоксон:

Съответната стандартна крива за параоксон при различни концентрации на *ACh* е показана на Фигура 19. Вижда се, че работният диапазон на субстрата е $2.5 \cdot 10^{-3}$ – $30 \cdot 10^{-3}$ M. Фигура 19 (А) има S-образна форма и показва линеен отговор за концентрации на параоксона в диапазона $5 \cdot 10^{-7}$ – $5 \cdot 10^{-6}$ M в присъствието на различни концентрации на *ACh*. Границата на определяне (приета за равна на стойността, при която задържането е 10%) за параоксона е $1.5 \cdot 10^{-7}$ M.



(А)



(Б)

Фигура 19. Стандартни криви за параоксон /А/ и *ACh* /Б/ получена от *AChE-ChO* биосензор

Резултатите, получени от инхибиторните константи, показват че параоксонът действа като конкурентен инхибитор върху активността на ензима за свободна и имобилизирана *AChE*. Стойностите на K_i за различни концентрации на параоксон за свободна и имобилизирана *AChE* са показани в Таблица 13. Може да се види, че

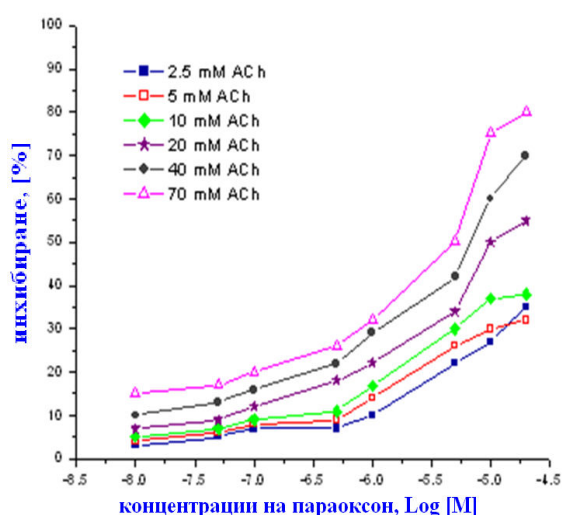
свободната *AChE* показва най-ниска стойност на K_i , което означава, че свободната *AChE* притежава по-висок афинитет към параоксона, отколкото имобилизираната *AChE*.

Таблица 13. Стойности на инхибиторната константа K_i за различни концентрации на параоксон за свободна и имобилизирана *AChE* (за *AChE-ChO* биосензор)

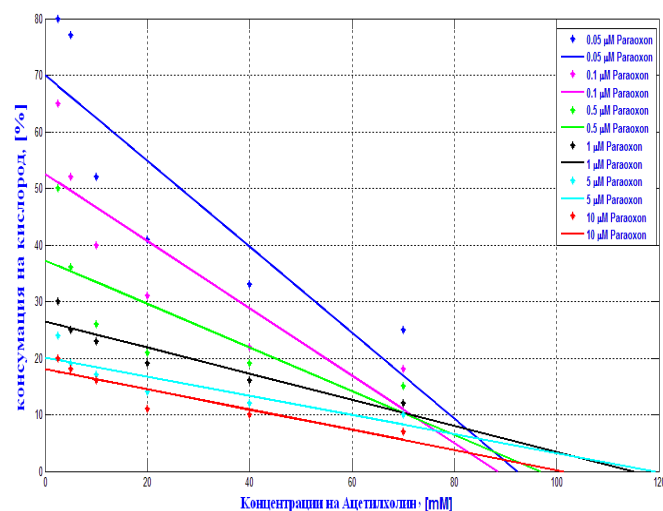
концентрации на параоксон, $[M.10^{-6}]$	K_i , ETMS $[M.10^{-9}]$	K_i , свободен ензим $[M.10^{-9}]$
0.01	2.831	3.57
0.05	5.219	3.991
0.1	5.998	7.39
0.5	21.716	18.461
1.0	37.044	32.729

7.5. Измерване на параоксон като инхибитор с биосензор с едновременно имобилизирани *AChE*, *ChO* и *HRP*

Съответната стандартна крива за параоксон при различни концентрации на *ACh* е показана на Фигура 20. Фигура 20 (А) показва линейен отговор за концентрации на параоксона в диапазона 5.10^{-7} – $5.10^{-6}M$ в присъствието на различни концентрации на *ACh*. Границата на определяне за параоксон е $1.28 \cdot 10^{-7}M$.



