

Московский государственный университет
имени М.В.Ломоносова
Биологический факультет
Институт теоретической и экспериментальной биофизики
Российской академии наук

На правах рукописи

Ким Александр Леонидович



**Разработка биосенсоров на основе фермент-содержащих
полиэлектролитных микрокапсул**

1.5.6. Биотехнология

ДИССЕРТАЦИЯ

на соискание ученой степени кандидата биологических наук

Научный руководитель:
кандидат биологических наук
Тихоненко Сергей Алексеевич

Москва – 2023

Оглавление

Оглавление	2
Введение	4
I. Обзор литературы	12
1. Биохимические методы анализа	12
1.1. Анализируемые вещества	12
1.2. Ферментативные методы анализа	14
1.2.1. Методы с использованием свободного фермента	15
1.2.2. Методы с использованием иммобилизованных ферментов	19
2. Полиэлектролитные микрокапсулы	24
2.1. Применение микрокапсул в качестве диагностических систем	26
2.2. Диагностические системы на базе инкапсулированных ферментов	26
3. Механизмы образования полиэлектролит-белкового комплекса	32
3.1. Теория регулирования заряда и теория анизотропии заряда	32
4. Термодинамика полиэлектролит-белковых взаимодействий	35
4.1. Линейные полиэлектролиты	35
4.2. Полиэлектролит-белковые взаимодействия при иммобилизации белков	36
II. Материалы и методы	38
III. Результаты и обсуждения	44
1. Разработка диагностической системы для определения концентрации мочевины на основе иммобилизованной на пластине инкапсулированной уреазы	44
2. Изучение влияния полиэлектролитов на каталитические свойства алкогольдегидрогеназы	51
2.1. Влияние полиаллиламина на активность и конформационные свойства алкогольдегидрогеназы	52
2.2. Влияние полистиролсульфоната на активность алкогольдегидрогеназы	58
2.2.1. Флуоресцентные свойства комплекса ПСС-АДГ	58
2.2.2. Влияние полистиролсульфоната натрия на каталитическую активность алкогольдегидрогеназы	59
2.2.3. Влияние солей на свойства АДГ в комплексе с ПСС	60
3. Разработка диагностической системы для определения концентрации этанола на базе инкапсулированной алкогольдегидрогеназы	63

3.1. Сравнение каталитических характеристик свободной и инкапсулированной алкогольдегидрогеназы.....	64
3.2. Определение аналитических характеристик диагностической системы для определения концентрации этанола на базе инкапсулированной алкогольдегидрогеназы	65
4. Разработка биосенсора на основе инкапсулированной глюкозооксидазы, иммобилизованной на поверхности амперометрического матричного электрода, покрытого берлинской лазурью.	68
4.1. Изучение влияния полиэлектролитов на каталитические характеристики глюкозооксидазы.....	69
4.2. Формирование глюкозного биосенсора на базе инкапсулированной глюкозооксидазы.....	70
4.3. Каталитические характеристики инкапсулированной глюкозооксидазы	71
4.4. Применение биосенсоров для определения глюкозы в образцах напитков	79
5. Модификация углеродными многослойными нанотрубками глюкозного биосенсора на базе инкапсулированной в полиэлектролитные микрокапсулы глюкозооксидазы.....	82
5.1. Каталитические характеристики модифицированного УМНТ глюкозного биосенсора.	83
IV. Заключение	88
V. Выводы.....	89
VI. Список литературы:	90

Введение

Актуальность темы исследования и степень ее разработанности.

Для обеспечения контроля качества пищевой продукции, постановки диагноза пациента и мониторинга его состояния необходима информация о составе анализируемой пробы и концентрации входящих в нее аналитов, в частности, таких как мочевины, этанол и глюкоза. В настоящий момент для определения концентраций этих веществ широко используют энзимологические методы анализа (Bisswanger, 2014). Однако такие методы имеют ряд недостатков: неоднозначность анализа в присутствии протеаз, относительно небольшое время хранения фермента в растворе, однократное использование фермента и т.д.

Применение методов иммобилизации ферментов при создании диагностических систем позволяют устранить указанные недостатки (Mohamad et al., 2015). Один из таких методов - включение фермента в гель, который широко распространен благодаря своей относительной простоте в изготовлении и невысоким денежным затратам (Sharma et al., 2010). Однако биосенсоры, полученные подобным способом, обладают небольшим сроком хранения из-за неустойчивости гелевой матрицы (Imam et al., 2021).

Другим распространенным методом является иммобилизация молекул фермента между полиэлектролитными мультислоями на поверхности твердых тел произвольной формы (Decher et al., 1992; Shchukin et al., 2004). Биосенсоры, разработанные на основе этого способа иммобилизации, обладают более длительным сроком хранения, т.к. полиэлектролитные мультислои, в отличие от гелевой матрицы, обладают большей устойчивостью (Hoogeveen et al., 1996; de Grooth et al., 2015). Одним из недостатков данной технологии является относительно невысокое содержание молекул иммобилизованного фермента на единицу площади покрытия (Shchukin et al., 2004).

Одним из возможных путей решения этой проблемы является инкапсуляция ферментов в полиэлектролитные микрокапсулы (ПМК). Такие капсулы получают

путем поочередной адсорбции противоположно заряженных полиэлектролитов на коллоидную частицу с последующим ее удалением (Donath et al., 1998). Данные микрокапсулы имеют диаметр от 0,5 до 10 мкм, обладают полупроницаемой оболочкой, состав и толщину которой можно контролировать (Maуа et al., 2003; Shenoy et al., 2003; Sukhorukov et al., 2005).

Львов и соавторы одни из первых продемонстрировали возможность инкапсулирования ферментов в полиэлектролитные микрокапсулы (Lvov et al., 2001). Они инкапсулировали уреазу в полиэлектролитные микрокапсулы состава (ПСС/ПАА)₄ с сохранением активности фермента. В дальнейшем идея инкапсулировать ферменты в полиэлектролитные микрокапсулы получила свое продолжение в виде создания диагностических систем на их основе: микродиагностикум на основе инкапсулированной уреазы и ЛДГ (Сухоруков и др., 2006); биосенсор на основе инкапсулированной уреазы, иммобилизованной на поверхности рН-электрода (Терновский и др., 2007); полиэлектролитный уреазный микродиагностикум с седиментационной системой регистрации (Дубровский и др., 2017); биосенсор на основе инкапсулированных ферментов с флуоресцентной системой регистрации (Kazakova et al, 2011), (Kazakova et al, 2013); биосенсор на основе ПМК с инкапсулированной уреазой и парамагнитными частицами Fe₃O₄ и рН-чувствительного полевого транзистора (Решетилов и др., 2015).

Использование в диагностических системах инкапсулированных в ПМК ферментов имеет ряд преимуществ. Так, Сухоруковым с соавт. показано, что инкапсулированная уреазы сохраняет свою активность более полугода, в то время как нативный фермент - всего неделю; при этом белок не был подвержен негативному воздействию протеаз, находящихся в растворе (Сухоруков и др., 2007). Кроме того, инкапсулированный фермент может быть использован повторно. В частности, в работе Монтреля М.М. с соавторами была показана диагностическая система на основе ПМК, иммобилизованных на поверхности рН-электрода, который может быть использован повторно (Монтрель и др., 2006).

Несмотря на то, что диагностические системы на основе полиэлектролитных микрокапсул были предложены около 20 лет назад, возможности этих систем до конца не раскрыты. В частности, расширение спектра инкапсулированных ферментов позволит увеличить количество анализируемых субстратов, а использование различных способов регистрации аналитического сигнала позволит получить диагностические системы с новыми уникальными характеристиками. В связи с этим создание диагностических систем на основе инкапсулированных ферментов в полиэлектролитные микрокапсулы представляет перспективное направление исследований.

Цель и задачи работы. Целью настоящей работы является разработка диагностических систем на основе ферментов, инкапсулированных в полиэлектролитные микрокапсулы, для определения концентрации глюкозы, этанола и мочевины.

Для достижения указанной цели были поставлены следующие задачи:

1. Разработать многократную диагностическую систему для определения концентрации мочевины на основе иммобилизованной на пластине инкапсулированной уреазы со спектрофотометрическим методом регистрации и продемонстрировать возможность ее практического применения.
2. Изучить влияние полиэлектролитов полистиролсульфоната (ПСС) и полиаллиламина (ПАА) на каталитические характеристики АДГ.
3. Разработать многократную диагностическую систему для определения концентрации этанола на основе инкапсулированной алкогольдегидрогеназы со спектрофотометрическим методом регистрации и продемонстрировать возможность ее практического применения.
4. Разработать биосенсор на основе инкапсулированной глюкозооксидазы, иммобилизованной на поверхности амперометрического матричного

электрода, покрытого берлинской лазурью, и продемонстрировать возможность его практического применения.

5. Увеличить чувствительность разработанного биосенсора на основе инкапсулированной глюкозооксидазы, иммобилизованной на поверхности амперометрического матричного электрода, покрытого берлинской лазурью, за счет его модификации мультислойными углеродными нанотрубками. Определить его диагностические характеристики.

Объектами исследования являлись ферменты алкогольдегидрогеназа, глюкозооксидаза и уреазы в свободном и инкапсулированном состоянии, а также диагностические системы, разработанные на их основе.

Предметом исследования являлось определение функциональных характеристик диагностических систем и биосенсоров на основе ферментов алкогольдегидрогеназа, глюкозооксидаза и уреазы, инкапсулированных в полиэлектролитные микрокапсулы.

Научная новизна работы.

Разработана диагностическая система на основе инкапсулированной уреазы, иммобилизованной на поверхности кварцевой пластины, со спектрофотометрическим методом регистрации. Полученная диагностическая пластина позволяет многократно определять концентрацию мочевины в диапазоне от 3 до 40 мМ.

Впервые изучено влияние полиэлектролитов полиаллиламина и полистиролсульфоната на алкогольдегидрогеназу. Показано незначительное снижение активности АДГ в присутствии ПСС, которое нивелируется добавлением в реакционную смесь хлорида натрия (0.2 М) или сульфата аммония (0.1 М).

Показано, что полиаллиламин ингибирует активность алкогольдегидрогеназы. Установлено, что с увеличением концентрации хлорида натрия (более 100 мМ) снимается ингибирующее воздействие ПАА на АДГ за счет электростатического

экранирования поверхностных зарядов фермента ионами соли. Сульфат аммония в низких концентрациях (5 мМ) снимает ингибирующее воздействие ПАА на АДГ.

В дальнейшем была разработана диагностическая система для определения концентрации этанола на основе инкапсулированной алкогольдегидрогеназы со спектрофотометрическим методом регистрации.

Разработана диагностическая система на основе инкапсулированной глюкозооксидазы, иммобилизованной на поверхности амперометрического матричного электрода, покрытого берлинской лазурью. Разработанная система была использована для анализа глюкозы в реальных образцах сока и показана высокая корреляция данных, полученных предложенным и стандартным методом измерения глюкозы.

Увеличена чувствительность разработанного глюкозного биосенсора за счет его модификации мультислойными углеродными нанотрубками, коэффициент чувствительности биосенсора увеличился с 0,05 $\mu\text{A}/\text{мМ}$ до 0,94 $\mu\text{A}/\text{мМ}$.

Теоретическая и практическая значимость работы. В данной работе исследовано влияние полиэлектролитов полиаллиламина и полистиролсульфоната на активность алкогольдегидрогеназы и глюкозооксидазы. Полученные результаты имеют важное теоретическое значение, так как расширяют знания о влиянии полиэлектролитов на биологические макромолекулы и механизмах ингибирования ферментов. Полученные данные могут быть использованы в биотехнологических и медицинских исследованиях, связанных с влиянием полиэлектролитов на биологические системы.

В результате исследования были разработаны диагностические системы для определения концентрации этанола, мочевины и глюкозы в растворах. Полученные системы обладают высокой чувствительностью и точностью определения, а также позволяют многократно проводить анализы в широком диапазоне концентраций. Применение полиэлектролитных капсул для иммобилизации ферментов значительно увеличивают срок службы биосенсоров, что делает их применение

более экономически выгодным. Разработанные системы могут найти применение в медицинской диагностике, контроле качества продуктов питания и других областях, где требуется быстрое и точное определение концентрации соединений в растворах.

Методология и методы исследования. Выбор ферментов для инкапсулирования был обусловлен их востребованностью в качестве биоселективного элемента при разработке диагностических систем. В работе для инкапсулирования ферментов использовался один из двух методов: метод копреципитации (Petrov et al., 2008) и метод адсорбции (Kochetkova et al., 2013). Для формирования полиэлектролитных микрокапсул в качестве микроматриц использовали микросферолиты карбоната кальция (Antipov et al., 2003). Для формирования оболочки ПМК использовали полиэлектролиты полиаллиламин и полистиролсульфонат. Активность ферментов определяли спектрофотометрическими (Guru and Taranath Shetty, 1990; Van Staden and Taljaard, 1997) и амперометрическими методами (Karyakin et al., 1994). Для закрепления полиэлектролитных микрокапсул с инкапсулированной уреазой на поверхности кварцевой пластины использовали модифицированный метод, описанный в работе (Монтрель и др., 2006). Для закрепления ПМК на рабочем электроде трехконтактного печатного электрода модифицировали поверхность берлинской лазурью (Karyakin et al., 1994), после чего наносили суспензию ПМК с инкапсулированной глюкозооксидазой.

Положения, выносимые на защиту:

1. Разработанная многоцветная диагностическая система на основе иммобилизованной на пластине инкапсулированной в полиэлектролитные микрокапсулы уреазы со спектрофотометрическим методом регистрации позволяет определить концентрацию мочевины.
2. Полиаллиламин снижает активность алкогольдегидрогеназы, однако 5 mM сульфата аммония и высокая ионная сила (200 mM NaCl) снимают данное ингибирующее воздействие.

3. Разработанная диагностическая система многократного использования на основе инкапсулированной в полиэлектролитные микрокапсулы алкогольдегидрогеназы со спектрофотометрическим методом регистрации позволяет определить концентрацию этанола.
4. Разработанный биосенсор на основе инкапсулированной в полиэлектролитные микрокапсулы глюкозооксидазы, иммобилизованной на поверхности амперометрического матричного электрода, покрытого берлинской лазурью, позволяет определить концентрацию глюкозы.
5. Повышена чувствительность разработанного биосенсора на основе инкапсулированной в полиэлектролитные микрокапсулы глюкозооксидазы, иммобилизованной на поверхности амперометрического матричного электрода, покрытого берлинской лазурью, путем модификации многослойными углеродными нанотрубками.

Степень достоверности и апробация результатов. Достоверность полученных результатов определяется значительным объемом проведенных исследований, использованием в работе современных экспериментальных, статистических и биофизических методов. Достоверность результатов также подтверждается публикациями в рецензируемых отечественных и международных журналах, и патентом в РФ. Результаты диссертации были представлены на следующих российских и международных конференциях: «Ломоносов-2021» и «Ломоносов-2017» (Москва, 2017, 2021), «Перспективные направления физико-химической биологии и биотехнологии» XXIX Зимняя молодежная научная школа (Москва, 2017), «Перспективные направления физико-химической биологии и биотехнологии XXX зимняя молодежная научная школа» (Москва, 2018), «Экспериментальная и теоретическая биофизика» (Пушино, 2018), «Современные проблемы науки о полимерах» (Санкт-Петербург, 2022).

Личный вклад автора. Автором самостоятельно спланирован и проведен комплекс теоретических и экспериментальных исследований. Автор, Ким Александр Леонидович, провел анализ актуальной литературы по теме работы.

Проведение экспериментов требовало кооперации с различными научными группами. Исследования по иммобилизации инкапсулированной глюкозооксидазы на поверхности трехконтактного печатного электрода проведены в сотрудничестве с лабораторией биосенсоров Института биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрыбина РАН. Автор провел обработку всех полученных результатов, а также участвовал в подготовке публикаций к печати.

Структура работы. Работа состоит из следующих разделов: «Введение», «Обзор литературы», «Материалы и методы исследования», «Результаты и обсуждение», «Заключение», «Выводы», и «Список литературы». Работа изложена на 109 страницах, содержит 32 рисунка и 6 таблиц. Список литературы включает 175 источников, в том числе 147 иностранных.

Публикации. По теме диссертации опубликовано 7 научных работ, среди них 5 статей в журналах, индексируемых в базах данных WoS, Scopus и RSCI, рекомендованных для защиты в диссертационном совете МГУ имени М.В. Ломоносова, 1 глава в книге и 1 патент РФ. В статьях и патенте, опубликованных в соавторстве, основополагающий вклад принадлежит соискателю.

Благодарности. Автор выражает свои благодарность и признательность за научное руководство своему научному руководителю – к.б.н. Тихоненко Сергею Алексеевичу, сотрудникам научной группы по изучению полиэлектролитных микрокапсул Мусину Егору Валиевичу и Дубровскому Алексею Владимировичу, а также сотрудникам лаборатории роста клеток и тканей ИТЭБ РАН. Отдельную благодарность автор выражает своим родителям – Ким Екатерине Владимировне и Киму Леониду Владимировичу за напутствие и моральную поддержку, которые сопровождали меня все эти годы.

I. Обзор литературы

1. Биохимические методы анализа

1.1.Анализируемые вещества

Для точной постановки диагноза необходимо знать состав анализируемой пробы и концентрацию входящих в нее аналитов, к которым относятся субстраты ферментов, белки, аминокислоты, липиды, пигменты, витамины, микроэлементы и др.

К одним из основных определяемых субстратов относятся мочевины, этанол, глюкоза, сахароза, креатинин и другие. Мочевина — это конечный продукт белкового метаболизма у млекопитающих. Биохимический анализ крови по уровню мочевины позволяет выявить общепатологические процессы организма, связанные с регуляцией белкового обмена. Низкое содержание карбамида в крови характерно при сниженном катаболизме белков, после введения глюкозы, при печеночной недостаточности, голодании и повышенном диурезе. Повышенная концентрация мочевины в крови может быть связано с усилением катаболизма белка, обезвоживанием, нарушением выделительной функцией почек (нефросклероз, острая почечная недостаточность), препятствием в мочевыводящих путях (камень, опухоль) (Кишкун, 2009).

Концентрация мочевины это один из параметров качества в мясных и молочных продуктах. Повышенное содержание мочевины в молочных изделиях может свидетельствовать о фальсификации данного типа продуктов с целью увеличения показателя массовой доли белка, который не учитывает содержание небелкового азота. Помимо прочего количество мочевины в молоке позволяет оценить состояние здоровья коровы (Юрова, 2012).

Еще одним часто определяемым метаболитом является этанол. Данный аналит определяют в рамках клинической и судебной медицины, связано это с тем, что алкоголь влияет практически на все группы органов, в частности, этанол обладает выраженной органотропностью по отношению к мозгу (Шабанов, 2002) и вызывает изменения в поведении человека, путем запуска активности гамма-аминомасляной

кислоты, активации дофаминовых и других рецепторов (Barr et al., 2003; Krystal et al., 2006; Weinshenker and Schroeder, 2007). Употребление высоких доз алкоголя приводят к оксидативному повреждению и гибели нейронов (Muneer et al., 2011). В целом этанол негативно влияет на многие группы органов: мочеполовую систему, снижая оплодотворяемость ооцитов, вызывая гипотестостеронемия и изменяя уровень гонадотропина (La Vignera et al., 2013); сердечно-сосудистую систему, потребление больших доз алкоголя может привести к кардиомиопатии (Fatjó et al., 2007), аритмии (Uyarel et al., 2005) и гемолитической анемии (Быць Юрий Викторович, 2008); ЖКТ, вызывая некротизирующий панкреатит (Ramstedt, 2004), цирроз печени (Садовникова, 2003) и другие системы органов.

Определение концентрации этанола необходимо и в судебной медицине, и при этом является одним из самых частых проводимых анализов, этот факт связан с тем, что во многих странах разрешено управление транспортным средством при низких концентрациях алкоголя в крови. Кроме того, определение концентрации этилового спирта в крови позволяет определить время смерти человека при алкогольной интоксикации. Соотношение концентраций этанола и ацетальдегида в крови жертвы напрямую влияет на патоморфологию и танатогенез пострадавшего, при правильном определении количества этих веществ можно определить время смерти вплоть до минуты (Пермяков и Витер, 2002).

Глюкоза также является часто определяемым низкомолекулярным метаболитом, что связано с распространенностью сахарного диабета и развитостью его диагностики (The Emerging Risk Factors Collaboration, 2010). Глюкоза является источником энергии для метаболических процессов живых организмов. Определение концентрации глюкозы в крови человека позволяет выявить ряд физиологических расстройств: сахарный диабет (Dong et al., 2018), дисфункцию печени, мышечная недостаточность (Nishida, 2017), поджелудочной железы (Kikuta, 2015; Sun et al., 2019), наличие опухолей (Liao et al., 2015). При этом постоянный мониторинг уровня глюкозы в крови необходим людям с патологическим нарушением метаболизма глюкозы.

В современных клинико-диагностических лабораториях применяют целый ряд методов, которые позволяют определить вышеперечисленные типы анализов: ферментативные (определение субстратов, определение ингибиторов), биосенсорный (электрохимические биосенсоры, биосенсоры на основе ферментов, микроорганизмов, пьезокварцевые биосенсоры), иммунохимические (иммуноаналитический, иммуноферментный и флуоресцентный иммуноанализ). В частности, распространены в клинических лабораториях ферментативные методы (Борисович, 2010).

1.2. Ферментативные методы анализа.

Ферментативные методы анализа – это методы, которые позволяют количественно определить вещества в растворе, используя ферменты. Данные методы обладают высокой чувствительностью и специфичностью, что позволяет определить количество субстрата в смеси, которая содержит близкие по строению вещества. Чаще всего для определения концентрации исследуемого анализа используют следующие методы анализа: “по конечной точке”, кинетический и псевдокинетический.

Метод “по конечной точке” заключается в определении концентрации конечного продукта реакции после ее полного прерывания или завершения. Завершение ферментативной реакции позволяет зафиксировать количество продукта реакции в растворе, которое пропорционально количеству исходного вещества. В дальнейшем, определяют концентрацию продукта реакции используя фотоколориметрические, потенциометрические, гравиметрические и др. методы химического анализа.

Кинетические методы анализа основаны на изменении скорости реакции от концентрации определяемого вещества, этими веществами могут выступать как субстраты, так и активаторы, или ингибиторы ферментов. Основываясь на характере изменения скорости ферментативной реакции от концентрации определяемого вещества, можно рассчитать концентрацию анализируемого вещества.

В псевдокинетических методах также определяется скорость ферментативных реакций, но в отличие от кинетических методов измеряется оптическая плотность после ЛАГ-фазы в начале и в конце интервала измерения.

Кроме того, вышеперечисленные методы разделяют на два типа, в зависимости от того находится фермент в свободном или в иммобилизованном состоянии (Золотов Ю.А., Дорохова Е.Н., 2002); (Долманова и Угарова, 1980); (Березин и др., 1987).

1.2.1. Методы с использованием свободного фермента.

Ферментативные методы анализа с использованием свободного фермента можно разделить на группы по способу регистрации полученного продукта:

- Фотометрические методы
 - методы с использованием моноферментной реакции
 - методы с использованием сопряженных ферментативных реакций
- Электрохимические методы
- Флуорометрический методы

● **Фотометрические методы**

Фотометрические методы – это ряд методов, которые основаны на избирательном поглощении электромагнитного излучения в видимой, инфракрасной и ультрафиолетовой областях молекулами определяемого вещества. Спектр поглощения продукта ферментативной реакции линейно изменяется при изменении концентрации исследуемого вещества, что позволяет достоверно оценить его количество в растворе. Подобные методы анализа используют как при моноферментной реакции, так и при сопряженных ферментативных реакциях для определения конечного продукта.

а. Методы с использованием моноферментной реакции.

Данный метод заключается в образовании соединения, количество которого

прямо пропорционально количеству субстрата. Например, определение концентрации мочевины производится при помощи уреазы, которая катализирует гидролиз мочевины с образованием аммиака и CO_2 . В щелочной среде нитропруссид катализирует реакцию взаимодействия аммиака с салицилатом и гипохлоритом натрия с образованием окрашенного соединения (реакция Бертло (Van Staden and Taljaard, 1997)), интенсивность окраски которого прямо пропорциональна концентрации мочевины и измеряется фотометрически при длине волны 540 нм. Главным преимуществом такого метода является стабильность окраски на протяжении длительного времени, что позволяет использовать этот метод вручную.

в. Методы с использованием сопряженных ферментативных реакций.

Метод сопряженных ферментативных реакций использует комбинацию нескольких ферментов, где продукт реакции одного фермента является субстратом для другого. Например, у больных диабетом уровень глюкозы в моче определяют при помощи глюкозооксидазы (ГО) и пероксидазы (ПО). ГО катализирует превращение глюкозы в глюконовую кислоту, в результате образуется перекись водорода, которая под действием ПО окисляет ортодианизидин и образует цветное соединение. Исходный уровень глюкозы рассчитывают, измерив интенсивность окраски раствора. Аналогичным способом проводится определение этанола только в качестве первого фермента используется алкогольоксидаза, которая катализирует окисление этанола до альдегида и перекиси водорода. Данный способ позволяет определить концентрацию этанола без вмешательства в реакцию эндогенного NAD и NADH (Huggett and Nixon, 1957).

Однако эндогенные компоненты реакционной среды влияют на результаты анализа. В анализируемой среде может изначально находиться промежуточный субстрат сопряженной реакции, который приведет к ложному завышению результатов. Например, одним из самых распространенных методов определения мочевины является подход с использованием уреазы и глутаматдегидрогеназы

(ГлДГ), коферментом которого является NADH. Полученный аммиак, в результате гидролиза мочевины уреазой, под действием ГлДГ взаимодействует с α -кетоглутаратом и образуется L-глутамат, при наличии изначально в реакционной среде NH_4^+ количество образующейся глутаминовой кислоты будет выше истинного значения (Tabata and Murachi, 1988).