(А)



(Б)

Фигура 20. Калибровъчните криви за параоксон /А/ и *ACh* /Б/ получена от *AChE-ChO-HRP* биосензор

Установено беше, че линейният диапазон е подобен на диапазона (5.10^{-7} – $5.10^{-6}M$), съобщен от Narayanaswamy [142], както и на диапазона (8.10^{-7} – $1.5.10^{-6}M$), съобщен от Yotova et al. [107]. Освен това, се вижда че този диапазон е подобен на нашия диапазон,

получен със създадения оптичен биосензор с едновременна имобилизация на *AChE* и *ChO*.

Вижда се, че границата на определяне за *AChE-ChO* биосензора ($1.5 \cdot 10^{-7} M$) и за нашия *AChE-ChO-HRP* биосензор ($1.28 \cdot 10^{-7} M$) е по-висока от границата на детекция за параоксон, получена от Hart et al., която е $1 \times 10^{-8} M$, и по-ниска от границата на детекция, получена от Li et al., която е $1.8 \times 10^{-7} M$.

Може да се направи изводът, че биосензорът с *AChE-ChO-HRP* е по-чувствителен от биосензор с *AChE-ChO* за определяне на параоксонови пестициди.

Стойностите на K_i за различни концентрации на параоксон за свободна и имобилизирана *AChE* са показани в Таблица 14. Може да се види, че свободната *AChE* показва най-ниска стойност на K_i , което означава, че свободната *AChE* притежава по-голям афинитет към параоксона, отколкото имобилизираната *AChE*.

Таблица 14. Стойности на инхибиторната константа K_i за различни концентрации на параоксон за свободна и имобилизирана *AChE* (за *AChE-ChO-HRP* биосензор)

концентрации на параоксон, $[M \cdot 10^{-6}]$	K_i , ETMS $[M \cdot 10^{-9}]$	K_i , свободен ензим $[M \cdot 10^{-9}]$
0.01	3.713	3.981
0.05	5.485	4.025
0.1	9.439	6.971
0.5	35.827	20.231
1.0	52.414	35.817

Сравнена е ефикасността на хидроксиламин и 2-РАМ като реактивиращи реагенти за имобилизираната *AChE*. След третиране на сензорас 2-РАМ, който е често използван реагент за реактивация на органофосфат-инхибирани холинестеразни ензими, беше постигнато значително възстановяване на ензимния сензорен сигнал. Доброто реактивиращо свойство на 2-РАМ се дължи на катйонния център на алдоксима. Тази част може да се свързва към анионната област на инхибиращия ензим, способствайки по този начин за по-лесното и по-близкото взаимодействие между нуклеофилната –ОН -група и фосфорилираната естерна област.

Математически модел за определяне IC_{50} : на параоксон

Стойностите на IC_{50} за параоксон, получени от експерименталната работа, са сравнени със стойностите, получениот математическия модел

$$(\text{уравнение: } IC_{50} = \frac{K_i}{K_m} * ([S] + K_m)).$$

Таблица 15. Стойности на IC_{50} от експериментите и решение от модела за параоксон за едновременно имобилизирани *AChE-ChO-HRP* върху ETMS хибридна мембрана

ACh концентрации, [$M \cdot 10^{-3}$]	IC_{50} , [$M \cdot 10^{-9}$] експериментал ни данни	IC_{50} , [$M \cdot 10^{-9}$] модел
2.5	30.682	20.238
5.0	52.375	36.764
10	62.339	69.815
15	110.621	102.867
20	152.814	135.918
25	160.925	168.970
30	217.331	202.021

Резултатите, получени от експерименталните и теоретичните методи, бяха сравнени с помощта на прост регресионен анализ. Полученото регресионно уравнение е: $Y = 0.9832 X - 5.3245$, корелация (r) = 0.988, $r^2 = 0.975$. Между резултатите от експерименталния метод и изчислените данни от нашия модел има добра корелация.

7.6 Нови пептидсъдържащи съединения като инхибитори на *AChE*

Галантаминът е селективен инхибитор на *AChE* и един от най-често използваните за лечение на пациенти с лека до умерена форма на болестта на Алцхаймер. Затова синтезът на нови пептидсъдържащи съединения, представляващи аналози на галантамина, е много важен. В тази част е изследван ефектът на няколко новосинтезирани галантаминови производни, синтезирани във катедра по Органична химия на в Химикотехнологичен и металургичен университет.

Изследвани са пет нови хибридни съединения, представляващи производни на галантамина. Резултатите показват, че четири от тях (I_9 , I_{11} , I_2 и I_1) имат инхибиращ ефект към ензима *AChE*, но съединение I_3 няма инхибиращ ефект към *AChE* (той има обратен ефект). Затова изследването продължи само с останалите четири инхибитора (I_9 , I_{11} , I_2 и I_1).

Съответните стандартни криви на новите инхибитори I_9 , I_{11} , I_2 и I_1 в присъствието на $7.5 \mu M$ ACh показват линеен отговор за концентрации на инхибитора от $5 \mu M$ до $100 \mu M$, а за концентрации на субстрата от $90 \mu M$ до $3500 \mu M$. Диапазонът на линейност е много широк. Резултатите показват, че всички нови инхибитори действат по конкурентен механизъм върху самостоятелно имобилизирана *AChE* и за *AChE*, имобилизирана с *ChO* в мултиензимна система.

Стойностите на IC_{50} за новите пептидни инхибитори са показани на Таблица 16.

Таблица 16. Стойности на IC_{50} за новите пептидни
инхибитори съединения

№ на инхибиторни	код на инхибиторни	Брутна формула	съединение	IC_{50} , [$M \cdot 10^{-6}$]
1	I ₉	C ₄₇ H ₇₂ N ₈ O ₁₂	Boc-Val-Asn-Leu-Ala-Val-Gly-OGal	39.11
2	I ₁₁	C ₄₂ H ₆₃ N ₇ O ₁₁	Boc-Val-Asn-Leu-Ala-Gly-OGal	34.46
3	I ₂	C ₅₀ H ₆₉ N ₇ O ₁₃	Boc-Asp-(norGal)-Asp-Leu-Ala-Val-NH-Bzl	38.30
4	I ₁	C ₅₀ H ₆₉ N ₇ O ₁₃	Boc-Asp-(norGal)-Asp-Leu-β-Ala-Val-NH-Bzl	40.70
5	I ₃	C ₅₅ H ₇₉ N ₉ O ₁₃	Boc-Asp-(norGal)-Val-Asn-Leu-β-Ala-Val-NH-Bzl	-

Стойностите на IC_{50} за новите инхибитори I₉, I₁₁, I₂ и I₁ за самостоятелно имобилизирана *AChE* върху *ETMS* и *MTES* хибридни мембрани са представени в Таблица 17. Тези стойности са получени от експерименталната работа и са сравнени с данните, получени от решаването на математическия модел.

$$(\text{уравнение: } IC_{50} = \frac{K_i}{K_m} * ([S] + K_m)).$$

Таблица 17. Стойности на IC_{50} за новите инхибитори I₉, I₁₁, I₂ и I₁ за
индивидуално имобилизирана *AChE* върху *ETMS* и *MTES*
хибридни мембрани

код на инхибиторни	Ach концентрации, [$M \cdot 10^{-6}$]	IC_{50} , [$M \cdot 10^{-6}$] експерименталн а, ETMS	IC_{50} , [$M \cdot 10^{-6}$] модел, ETMS	IC_{50} , [$M \cdot 10^{-6}$] експерименталн а, MTES	IC_{50} , [$M \cdot 10^{-6}$] модел, MTES
I ₉	90	88.7937	22.1292	47.8343	10.4596
	500	87.4481	27.0579	58.1624	19.1765
	1000	103.551	53.1028	29.9289	15.0881
	2000	132.927	92.2748	43.4199	39.1599
	3000	158.424	148.1922	51.2500	60.6516
I ₁₁	90	71.2084	17.0934	77.5518	15.2477
	500	69.2061	21.0690	74.7308	22.9011
	1000	71.5299	28.4156	81.3531	39.8696
	2000	73.6920	44.8313	74.6748	54.8049
	3000	80.9059	63.9222	88.6576	91.0620
I ₂	90	81.8367	24.1802	85.5129	14.2858
	500	75.5337	27.0631	80.7281	21.1961
	1000	82.9159	40.4425	89.7492	37.8817
	2000	100.006	64.5831	86.1943	59.5844
	3000	105.562	86.1657	91.1600	88.9068
I ₁	90	60.30726	15.2914	80.2089	14.0608
	500	57.9008	18.7868	83.9595	26.2145
	1000	63.2767	28.4457	85.6181	38.9688
	2000	83.1209	53.2892	100.754	75.6287
	3000	114.927	94.5845	90.9693	97.2191