В связи с описанным выше недостатком ведутся исследования новых сопряженных ферментативных реакций, которые могут обойти данные проблемы. Например, метод определения мочевины на основе уреазы и лейциндегидрогеназы, которая связывает аммиак с образованием L-изолейцина. Данный подход проходит в два этапа. В исследуемый образец добавляют 2-кетоизокапроновую кислоту, которая в присутствии NADH и лейциндегидрогеназы взаимодействует с эндогенным NH_4^+ с образованием L-изолейцина. Потом в анализируемую среду добавляют уреазу и образовавшийся аммиак после гидролиза мочевины, как в предыдущем пункте превращается в L-изолейцин (Morishita et al., 1997). Измерив поглощение NADH в каждом из этапов, можно определить более точное количество мочевины.

Наиболее чувствительными ферментативными методами анализа являются билюминесцентные. Чаще всего используют реакции, которые катализируются люциферазой. В данные реакции включают люциферин - карбоновая кислота, которая под действием люциферазы и в присутствии АТФ окисляется кислородом до образования люминесцирующего вещества, интенсивность которого регистрируется с помощью люминометра (Лелевич С.В., Гриневич Т.Н., 2013). Например, для определения концентрации мочевины существует кинетический люминометрический метод, который основан на карбоксилировании мочевины и гидролизе образующегося аллофаната под действием уреазы в АТФ-зависимой реакции. В ходе данных реакций фиксируют скорость гидролиза АТФ (Näslund et al., 1998).

Методы с использованием сопряженных ферментативных реакций являются быстрыми, точными и могут быть адаптированы для использования в автоматических анализаторах. При этом данные методы имеют недостатки в виде

влияния эндогенных элементов на результаты анализов.

- **Электрохимические методы**

Электрохимические методы (потенциометрия, амперометрия) это ряд методов, которые основаны на электрохимических явлениях, связанных с изменением в анализируемой среде структуры, химического состава или концентрации анализируемого объекта. Подобные методы удобны при контроле скорости реакций, которые протекают с поглощением или выделением протонов, а также в окислительно-восстановительных реакциях, в таких как поглощение кислорода, образование перекиси и т.д (Colmati et al., 2019; Plekhanova et al., 2019).

Среди данных методов часто используют ионоселективные электроды - электрохимические преобразователи, в которых в зависимости от активности селективных ионов в анализируемой среде возникает электрический потенциал, то есть возникает электродвижущая сила, значения которой фиксируют. Существует множество электродов селективных к разным ионам: H^+ , Na^+ , Ca^{2+} , Li^+ и другим. Например, для определения концентрации холестерина используют холестериноксидазу, под действием которой образуются холест-4-ен-3-он и перекись водорода (MacLachlan et al., 2000). В дальнейшем измеряют количество накопленной H_2O_2 с помощью, катализируемой молибдатом реакции с ионами йода и с помощью йод-селективного электрода измеряют убыль анионов йода (Брайулеску and Кошофрец, 1980).

Электрохимические методы обладают высокой точностью и скоростью проведения измерения, а также низкой стоимостью анализа, но при этом требует достаточно специфичного оборудования.

- **Флуорометрический методы**

Флуорометрические методы — это ряд методов, которые основаны на ферментативной катализе, приводящем к образованию флуоресцентных продуктов, интенсивность которых прямо пропорциональна активности фермента, что позволяет количественно измерить активность фермента при помощи

флуориметра. Например, флуорометрический метод можно использовать для измерения активности матричных металлопротеиназ (ММП) в раковых клетках. ММП представляют собой ферменты, участвующие в разрушении внеклеточного матрикса, необходимого для инвазии и метастазирования опухоли. Измеряя активность ММП с помощью флуорометрического метода, исследователи могут лучше понять механизмы, лежащие в основе роста опухоли, и разработать новые методы лечения рака (Hawkins et al., 2013).

К достоинствам флуорометрического метода можно отнести его высокую чувствительность и специфичность, а также возможность измерения активности ферментов в сложных биологических образцах. Он также относительно прост в исполнении и может быть автоматизирован для высокопроизводительного скрининга. Кроме того, этот метод можно использовать для измерения активности ферментов в режиме реального времени, что делает его полезным для мониторинга кинетики ферментов. Недостатки флуорометрического метода включают возможность помех от других флуоресцентных соединений в образце, а также необходимость в специальном оборудовании и реагентах. Кроме того, метод ограничен ферментами, которые производят флуоресцентные продукты при катализе, что может быть недостатком для ферментов, у которых нет доступного флуоресцентного субстрата (Quesada et al., 1997; Dairaku et al., 2014; Rajan et al., 2021).

1.2.2. Методы с использованием иммобилизованных ферментов

Иммобилизация ферментов - их закрепление на нерастворимой матрице или заключение в полупроницаемую оболочку, с максимально возможным сохранением каталитических свойств. Фиксация ферментов может осуществляться химической связью, адсорбционно или включением фермента в гель, при этом не допускается связывание с функциональными группами активного центра фермента или с группа образующие фермент-субстратный комплекс. Обычно иммобилизованные ферменты не растворены в воде, поэтому между двумя фазами

должен быть возможен обмен молекулами субстрата, продуктов реакции, активаторов и ингибиторов (Datta et al., 2013).

Широко распространено создание диагностических систем при помощи иммобилизации фермента в гель, что связано с низкими трудозатратами данной процедуры. Например, иммобилизация уреазы на поверхности стеклянного электрода, при помощи желатиновой мембраны или слоя акриламидного геля. Данный электрод способен определять ионы аммония, таким образом, когда электрод помещен в раствор, который содержит мочевины, то субстрат способен проникать в слои геля с ферментом. Уреаза катализирует реакцию разложения мочевины до аммиака и CO_2 , а электрод определяет уровень ионов аммония произведенных в толще геля, в результате по измеренному потенциалу можно вычислить начальную концентрацию мочевины (Бердников А.В., Семко М.В., 2004).

Ферменты, иммобилизованные на поверхности электродов можно выделить в отдельную группу – ферментные электрохимические биосенсоры (Lud et al., 2006). Биосенсор — это устройство, которое генерирует сигнал, связанный с концентрацией определенного аналита, при помощи чувствительного слоя, который содержит биологический компонент (ферменты, ткани, бактерии и т.д.). Биосенсор представляет собой комбинацию биохимического и физического преобразователя. Биохимический преобразователь выполняет функцию распознавания биологических компонентов, преобразуя информацию о химических связях в физический сигнал, а физический преобразователь визуализирует данный сигнал в числовые показатели, например, демонстрирует изменение оптической плотности, электропроводности или интенсивности флуоресценции. Эти особенности позволяют биосенсору селективно и на прямую определять соединения в смеси компонентов, не используя другие реагенты. Физических преобразователей существует большое количество: электрохимические, спектроскопические, термические, пьезоэлектрические и т.д. Самыми распространенными являются электрохимические (Будников, 1996).

В настоящее время самым распространенным биосенсором является

амперометрический биосенсор с иммобилизованной глюкозооксидазой для определения сахара в крови. Одним из возможных примеров подобных устройств является биосенсор на основе платинового электрода, на поверхности которого иммобилизована глюкозооксидаза в полиакриламидном геле (Корыта, 1983). С целью улучшения подобных устройств проводятся большое количество работ. Например, глюкозооксидаза, иммобилизованная за счет ковалентного связывания с аминированными и карбоксилированными многостеночными углеродными нанотрубками, имеет повышенную чувствительность и больший диапазон определения концентраций аналита (Рогалева и др., 2011). Также данный биосенсор может быть улучшен путем увеличения числа иммобилизованных ферментов на электроде. Например, в результате окисления глюкозы образуется H_2O_2 , восстановление которой фиксируется электрохимически после участия пероксидазы. Оба фермента, пероксидазу и глюкозооксидазу фиксировали на золотых нанотрубках модифицированных меркаптоэтанолом (Delvaux et al., 2005).

На данный момент существует несколько основных методов закрепления ферментов на носителе:

1. В присутствии фермента проводится полимеризация мономера, которая образует матрицу, в результате фермент включается в сетку полимера.
2. За счет взаимодействия заряженных групп фермента и матрицы.
3. При помощи инкапсулирования - создание полупроницаемой капсулы с включенным ферментом.
4. Связывание фермента и матрицы за счет образования ковалентных связей.
5. Связывание фермента и матрицы за счет образования нековалентных связей.
6. Сополимеризация мономера, образующего матрицу из фермента.
7. Сшивание молекул фермента между собой (Karlheinz D. and Herbert W, 2008).

Наибольшее распространение получили способы иммобилизации фермента при помощи как ковалентного связывания с матрицей, так и включения его в гель. В первом случае матрица для ковалентного связывания фермента должна

соответствовать нескольким критериям: носитель должен быть нерастворим в воде; обладать большой площадью внутренней поверхности; должен создавать минимальные диффузионные затруднения для субстрата и продуктов реакции; и самое главное носитель должен иметь химически активные группы, для связывания фермента с поверхностью носителя (Варфоломеев, 2005). Условно матрицы можно поделить на два типа: органические и неорганические (Mohamad et al., 2015).

При создании диагностических систем для иммобилизации ферментов в качестве органических носителей чаще всего применяют полисахариды и их производные. Например, целлюлоза широко используется для иммобилизации целого ряда ферментов: лакказы (Al-Adhami et al., 2002), глюкоамилазы (Bryjak et al., 2007), альфа-амилазы (Namdeo and Vajrai, 2009), тирозиназы (Labus et al., 2011), липазы (Huang et al., 2011) и бета-галактозидазы (Klein et al., 2011). Для увеличения сохранения активности лакказы использовали целлюлозную матрицу модифицированную диэтиламиноэтилом (Al-Adhami et al., 2002). Также была создана система способная расщеплять крахмал, для этого использовали наночастицы магнетита покрытые целлюлозой, которая была ковалентно связана с альфа-амилазой (Namdeo and Vajrai, 2009). Иммобилизацию проводили при помощи активации данных пленок за счет глутарового альдегида. Этот метод иммобилизации основан на реакции альдегидной группа глутарового альдегида с аминогруппой, присутствующей в пленке, образуя основание Шиффа, которая связывается с аминогруппой фермента. В результате, иммобилизованный фермент сохранил около 60% от исходной активности (Klein et al., 2011).

Также широко применяются неорганические носители, которые используют из-за наноразмерной структуры с большой площадью поверхности и высокой устойчивости к химическому и физическому воздействиям, чаще всего в качестве матрицы используют оксид кремния. Например, такие ферменты, как лигнин пероксидаза и пероксидаза хрена были иммобилизованы на двуокись кремния для удаления хлораргининов из среды (Dezott et al., 1995). Также иммобилизация альфа-амилазы на данных наночастицах позволяет использовать их в моющих средствах, в результате повысив их эффективность (Najafi et al., 2018). Оксид

кремния может быть подвержен модификациям, например, аминированию гидроксильных групп и добавлению метиловых или поливиниловых групп спирта, что позволяет усилить связь между ферментом и матрицей (Narsimha Rao et al., 2000); (Shioji et al., 2003). Погорилик с соавторами иммобилизовали уреазу на поверхности поли(3-меркаптопропил) силоксановой матрице, что позволило сохранить активность фермента в течение 300 суток, при этом авторы показали, что полисилоксановая матрица, модифицированная 3-аминопропилом менее эффективна, так как активность фермента крайне мала (Pogorilyi et al., 2007). А Петров с соавторами предложили иммобилизовать белок на CaCO₃ микросферолите двумя методами: адсорбционным методом и копреципитацией. Преимуществом метод копреципитации является возможность легко контролировать концентрацию белка внутри частиц и минимизировать взаимодействия белка с макромолекулами из раствора (Petrov et al., 2008).

Включение фермента в гель имеет широкую распространенность среди методов иммобилизации, так как он не требует больших трудозатрат. Например, гибридная матрица альгинат-желатин-кальций обладает высокой герметизацией, что позволяет уменьшить выход фермента в анализируемую среду и обеспечить более высокую степень механической стабильности (Wang et al., 2011). Включение липазы в κ-каррагинан увеличивало ее термостабильность и устойчивость к органическим растворителям (Jegannathan et al., 2010); (Tümtürk et al., 2007).

Методы анализа с использованием как иммобилизованных, так и свободных ферментов имеют общие преимущества: высокую специфичность; высокую чувствительность и точность определения. Однако свободный фермент нельзя использовать повторно и обладает низкой стабильностью в растворе, а также требует фракционирования исследуемой жидкости. Иммобилизованные ферменты также обладают несколькими недостатками: недолговечность диагностической системы, требуется специализированное аппаратное обслуживание и база.

Еще одним методом иммобилизации ферментов является их инкапсулирование в полиэлектролитные микрокапсулы (ПМК). Ферменты, инкапсулированные в ПМК лишены подобных недостатков и могут стать

перспективной заменой вышеописанных диагностических методов.

2. Полиэлектrolитные микрокапсулы

Полиэлектrolитные микрокапсулы (ПМК) - это супрамолекулярные системы, полученные методом поочередной адсорбции противоположно заряженных полиэлектrolитов (Sukhorukov et al., 1998). Технология создания полиэлектrolитных микрокапсул (ПМК) впервые была предложена в 1992 году, при изучении полиэлектrolитных мультислойных пленок из полистиролсульфоната (ПСС), поливинилсульфата и полиаллиламина (ПАА), полученных по технологии “layer-by-layer” (Decher et al., 1992). Сами же полиэлектrolитные микрокапсулы впервые стали объектом научного изучения и практического применения лишь в 1998 году. Полученные капсулы были сформированы из полимеров ПСС и ПАА на меламиноформальдегидных коллоидных частицах и достигали размеров в 2-3 мкм (Sukhorukov et al., 1998).

В конечном варианте метод создания полиэлектrolитных микрокапсул состоит из трех этапов (рис.1).

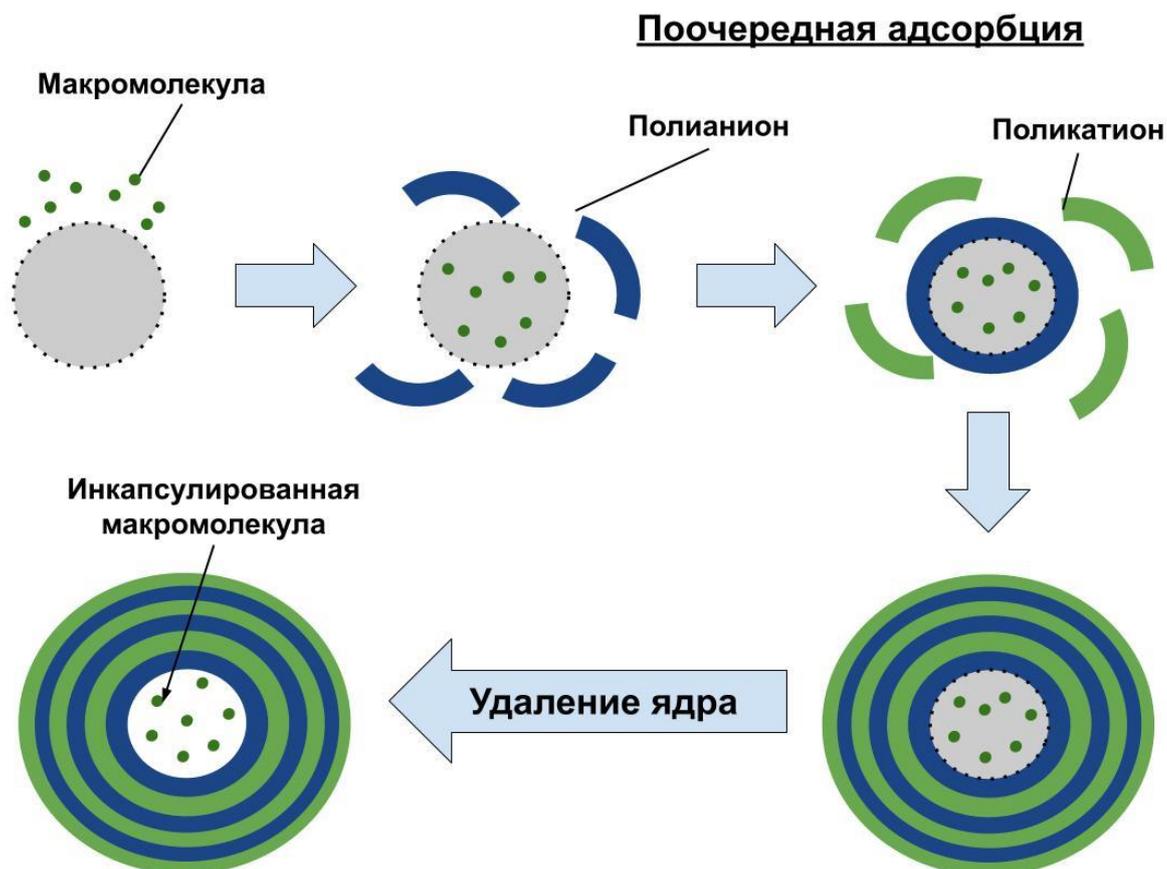


Рис. 1. Схема получения полиэлектролитных микрокапсул.

На первом этапе получают ядро, которое содержит необходимую макромолекулу, например фермент. На следующем этапе на данное ядро поочередно адсорбируют селективно подобранные полиэлектролиты, которые имеют противоположные заряды и в результате образуют мультислойную оболочку. На последнем этапе разрушают и удаляют ядро, например, при помощи ЭДТА.

Полученные ПМК обладают следующими свойствами: полупроницаемость; контроль толщины и состава оболочки; контроль размера капсулы от десятков нанометров до десятков микрометров (Mayya et al., 2003; Shenoy et al., 2003). Полиэлектролитные микрокапсулы используют в разработке систем адресной доставки, самовосстанавливающихся покрытий, диагностических и тераностических систем (Andreeva et al., 2008; Borodina et al., 2008; Nifontova et al., 2018; Kim et al., 2019).

2.1. Применение микрокапсул в качестве диагностических систем

Одно из перспективных направлений данной технологии — это применение ПМК в качестве диагностических систем, что стало возможным благодаря полупроницаемости оболочки микрокапсулы.

На данный момент, разрабатываемые диагностические системы на базе полиэлектролитных микрокапсул можно разделить на три направления, в зависимости от инкапсулированного вещества: содержащие фермент, флуоресцентные метки и квантовые точки (Kazakova et al., 2011, 2013; Nifontova et al., 2019).

2.2. Диагностические системы на базе инкапсулированных ферментов

Полиэлектролитные микрокапсулы в растворе

Диагностические системы на основе инкапсулированных ферментов обладают рядом преимуществ перед свободными ферментами, используемые в клинико-диагностических лабораториях:

1. Инкапсулированный фермент способен сохранять свою активность на протяжении длительного времени.

2. Инкапсулированный фермент не подвержен негативному воздействию протеаз.

3. Диагностические системы на базе инкапсулированных ферментов имеют возможность многократного применения (Сухоруков и др., 2007).

В частности, в работе Сухорукова Б.И. и его коллег была показана возможность капсулирования лактатдегидрогеназы (ЛДГ) и уреазы. Ими же был предложен способ ферментативного определения концентрации анализируемого вещества при помощи ПМК с уреазой или лактатдегидрогеназой, которые извлекали из среды путем фильтрации (Сухоруков и др., 2006).

Инкапсулированный фермента иммобилизованный на твердой поверхности

Полиэлектролитные микрокапсулы могут быть закреплены на твердой поверхности, чтобы упростить манипуляцию с микродиагностической системой или создать биосенсор целевого назначения.

Одна из первых попыток иммобилизации полиэлектролитных микрокапсул была описана Нолте и Фери (Nolte and Fery, 2004), а также Фенгом с соавторами (Feng et al., 2004). В этих работах ПМК иммобилизовали на твердых подложках с помощью электростатических сил (рис. 2.А). Для этого авторы с помощью микроконтактной печати поочередно покрыли поверхность отрицательно и положительно заряженными полиэлектролитами, таким образом, чтобы разнозаряженные участки поверхности чередовались друг с другом. В дальнейшем наносили суспензию полиэлектролитных микрокапсул (ПСС/ПДАДМАК)₃, обладающих положительным поверхностным зарядом, которые электростатически связывались с отрицательно заряженными участками поверхности. Таким образом, авторы разработали способ иммобилизовать ПМК на твердой поверхности, но данная система нестабильна в растворах с высокой ионной силой или крайних значениях pH. В связи с этим, многими авторами было предложено иммобилизовать полиэлектролитные микрокапсулы в полиэлектролитный слой, используя технологию LbL, в результате ПМК были покрыты слоем противоположно заряженных полиэлектролитов (Рис. 2Б) (Delcea et al., 2011), (Kohler et al., 2012), (Skirtach et al., 2010), (Schmidt et al., 2012). В частности, Монтрель М.М. с соавторами одними из первых описали подобную методику, в работе которых была показана диагностическая система на основе уреазы, инкапсулированной в ПМК, иммобилизованных на поверхности pH-электрода (Монтрель и др., 2006).

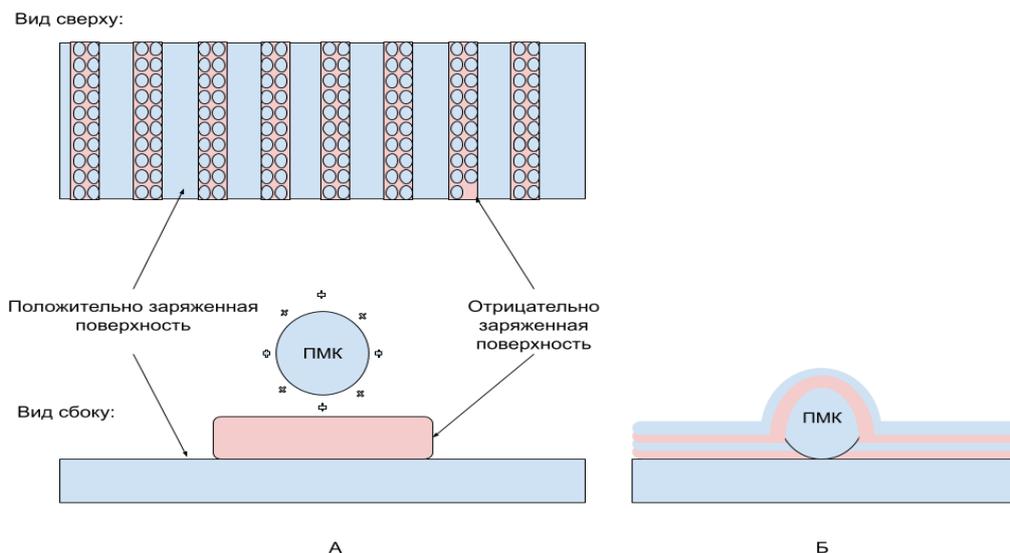


Рис. 2. Схема иммобилизации ПМК за счет электростатического взаимодействия. А – без дополнительного покрытия слоями полиэлектролитов, Б – с дополнительным покрытием слоями полиэлектролитов.

В настоящий момент существует множество способов иммобилизации ПМК на твердой поверхности: метод основанный на гидрофобно/гидрофильном взаимодействии между ПМК и поверхностью (Troitsky et al., 2004); за счет ковалентных связей между ПМК и поверхностью (Wang et al., 2006; Yang and Gao, 2009), а также за счет создания камер микронного размера, в которые помещают одну или несколько микрокапсул (Kiryukhin et al., 2011a, 2011b, 2012, 2013).

Иммобилизация ПМК позволяет реализовать концепции «Lab-on-a-chip» (LOC) и «Micro Total Analysis Systems» (mTAS), которые могут быть использованы в химических и биологических областях науки. В работе Антипиной и др. (Antipina et al., 2009) была показана возможность реализации данного концепта путем иммобилизации ПМК, содержащих глюкозооксидазу и пероксидазу. Для этого полиэлектролитные микрокапсулы состава $(\text{ПСС/ПАА})_6\text{ПСС}$, содержащих меламина формальдегидные ядра, помещали в микролунки размером 2,5-3 мкм. На следующем этапе ядра ПМК удаляли раствором HCl и увеличивали проницаемость оболочки капсулы за счет кислотности среды равной pH 5. В дальнейшем полученные ПМК инкубировали в растворе ферментов с постепенным изменением

pH раствора в щелочной диапазон, для уменьшения проницаемости оболочки ПМК. Полученная система способна катализировать реакцию окисления глюкозы с последующей активацией окислительной реакции субстрата пероксидазы в рамках одной капсулы (Antipina et al., 2009).

Для создание иммобилизованного биосенсора нет необходимости фиксировать ПМК на поверхности электрода на постоянной основе. Например, существует биосенсор на основе pH-чувствительного полевого транзистора для определения мочевины (Решетиллов и др., 2015). В данном приборе использовали ПМК с инкапсулированной уреазой и парамагнитными частицами Fe_3O_4 . Эти частицы позволяют осадить микрокапсулы в постоянном магнитном поле (МП) на поверхности электрода, а для восстановления мобильности ПМК достаточно ослабить воздействие МП. Полученный биосенсор имел высокую чувствительность (~ 3.58 pH/мМ) и 30—150 с для формирования сигнала.

Диагностические системы на основе инкапсулированных флуоресцентных зондов

Метод послойной адсорбции полиэлектролитов при создании ПМК позволяет включать в полимерную оболочку различные функциональные компоненты, включая красители, флуоресцентные метки (FITC, TRITC) или флуоресцентные (квантовые точки) наночастицы, а также контролировать толщину мембраны при ее формировании (Amiot et al., 2008; Tong et al., 2012). Благодаря подобным модификациям, микрокапсулы являются многообещающими агентами для биовизуализации в современной диагностике (Amiot et al., 2008; Kilic et al., 2017).

Существует несколько методов включения флуоресцентной метки или наночастицы в полиэлектролитную микрокапсулу: путем конъюгирования метки с одним из полимеров ПМК (Haložan et al., 2009; Reisch and Klymchenko, 2016); при помощи соосаждения полимеров, меченных флуоресцентными красителями, во время приготовления микрочастиц матрицы, например микросферолитов карбоната кальция (Kazakova et al., 2013); их также можно инкапсулировать после удаления матрицы; для этого обеспечивается диффузия низкомолекулярных и

высокомолекулярных соединений через полимерную мембрану за счет увеличения ионной силы или pH микроокружения.