Стойностите на IC_{50} за новите пептидни инхибитори за самостоятелно имобилизира на *AChE* върху ETMS хибридни мембрани, получени от експерименталната работа, и данните, изчислени от нашия математически модел, бяха сравнени с помощта на прост регресионен анализ. Корелацията, получена за I_9 е: $r = 0.995$. Корелацията, получена за I_{11} е: $r = 0.942$, за I_2 е: $r = 0.963$, I_1 е: $r = 0.995$.

Между резултатите от експерименталния метод и данните, изчислени от нашия математически модел, съществува добра корелация.

Стойностите на IC_{50} за новите пептидни инхибиторни съединения за индивидуално имобилизира на *AChE* върху MTES хибридни мембрани, получени от експерименталната работа и данните, изчислени от нашия математически модел, бяха сравнени с помощта на прост регресионен анализ. Корелацията, получена за I_9 е: $r = 0.239$. Корелацията, получена за I_{11} е: $r = 0.7501$. Корелацията, получена за I_2 е: $r = 0.696$. Корелацията, получена за I_1 е: $r = 0.782$.

Между резултатите, получени от експерименталния метод и данните, изчислени от нашия математически модел за инхибитори I_{11} и I_1 , съществува добра корелация.

Стойностите на IC_{50} за новите инхибитори I_9 , I_{11} , I_2 и I_1 за имобилизирани *AChE-ChO* върху ETMS и MTES хибридни мембрани са показани в Таблица 18. Тези стойности са получени от експерименталната работа и са сравнени със стойностите, получени от математическия модел.

Таблица 18. Стойности на IC_{50} за новите инхибитори I_9 , I_{11} , I_2 и I_1 за имобилизирани *AChE-ChO* върху ETMS и MTES хибридни мембрани.

код на инхибиторни	Ach концентрации, $[M \cdot 10^{-6}]$	IC_{50} , $[M \cdot 10^{-6}]$ експериментално, ETMS	IC_{50} , $[M \cdot 10^{-6}]$ модел, ETMS	IC_{50} , $[M \cdot 10^{-6}]$ експериментално, MTES	IC_{50} , $[M \cdot 10^{-6}]$ модел, MTES
I_9	90	42.9382	16.2425	36.3363	4.788
	500	44.8816	22.0652	25.2562	5.644002
	1000	57.5844	33.3235	29.2095	9.52752
	2000	74.5075	55.6741	44.2745	39.1592
	3000	57.8062	62.1867	68.2169	67.7626
I_{11}	90	44.0371	16.3653	72.5813	26.886
	500	36.5106	17.4532	71.5808	38.865
	1000	47.5958	29.6701	79.5728	69.975
	2000	60.2578	48.8378	73.2043	76.321
	3000	74.9407	69.4024	92.0360	121.721
I_2	90	99.4745	27.4050	41.3167	12.2317
	500	126.136	47.0392	48.1478	35.6453
	1000	107.051	54.6372	82.6020	70.7369
	2000	106.5018	76.0072	82.4890	95.5814

	3000	122.074	105.7866	42.1713	66.2069
I_1	90	48.7335	13.1703	63.0561	18.3872
	500	39.2251	12.4076	68.1939	36.9185
	1000	40.8979	18.0841	42.0213	29.1515
	2000	54.8815	35.8842	21.1993	23.9036
	3000	67.5580	53.0606	48.5312	69.0241

Стойностите на IC_{50} за новите пептидни инхибитори за имобилизирани *AChE-ChO* върху ETMS хибридни мембрани, получени от експерименталната работа и данните, изчислени от нашия математически модел, бяха сравнени с помощта на прост регресионен анализ. Получените корелации са както следва: за I_9 : $r = 0.802$; за I_{11} : $r = 0.98$; за I_2 : $r = 0.459$ и за I_1 : $r = 0.932$.