Полиэлектролитная микрокапсула, модифицированная одним из перечисленных методом, способна реагировать на изменения анализируемой среды, которые позволят определить нужные показатели локально или даже при помощи одной микрокапсулы. Например, в работе Казаковой Л.И. и ее коллег (Kazakova et al., 2013) микрокапсулы состава (ПСС/ПАА)₄ПСС содержат во внутреннем пуле лактатоксидазу, а в оболочке капсулы был закреплен флуоресцентный зонд дигидрородамин 123. Дигидрородамин 123 является незаряженным, бесцветным индикатором активных форм кислорода (АФК), под действием которого АФК способен окисляться до флуоресцентной катионной липофильной формы - родамин 123 (Сосимчик et al., 2009). Таким образом, данные микрокапсулы при наличии лактата, образуют АФК (H₂O₂), которые в присутствии пероксидазы окисляют дигидрородамин 123 до родамина 123. В конечном счете диагностическая система позволяет определить концентрацию лактата и АФК в анализируемой среде, используя лишь одну ПМК, при помощи конфокальной лазерной сканирующей микроскопии. Также в работе Казаковой Л.И. и др. (Kazakova et al., 2011) были использованы микрокапсулы, содержащие флуоресцентный зонд чувствительный к изменению значений pH (SNARF-1) и уреазу, данная система использовалась для разработки сенсора на мочевины, также способного определить локальный pH среды.

Флуоресцентный зонд может содержаться не только в оболочке ПМК, но и в ее внутреннем пуле. Так в работе Крефт с коллегами (Kreft et al., 2007) ПМК в своем внутреннем пуле содержали Alexa Fluor 488 (флуоресцентная метка не чувствительная к pH; также можно использовать TRITC), при этом в оболочке находился SNARF-1. Таким образом капсулирование сразу нескольких меток позволяет различить микрокапсулы между собой во время проведения анализа в одной и той же анализируемой среде что, в свою очередь, позволяет отслеживать изменения в состоянии конкретной капсулы.

Кроме флуоресцентных зондов в состав полиэлектролитных микрокапсул

могут входить кислотно-основные индикаторы, такие как лакмус, бромтимоловый синий (БТС) и метиловый красный (МК). Данные микрокапсулы можно использовать для определения pH в растворах, а также данную технологию использовали для введения в состав зубной пасты в качестве зонда кислотности (Бурмистрова и др., 2013).

Вышеперечисленные диагностические системы на базе полиэлектролитных микрокапсул и их применение в биомедицинской сфере демонстрирует их перспективность и необходимость развития данного направления. В связи с чем появляется необходимость в полном понимании взаимодействия полиэлектролитов с инкапсулируемыми веществами, в частности, с белковыми молекулами.

При разработке диагностических систем на базе микрокапсул следует учитывать взаимодействия между капсулируемым веществом и полиэлектролитами, которые используют при формировании оболочки микрокапсулы, с целью уменьшить данное взаимодействие для сохранения функциональных свойств белка (Сабурова и др., 2008).

Кроме того, необходимо учитывать полиэлектролитный состав оболочки микрокапсул не только чтобы уменьшить влияние полимера на инкапсулированный фермент, но и для того, чтобы предотвратить влияние продуктов реакции фермента на оболочку капсулы. Например, в работе Пасторино и др. (Pastorino et al., 2014) было показано, что функционирование инкапсулированной цитохром-С-оксидазы не разрушает ПМК, состоящие из полиаллиламина и полистиролсульфоната. В то время как большая часть микрокапсул, состоящих из хитозана и пектина, разрушались или деформировались во время работы фермента. Это связано с тем, что цитохром-С-оксидаза окисляет цитохром С и снижает значения pH раствора, в результате чего оболочка подобных ПМК разрушалась, т.к. обладала рыхлой и не стабильной структурой (т.к. рКа хитозана и пектина составляет 6,8 и 3,6 соответственно).

3. Механизмы образования полиэлектролит-белкового комплекса.

Изучение полиэлектролит-белкового взаимодействия является одним из развивающихся направлений биотехнологии. Широко известным является тот факт, что белки и полиэлектролиты (ПЭ) способны образовывать комплексы и коацерваты при определенных условиях среды, которые обусловлены в основном не специфическими или ковалентными связями, а именно электростатическими взаимодействиями. (Carlsson et al., 2001; Cousin et al., 2005; Nilsson et al., 2005). По сравнению со специфическим связыванием биомолекул с комплементарными эпитопами, такими как биотин-авидин и антиген-антитело, структура комплекс белок-ПЭ может быть адаптирована путем модуляции взаимодействий белок-ПЭ, удовлетворяя потребности различных задач, таких как биосенсоры (Sukhorukov et al., 2007b; Wang et al., 2011; Kazakova et al., 2013; Han et al., 2016), фармакология (Alvarez-Lorenzo et al., 2013; Islam et al., 2015), разделение белков (Yasar Mahlicli et al., 2012; Chen et al., 2015) и тканевой инженерии (Araujo et al., 2014).

Кроме того, полное понимание взаимодействия полиэлектролита с белком может помочь определить токсикологию биоматериалов на основе ПЭ в кровеносной системе, поскольку они будут подвергаться воздействию различных биомолекул, таких как сывороточный альбумин человека (HSA), трипсин (TRP) и гемоглобин (Hb) (эффект опсонизации) (Koeqler et al., 2012; Inturi et al., 2015). Регулируя ключевые параметры, связанные с образованием белок-ПЭ комплекса, такие как поверхностный заряд, гидрофобность и гибкость цепи, может быть оценена и оптимизирована биосовместимость материалов на основе полиэлектролитов ПЭ.

3.1. Теория регулирования заряда и теория анизотропии заряда

Существует два основных механизма взаимодействия между белком и полиэлектролитом: теория регуляции заряда (da Silva and Jönsson, 2009; de Vos et al., 2010; Lund and Jönsson, 2013) и теория анизотропии заряда (Seurek et al., 2003; Kayitmazer et al., 2010; Silva et al., 2010; Xu et al., 2012). Обе эти теории объясняют

ряд явлений, которые возникают при полиэлектролит-белковом взаимодействии, например, наличие поверхностного заряда белка при кислотности среды равной изоэлектрической точки (pI) этого белка. Согласно теории регуляции заряда взаимодействие между полиэлектролитом и белком происходит в ограниченном пространстве. Полиэлектролит в растворе будет притягивать соответствующие противоионы белка за счет кулоновских взаимодействий, поэтому микросреда, включая локальный pH и как следствие распределение ионов в белке, изменяется электрическим полем полиэлектролита. Следовательно, состояния протонирования кислотных или основных остатков белка могут быть изменены, что приведет к другому профилю заряда и электростатическим свойствам по сравнению с его нормальным состоянием. Например, под влиянием отрицательно заряженного полиэлектролита, белок (окруженный отрицательными ионами) будет иметь более высокий локальный pH , который увеличит количество положительно заряженных аминокислотных остатков белка, даже при $pH > pI$. Данная теория подтверждается методом Монте-Карло при анализе связывания различных белков с ПЭ, особенно при низкой ионной силе (da Silva and Jönsson, 2009). Однако теория регуляции заряда не позволяет объяснить зависимость ионной силы связывания ПЭ с белком или высокую селективность, достигаемую ПЭ или ПЭ-модифицированными наночастицами на белках с аналогичным зарядом (бычий сывороточный альбумин / β -лактоглобулин и изоформы β -лактоглобулина, BLGA / BLGB). Например, Балауф и др. исследовали взаимодействие между β -лактоглобулином (BLG) и сферическими полиэлектролитными щетками (SPB) с помощью изотермической титрационной калориметрии (ИТК) в сочетании с расчетами статистической модели (Henzler et al., 2010). Судя по положительному изменению энтальпии ($\Delta H > 0$) и ее значительному уменьшению с увеличением ионной силы, они пришли к выводу, что высвобождение противоиона, а не регулирование заряда, было основной движущей силой для взаимодействия BLG – SPB.

Другая теория, объясняющая физико-химические процессы полиэлектролит-белкового взаимодействия, была предложена Дубиным - **теория анизотропии заряда** (Cooper et al., 2005; Silva et al., 2010; Du et al., 2014). По сравнению с

регулированием заряда, теория анизотропии заряда уделяет больше внимания внутренней электростатической неоднородности белков, а не внешнему влиянию ПЭ. Согласно этой теории, на поверхности белка локально располагаются различные «заряженные участки», очень чувствительные к таким условиям, как ионная сила и pH. При образовании комплекса белок-полиэлектролит, заряженные участки полиэлектролита и белка с одинаковыми зарядами создают эффект «дальнего отталкивания», а с противоположными зарядами - эффект «ближнего притяжения» (Stradner et al., 2004). Следовательно, в зависимости от рассматриваемого полиэлектролита и белка, определенное количество соли может экранировать отталкивание на больших расстояниях, но не влиять на притяжение на коротких расстояниях. Таким образом, ионная сила может влиять на сродство полиэлектролит-белкового связывания (Antonov et al., 2010; Xu et al., 2011; Qin et al., 2015). Тем не менее, профили заряженных участков белков с похожими pI или даже структурами могут явно отличаться, так что их фазовые границы комплексообразования и коацервации / преципитации могут расходиться относительно друг друга. Например, два вида β -лактоглобулина (BLGA и BLGB), структура которых отличается только одним аминокислотным остатком (заменена нейтральная аспарагиновая кислота на отрицательный глицин), приводит к тому, что BLGA имеет большой участок отрицательного заряда и большую аффинность связывания с линейными ПЭ и заряженными наночастицы золота, чем BLGB (Chen et al., 2011, 2014; Xu et al., 2011).

Несмотря на то, что до сих пор неизвестно какой механизм играет доминирующую роль в процессе связывания полиэлектролита с белком, Хартвиг с коллегами предположил, что оба этих механизма работают в определенных обстоятельствах (Hartvig et al., 2011). Согласно предыдущему сообщению (Barroso da Silva et al., 2014), механизм регуляции заряда преобладает для селективного связывания белков при более низкой ионной силе. Однако увеличение ионной силы в конечном итоге приводит к увеличению дипольного момента, и доминирующий эффект превращается в механизм заряженных участков, что хорошо объясняется механизмом анизотропии заряда.

4. Термодинамика полиэлектролит-белковых взаимодействий

4.1. Линейные полиэлектролиты

Изучение взаимодействия линейных полиэлектролитов с полипептидами может служить основой для изучения взаимодействия разных типов полиэлектролитов с белками (Huang and Lau, 2016). Дубин, Балауф и др. проводили исследования с синтетическими и природными линейными полиэлектролитами, такими как гепарин (Xu et al., 2012), гиалуроновая кислота (Du et al., 2014), полиаллиламин гидрохлорид (ПАА) (Yu et al., 2015) и полидиаллилдиметиламмоний хлорид (PDADMAC) (da Silva and Jönsson, 2009), при их взаимодействии с различными белками, методами титрования и моделирования. Было показано, что гепарин способен предотвратить и обратить вспять агрегацию бычьего сывороточного альбумина (BSA), β -лактоглобулина (BLG) и Zn-инсулина при pH около pI и при низкой ионной силе. Кроме того, при значениях pH около pI, гиалуроновая кислота имеет большее сродство к BSA, чем к BLG. Подобный эффект наблюдался в других работах с поликатионами (PDADMAC, ПАА), было показано изменение селективности белка из-за изменения заряда полиэлектролита. Более сильное связывание обоих белков (BSA, BLG) с поликатионами, может быть связано с более высокой гибкостью цепи и эффективной линейной плотностью заряда этих поликатионов. Ванг и др. показали отталкивание между комплексами с одинаковым зарядом между полиэлектролитными сферическими щетками и β -лактоглобулином (BLG) (Wang et al., 2017). Также, Кайитмазер с соавт. (Kayitmazer et al., 2007) изучил критические условия комплексообразования и коацервации для пар PDADMAC – BSA посредством турбидиметрического титрования и обнаружили, что состояние коацервации может быть связано со значением pH, ионной силы и стехиометрией.

Ю и др. (Yu et al., 2015) провели всесторонние исследования связывания человеческого сывороточного альбумина с полиакриловой кислотой и связали этот процесс с гетерогенным распределением заряда белка, которое может привести к значительному высвобождению противоиона во время связывания.

4.2. Полиэлектrolит-белковые взаимодействия при иммобилизации белков

Изучение взаимодействий белков с полиэлектролитами во время их иммобилизации является важным аспектом для обеспечения стабильности и функциональности иммобилизованных белков, которые находят широкое применение в биосенсорах, биокатализе и доставке лекарств. Понимание механизмов взаимодействия между белком и полиэлектролитом может существенно улучшить методы иммобилизации и повысить их эффективность и стабильность.

Отличия между белок-полиэлектrolитными взаимодействиями при иммобилизации и в растворе заключаются в характере взаимодействия. В растворе белок и полиэлектролит взаимодействуют динамично и обратимо, тогда как при иммобилизации взаимодействие более сложное и может привести к необратимым изменениям структуры и функции белка. Кроме того, на взаимодействие между белком и полиэлектролитом может дополнительно влиять наличие других факторов иммобилизации, таких как поверхность и матрица (в знач. полиэлектролит). В частности, промежуточное состояние комплексообразования между белком и полиэлектролитом может быть использовано для иммобилизации и стабилизации белков, поскольку оно может предотвратить дальнейшую агрегацию белка посредством электростатического отталкивания. Например, Ванг и др. наблюдали большой диапазон плато во время турбидиметрического титрования между SPB и BLG, что можно объяснить отталкиванием между комплексами с одинаковым зарядом (Wang et al., 2013). Полиэлектrolиты, включая синтезированные и природные, применяются для стабилизации белка и предотвращения его агрегации. Например, Ксу и др. использовали гепарин для обращения и ингибирования агрегации трех белков: БСА, BLG и Zn-инсулин, при сохранении исходной структуры белка (Xu et al., 2012). Согласно результатам турбидиметрического титрования и DLS, агрегация этих белков, как в нативном, так и в денатурированном состоянии может хорошо контролироваться путем образования растворимых комплексов с гепарином.

Поскольку полиэлектролиты могут обеспечить ферменты стабильной средой и помочь сохранить их нативные функции, полиэлектролиты имеют большой потенциал для использования при разработке каталитических систем. Например, Xu et al. загружали амилоглюкозидазу в слои магнитных сферических полиэлектролитных щеток. Согласно результатам ИТК, сильное связывание между ферментами и SPB можно было четко наблюдать даже на «неправильной стороне» связывания. Таким образом, одновременно могут быть достигнуты повышенная ферментативная активность и способность к магнитному воздействию (Marangoni et al., 2013).

Полиэлектролиты и заряженные наночастицы могут по-разному взаимодействовать с разными белками на стадиях комплексообразования и мобилизации, и это различие в аффинности связывания, как обнаружено ИТК, можно использовать для создания флуоресцентного (De et al., 2009), колориметрического (Tang et al., 2013) или даже обонятельного (Duncan et al., 2017) сенсора. Как правило, после образования электростатически управляемого комплекса с флуоресцентными белками или ферментами, такими как β -галактозидаза (β -Gal), положительно заряженные наночастицы золота (Miranda et al., 2010) или линейные полиэлектролиты (Rana et al., 2016) могут временно ингибировать их функциональность, в то время как присутствие аналитов может нарушать равновесие связывания и восстанавливать функциональность. Выбрав соответствующий функциональный белок и заряженный сенсорный агент (субстрат), можно получить надежные сигналы на основе полученного массива/комплекса. После обработки считываемых сигналов исследователи успешно идентифицировали и дифференцировали различные белки (Miranda et al., 2010) и бактерии (Li et al., 2014), а также метастатические (Rana et al., 2012), раковые (Idris et al., 2012) и нормальные клетки (Bajaj et al., 2009). На основе описанного выше свойства комплексообразования были разработаны биосенсоры для многих используемых диагностических систем, таких как тест-полоски для питьевой воды (Ceran et al., 2014) и диагностики фиброза печени (Peveler et al., 2018).

II. Материалы и методы

Реактивы.

В работе использовали: уреазу (Jack bean, *Canavalia ensiformis*, EC.3.5.1.5.) фирмы Fluka, №94285 с активностью 97,0 U/mg, дрожжевую алкогольдегидрогеназу (КФ 1.1.1.1) фирмы “Sigma”, глюкозооксидаза (КФ 1.1.3.4) из *Aspergillus niger* (активность 185000 ед./г) (Sigma-Aldrich). Полистиролсульфонат натрия (ПСС) и полиаллиламин гидрохлорид (ПАА) с молекулярной массой 70 кДа и полиэтиленимин (ПЭИ) с молекулярной массой 25 кДа фирмы “Sigma” (США), полидиаллилдиметиламмоний гидрохлорид (ПДАДМА) с молекулярной массой 70 кДа фирмы “Sigma” (США), декстрансульфат (ДС) с молекулярной массой 10 кДа фирмы “Sigma”, этилендиаминтетрауксусную кислоту (EDTA) использовали фирмы “Sigma” (Германия), хлорид кальция ($\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$), хлорид натрия, карбонат натрия, сульфат аммония - фирмы «Реахим» (Россия), Tris буфер фирмы “Serva” (США), калий фосфорнокислый двузамещенный 3-водный, натрия гидроокись, глюкоза, уксусная кислота (Диакон, Россия); хитозан низкомолекулярный, гексацианоферрат (III) калия, (“Sigma-Aldrich”, США); хлорид железа (III), хлорид калия (Химмед, Россия); соляная кислота, пероксид водорода (30 % раствор).

В качестве рабочих электродов использовали электроды 3-контактные, полученные матричной печатью (ООО «КолорЭлектроникс», Москва, Россия), содержащие в составе рабочего электрода графитовую пасту Electrodag 6017SS (Henkel, Германия).

Инкапсулирование фермента в полиэлектролитные микрокапсулы (метод копреципитации)

Для приготовления 10 млн. полиэлектролитных микрокапсул на первом этапе получали CaCO_3 микросферолиты (ср. разм. $4,5 \pm 1$ мкм.), для этого 1,5 мл 0,33 М Na_2CO_3 добавляли к интенсивно перемешиваемому 1,5 мл 0,33 М раствору CaCl_2 , содержащего 6мг/мл фермента (Petrov et al., 2008). Полученную суспензию

осаждали при 500g, с последующим декантированием надосадочной жидкости и использовали для получения ПМК. Оболочку полиэлектролитных микрокапсул на микросферолитах CaCO_3 формировали путем их поочередной инкубации в растворах полианиона ПСС и поликатиона ПАА объемом 2 мл с концентрацией 2 мг/мл, содержащих 0,5М NaCl. После каждой инкубации образцы трехкратно промывали 2 мл 0,5М NaCl для удаления не адсорбированных молекул полимеров. После нанесения необходимого числа слоев карбонатная микрочастица растворялась и удалялась при помощи инкубации в 20 мл 0,2 М раствора ЭДТА (рН=7) в течение 2 часов. На последнем этапе полученные полиэлектролитные микрокапсулы промывались трижды 2 мл дистиллированной воды. Средний размер полученных ПМК – $4,5 \pm 1$ мкм. Инкапсулировано около 50–60% от общей массы белка.

Инкапсулирование фермента в полиэлектролитные микрокапсулы (метод адсорбции)

Данный метод аналогичен методу копреципитации, но отличительная особенность заключается в том, что для создания этих полиэлектролитных микрокапсул в качестве ядра использовали CaCO_3 микросферолиты, не содержащие фермент (Antipov et al., 2003). После формирования полиэлектролитной оболочки CaCO_3 ядро удалялось при помощи инкубации в 20 мл 0,2 М раствора ЭДТА в течение 2 часов. Полученные полиэлектролитные микрокапсулы промывались трижды 2 мл дистиллированной воды. Далее, микрокапсула инкубировалась в растворе белка с концентрацией 3–6 мг/мл в течение 12 часов. Благодаря своей пористой структуре белок сорбировался в микрокапсулу (инкапсулировано около 70-80% от общей массы белка). Микрокапсулы трёхкратно промывали бидистиллированной водой для удаления неадсорбированных молекул белка. Средний размер полученных ПМК – $4,5 \pm 1$ мкм.

Закрепление полиэлектролитных микрокапсул на поверхности кварцевой пластины

Для закрепления полиэлектролитных микрокапсул с инкапсулированной уреазой на поверхности кварцевой пластины использовали модифицированный метод, описанный в работе Монтреля М.М. (Монтрель и др., 2006). Для этого кварцевую пластину (1 x 9 x 45 мм) поочередно инкубировали в течение 10 минут в растворах (5мл) полиэтиленimina, ПАА и ПСС с концентрацией 2 мг/мл. Между инкубациями в растворах полиэлектролитов пластину трижды инкубировали по 30 секунд в дистиллированной воде (10 мл) для удаления неадсорбированных молекул полиэлектролита. Полиэтиленimin обеспечивает сцепление между поверхностью и полимерным слоем, за счет своей сетчатой структуры. В дальнейшем наносили слой из полиэлектролитных микрокапсул, имеющие состав оболочки ПСС/ПАА/ПСС. На последнем этапе, поверх слоя капсул, дополнительно наносили три слоя полимеров ПАА/ПСС/ПАА (Монтрель et al., 2006; Фомкина et al., 2011). Полученную пластину хранили при комнатной температуре (22 °С) в закрытой 15 мл пластиковой пробирке.

Определение концентрации мочевины

Концентрацию мочевины определяли по методу Бергло по конечной точке (Van Staden and Taljaard, 1997). Принцип метода заключается в том, что уреазы 12,5 кЕ/л в растворе калия фосфорнокислого однозамещенного 121 ммоль/л катализирует гидролиз мочевины (образец) с образованием аммиака и углекислого газа. Нитропруссид натрия 5,07 ммоль/л в щелочной среде катализирует реакцию взаимодействия аммиака с салицилатом 62,4 ммоль/л и гипохлоритом натрия 10 ммоль/л с образованием окрашенного соединения, интенсивность окраски которого прямо пропорциональна концентрации мочевины и измеряется фотометрически при длине волны 540 нм. В случае определения концентрации мочевины при помощи диагностической пластины ее погружали в 3 мл раствора, содержащий образец с мочевиной и инкубировали 10 минут. В дальнейшем,

пластину извлекали из анализируемой среды и добавляли в раствор описанные выше реактивы для образования окрашенного соединения.

Регистрация кинетики ферментативных реакций (АДГ)

Кинетику ферментативных реакций регистрировали по изменению оптической плотности в полосе поглощения НАДН при 340 нм на спектрофотометре Cary 100 (“Agilent”, США)(Guru and Taranath Shetty, 1990). Реакцию запускали добавлением 100 мкл раствора фермента в 1.9 мл реакционной смеси, содержащей 200 мМ этанола, 0,2 мМ НАД⁺ в 0,05 М трис-НСl буфере (рН 7,2). При изучении влияния полиэлектролитов на фермент к раствору белка добавляли ПЭ в весовом соотношении 1:1 и 1:5 (1 и 5 мг/мл соответственно). Исследование влияния солей на полиэлектролит – белковое взаимодействие проводили в присутствии 2,0 М NaCl, 0,2 М NaCl и 0,1 М (NH₄)₂SO₄. Растворы солей готовили совместно с полиэлектролитами, в дальнейшем к этой смеси добавляли раствор фермента для последующего инкубирования.

Определение активности АДГ

Активность АДГ определяли по наклону линейной части кривой накопления НАДН во времени в течение первых 10 с после начала реакции как отношение изменения оптической плотности (A) ко времени (t). Концентрация кофермента НАД (0.2 мМ) превышала точку насыщения (условие насыщения по коферменту).

Измерение флуоресценции АДГ

Спектры флуоресценции АДГ регистрировали на приборе Cary Eclipse (“Agilent”, США) в термостатируемой кювете (20°C) с длиной оптического пути 1 см при возбуждении при 273 нм (“Protein Fluorescence,” 2006). Состав реакционной смеси: АДГ – 50 мкг/мл, ПСС – 50 мкг/мл, 0.05 М трис-НСl, рН 7.2.

Статистический анализ данных

Для каждого измерения интенсивности флуоресценции АДГ и активности АДГ были получены средние значения и относительное стандартное отклонения.

Число повторов (N) было 5. Значимость различий проверяли с использованием независимого t-критерия с двумя образцами (t-критерий Стьюдента), $p \leq 0,01$.

Регистрация кинетики ферментативных реакций (Глюкозооксидаза)

Кинетику ферментативных реакций регистрировали по изменению силы тока при напряжении 100 мВ на оксиметре при помощи программы Record4USB в режиме «микроамперметр» при усилении 1. Реакцию запускали добавлением раствора глюкозы в реакционную смесь. Конечные концентрации компонентов смеси: глюкоза – 93,75 мМ, глюкозооксидаза – 62,5 мкг/мл, фосфатный буфер – 10 мМ. При изучении влияния полиэлектролитов на фермент к раствору белка добавляли ПЭ в весовом соотношении 1:1 и 1:5 (1 и 5 мг/мл соответственно).

Формирование химического сенсора на основе берлинской лазури

Осаждение берлинской лазури на поверхность электродов проводили из реакционной смеси состава: 0.1 М FeCl₃ и 0.1 М K₃[Fe(CN)₆] в фоновом электролите 0.1 М KCl, 0.1 М HCl. Смесь предварительно выдерживали в течение 20 мин в пробирке Эппендорфа в темноте, затем ее наносили на рабочий электрод. Через 15 мин в нанесенный раствор на электроде добавляли пероксид водорода до достижения концентрации 100 мМ в капле и выдерживали полученную смесь на электроде в течение 45 мин. По окончании осаждения поверхность электродов промывали дистиллированной водой. Затем проводили активацию электрода (потенциодинамическая обработка модифицированного берлинской лазурью (БЛ) электрода в циклическом режиме в фоновом электролите в интервале потенциалов от -0.05 до 0.35 В) в соответствии с методикой, описанной в работе Arkady A. Karyakin et al (Karyakin et al., 1994). Если анодный пик окисления на циклической вольтамперограмме был выше значения 20 мкА, электрод считался годным для проведения дальнейших измерений.

Формирование глюкозного биосенсора

1) 5 мкл полиэлектролитных капсул со встроенной глюкозооксидазой наносили на поверхность модифицированного берлинской лазурью рабочего электрода, подсушивали на воздухе при комнатной температуре в течение 30

минут. В случае модификации глюкозного биосенсора углеродными мультислойными нанотрубками (УМНТ) использовали ПМК, содержащие в оболочке или ядре УМНТ.

2) Готовили смесь глюкозооксидазы (2 мг/мл) и хитозана (2 %-ый раствор в 1 %-й уксусной кислоте (Wang X., Gu H., Yin F., 2009)), в объемном соотношении 1:1. 5 мкл полученной смеси наносили на поверхность модифицированного берлинской лазурью рабочего электрода, подсушивали на воздухе при комнатной температуре в течение 30 минут.