Между резултатите, получени от експерименталния метод и данните, изчислени от нашия математически модел за инхибитори I_9 , I_{11} и I_1 , съществува добра корелация.

Стойностите на IC_{50} за новите инхибитори за имобилизирани *AChE-ChO* върху MTES хибридни мембрани, получени от експерименталната работа и данните, изчислени от нашия математически модел, бяха сравнени с помощта на прост регресионен анализ. Получените корелации са, съответно: за I_9 : $r = 0.953$; за I_{11} : $r = 0.888$; за I_2 : $r = 0.758$ и за I_1 : $r = 0.093$.

Между резултатите, получени от експерименталния метод и данните, изчислени от нашия математически модел за инхибитори I_9 , I_{11} и I_2 , съществува добра корелация. Данните от тези статистически изчисления потвърждават точността на предложения модел.

Стойностите на K_i при различни концентрации на новите инхибитори за имобилизирана *AChE* са показани в Таблица 19. Резултатите показват, че всички съединения I_9 , I_{11} , I_2 и I_1 действат като конкурентен инхибитор за самостоятелно имобилизираната *AChE* и съвместно имобилизираните *AChE-ChO*. Може да се види, че имобилизираната *AChE* върху ETMS хибридна мембрана показва най-ниска стойност на K_i както за самостоятелно имобилизираната *AChE*, така и за *AChE*, имобилизирана с *ChO*. Това означава, че имобилизираната *AChE* върху ETMS матрици притежава по-висок афинитет към всички нови инхибиторни съединения I_9 , I_{11} , I_2 и I_1 , отколкото имобилизираната *AChE* върху MTES хибридна мембрана. Това се дължи основно на ковалентната имобилизация и наминимизирането на процеса на масов пренос, за разлика от MTES матриците. То може да се дължи и на структурни промени в ензима, водещи до формирането на комплекс инхибитор–ензим, или на характеристиките на различните матрици.

Таблица 19. Стойности на K_i за различни нови концентрации на инхибитори за имобилизирана *AChE*

код на инхибиторни	инхибитор концентрация, $[M \cdot 10^{-6}]$	K_i , MTES(AChE, ChO), $[M \cdot 10^{-6}]$	K_i , ETMS (AChE, ChO), $[M \cdot 10^{-6}]$	K_i , MTES (AChE), $[M \cdot 10^{-6}]$	K_i , ETMS (AChE), $[M \cdot 10^{-6}]$
I₉	5	0.46740	0.29920	41482	0.20439
	25	2.98680	2.08507	2.28114	1.13691
	50	8.68655	6.04963	5.46817	3.31031
	75	13.1731	12.27632	8.72065	6.97306
I₁₁	5	0.30761	0.25732	0.21175	0.21670
	25	1.78420	2.00128	1.43737	1.39134
	50	4.65175	6.76940	3.36793	3.52915
	75	10.35248	18.1817	9.52302	7.93791
I₂	5	0.71826	0.25448	0.26209	0.24060
	25	4.13814	1.48528	1.51692	1.31599
	50	8.85843	3.40922	4.79799	3.98388
	75	24.07492	6.03096	6.96592	6.80375
I₁	5	0.95686	0.32380	0.45624	0.24435
	25	7.24132	2.29490	3.85745	1.89315
	50	13.88548	4.92506	5.62258	5.25822
	75	26.51436	8.77783	9.28964	11.32210

ИЗВОДИ

1- Изследването на имобилизацията на *GOx* може да се обобщи както следва:

- 1- Ензимът *GOx* беше използван като моделен ензим за избор на подходящи хибридни мембрани за оптичните биосензори.
- 2- Характеристиките на имобилизирания *GOx* ензим върху различни матрици показаха, че хибридната мембрана ETMS с CAB и AA/AN има голям потенциал за имобилизация. Имобилизираният върху нея ензим притежава най-високата относителна активност (75.28%).

2- Изследването на имобилизацията на *HRP* може да се обобщи както следва:

- 1- Потвърдено беше, че активността на *HRP* също зависи от вида на хибридните мембрани.
- 2- Характеристиките на индивидуално имобилизирания *HRP* ензим върху новите хибридни мембрани показаха промяна в оптималните стойности на рН (от рН 5.5 до рН 6.5) и на температурата (от 30°C до 40°C) в сравнение със свободния ензим (рН 6, температура 35°C).
- 3- Разликата в оптималните стойности на рН и на температурата за различните видове мембрани в сравнение със свободния ензим се дължеше на влиянието на матрицата. От тези резултати може да се предположи, че хибридните материали подобряват стабилността на ензима.
- 4- Установихме, че най-добрата хибридна мембрана с най-висока относителна активност (89.74 %) за *HRP* е ETMS с CAPH и AA/AN, и тя е подходяща за конструиране на биосензорите.

3- Изследването на имобилизацията на *AChE* може да се обобщи както следва:

- 1- Характеристиките на индивидуално имобилизираната *AChE* върху хибридни мембрани показаха, че няма промяна в оптималната стойност на рН и на температурата в сравнение със свободния ензим.
- 2- Изследвайки каталитичните свойства на свободен и имобилизиран ензим, беше установено, че ETMS с CAPH и AA/AN мембрана е най-добрата система за създаване на оптични биосензори. Тя притежава най-високата относителна активност (85.80 %) за *AChE*.
- 3- Изчислените стойности на K_m за имобилизирана *AChE* бяха от два до четири пъти ($K_m = 6.542 \cdot 10^{-4} M$ за ETMS-CAPH-AA/AN; $K_m = 8.178 \cdot 10^{-4} M$ за MTES-CAPH-AA/AN; $K_m = 5.617 \cdot 10^{-4} M$ за ETMS-CAPL-AA/AN; $K_m = 13.340 \cdot 10^{-4} M$ за MTES-CAPL-AA/AN хибридни мембрани) по-високи, отколкото за свободна ензим ($K_m = 3.412 \cdot 10^{-4} M$).

4- Изследването на имобилизацията на *ChO* може да се обобщи както следва:

- 1- Характеристиките на индивидуално имобилизирания *ChO* върху хибридни мембрани показаха, че няма промяна в оптималните стойности на рН и на температурата в сравнение със свободния ензим.
- 2- Изследвайки каталитичните свойства на свободен и имобилизиран ензим, беше установено, че ETMS с CAPH и AA/AN мембрана е най-добрата система за създаване на оптични биосензори. Тя притежава най-високата относителна активност (72.96 %) за *ChO*.

- 3- Изчислените стойности на K_m за имобилизиран *ChO* бяха над десет пъти ($K_m = 25.51 \cdot 10^{-3} M$ for ETMS-CAPH-AA/AN; $K_m = 56.48 \cdot 10^{-3} M$ for MTES-CAPH-AA/AN) по-високи, отколкото за свободна ензим ($K_m = 2.95 \cdot 10^{-3} M$). Това увеличение в стойностите на K_m може да се дължи на структурни промени в ензима.

5- Изследването на параметрите и характеристиките на създадените оптико-влакнести биосензори може да се обобщи както следва:

- 1- Нашите изследвания показват, че флуоресцентният оптичен биосензор за кислородни измервания е по-подходящ за различни цели от изследваните по-рано електрохимични биосензори, поради гъвкавия им дизайн и предаване на сигнала. Оптичните биосензори имат предимства от гледна точка на времето за отговор, разходите на реагенти и размерите им.
- 2- Създаденият оптичен биосензор на базата на едновременна имобилизация на *AChE* и *ChO* ензими върху нова хибридна мембрана показва висока стабилност (25 дни), кратко време за отговор (90 s) и широк линейен диапазон на ACh ($2.5 \cdot 10^{-3} - 30 \cdot 10^{-3} M$) както за кислородния оптичен биосензор, така и за оптичния биосензор във видимата област. Може да се направи изводът, че този биосензор предлага добра точност и възпроизводимост на измерванията.
- 3- Нашите изследвания дават възможност за създаването на добър оптичен биосензор за измерване във видимия диапазон чрез едновременна имобилизация на ензима *HRP* с ензимите *AChE* и *ChO*. Тази мултиензимна система подобрява чувствителността на биосензора и повишава неговата оперативна стабилност.
- 4- Създаденият оптичен биосензор на базата на едновременна имобилизация на ензимите *AChE*, *ChO* и *HRP* върху нова хибридна мембрана показва висока стабилност (34 дни), кратко време за отговор – 120 s за кислороден оптичен биосензор 100 s, за биосензор във видимата област, и широк линейен диапазон на ACh ($2 \cdot 10^{-3} - 30 \cdot 10^{-3} M$). От статистическата обработка на резултатите може да се направи изводът, че този биосензор предлага добра точност и възпроизводимост на измерванията.