Готовые биосенсоры хранили при температуре 4°C в темноте. Измерения выполняли при 20 С в кювете объемом 1 мл при постоянном перемешивании. Модельные растворы глюкозы были приготовлены в 25 мМ натрий-калий-фосфатном буферном растворе (рН 6.5, буферная емкость 0.024 экв./рН) с добавлением 10 мМ NaCl.

В качестве образцов для определения концентрации глюкозы использовали соки, разведенные буферным раствором до концентрации, необходимой для анализа (а именно в 10 раз):

- 1) Сок яблочный восстановленный осветлённый «Global Village», ООО «Южная соковая компания», РФ, углеводы 10 г на 100 мл продукта;
- 2) Сок яблочный осветлённый восстановленный «Фруто-Няня», АО «Прогресс», Россия, углеводы 11.2 г на 100 г продукта;
- 3) Нектар апельсиновый с мякотью «Фруктовый сад», ООО «Лебедянский», Россия, углеводы 12 г на 100 мл продукта, сахара 12 г на 100 мл продукта;
- 4) Нектар мультифруктовый с мякотью «Фруктовый сад», ООО «Лебедянский», Россия, углеводы 11 г на 100 мл продукта, сахара 11 г на 100 мл продукта;
- 5) Вино домашнее, выдержка 2 года, сорт винограда Изабелла;
- 6) Напиток безалкогольный негазированный пастеризованный «Aloe-Fresh», ООО «Вельта-Пенза», Россия, углеводы 8.72 г на 100 г продукта;
- 7) Винный напиток сладкий Сангрия «Эль Курадор», Производитель «Hauser Weinimport GmbH», Germany, углеводы 7.5 г в 100 мл продукта, содержание этилового спирта в 100 мл 6.9 мл, объемная доля этилового спирта 6.9% об., сахар 70-80 г/дм³.

III. Результаты и обсуждения*

1. Разработка диагностической системы для определения концентрации мочевины на основе иммобилизованной на пластине инкапсулированной уреазы

Ранее была показана возможность включения ферментов в полиэлектролитные микрокапсулы (Сухоруков и др., 2007), изучены каталитические характеристики, а также стабильность при длительном хранении и защиты от протеолитических ферментов инкапсулированных белков (Сухоруков и др., 2006). Следующим этапом развития данных исследований стало разработка диагностических систем на низкомолекулярные соединения, на основе инкапсулированных ферментов – микродиагностикумов (Sukhorukov et al., 2007a).

* Основные результаты, изложенные в данной главе, опубликованы в следующих научных статьях автора в журналах, индексируемых в базах данных WoS, Scopus и RSCI, рекомендованных для защиты в диссертационном совете МГУ имени М.В. Ломоносова:

1. **Kim A.L.**, Musin E. V., Dubrovskii A. V., Tikhonenko S.A., Effect of Polyallylamine on Alcoholdehydrogenase Structure and Activity. //Polymers.— 2020, — Vol.12, — № 4, — P. 832. (WOS IF 4, 967; SJR IF 0.72; Q1) Вклад автора в печатных листах: (0,625/0,5) (Здесь и далее в скобках приведен объем публикации в печатных листах и вклад автора в печатных листах)
2. **Kim A.L.**, Musin E.V., Dubrovskii A.V., Tikhonenko S.A., Determination of urea concentration using urease-containing polyelectrolyte microcapsules. //Analytical Methods.— 2019, — Vol.11, — № 12, — P. 1585-1590. (WOS IF 2, 896; SJR IF 0.54; Q2) (0,75/0,6)
3. Plekhanova Y. V., Tikhonenko S.A., Dubrovsky A. V., **Kim A.L.**, Musin E. V., Wang G.-J., Kuznetsova I.E., Kolesov V. V., Reshetilov A.N., Comparative Study of Electrochemical Sensors Based on Enzyme Immobilized into Polyelectrolyte Microcapsules and into Chitosan Gel. //Analytical Sciences.— 2019, — Vol.35, — № 9, — P. 1037–1043. (WOS IF 2,081; SJR IF 0.27; Q3) (0,3125/0,09375)
4. Reshetilov A., Plekhanova Y., Tarasov S., Tikhonenko S., Dubrovsky A., **Kim A.**, Kashin V., Machulin A., Wang G.J., Kolesov V., Kuznetsova I., Bioelectrochemical properties of enzyme-containing multilayer polyelectrolyte microcapsules modified with multiwalled carbon nanotubes. //Membranes.— 2019, — Vol.9, — № 4, — P. 1–12. (WOS IF 4,106; SJR IF 0.49; Q2) (0,625/0,1875)
5. Дубровский А. В., Мусин Е. В., **Ким А. Л.**, Тихоненко С. А., Влияние полиэлектролитов на каталитическую активность алкогольдегидрогеназы. //Прикладная биохимия и микробиология.— 2016, — Т.52, № 2, С. 250-254, 2016.Doi:10.7868/S0555109916020045. IF (РИНЦ)-1,439 (0,25/0,15) [Dubrovsky A.V., Musin E.V., Kim A.L., Tikhonenko S.A., Effect of polyelectrolytes on catalytic activity of alcohol dehydrogenase // Applied biochemistry and microbiology. — 2016. — Vol. 52. — № 2. — P. 233-236. DOI: 10.1134/S0003683816020046. (WOS IF 0,886; SJR IF 0.247; Q3)]

Одним из основных преимуществ вышеописанного микродиагностикума – это возможность многократного его применения путем извлечения микрокапсул из реакционной среды и последующего их использования (Сухоруков et al., 2006; Sukhorukov et al., 2007a). Кроме того, инкапсулированный фермент способен сохранять свою активность на протяжении длительного времени и не подвержен негативному воздействию протеаз (Сухоруков et al., 2006).

Но несмотря на явные преимущества предложенного микродиагностикума, его главным недостатком является трудоемкость использования, в частности извлечение его из анализируемой среды. Для устранения данного недостатка было предложено закрепить микрокапсулы с включённым в них белками – сенсорами на твердой поверхности и создать на их основе диагностическую пластину.

Закрепление полиэлектролитных микрокапсул на кварцевой пластине

С целью закрепления микрокапсул на кварцевой пластине был использован модифицированный метод иммобилизации ПМК на твердой поверхности описанный в работе Монтрея М.М. с коллегами (Фомкина и др., 2011). На первом этапе, кварцевую пластину инкубировали в растворе полиэтиленimina (ПЭИ) с целью придать ее поверхности электростатические свойства. В дальнейшем, по технологии поочередной адсорбции, на кварцевую пластину наносили полиаллиламин и полистиролсульфонат, факт закрепления которых регистрировали спектрофотометрическим методом по пику поглощения ПСС (длина волны 225 нм).

На рис. 3 показаны спектры поглощения пластины на разных стадиях ее покрытия полиэлектролитами. Из рисунка видно, что при адсорбции полистиролсульфоната на кварцевую пластину, покрытую полиэтиленимином, увеличивается оптическая плотность при 225 нм. При последующим нанесении полиаллиламина увеличения оптической плотности не происходит, так как ПАА не имеет пика поглощения при 225 нм. Последующее закрепление ПСС поверх слоя ПАА подтверждается пропорциональным увеличением оптической плотности, что

свидетельствует об образовании полиэлектролитного комплекса. В конечном счете полиэлектролитная пленка имеет состав - (ПЭИ/ПСС/ПАА/ПСС).

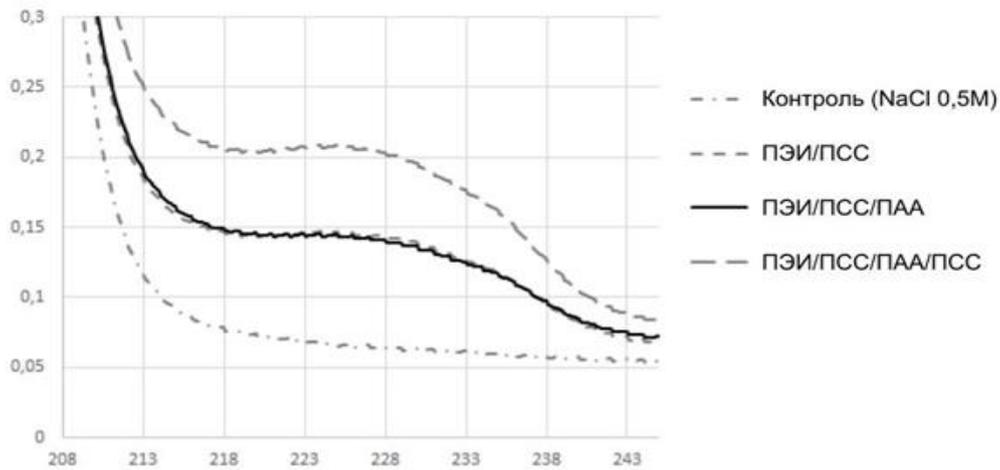


Рис. 3. Спектр поглощения ПСС, закрепленного на поверхности кварцевой пластины.

В дальнейшем полиэлектролитные микрокапсулы состава $(\text{ПСС/ПАА})_2$ закрепляли на полученной полимерной пленке, поверхностный заряд которой противоположен заряду капсул. На последнем этапе микрокапсулы фиксировали дополнительными слоями полиэлектролитов и удаляли CaCO_3 кор из ПМК при помощи раствора ЭДТА. (схема данной технологии представлена на рис. 4)

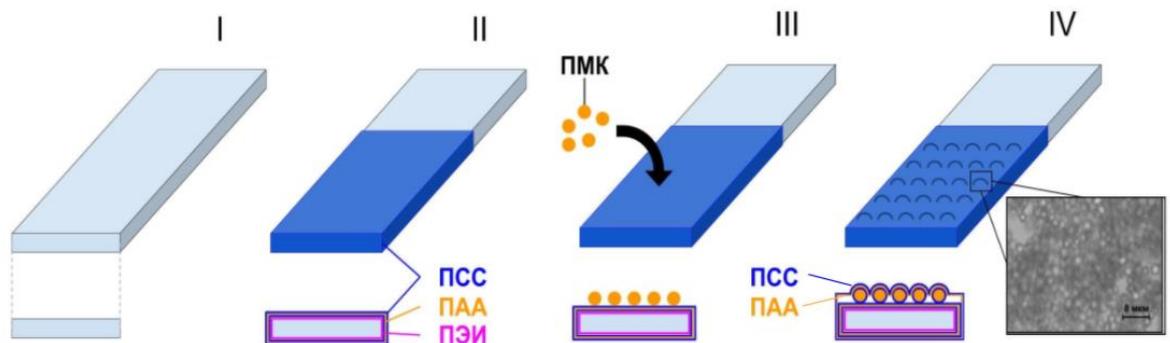


Рис. 4. Технология закрепления ПМК на кварцевой пластине.

Из описанного выше видно, что данный метод позволяет закрепить полиэлектролитные микрокапсулы на поверхности твердого носителя, что открывает возможность для создания диагностической пластины на основе инкапсулированного фермента, который сохраняет свою активность, а благодаря полупроницаемости оболочки субстрат из раствора может беспрепятственно проникать к ферменту (Рис.5).

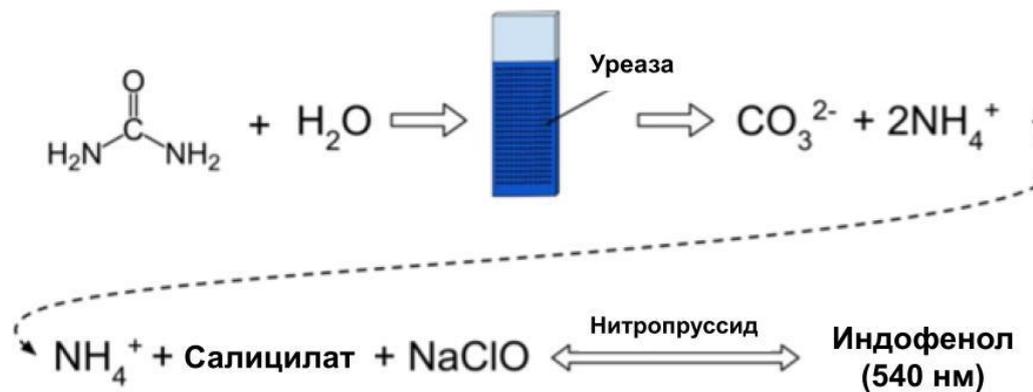


Рис.5. Схема реакции обнаружения мочевины при помощи диагностической пластины.

Одним из основных преимуществ диагностической пластины является ее многократное применение благодаря возможности извлечения сенсорного компонента (инкапсулированной уреазы) из реакционной среды и повторного его использования. В работе Кима и др. (Kim et al., 2019) была представлена возможность извлечения полиэлектролитных микрокапсул при помощи метода фильтрация, но данный процесс занимает более 10 минут, что значительно превышает извлечение диагностической пластины из анализируемой среды.

На рис. 6 приведены результаты по многократному применению диагностической пластины. Для этого использовали модифицированный фотометрический метод Бертло (по конечной точке), для этого фермент (уреаза) заменяли на диагностическую пластину, содержащую на своей поверхности ПМК с инкапсулированной уреазой.

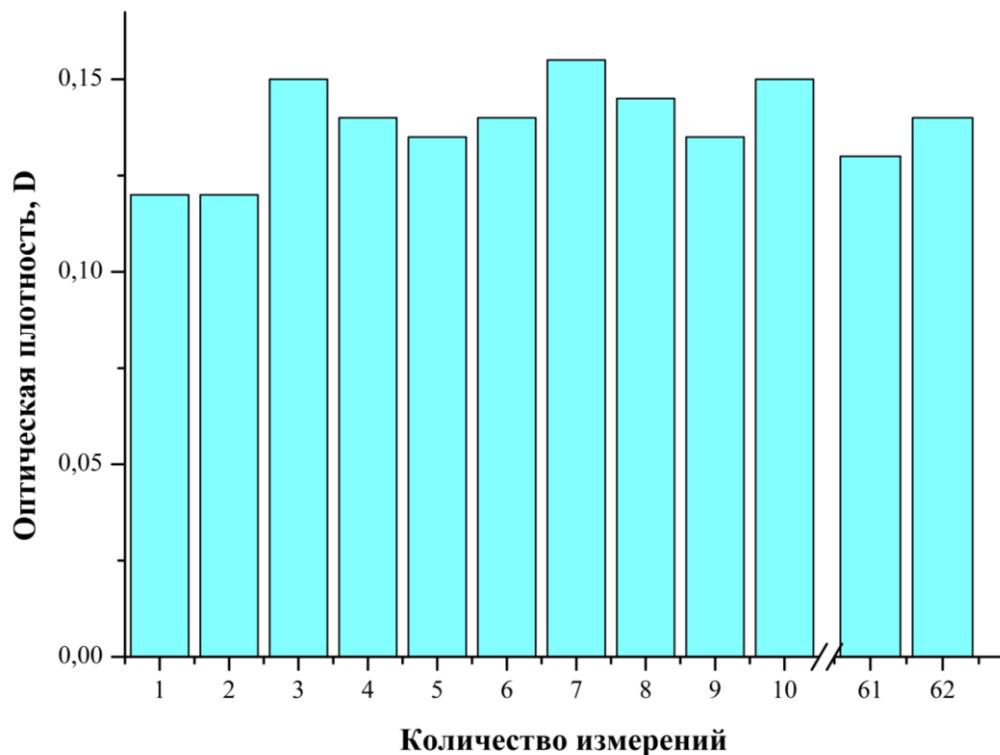


Рис. 6. Многократное применение диагностической пластины. Мочевина – 17 ммоль/л, нитропруссид натрия – 5,07 ммоль/л, салицилат – 62,4 ммоль/л, гипохлорит натрия – 10 ммоль/л, рН – 6.2, Т - 22°C.

Представленные результаты были получены с использованием одной диагностической пластины с закрепленными ПМК с уреазой. Как видно, при повторном многократном использовании диагностической пластины, отклонения не превышают порогового значения 9,6%.

Аналогичным образом была изучена возможность многократного использования диагностической пластины, содержащей уреазу, для определения концентрации мочевины в анализируемой жидкости в широком диапазоне ее концентраций. По результатам исследования был определен диапазон определяемых концентраций мочевины и линейный диапазон определяемых концентраций (рис. 7.).

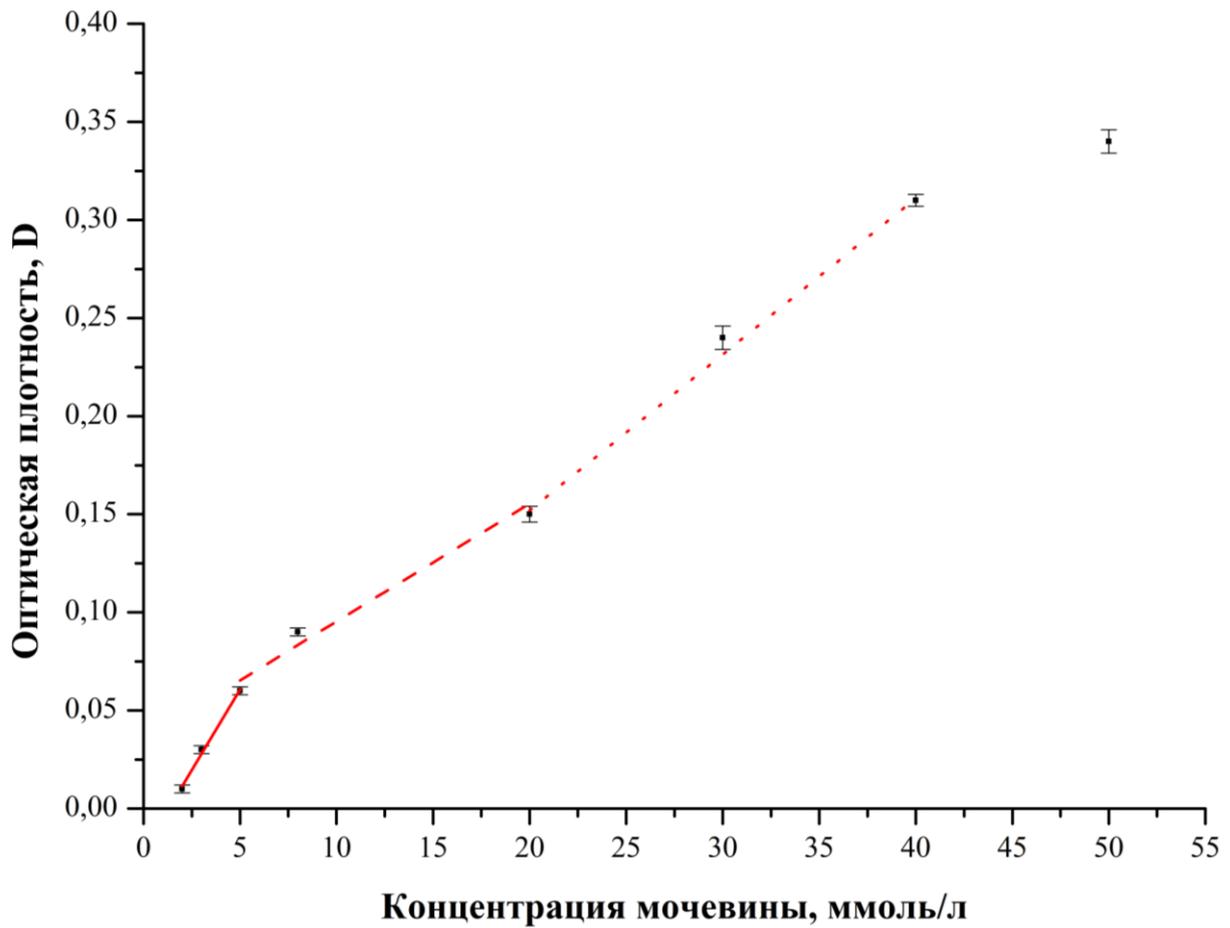


Рис. 7. Диапазон определяемых концентраций диагностической пластины. Нитропруссид натрия – 5,07 ммоль/л, салицилат – 62,4 ммоль/л, гипохлорит натрия – 10 ммоль/л, рН – 6,2, Т - 22°C.

В результате было показано, что полученная диагностическая пластина позволяет обнаружить концентрацию мочевины в диапазоне от 2 до 50 ммоль/л, с тремя линейными диапазонами определяемых концентраций: от 2 до 5 ммоль/л (погрешность линейности не более 9,1%); от 5 до 20 ммоль/л (погрешность линейности не более 7,4%); от 20 до 40 ммоль/л (погрешность линейности не более 3,8%).

По полученным результатам также были рассчитаны коэффициенты вариации, необходимые для оценки точности и повторяемости анализа (табл.1.).

Таблица 1. Коэффициенты вариации полученных данных.

Концентрация мочевины, ммоль/л	2	3	5	8	20	30	40
Коэффициент вариации, %	20	6.7	3.3	2.2	2.7	2.5	1.0

Как видно из таблицы 1, коэффициент вариации не превышает 6.7% в диапазоне от 3 до 40 мМ мочевины. При этом, в значении 2 мМ, коэффициент вариации составляет 20%, что не удовлетворяет требованиям, предъявляемым к подобным диагностическим системам. Таким образом, по полученным результатам и проведенным расчетам можно сделать вывод, что диапазон определяемых концентраций мочевины находится в интервале от 3 до 40 мМ при коэффициенте вариации не более 7%.

На следующем этапе были проведены работы по изучению возможности использования диагностических пластин для анализа биологических жидкостей. Для этого была взята сыворотка крови у 5-ти волонтеров и определена концентрация мочевины по стандартному уреазному методу Бергло как с использованием свободного фермента (сертифицированный набор (КТ) Мочевина Диакон-ДС), так и с использованием диагностической пластины, эти результаты представлены в таблице 2.

Таблица 1. Сравнение результатов применения стандартного уреазного метода Бергло с использованием свободного фермента и диагностической пластины.

Образец	Диагностическая пластина, мМ	Стандартное отклонение, %	Свободный фермент, мМ	Стандартное отклонение, %
1	16,2	3,14	15,9	1,73
2	10,9	4,19	11,3	2,21
3	19,3	2,2	20,1	1,43

4	15,4	1,5	15,9	3,62
5	38,2	3,75	39,9	2,1

Из таблицы 2 видно, что данные измерения с помощью свободного фермента и диагностической пластины отличаются не более чем на 4,26%.

Полученная диагностическая пластина позволяет обнаружить концентрации мочевины в диапазоне от 3 до 40 ммоль/л, с тремя линейными диапазонами определяемых концентраций от 3 до 5 ммоль/л; от 5 до 20 ммоль/л; от 20 до 40 ммоль/л.

2. Изучение влияния полиэлектролитов на каталитические свойства алкогольдегидрогеназы.

Глобальное производства этанола и алкогольной продукции требует постоянного мониторинга качества получаемой продукции, в связи с чем востребованы методы определения концентрации этанола. Одним из используемых методов является метод определения этанола при помощи алкогольдегидрогеназы. Но так как алкогольдегидрогеназный метод анализа этанола имеет те же недостатки, что и остальные ферментативные методы (Борисович, 2010), то возникает необходимость в их устранении, например, при помощи инкапсулирования этого фермента в ПМК. С этой целью нами предложена разработка микродиагностикума на базе алкогольдегидрогеназы инкапсулированной в полиэлектролитные микрокапсулы.

Первым этапом при разработке полиэлектролитного микродиагностикума на этанол является изучение влияния полианионов и поликатионов, используемые при создании ПМК, на каталитические и конформационные свойства алкогольдегидрогеназы и подобраны условия, при которых ингибирование полиэлектролитов на фермент действовало минимально.

2.1. Влияние полиаллиламина на активность и конформационные свойства алкогольдегидрогеназы

Первым этапом изучения взаимодействия АДГ с ПАА, было исследование его влияния на активность фермента. Для изучения влияния ПАА на АДГ были выбраны следующие концентрации полиэлектролита: равная по массе ферменту и в 5 раз превышающая данное значение. Данный выбор связан с тем, что при инкапсулировании фермента соблюдается соотношение 1 к 1 полиэлектролита к белку, при этом пятикратное увеличение концентрации полиэлектролита позволит нам увидеть более выраженные эффекты, связанные с влиянием полимера на АДГ.

На рисунке 8 представлена зависимость начальной активности свободной АДГ и в комплексе с ПАА от времени инкубации. Из рисунка видно, что ПАА ингибирует активность фермента в первые минуты инкубации. В дальнейшем не наблюдается влияния полиэлектролита на активность алкогольдегидрогеназы, падение активности с течением времени объясняется инактивацией фермента. Из рисунка 8 видно, что комплекс АДГ-ПАА имеет значительно более низкую активность на протяжении всего времени инкубации по сравнению с нативным ферментом.