6- Извеждането на математическия модел на времето за отговор на оптичния биосензор може да се обобщи както следва:

- 1- Според уравнението на изследвания модел, времето за отговор зависи от различни параметри, като коефициент на дифузия на субстрата, дебелина на мембраната, кинетични параметри на ензима и начална концентрация на субстрата.
- 2- Установена беше добра корелация между експерименталните резултати и данните, изчислени от нашия модел. Данните от всички статистически изчисления потвърдиха точността на предложения модел за биосензор 1 и биосензор 2.
- 3- В резултат от изчисляването на числото на Дамкьолер (D_a) от експерименталните данни беше намерена стойността $D_a = 5.775$. Тази стойност на D_a е по-висока от стойността в режим на кинетичен контрол, но е под тази стойност на критерия за масообменен контрол. Освен това, степента на конверсия на субстрата, получена от тази стойност е $X = 85\%$. Може да се приеме, че съществува подходяща степен на конверсия за

измерване, съобразена с времето за отговор. Тези резултати ние получихме с подходяща мембрана с необходимата дебелина за създаване на оптичен биосензор с високо бързодействие.

7- Изследване на карбофурана, като инхибитор на едновременно имобилизираните ензими може да се обобщи както следва:

- 1- Измерванията на инхибирането с карбофуран, като представител на карбаматните пестициди се оказаха успешни.
- 2- Стандартните криви за карбофуран показаха линеен отговор в диапазона на концентрации ($5 \cdot 10^{-8}$ – $5 \cdot 10^{-7} M$) за биосензора с AChE-ChO и за биосензора с AChE-ChO-HRP.
- 3- Границата на определяне за карбофуран, измерена при $I_{10}\%$, беше $2.1 \cdot 10^{-8} M$, за биосензора с AChE-ChO и $1.6 \cdot 10^{-8} M$ за биосензора с AChE-ChO-HRP.
- 4- Регенерацията на карбамат-инхибирания ензим беше проста и изискваше само третиране с разтвор на субстрата.

8- Изследването на параоксона като инхибитор на едновременно имобилизираните ензими може да се обобщи както следва:

- 1- Измерванията на инхибирането с помощта на параоксон, като представител на органофосфатните пестициди се оказаха успешни.
- 2- Стандартните криви за параоксон показаха линеен отговор в диапазона на концентрации ($5 \cdot 10^{-7}$ – $5 \cdot 10^{-6} M$) за биосензора с AChE-ChO и за биосензора с AChE-ChO-HRP.
- 3- Границата на определяне за параоксон, измерена при $I_{10}\%$, беше $1.5 \cdot 10^{-7} M$ за биосензора с AChE-ChO и $1.28 \cdot 10^{-7} M$ за биосензора с AChE-ChO-HRP.
- 4- Беше сравнена ефикасността на хидроксиламин и 2-РАМ като реактивирани агенти за фосфорилиран AChE биосензор. Беше установено, че регенерацията с помощта на 2-РАМ е по-добра от регенерацията с помощта на хидроксиламин. Това може да се установи по по-доброто нуклеофилно действие на оксима в сравнение с хидроксиламина.