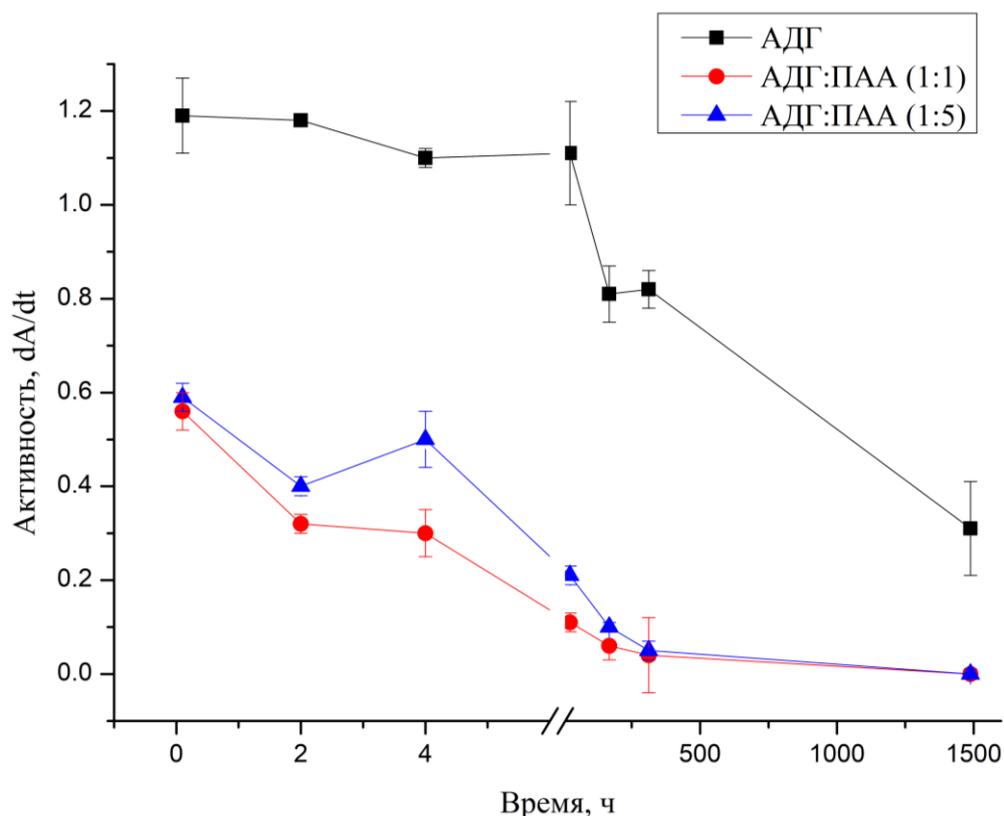


Рис. 8. Зависимость активности АДГ (алкогольдегидрогеназы) (6,25 мкг / мл) в нативном состоянии и в присутствии ПАА (6,25 мкг / мл, 1: 1; 31,25 мкг / мл, 1: 5) от время инкубации. Этанол – 200 мМ, НАД⁺ – 0,2 мМ, трис-НСl – 0,05 М, рН – 7,2, Т – 22°С.

Поскольку падение активности фермента может быть связано как с изменением его структуры, так и с образованием комплекса с полимером, то была поставлена задача изучить влияние полимера на структуру АДГ методом флуоресцентной спектроскопии.

На рисунке 9 представлена зависимость собственной флуоресценции алкогольдегидрогеназы как свободной, так и в присутствии полиэлектролита от времени инкубации. Из рисунка видно, что присутствие ПАА в растворе не влияет на флуоресценцию белка как в начальный момент времени, так и при длительной инкубации. Из этого можно сделать вывод, что полиэлектролит не разрушает третичную структуру белка (24).

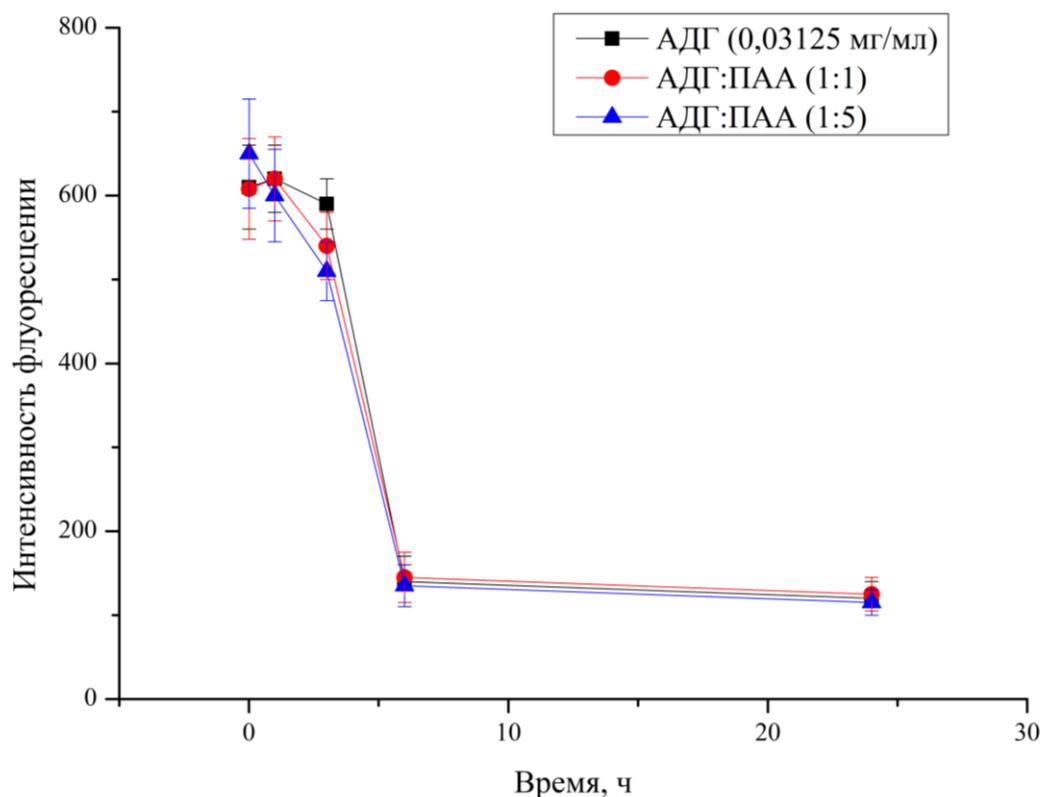
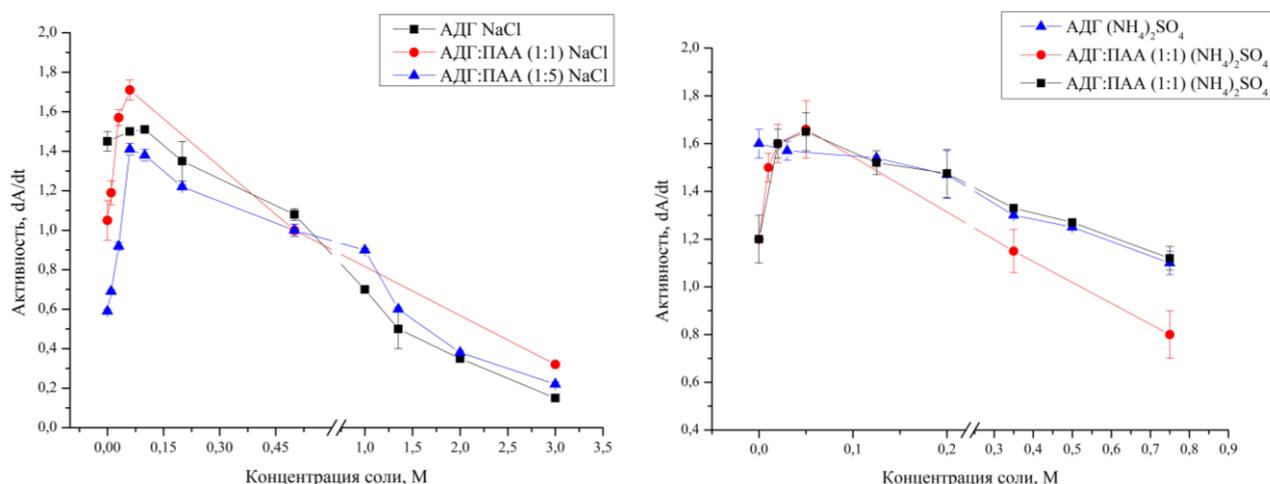


Рис. 9. Зависимость флуоресценции АДГ (31,25 мкг/мл) в свободном состоянии и в присутствии ПАА (31,25 мкг/мл, 1:1; 156,25 мкг/мл, 1:5) от времени инкубации. Этанол – 200 мМ, НАД⁺ – 0,2 мМ, трис-НСl – 0,05 М, рН – 7,2, Т – 22°С.

Таким образом, было установлено, что ПАА влияет на активность фермента, но не влияет на его структуру. Для понимания данного эффекта была поставлена задача изучить механизмы ингибирования фермента. Для этого, учитывая электростатическую природу образования белок-полиэлектrolитного комплекса, АДГ инкубировали в растворе соли сульфата аммония или хлорида натрия в присутствии полиэлектролитов ПАА. Как было ранее показано в работе Тихоненко С.А. и др (Tikhonenko et al., 2009) на примере уреазы, что данные соли влияют на каталитические свойства и механизм образования комплекса уреазы-ПАА в частности, присутствие 0.005 М сульфата аммония или 0.2 М хлорида натрия частично снимало негативное влияние ПАА. В случае 0.2 М хлорида натрия противоионы соли экранируют заряды как на полиэлектролите, так и на ферменте, что уменьшало взаимодействия между ними. В случае 5 мМ сульфата аммония сульфогруппа соли связывается как минимум с двумя аминоклупами

полиэлектролита, что в результате приводит к увеличению жесткости цепи полимера и уменьшению его степеней свободы и как следствие, к снижению полиэлектролит-белкового взаимодействия (Tikhonenko et al., 2009).

Таким образом, было изучено влияния хлорида натрия и сульфата аммония на АДГ в присутствии ПАА. На рис. 10. представлена зависимость активности АДГ в свободном состоянии и в присутствии ПАА в соотношении 1:1 и 1:5 от концентрации хлорида натрия (10а), из рисунка видно, что АДГ ингибируется в присутствии полимера. При добавлении NaCl и последующем добавлении ПАА в раствор АДГ активность фермента увеличивалась с ростом концентрации соли, вплоть до 0,05 М хлорида натрия. Такой эффект можно объяснить тем, что противоионы соли экранируют заряды как на полиэлектролите, так и на ферменте, что привело к уменьшению взаимодействия между ними. В дальнейшем наблюдается постепенное падение активности АДГ как в свободном состоянии, так и в присутствии ПАА, при этом их тенденции не отличаются. Такое падение активности белка связано с понижением его растворимости из-за высаливания и дегидратации солью.



(A)

(B)

Рис. 10. Зависимость активности АДГ (6,25 мкг/мл) в свободном состоянии и в присутствии ПАА (6,25 мкг/мл, 1:1; 31,25 мкг/мл, 1:5) от концентрации хлорида

натрия (А) и сульфата аммония (Б). Этанол – 200 мМ, НАД⁺ – 0,2 мМ, трис-НСl – 0,05 М, рН – 7,2, Т – 22°С.

Кроме того, было изучено влияние сульфата аммония на АДГ в присутствии ПАА (10б), данный выбор соли обусловлен тем, что сульфат аммония является дивалентной солью, таким образом рост активности фермента в комплексе с полиэлектролитом в присутствии данной соли может отличаться от активности комплекса в присутствии хлорида натрия. Также, известно, что увеличение активности фермента (уреазы) в комплексе с ПАА происходит при более низкой концентрации сульфатов, чем для хлоридов (Tikhonenko et al., 2009). На рис. 10 представлена зависимость активности АДГ в свободном состоянии и в присутствии ПАА в весовом соотношении 1:1 и 1:5 от концентрации сульфата аммония. Из рисунка видно, что АДГ ингибируется в присутствии полимера и отсутствии соли. При добавлении $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ и последующем добавлении ПАА в раствор АДГ активность фермента увеличивалась с ростом концентрации соли, вплоть до 0,005 М сульфата аммония. В данном случае концентрация соли сульфата аммония недостаточна для образования эффекта экранирования между полиэлектролитом и ферментом, поэтому предотвращение ингибирования фермента может быть связано с тем, что сульфогруппа соли связывается как минимум с двумя аминогруппами полиэлектролита, что в результате приводит к увеличению жесткости цепи полимера и уменьшению его степеней свободы и как следствие, к снижению полиэлектролит-белкового взаимодействия (Сабурова et al., 2008). Что позволяет сделать вывод о том, что падение активности алкогольдегидрогеназы в присутствии полиэлектролита предположительно связано с блокированием активной петли фермента при образовании белок-полимерного комплекса. В дальнейшем наблюдается постепенное падение активности АДГ как в свободном состоянии, так и в присутствии ПАА, при этом их активности не отличаются. Падение активности белка связано с высаливанием и дегидратации солью. В результате, видно, что оптимальная концентрация $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ для снятия

ингибирования фермента полиэлектролитом (ПАА) находится в диапазоне от 0,005 М до 0,15 М.

В дальнейшем, было изучено влияния 0,15М $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ на активность АДГ в присутствии ПАА при длительном инкубировании. Выбор данной концентрации сульфата аммония позволит показать влияние сразу двух механизмов полиэлектролит-белкового взаимодействия: ионная сила 150 ммоль сульфата аммония соответствует по ионной силе 300 ммоль хлорида натрия, при которой наблюдалось снижение ингибирования фермента, что может быть объяснено ослаблением электростатических взаимодействий между заряженными группами белка и ПЭ за счет экранирования зарядов противоионами соли. Также при 150 ммоль сульфата аммония наблюдалось снижение ингибирования, что связано с увеличением жесткости полимерной цепи (эффект описан выше). На рис. 11 представлена зависимость активности свободной АДГ и в присутствии ПАА в соотношении 1:1 и 1:5 от времени инкубации в 0.15 М сульфате аммония.

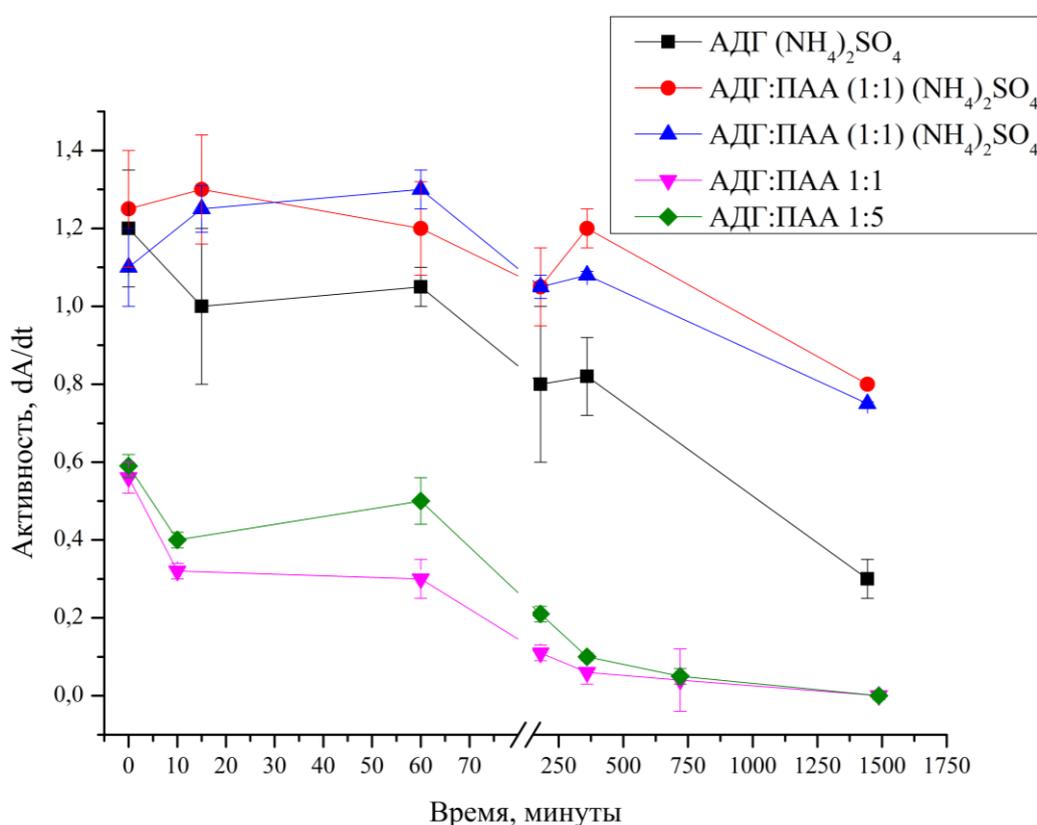


Рис. 11. Зависимость активности АДГ (6,25 мкг/мл) в свободном состоянии и в присутствии ПАА (6,25 мкг/мл, 1:1; 31,25 мкг/мл, 1:5) и сульфата аммония от

времени инкубации. Этанол – 200 мМ, НАД⁺ – 0,2 мМ, трис-НСl – 0,05 М, рН – 7,2, Т – 22°С.

Из рис. 11 видно, что $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ снимает ингибирование фермента полиаллиламином. При дальнейшей инкубации раствора наблюдается постепенное снижение активности как свободной АДГ, так и в комплексе с ПАА. Таким образом, мы видим, что 0.15М сульфат аммония снимает ингибирование фермента полиэлектролитом на протяжении всего времени инкубации.

2.2. Влияние полистиролсульфоната на активность алкогольдегидрогеназы

2.2.1. Флуоресцентные свойства комплекса ПСС-АДГ

Первым этапом изучения взаимодействия АДГ с ПСС, было исследование влияния полистиролсульфоната на собственную флуоресценцию фермента. На рис. 12 представлены спектры собственной флуоресценции свободной АДГ и в присутствии ПСС в 0,05 М трис-НСl буфере (рН 7.2), полученные через 1 ч инкубации с ПЭ. Из рис. 5 видно, что флуоресценция белка в присутствии ПСС уменьшалась на 25%, что предположительно связано с частичным разрушением его четвертичной структуры. При дальнейшей инкубации раствора существенных изменений в интенсивности флуоресценции не наблюдалось как в свободном состоянии, так и в присутствии ПСС.

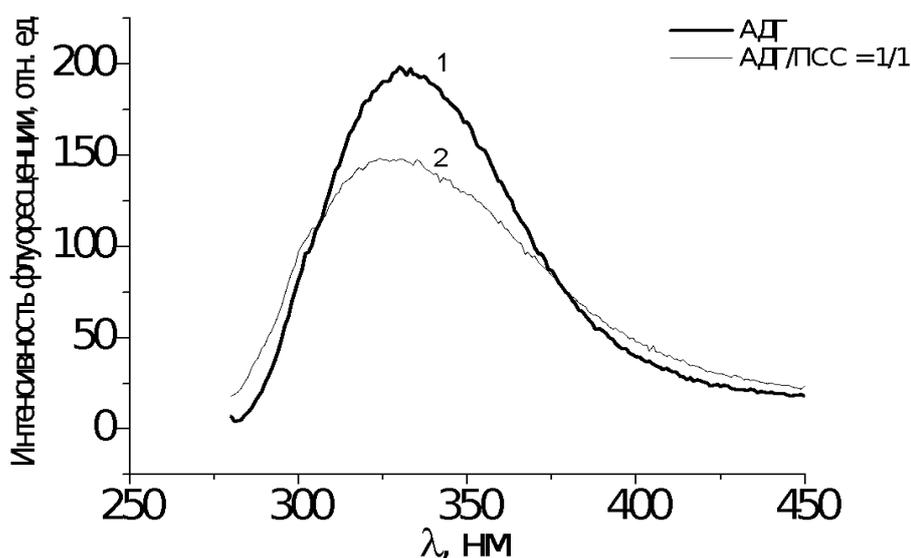


Рис. 12. Спектры флуоресценции АДГ в свободном состоянии (1) и в присутствии ПСС (50 мкг/мл, 2). Записаны через 1 ч после добавления ПСС. 1 – АДГ (50 мкг/мл), 2 – АДГ/ППС – 1:1

2.2.2. Влияние полистиролсульфоната натрия на каталитическую активность алкогольдегидрогеназы.

Следующим этапом изучения взаимодействия АДГ с ПСС, было исследование их влияния на активность фермента. На рис. 13 представлена зависимость активности от времени инкубации свободной АДГ и в присутствии ПСС в соотношении 1:1 и 1:5. Из рисунка видно, что ПСС не влиял на активность фермента в первые 6 ч инкубации. Падение активности, как свободного фермента, так и в комплексе с ПСС объясняется инактивацией фермента, зависящей от времени инкубации, а не влиянием ПЭ. Такое поведение АДГ, сопровождаемое частичным разрушением ее четвертичной структуры, объясняется тем, что активность фермента является функцией отдельных его субъединиц, а не глобулы в целом, поскольку дрожжевая АДГ имеет 4 независимых активных центра по одному на каждую субъединицу (Raj et al., 2014). В дальнейшем видно падение активности фермента в течение 144 ч, причем как в присутствии полиэлектролита, так и свободной АДГ. Из рис. 13 также видно, что в присутствии ПСС фермент инактивировался сильнее, чем свободный, при этом соотношение полиэлектролита к белку не влияло на активность.

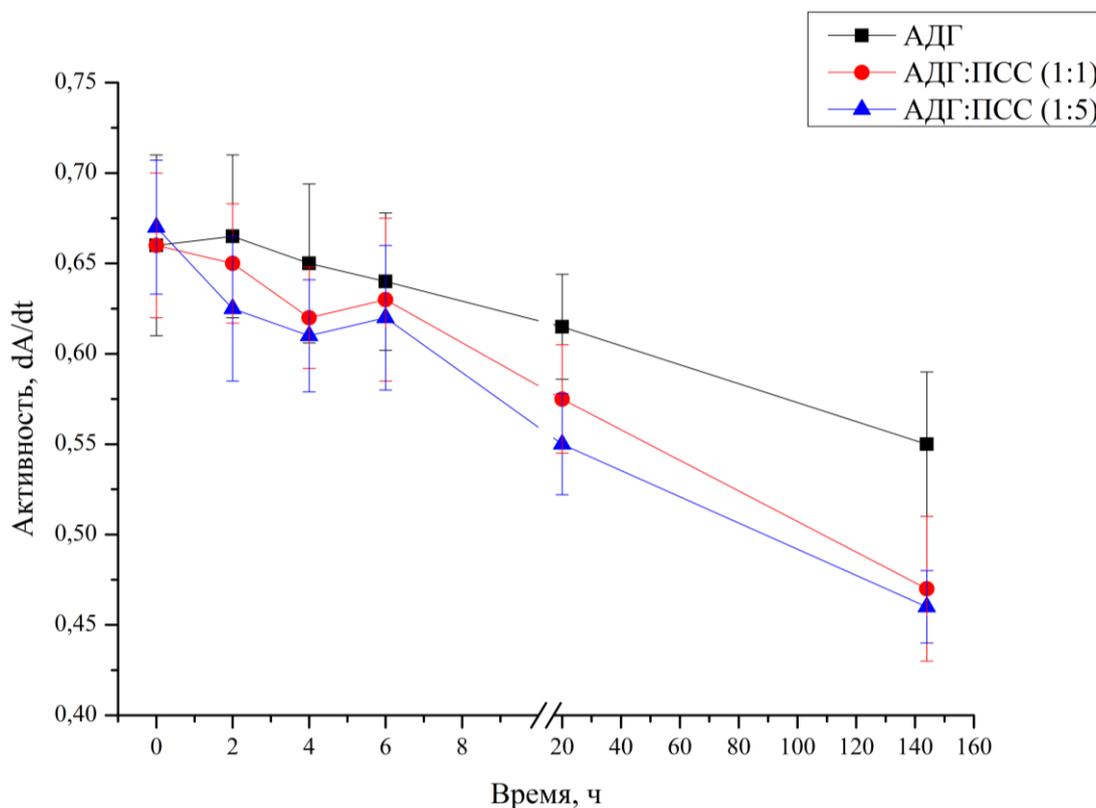


Рис. 13. Зависимость активности АДГ в свободном состоянии и в присутствии ПСС (50 мкг/мл 1/1; 250 мкг/мл, 1/5) от времени инкубации. Этанол – 200 мМ, НАД⁺ – 0,2 мМ, трис-НСl – 0,05 М, рН – 7,2, Т – 22°С.

2.2.3. Влияние солей на свойства АДГ в комплексе с ПСС

Ранее было показано, что моно- и дивалентные соли влияют на каталитические свойства и механизмы комплексообразования АДГ-ПСС (Durdenko et al., 2010). Было установлено, что при концентрациях соли ниже 0,4 М активность АДГ монотонно возрастает для всех исследованных солей. Рост активности может быть объяснен ослаблением электростатических взаимодействий между заряженными группами белка и ПЭ за счет экранирования зарядов противоположными ионами соли. Об основном вкладе электростатических взаимодействий в этот эффект свидетельствует совпадение кривых для моно- и дивалентных солей, если их представить как функцию от ионной силы.

В связи с этим нами было изучено влияние солей на флуоресценцию и активность АДГ (рис. 14) как в присутствии ПСС, так и без него. Данные не представлены, так как было установлено, что флуоресценция белка в присутствии

солей не отличалась от флуоресценции без них. Исследование влияния солей на полиэлектролит – белковое взаимодействие проводили в присутствии 2.0 М NaCl, 0.2 М NaCl и $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$. В растворы солей добавляли необходимое количество полиэлектролита, в дальнейшем к этой смеси добавляли раствор фермента для последующего инкубирования. Реакцию запускали добавлением раствора фермента в реакционную смесь, содержащей 0.1 мМ этанола, 0.2 мМ НАД⁺ в 0.05 М трис – HCl буфере (pH 7.2). При изучении влияния полиэлектролитов на фермент к раствору белка добавляли ПЭ в весовом соотношении 1:1 и 1:5.

Исследование каталитических свойств АДГ в присутствии 0.2 М хлорида натрия показало, что присутствие соли снимало инактивацию свободного фермента при длительной инкубации в течении 144 ч, однако ПСС при этом снижал активность АДГ пропорционально содержанию полиэлектролита. Эффект снятия ингибирования свободного фермента при его инкубации в растворе может быть связан с тем, что АДГ представляет собой сульфогидрильный фермент, за активность которого отвечают сульфогидрильные (-SH) группы (Raj et al., 2014). Присутствие в растворе 0.2 М NaCl предотвращает образование дисульфидных мостиков между ними. Благодаря этому воздействие ПСС на активность фермента становится более выраженным. Эти данные представлены на рис. 14 А.

Добавление 2.0 М хлорида натрия к реакционной смеси приводило к падению активности фермента вне зависимости от присутствия ПСС (рис. 14 Б). Такое поведение можно объяснить тем, что при столь высокой ионной силе происходит частичное выпадение белка в осадок, что приводит к падению его активности. Это предположение подтверждается помутнением таких растворов.

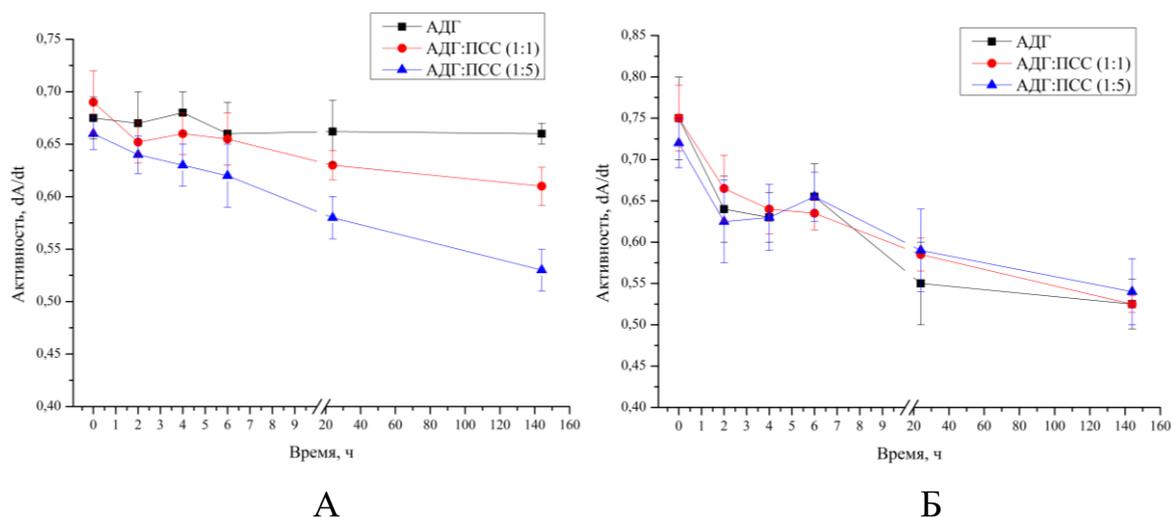


Рис. 14. Зависимость активности АДГ (1) в свободном состоянии и в присутствии ПСС (50 мкг/мл 1/1; 250 мкг/мл, 1/5) и хлорида натрия (А - 0.2 М, Б – 2.0 М) от времени инкубации. Этанол – 200 мМ, НАД⁺ – 0,2 мМ, трис-НСl – 0,05 М, рН – 7,2, Т – 22°C.

На рис. 15 представлена зависимость активности свободной АДГ и в присутствии ПСС в соотношении 1:1 и 1:5 от времени инкубации в 0.1 М сульфате аммония. Из рис. 15 видно, что $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ не только сохраняет активность АДГ в течение 144 ч, но и снимает ингибирование фермента ПСС. Первый эффект (сохранение активности АДГ), как и в эксперименте с 0.2 М NaCl, связан с предотвращением образования дисульфидных связей, что приводит к сохранению активности сульфогидрильных групп. Снятие же ингибирующего воздействия ПСС может быть обусловлено тем, что ионы SO_4^{2-} конкурентно связываются теми же участками молекулы белка, что и сульфогруппы ПСС, снимая тем самым влияние полиэлектrolита на активность АДГ.

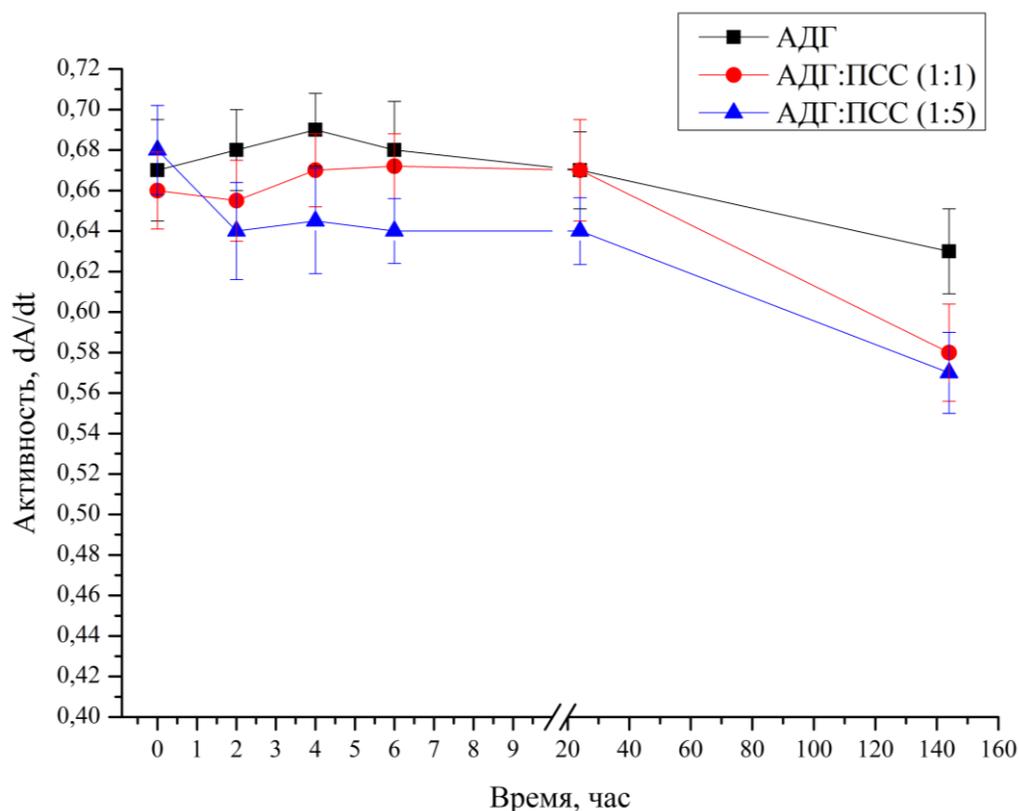


Рис. 15. Зависимость активности АДГ с 0.1 М сульфатом аммония в свободном состоянии и в присутствии ПСС (50 мкг/мл, 1/1; 250 мкг/мл, 1/5) от времени инкубации. Этанол – 200 мМ, НАД⁺ – 0,2 мМ, трис-НСl – 0,05 М, рН – 7,2, Т – 22°С.

По результатам исследования, было показано, что ПСС оказывал лишь незначительное воздействие на структуру и активность АДГ, а ПАА оказывал значительное воздействие на активность фермента. Однако, в присутствии 0.1 М сульфата аммония активность фермента восстанавливалась до нативной. В связи с вышесказанным было предложено проводить ферментативную реакцию инкапсулированной АДГ в присутствии 0.1 М сульфатом аммония.

3. Разработка диагностической системы для определения концентрации этанола на базе инкапсулированной алкогольдегидрогеназы.

Полученные результаты по влиянию ПАА и ПСС на структуру и активность алкогольдегидрогеназы позволили подобрать условия проведения ферментативной реакции минимизирующих их влияние на активность инкапсулированной АДГ.

Как известно длительная инкубация АДГ в растворе ЭДТА приводит к инактивации фермента, что связано с потерей Zn^{2+} из состава белковой молекулы, за счет образования комплекса между ЭДТА и ионами цинка (Magonet et al., 1992), которые необходимы для стабилизации четвертичной структуры алкогольдегидрогеназы, в связи с чем был выбран метод инкапсулирования фермента – адсорбция (Kochetkova et al., 2013), представляющий собой адсорбцию фермента в готовые микрокапсулы с уже удаленным $CaCO_3$ ядром, что исключило контакта АДГ с ЭДТА.

3.1. Сравнение каталитических характеристик свободной и инкапсулированной алкогольдегидрогеназы.

Следующей задачей являлось исследование каталитических свойств инкапсулированной АДГ. Для этого была исследована скорость реакции, катализируемая ферментом в капсулах в зависимости от концентрации этанола. На рис. 16 приведены кривые зависимости скорости реакции расщепления этанола от концентрации этанола, катализируемого АДГ в свободном и инкапсулированном состоянии. Активность определяли спектральным методом при 340 нм (спектр поглощения NADH). Как видно из рисунка 16, константа Михаэлиса-Ментен инкапсулированной алкогольдегидрогеназы к субстрату в 1,7 раза выше, чем свободного фермента.

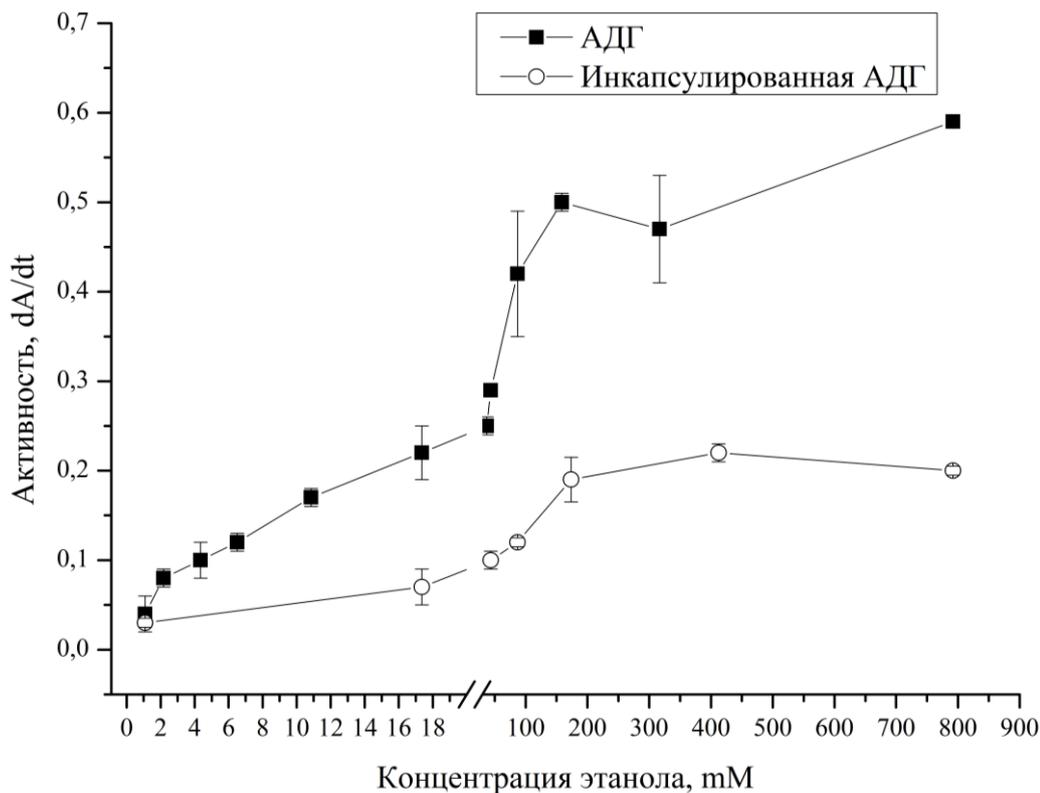


Рис. 16. Зависимость активности АДГ в свободном состоянии и в капсулах от концентрации этанола. $\text{НАД}^+ - 0,2 \text{ мМ}$, $\text{трис-НСI} - 0,05 \text{ М}$, $\text{pH} - 7,2$, $\text{T} - 22^\circ\text{C}$.

Так константа Михаэлиса K_m по этанолу составляла $71,6 \text{ мМ}$ для АДГ в ПМК, в то время как для свободной АДГ эта величина была равна $41,2 \text{ мМ}$; V_{max} для инкапсулированной АДГ составляла 30% от величины для свободного фермента. Этот эффект может быть результатом иммобилизации фермента в полиэлектролитной микрокапсуле.

3.2. Определение аналитических характеристик диагностической системы для определения концентрации этанола на базе инкапсулированной алкогольдегидрогеназы

В дальнейшем была изучена возможность применения инкапсулированного АДГ в качестве диагностической системы на этанол, с этой целью был определен диапазон определяемых концентраций этанола при помощи инкапсулированной алкогольдегидрогеназы (рис. 17). Для этого при постоянном перемешивании

добавляли инкапсулированную АДГ в раствор НАД⁺(0,2 мМ) и этанола исследуемой концентрации и инкубировали в течение 10 минут. После инкубации спектрофотометрически определяли оптическую плотность раствора в полосе поглощения НАДН при 340 нм.

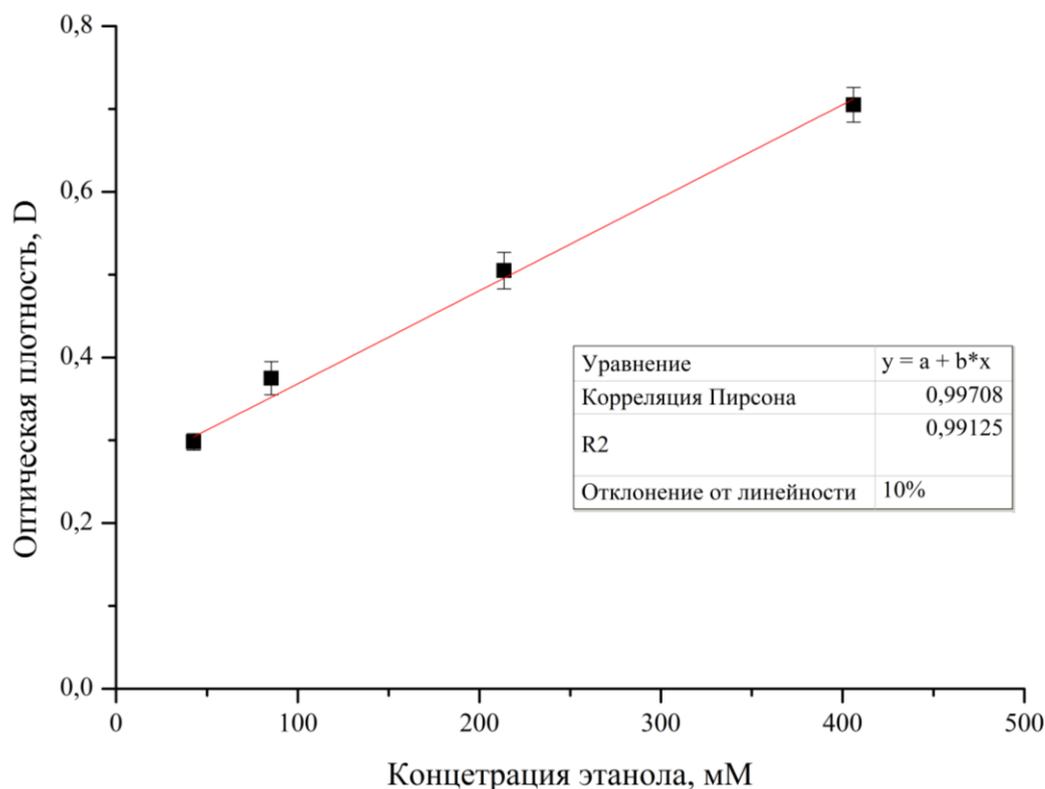


Рис. 17. Изменение оптической плотности от концентрации этанола. НАД⁺ – 0,2 мМ, трис-НСl – 0,05 М, рН – 7,2, Т – 22°С.

Из рисунка 17 видно, что при использовании инкапсулированной АДГ в качестве диагностической системы на этанол отклонения полученных значений оптической плотности при одной и той же концентрации не превышают 4,6% в диапазоне концентрации от 40 до 400 мМ. Данный диапазон определяемых концентраций подходит для определения этанола в пищевой промышленности, от 100 до 420 мМ.

На следующем этапе была изучена возможность многократного применения инкапсулированной формы алкогольдегидрогеназы для определения концентрации этанола в растворе. Для этого при 340 нм определяли оптическую плотность раствора после 10 минутной инкубации инкапсулированной АДГ в растворе

этанола 200 мМ. Для повторного использования ПМК их извлекали из анализируемой среды методом фильтрации. Полученные результаты представлены на рисунке 18.

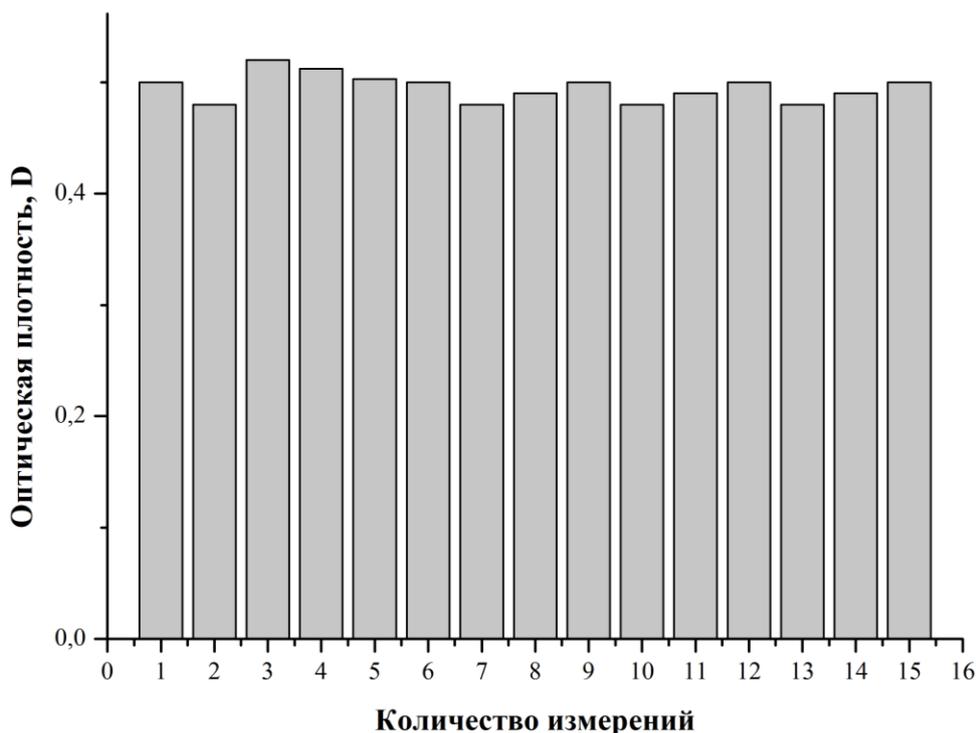


Рис. 18. Многократное применение инкапсулированной алкогольдегидрогеназы. Этанол – 200 мМ, НАД⁺ – 0,2 мМ, трис-НСl – 0,05 М, рН – 7,2, Т – 22°С.

Из графика видно, что при многократном использовании ПМК с АДГ оптическая плотность раствора изменяется не значительно и относительное стандартное отклонение не превышает 5%. Следовательно, полиэлектролитные микрокапсулы с инкапсулированной алкогольдегидрогеназой могут быть использованы многократно до 15 раз.

Таким образом, инкапсулированная АДГ может быть использована для определения концентрации этанола в растворе с использование спектрофотометрического метода «по конечной точке» в диапазоне концентраций от 40 до 400 мМ, т. к. отклонения полученных результатов в данном диапазоне не превышает 4,6%.

4. Разработка биосенсора на основе инкапсулированной глюкозооксидазы, иммобилизованной на поверхности амперометрического матричного электрода, покрытого берлинской лазурью.

Диагностические системы для определения концентрации глюкозы используют в различных областях, как в медицине, так и в промышленности. В частности, такая система может быть использована для мониторинга уровня глюкозы в крови пациентов с диабетом или другими заболеваниями, связанными с метаболизмом углеводов. Это может помочь в диагностике и лечении подобных заболеваний, а также предотвратить развитие осложнений, связанных с неадекватным контролем уровня глюкозы. Кроме того, такая система может быть полезна для мониторинга уровня глюкозы в пищевой промышленности и в других областях, где необходим постоянный контроль качества выпускаемой продукции с содержанием глюкозы. Одним из используемых методов является метод определения глюкозы при помощи глюкозооксидазы.

Этот метод анализа глюкозы имеет те же недостатки, что и остальные ферментативные методы (Борисович, 2010), в связи с чем возникает необходимость в их устранении, например, при помощи инкапсулирования этого фермента в ПМК. С этой целью нами предложена разработка микродиагностикума на базе алкогольдегидрогеназы инкапсулированной в полиэлектролитные микрокапсулы.

Первым этапом при разработке полиэлектролитного микродиагностикума для определения глюкозы является изучение влияния полианионов и поликатионов, используемые при создании ПМК, на каталитические и конформационные свойства глюкозооксидазы и подобраны условия, при которых ингибирование полиэлектролитов на фермент действовало минимально.

4.1. Изучение влияния полиэлектролитов на каталитические характеристики глюкозооксидазы

Для создания полиэлектролитных микрокапсул, оболочка которых минимально влияет на инкапсулированный фермент, было изучено влияние полианионов и поликатионов на каталитические характеристики глюкозооксидазы (ГО).

Для этого определяли активность ГО в присутствии полиаллиламина и полистиролсульфоната разных концентраций (рис. 19).

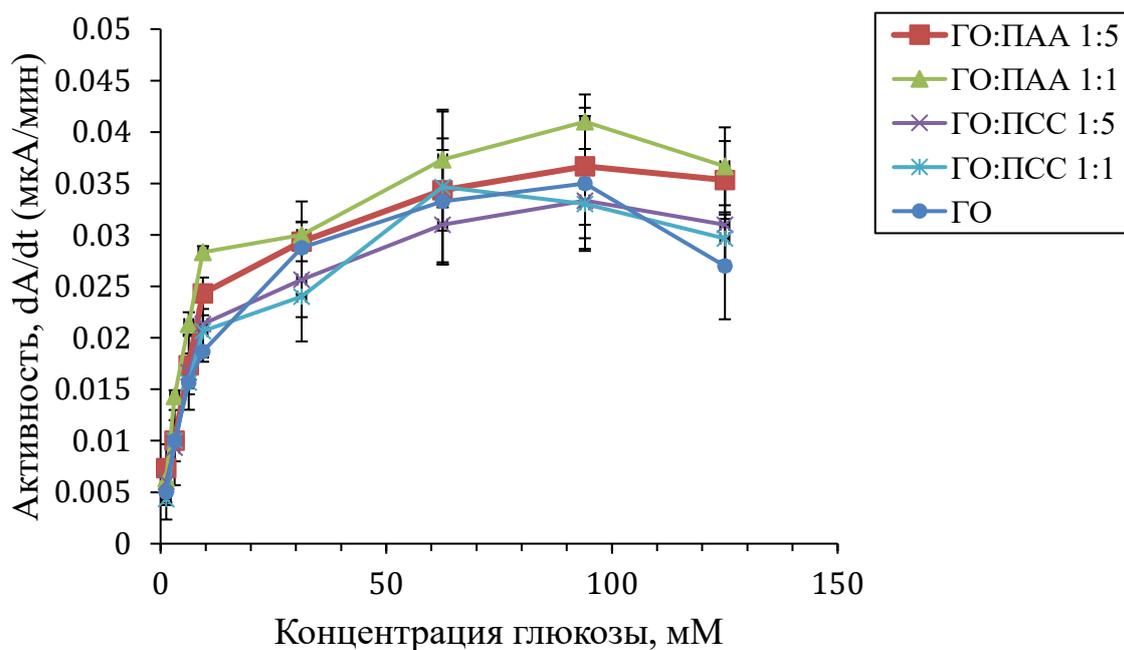


Рис.19. Зависимость активности глюкозооксидазы от концентрации глюкозы в растворе при различных концентрациях полиэлектролитов ПСС и ПАА. Глюкоза – 93,75 мМ, глюкозооксидаза – 62,5 мкг/мл, фосфатный буфер – 10 мМ.

Как видно из рисунка 19 используемые полиэлектролиты не влияют на активность фермента, что позволяет использовать данные полиэлектролиты для инкапсулирования глюкозооксидазы без потери ее активности.

4.2. Формирование глюкозного биосенсора на базе инкапсулированной глюкозооксидазы

Используя метод копреципитации, была инкапсулирована глюкозооксидаза с сохранением ее активности. В дальнейшем, для формирования глюкозного биосенсора инкапсулированную глюкооксидазу иммобилизовали на поверхности электрода (Рис.20). Для этого на рабочий электрод трехконтактного печатного электрода наносили слой берлинской лазури путем 45 минутной инкубации на поверхности электрода смеси состава 0.1 М FeCl_3 и 0.1 М $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ с добавлением пероксид водорода 100 мМ. По окончании осаждения поверхность электродов промывали дистиллированной водой. Затем на поверхность модифицированного берлинской лазурью рабочего электрода наносили суспензию полиэлектролитных микрокапсул с инкапсулированной глюкозооксидазой. В качестве сравнения на другой трехконтактный печатный электрод наносили на поверхность модифицированного берлинской лазурью рабочего электрода смесь глюкозооксидазы и хитозана.

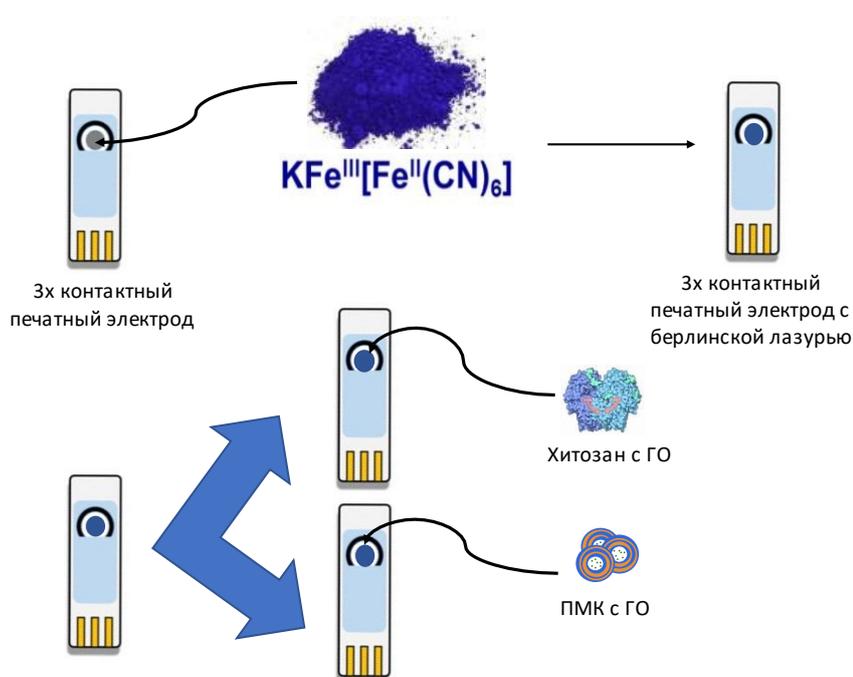


Рис.20. Формирование глюкозного биосенсора на базе иммобилизованной глюкозооксидазы.

В результате была получена диагностическая система, способная определять концентрацию глюкозы в растворе в результате реакции глюкозооксидазного окисления β -D-глюкозы до глюконо-1,5-лактона. Принцип работы полученного электрода изображен на рисунке 21.