9- Изследването на новите пептидни инхибиторни съединения, като инхибитор за едновременно имобилизирани ензими може да се обобщи както следва:

- 1- Измерванията на инхибирането с помощта на новите пептидни инхибиторни съединения, които са производни на галантамина, се оказаха успешни.
- 2- Те могат да помогнат за лечението на болестта на Алцхаймер. Те инхибират успешно ензима AChE.
- 3- Стандартните криви на всички тези инхибитори показаха линеен отговор в диапазона на концентрации ($5 \cdot 10^{-6}$ – $100 \cdot 10^{-6} M$) за биосензора с AChE-ChO.

В заключение, може да се каже, че създадените биосензори на основата на оптични влакна предлагат добра точност, чувствителност, оперативна стабилност, възпроизводимост и линейност на измерванията и че получените нови хибридни мембрани и метод на имобилизация могат да се прилагат успешно за измерване на пестициди.

Приноси

- 1- Създадени са нови хибридни мембрани на основат на етилтриметоксисилан-целулозен ацетат пропионат с висока молекулна маса - съполимер на акрилонитрил с акриламид, които са най – подходящи за имобилизация.
- 2- Имобилизирани са ковалентно поотделно и съвместно ензимите ацетилхолинестераза, холиноксидаза и пероксидаза, които показват висока относителна активност, съответно за AChE (85,80 %), ChO (72.96%) и HRP (89.74%), изследвани са и рН, t оптимум и кинетични параметри на новите биокатализатори системи.
- 3- Получените ковалентно свързани ензимни системи върху новите хибридни мембрани са приложени за създаването на биосензори с оптични влакна за измерване на пестициди.
- 4- Изведен е математически модел, описващ режим на действие на оптичните биосензори, като същевременно е направена и статистическа оценка на резултатите от измерванията.
- 5- Определени са инхибиторните константи на действието на органофосфатни пестициди и новосинтезирани инхибитори на ацетилхолинестераза в свободно и имобилизирано състояние.
- 6- Определена е ефикасността на реактивиращи агенти, като хидродксиламин и 2-пиридиналдоксимметилйодид /2-РАМ/ върху фосфолирана ацетилхолинестераза, имобилизирана върху мембрана за биосензор. Установено е, че по- добро действие, като нуклеофилен реагент няма 2- РАМ.

Части от дисертацията са използвани в следните научни списания:

- 1- Lyubov Yotova, Nourelhoda Medhat. Optical Biosensor with Multienzyme System Immobilized onto Hybrid Membrane for Pesticides Determination, International Journal of Bioautomation journal, Vol. 15(4), 2011.
- 2- Lyubov Yotova, Nourelhoda Medhat. Coimmobilization of Acetylcholinesterase and Choline Oxidase on New Nanohybrid Membranes Obtained by Sol Gel Technology, Biotechnology and Biotechnological equipment, Vol. 26(3), 2012; **IF-0.503**.

И доклади:

- 1- Nourelhoda Medhat, Lyubov Yotova. Using sol gel techniques for synthesis of hybrid membranes for optical biosensors: studying parameters for peroxidase, the 8th Scientific poster session for young scientist - 2011, University of Chemical Technology and Metallurgy, Sofia, Bulgaria.
- 2- Nourelhoda Medhat, Spaska Yaneva, Lyubov Yotova, Studying properties of glucose oxidase immobilized onto sol-gel hybrid membranes, the 8th Scientific poster session for young scientist - 2011, University of Chemical Technology and Metallurgy, Sofia, Bulgaria.
- 3- Amany Fathy, Nourelhoda Medhat, Lyubov Yotova. Sol-gel hybrid membranes for optical biosensors, the 8th Scientific poster session for young scientist – 2011, University of Chemical Technology and Metallurgy, Sofia, Bulgaria.
- 4- Nourelhoda Medhat, Lyubov Yotova. Synthesis of Hybrid Membranes Using Sol Gel Techniques, Suitable for Optical Biosensor, the International Workshop "Implementation of Nanomembrane Technology in The Pharmaceutical Industry", 9th to 10th September 2011, Sofia, Bulgaria, Supported by the European Commission Under grant Agreement: IAPP-GA-2008-218068.
- 5- Nourelhoda Medhat, Lyubov Yotova. Detection of Pesticides Residues Using Optical Biosensor, Fifth Balkan Conference on Glass Science & Technology and 17th – Conference on Glass and Ceramics, 25 – 29 September, 2011, Nessebar, Bulgaria.