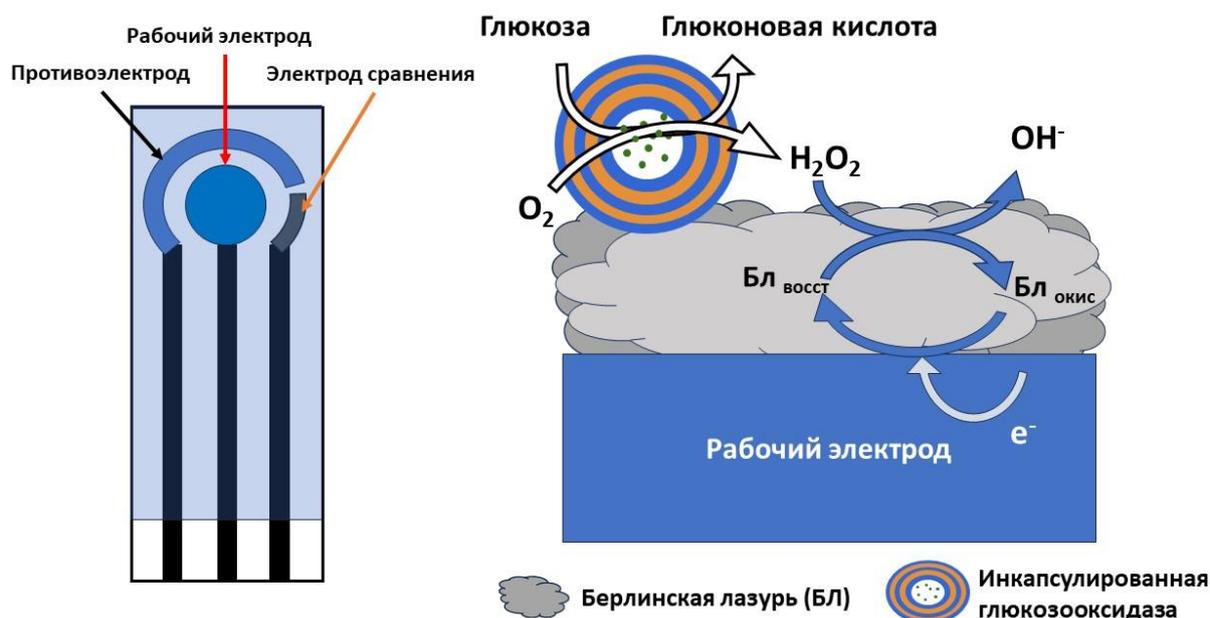


Рис.21. Биосенсор на основе инкапсулированной глюкозооксидазы, иммобилизованной на поверхности амперометрического матричного электрода, покрытого берлинской лазурью

Из рисунка 21 видно, что в результате глюкозооксидазной реакции образуется пероксид водорода, который в дальнейшем выступает в качестве окислителя берлинской лазури. Далее, окисленная форма берлинской лазури восстанавливается за счет прямого переноса электрона с поверхности электрода, что увеличивает ответ выходящего сигнала.

4.3. Каталитические характеристики инкапсулированной глюкозооксидазы

Для применения глюкозных биосенсоров в промышленности, медицине или других направлениях необходимо изучить влияние параметров анализируемой среды. Для этого изучили/определили зависимость полученных сигналов

биосенсоров от концентрации буферного раствора, его ионной силы и кислотности, а также от концентрации глюкозы в растворе.

Зависимость сигналов биосенсора от буферного раствора

Были получены сигналы биосенсора в буферных растворах со значением pH от 5.5 до 8 (рис. 22).

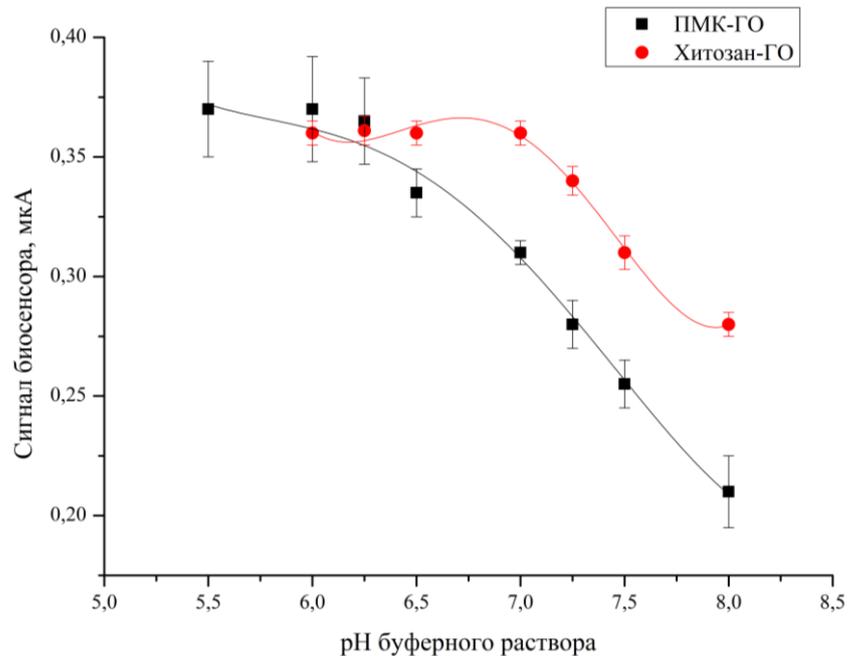


Рис. 22. Зависимость сигналов биосенсоров от pH буферного раствора.

Максимальные амплитуды ответов биосенсора при иммобилизации фермента в гель хитозана на поверхности электрода наблюдали в области значений pH 6.0-7.0, при иммобилизации капсулированием 5.5-6.0. Полученный сдвиг оптимума в щелочную сторону, скорее всего, связан с условиями, создаваемыми иммобилизации фермента.

Кроме значения pH буфера, также имеет значение его молярность. На рис. 23 показаны зависимости сигналов биосенсора двух типов от молярности использованного буферного раствора.

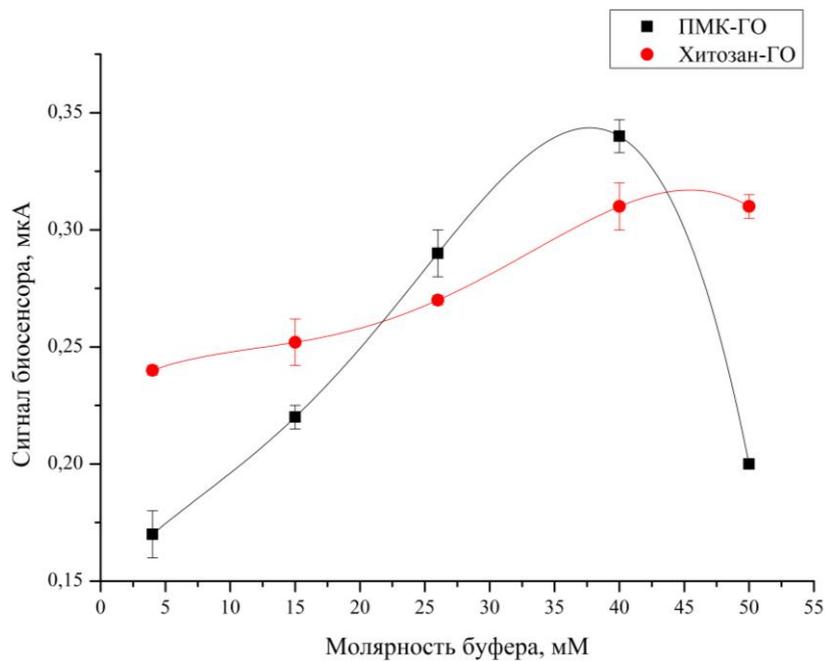


Рис. 23. Зависимость сигналов биосенсоров от молярности буферного раствора.

Как видно из рисунка с увеличением молярности использованного буфера сигналы биосенсора с применением хитозана растут и максимальные сигналы соответствуют 40-50 мМ буферному раствору. В то же время для капсулированного фермента наблюдается увеличение сигналов до концентрации 30-40 мМ, при дальнейшем увеличении молярности происходит падение уровня сигнала.

При электрохимических измерениях важно снизить сопротивление буферного раствора, добавление хлорида натрия в буфер приводит к нужному эффекту. На рис. 24 показаны зависимости сигналов биосенсоров от концентрации хлорида натрия в буфере.

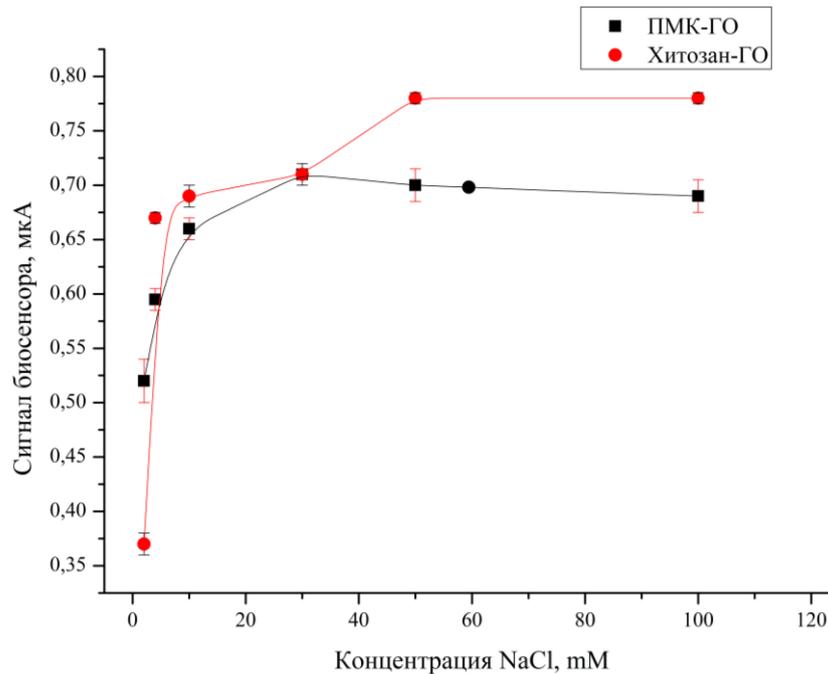


Рис. 24. Зависимость сигналов биосенсоров от концентрации хлорида натрия в буферном растворе.

Повышение концентрации NaCl в растворе приводит к увеличению сигнала биосенсора, в то же время при капсулировании фермента увеличение концентрации хлорида натрия выше 25 мМ ведет к уменьшению сигнала. Высокие концентрации хлорида натрия (выше 80 мМ) оказывают негативное влияние на активность фермента, что ведет к уменьшению сигналов биосенсора. Таким образом, увеличение концентрации солей выше 30 мМ оказывает отрицательное влияние на активность фермента в капсуле. Падение активности может быть связано с изменением структуры капсул при увеличении концентрации соли.

Калибровочные зависимости (градуировочные графики) сигналов биосенсоров от концентрации глюкозы

Зависимости сигналов биосенсора от концентрации глюкозы приведены на рис. 25.

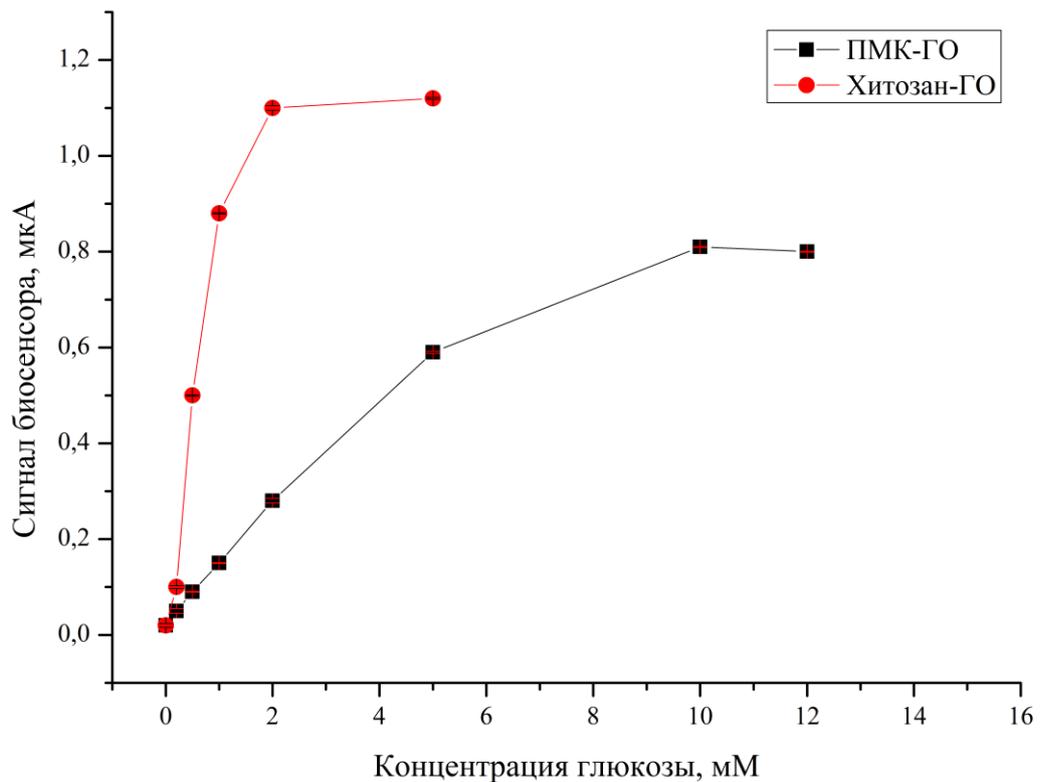


Рис. 25. Зависимость сигналов биосенсоров от концентрации глюкозы.

Диапазоны детекции и линейные диапазоны при использовании капсулированного фермента отличаются от таких же характеристик для фермента, иммобилизованного в гель хитозана. Так нижний и верхний пределы детекции выше, а линейный диапазон шире в случае капсулированного фермента. Коэффициент чувствительности же лучше в случае использования для иммобилизации хитозана (1.17 против 0.12 мкА/мМ).

Основные характеристики полученных биосенсоров представлены в таблице 3. Оценку воспроизводимости результатов измерений биосенсором с капсулированным ферментом проводили на основании статистической обработки выборки из 15 измерений концентрации глюкозы, равной 1 мМ. Коэффициент вариации составил 4.5 %, среднее значение сигнала и стандартное отклонение - 151.31 ± 6.88 нА. Для биосенсора с ГО, иммобилизованной в гель хитозана оценка воспроизводимости результатов измерений биосенсором проводилась на

основании статистической обработки выборки из 18 измерений концентрации глюкозы, равной 1 мМ. Коэффициент вариации составил 4.6 %, среднее значение сигнала и стандартное отклонение – 587.37 ± 27.08 нА.

Таблица 3. Характеристики полученных глюкозных биосенсоров

Способ иммобилизации фермента Параметр	Иммобилизация в гель хитозана	Капсулирование
Уравнение, описывающее калибровочную зависимость, значения параметров	$V = \frac{V_{\max} S^h}{K_M^h + S^h},$ <p>где $V_{\max} = 1.398$; $h = 1.176$; $K_M = 1.517$; $R^2=0.98$</p>	$V = \frac{V_{\max} S^h}{K_M^h + S^h},$ <p>где $V_{\max} = 1.069$; $h = 1.223$; $K_M = 4.071$; $R^2=0.99$</p>
Линейный диапазон детекции, мМ	0.02 – 0.60	0.05-5.5
Уравнение регрессии для линейного участка	$y = 1.1749x - 0.0032$	$y = 0,1184x + 0,0456$
Коэффициент корреляции R^2	0.99	0.99
Коэффициент чувствительности, мкА/мМ	1.17	0.12
Минимальный предел обнаружения, мМ	0.02	0.05
Диапазон детекции, мМ	0.02 – 5	0.05 - 10

Оценка долговременной стабильности

Срок службы биосенсоров на базе иммобилизованных ферментов является одним из ключевых параметров данного типа систем, т. к. многократность применения одно из конкурентных преимуществ перед применением нативных свободных ферментов.

Для ГО, встроенной в полиэлектролитные капсулы, через 5 месяцев при хранении между измерениями при 4°C, сигнал биосенсора составлял примерно 74 % от исходного уровня сигнала, в то время как для ГО, иммобилизованной в гель

хитозана сигнал биосенсора через 2 месяца составлял 43 % от исходного уровня (рис. 26).

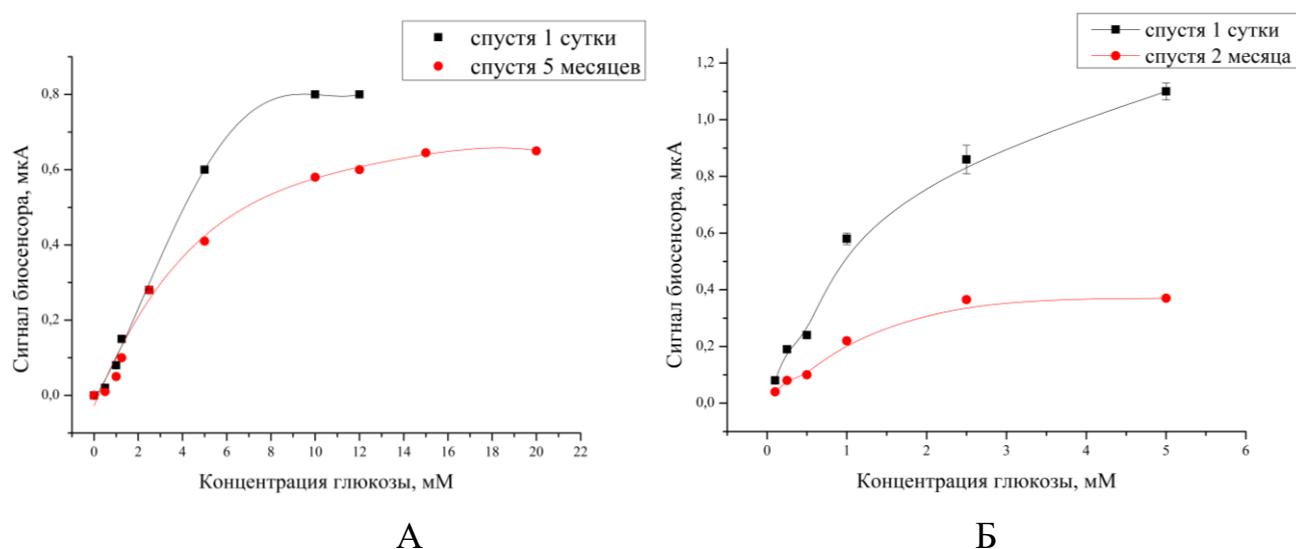


Рис. 26. Долговременная стабильность глюкозных биосенсоров: А – ГО иммобилизована в полиэлектролитные капсулы, Б – ГО иммобилизована в гель хитозана.

В табл. 4 показано изменение основных параметров биосенсора при хранении. Таким образом, капсулирование помогает сохранять активность фермента в составе биосенсора на достаточно высоком уровне в течение длительного времени, что согласуется с данными в работе Сухорукова Б.И. с соавторами (Сабурова et al., 2008).

Таблица 4. Изменение основных параметров калибровочной зависимости при хранении биосенсора

Параметр	Иммобилизация в гель хитозана		Иммобилизация в полиэлектролитные капсулы	
	1-й день	ч/з 2 месяца	1-й день	ч/з 5 месяцев
V_{\max}	1.398	0.491	1.069	0.819
h	1.176	1.494	1.223	1.319

K_M	1.517	1.166	4.071	4.276
-------	-------	-------	-------	-------

Метод иммобилизации инкапсулированной ГО на поверхности матричного электрода может найти применение при создании биосенсоров. Капсулирование фермента позволяет увеличить срок службы биосенсора и поддерживать его активность на высоком уровне.

Влияние некоторых компонентов, содержащихся в реальных образцах на сигнал биосенсора

При определении реальных образцов необходимо учитывать влияние основных веществ, встречающихся в них. Так при определении глюкозы в винных напитках на сигналы биосенсора может оказывать влияние содержание этилового спирта. Были изучены сигналы биосенсора на введение глюкозы в буферах с содержанием этилового спирта в диапазоне 0.1 – 2 М. Сигнал биосенсора при введении глюкозы в концентрации 1 и 5 мМ не изменялся, коэффициент вариации не превышал 5 % (на рис. 27 показаны величины сигналов биосенсора на основе ГО, иммобилизованной в полиэлектролитные капсулы, в присутствии этилового спирта на глюкозу в концентрации 5 мМ).

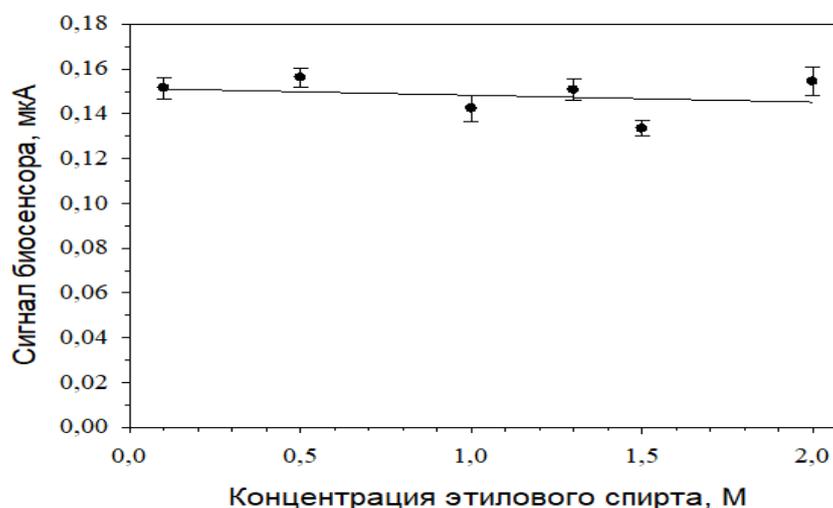


Рис. 27. Влияние этилового спирта на сигналы глюкозного биосенсора. ГО иммобилизована в полиэлектролитные капсулы, показана величина сигнала на глюкозу в концентрации 5 мМ

Таким образом, содержание этилового спирта в диапазоне концентраций 0.1 – 2 М не будет влиять на сигнал биосенсора и вносить дополнительную ошибку измерения, и таким биосенсором можно измерять содержание глюкозы в продукции, содержащей алкоголь.

Согласно Федеральному закону от 27 октября 2008 г. №178-ФЗ «Технический регламент на соковую продукцию из фруктов и овощей» («Технический регламент на соковую продукцию из фруктов и овощей,» 2011) на 23.07.2018) содержание кислоты в соках не должно превышать 3 г/л, в нектарах – 5 г/л. Изучали влияние лимонной кислоты в измерительной кювете в диапазоне концентраций 0.06 – 0.9 мМ на сигналы биосенсора при введении глюкозы в концентрации 5 мМ. Присутствие лимонной кислоты не изменяло сигнал биосенсора и значит, присутствие ее в образцах до концентрации 31 мМ (6 г/л) не будет влиять на определение глюкозы.

4.4. Применение биосенсоров для определения глюкозы в образцах напитков

Полученные биосенсоры были протестированы на реальных образцах сока и алкогольных напитков. Результаты сравнивали с данными стандартного метода определения глюкозы в образцах с помощью спектрофотометрии. Для наглядности на рис. 28 показано графическое представление данных по результатам измерения реальных образцов различными методами.

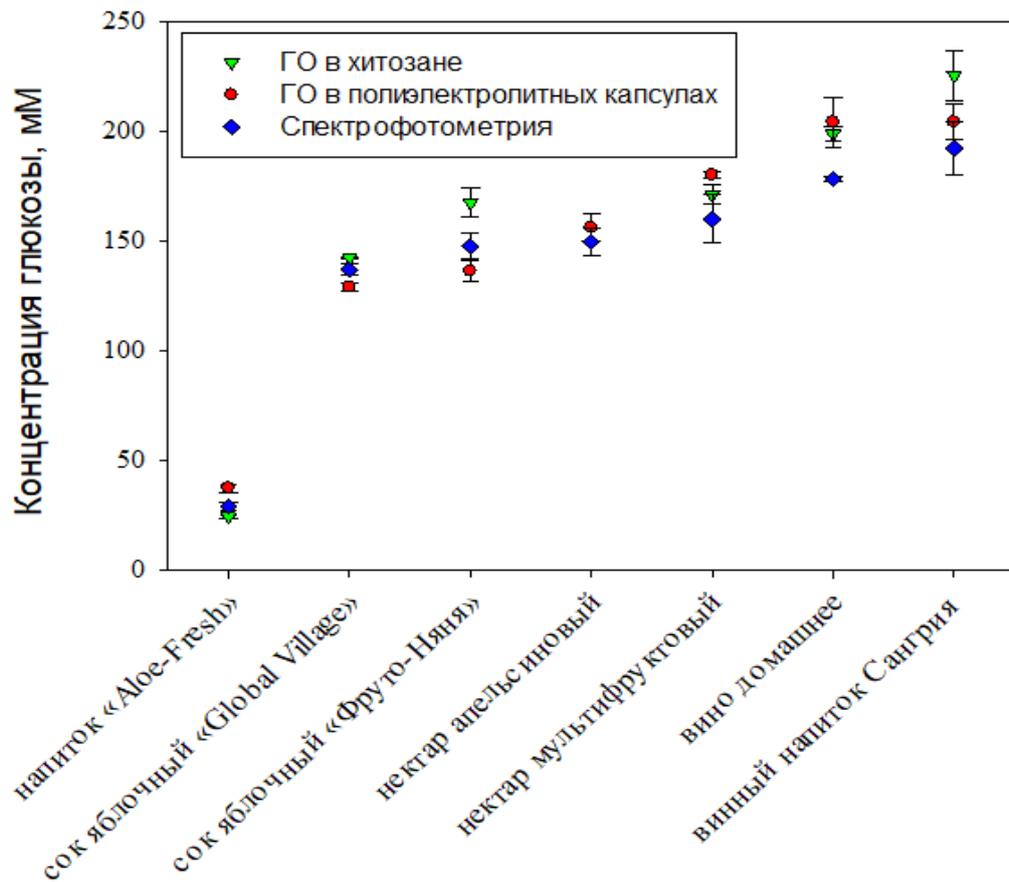


Рис. 28. Сравнение биосенсорных и спектрофотометрических методов определения глюкозы в образцах напитков

Коэффициент корреляции данных между измерениями, сделанными биосенсором с ГО, иммобилизованной в гель хитозана, и измерениями стандартным методом составляет 0.95. Коэффициент корреляции данных между измерениями, сделанными биосенсором с ГО, иммобилизованной в полиэлектролитные капсулы, и измерениями стандартным методом составляет 0.92. Коэффициент корреляции данных между измерениями, сделанными двумя типами биосенсоров, составляет 0.88. Данные по корреляции показаны на рис. 29.

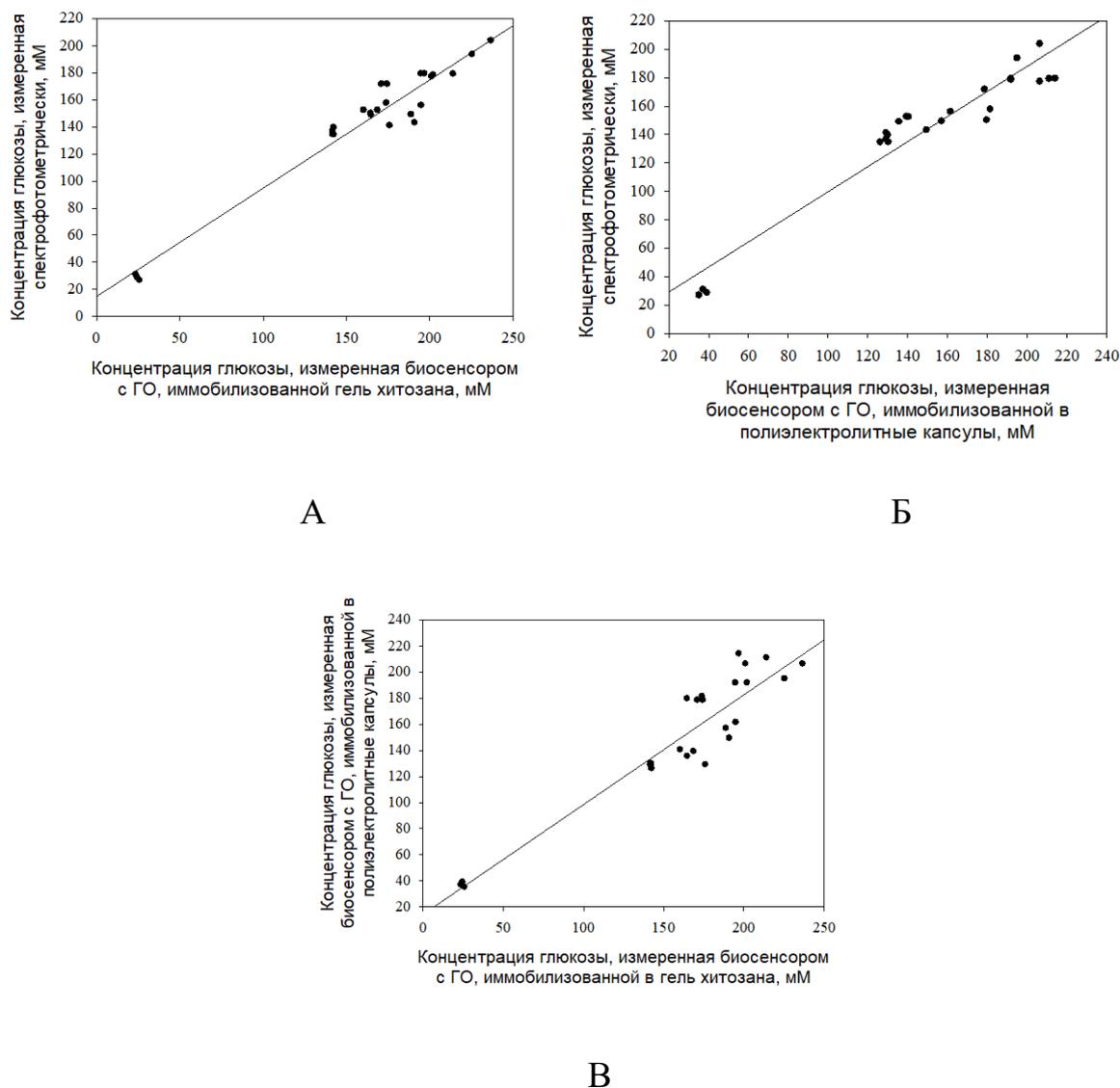


Рис. 29. Графическая корреляция данных, полученных различными методами измерения глюкозы в реальных образцах: А – спектрофотометрического и биосенсорного (ГО, иммобилизована в гель хитозан); Б – спектрофотометрического и биосенсорного (ГО иммобилизована в полиэлектролитные капсулы); В – двух типов биосенсоров

Таким образом, оба метода иммобилизации фермента ГО на поверхности матричного электрода, модифицированного берлинской лазурью, могут применяться для создания биосенсоров. Было показано, что активность фермента в капсулах зависит от молярности и концентрации хлорида натрия в буферном растворе, причем присутствие ионов калия оказывает вызывает большее снижение

сигнала биосенсора, чем ионы натрия. Коэффициент чувствительности биосенсора на основе ГО, иммобилизованной в геле хитозана, на порядок выше чувствительности биосенсора на основе ГО, иммобилизованной в полиэлектролитные капсулы. В то же время применение полиэлектролитных капсул для иммобилизации фермента позволяет увеличить срок службы биосенсора, по крайней мере, до полугода. Разработанные биосенсоры были применены для анализа глюкозы в реальных образцах сока и была показана высокая корреляция полученных данных с данными, полученными стандартным методом измерения глюкозы.

5. Модификация углеродными многослойными нанотрубками глюкозного биосенсора на базе инкапсулированной в полиэлектролитные микрокапсулы глюкозооксидазы

В нескольких работах (Gao et al., 2011b, 2011a) биосенсоры на основе иммобилизованной глюкозооксидазы в редокс-активных полимерах были модифицированы углеродными мультислойными нанотрубками. Эти биосенсоры продемонстрировали более низкий предел обнаружения, но при этом страдали затрудненным транспортом глюкозы через полимерную оболочку. ПМК не обладают подобным недостатком и при этом также могут быть модифицированы мультислойными нанотрубками. В связи с этим, было предложено модифицировать полученный выше глюкозный биосенсор мультислойными углеродными нанотрубками.

Для этого на стадии формирования ПМК в оболочку и/или ядро микрокапсулы добавляли суспензию углеродных мультислойных нанотрубок (Рис.30.). В дальнейшем процедура закрепления ПМК и берлинской лазури идентична процессу, описанному в главе 4.2.

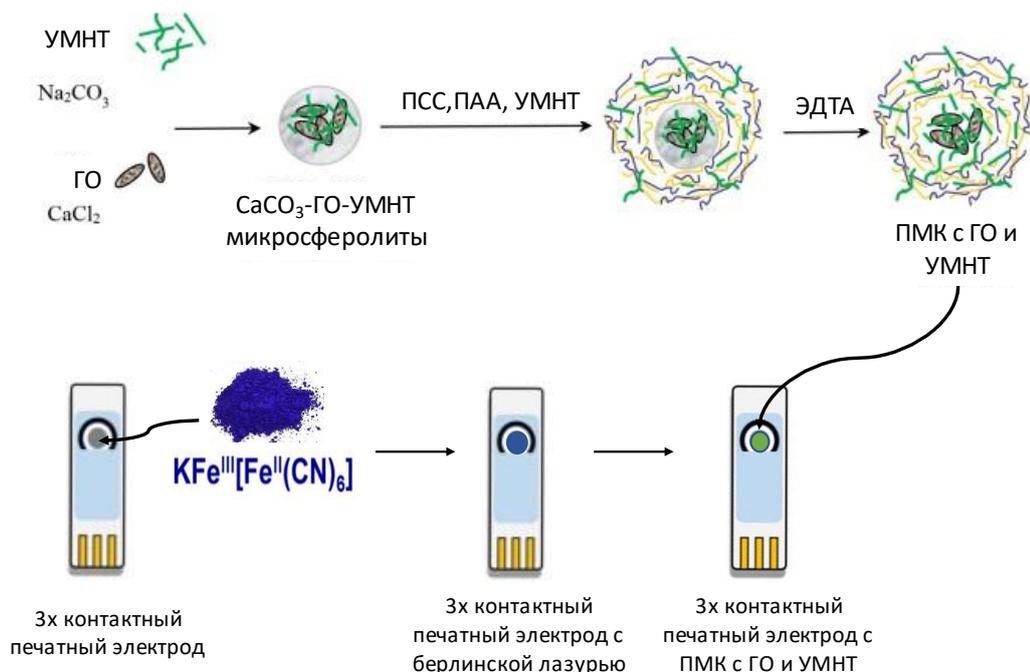


Рис. 30. Модификация глюкозного биосенсора на базе инкапсулированной глюкозооксидазы путем добавления углеродных многослойных нанотрубок.

В результате был получен глюкозный биосенсор на базе инкапсулированной глюкозооксидазы модифицированный углеродными мультислойными нанотрубками.

5.1. Каталитические характеристики модифицированного УМНТ глюкозного биосенсора.

Далее были определены активные сопротивления электродов, модифицированных различными компонентами изначального биосенсора. Значения приведены в таблице 5. Наибольшие значения сопротивлений были получены для электродов, напечатанных методом трафаретной печати без нанесения каких-либо покрытий, а также для электродов, модифицированных отдельно ферментом и ПМК. Наименьшее значение сопротивления наблюдалось для композиции, включающей ПМК/ГО с УМНТ в полости и между слоями полиэлектролита. При этом обнаружено снижение сопротивления со 120 до 25 кОм

по сравнению с композицией с ПМК/ГО без УМНТ. Таким образом, можно сделать вывод, что включение УМНТ в состав ПМК способствует лучшему переносу электронов в системе, что, в свою очередь, положительно влияет на характеристики биосенсоров на основе ПМК/ГО/УМНТ.

Таблица 5. Значения активных сопротивлений для различных модификаций электрода.

Электрод модифицированный различными компонентами	Сопротивление, кОм
Не модифицированный печатный электрод	4200±200
ПМК	2560±170
ПМК/УМНТ в ядре	172±8
ПМК/УМНТ в оболочке	181±6
ПМК/УМНТ в ядре и оболочке	162±6
Глюкозооксидаза	1200±30
УМНТ	34±1
ПМК с ГО	120±4
ПМК с ГО и УМНТ в ядре и оболочке	25±1

На следующем этапе мы исследовали характеристики биосенсоров на основе электродов с берлинской лазурью модифицированных ферментсодержащими ПМК. Использовали капсулы с УМНТ и без них в составе ПМК. Для сравнения использовали ГО, иммобилизованную методом простой сорбции на поверхности электрода. На рис. 31 представлены полученные градуировочные зависимости для биосенсоров, а в табл. 5 приведены численные значения основных характеристик. Введение УМНТ в капсулы приводит к более высокой чувствительности биосенсора к глюкозе (0,30 мкА/мМ против 0,05 мкА/мМ) при той же концентрации фермента на электроде (рис. 31, кривые 2 и 3). Дополнительная

модификация поверхности электрода нанотрубками приводит к дальнейшему увеличению сигналов биосенсора (рис. 31, кривая 4).

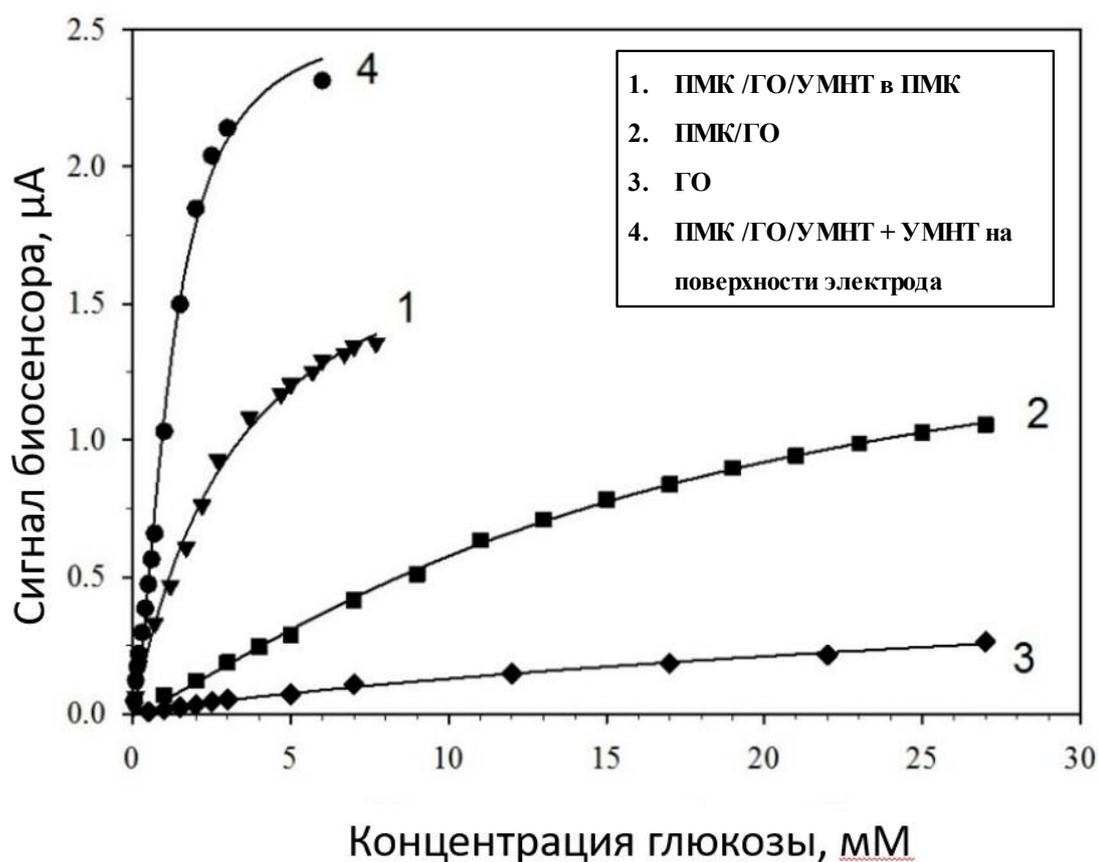


Рис.31. Калибровочные зависимости сигналов биосенсоров от концентрации глюкозы при различных модификациях электрода.

Кроме того, модификация электрода УМНТ изменяет диапазон обнаружения глюкозы (табл. 6). Нижний диапазон обнаружения смещен в сторону более низких концентраций, которые составляют 0,05 мМ, что позволяет определять более низкие концентрации глюкозы.

Таблица 6. Характеристики полученных глюкозных биосенсоров

Параметры	Состав биокатализатора			
	ПМК/ГО/УМНТ + УМНТ на электроде	ПМК/ГО/УМН Т	ПМК/ГО	ГО
Уравнение, описывающее градуировочную зависимость	$V = \frac{V_{\max} S^h}{K_M^h + S^h}$			
Значения параметров градуировочной зависимости	V _{max} =2.56	V _{max} =1.938	V _{max} =1.639	V _{max} =0.959
	H=1.667	H=1.05	H=1.238	H=0.865
	K _m =1.203	K _m =3.194	K _m =16.393	K _m =86.692
	R ² =0.99	R ² =0.99	R ² =0.99	R ² =0.99
Линейный диапазон определяемых концентраций, мМ	0.05-2	0.2-2.7	1-15	0.5-7
Уравнение регрессии линейного участка, коэффициент корреляции R ²	Y=0.9443x+0.019 3	Y=0.2966x- 0.1161	Y=0.0524x+0.029 3	Y=0.0149x+0.002 9
	R ² =0.99	R ² =0.99	R ² =0.99	R ² =0.99
Коэффициент чувствительност и, мкА/мМ	0.94	0.3	0.05	0.01
Минимально определяемая концентрация, мМ	0.05	0.05	1	0.5
Определяемый диапазон, мМ	0.05-3	0.05-6	1-25	0.5-25

При определении концентрации глюкозы в реальных образцах необходимо учитывать влияние основных веществ, встречающихся в них. Так при определении глюкозы в сокосодержащих и других напитках на сигналы биосенсора может

оказывать влияние содержание этилового спирта и лимонной кислоты. Для оценки этого влияния на биосенсор на основе электродов, модифицированных УМНТ, исследовали сигналы лимонной кислоты (в диапазоне концентраций от 0,06 до 0,90 мМ) и этанола (в диапазоне концентраций от 0,1 до 2,0 М). Результат показан на рисунке 32.

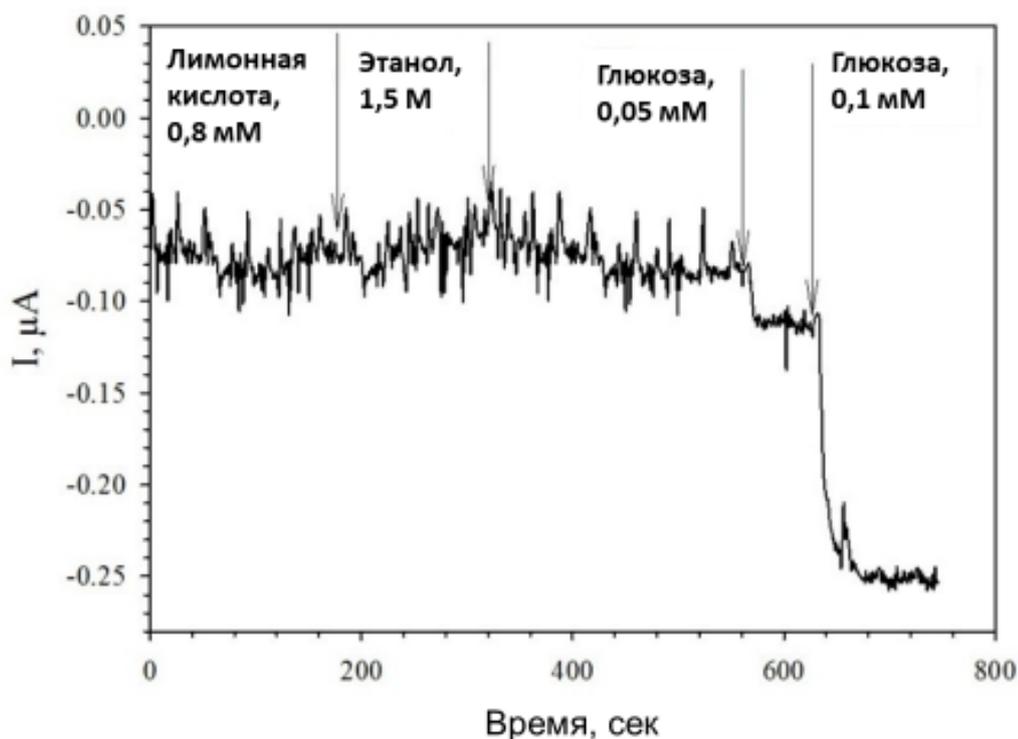


Рис.32. Влияние этилового спирта и лимонной кислоты на сигналы глюкозного биосенсора.

Как показано на рисунке 32, эти соединения не вызывали генерации полезных сигналов. Это связано, во-первых, со специфичностью используемого фермента, во-вторых, с отсутствием влияния этих компонентов на биосенсор.

Таким образом, модификация глюкозного биосенсора на основе инкапсулированной в полиэлектролитные микрокапсулы глюкозооксидазы привела к увеличению чувствительности биосенсора и снижению минимально определяемой концентрации глюкозы в растворе.

IV. Заключение

На основе инкапсулированной уреазы, иммобилизованной на поверхности кварцевой пластины, разработана новая система диагностики мочевины со спектрофотометрическим методом регистрации. Такая диагностическая пластина позволяет многократно (более 60 раз) измерять концентрацию мочевины в диапазоне от 3 до 40 мМ с относительным стандартным отклонением не более 7%.

Впервые исследовано влияние полистиролсульфоната и полиаллиламина на активность свободной алкогольдегидрогеназы. Установлено, что полиаллиламин ингибирует активность АДГ. Показано, что снижение ингибирующего воздействия полиаллиламина на алкогольдегидрогеназу происходит при добавлении сульфат-анионов, которые связываются с аминогруппами полиаллиламина. Установлено, что с увеличением концентрации хлорида натрия снимается ингибирующее воздействие ПАА на АДГ за счет электростатического экранирования поверхностных зарядов фермента ионами соли. Установлено, что инкубация АДГ с ПСС приводит к незначительному снижению ферментативной активности с течением времени. Добавление хлорида натрия (0,2 М) или сульфата аммония (0,1 М) снимает негативное влияние ПСС на активность фермента.

В результате проведённых исследований разработана диагностическая система со спектрофотометрическим методом регистрации, которая позволяет многократно определять концентрацию этанола в диапазоне от 40 до 400 мМ мг/мл с относительным стандартным отклонением менее 4,6%. При этом удалось добиться сохранения активности инкапсулированной алкогольдегидрогеназы на уровне 30% по сравнению с нативным ферментом. Константа Михаэлиса K_m инкапсулированной АДГ по этанолу составляла 71,6 мМ, что в 1,7 раз выше по сравнению со свободным ферментом.

На основе инкапсулированной глюкозооксидазы, иммобилизованной на матричном электроде, разработана диагностическая система с амперометрическим методом регистрации, позволяющая многократно определять глюкозу в диапазоне концентраций от 0,05 до 5,5 мМ с относительным стандартным отклонением не

более 5.5%. Система также может быть использована для определения глюкозы в реальных образцах сока и имеет высокую корреляцию с данными, полученными стандартным методом измерения глюкозы.

Увеличена чувствительность разработанного глюкозного биосенсора за счет его модификации мультислойными углеродными нанотрубками, коэффициент чувствительности биосенсора увеличился с 0,05 $\mu\text{A}/\text{mM}$ до 0,94 $\mu\text{A}/\text{mM}$.

Результаты исследования могут быть использованы для создания более эффективных диагностических систем и биосенсоров.

V. Выводы

1. Разработана многоразовая диагностическая система для определения концентрации мочевины на основе иммобилизованной на пластине инкапсулированной в полиэлектролитные микрокапсулы уреазы со спектрофотометрическим методом регистрации.
2. Показано, что полиаллиламин ингибирует активность алкогольдегидрогеназы, однако сульфат аммония (5 mM) и высокая ионная сила (200 mM NaCl) снимают данное ингибирующее воздействие.
3. Разработана диагностическая система многократного использования для определения концентрации этанола на основе инкапсулированной в полиэлектролитные микрокапсулы алкогольдегидрогеназы со спектрофотометрическим методом регистрации.
4. Разработан биосенсор на основе инкапсулированной в полиэлектролитные микрокапсулы глюкозооксидазы, иммобилизованной на поверхности амперометрического матричного электрода, покрытого берлинской лазурью.
5. Предложен способ повышения чувствительности разработанного биосенсора на основе инкапсулированной глюкозооксидазы, иммобилизованной на поверхности амперометрического матричного электрода, покрытого берлинской лазурью, путем модификации многослойными углеродными нанотрубками.

VI. Список литературы:

1. Бердников А.В., Семко М.В. Широкова Ю.А. Медицинские приборы, аппараты, системы и комплексы. Часть I. Технические методы и аппараты для экспресс-диагностики: Учебное пособие. Казан. гос.техн. ун-та, Казань 2004. 106 с.
2. Березин И.В., Клячко Н.Л., Левашов А.В., Мартинек К. Иммуобилизованные ферменты. Высшая школа, Москва 1987. 161 с.
3. Борисович Д.Б. Проблемы аналитической химии. Том 12. Биохимические методы анализа. Наука, Москва 2010. 391 с.
4. Брайулеску Г., Кошофреэ В.В. Применение ион-селективных мембранных электродов в органическом анализе. Мир, Москва 1980. 230 с.
5. Будников Г.К. Биосенсоры как новый тип аналитических устройств. //Соросовский образовательный журнал. — 1996, — Т.12, — С. 26–32.
6. Бурмистрова Н.А., Колонтаева О.А., Русанова Т.Ю., Иноземцева О.А., Суетенков Д.Е., Горин Д.А. Структуры ядро-оболочка и полиэлектролитные капсулы с иммобилизованными кислотно-основными индикаторами. //Известия Саратовского ун-та. Новая серия. Сер. Химия. Биология. Экология.— 2013, — Vol.4.
7. Быць Юрий Викторович Патологическая физиология. Москва: МЕД пресс-информ, 2008. 635 с.
8. Варфоломеев С.Д. Химическая энзимология. «Академия», Москва 2005. 472 с.
9. Долманова И.Ф., Угарова Н.Н. Ферментативные методы анализа. //Журнал аналитической химии.— 1980, — Vol.35, — № 8, — С. 1597–1639.
10. Дубровский А.В., Шабарчина Л.И., Тихоненко С.А. Полиэлектролитный ферментный микродиагностикум с седиментационной системой регистрации для определения мочевины в растворе, “Прикладная биохимия и микробиология.” //Прикладная биохимия и микробиология.— 2017, — № 4, — С. 427–432.
11. Золотов Ю.А., Дорохова Е.Н. Фадеева В.И. Основы аналитической химии. “Высшая школа,” Москва 2002. 384 с.

12. Кишкун А.А. Руководство по лабораторным методам диагностики. ГЭОТАР-Медиа, Москва 2009. 800 с.
13. Корыта И. Ионы, электроды, мембраны: Пер. с чешск. Мир, Москва 1983. 264 с.
14. Лелевич С.В., Гриневич Т.Н. В.В.В. Основы Клинической Биохимии. ГрГМУ, Гродно 2013. 184 с.
15. Монтрель М.М., Терновский В.И., Фомкина М.Г., Петров А.И., Ультратонкое полимерное покрытие, способ его изготовления и ферментативный биосенсор на его основе. // Патент RU 2 333 231, МПК C09D 201/02, B05D 1/36, C12Q 1/58, G01N 33/48 № 2006136254/04, Заявл. (16.10.2006); Оpubл. (10.09.2008)
16. Пермяков А.В., Витер В.И. Патоморфология и танатогенез алкогольной интоксикации. «Экспертиза», Ижевск 2002. 91 с.
17. Решетиллов А.Н., Плеханова Ю.В., Тихоненко С.А., Дубровский А.В., Полиэлектrolитные микрокапсулы с уреазой и парамагнитными частицами как основа потенциометрического биосенсора для определения мочевины. // Аналитическая химия.— 2015, — Т.11, — С. 1186–1190.
18. Рогалева Н.С., Шкотова Л.В., Львова О.В., Гарбуз В.В., Муратов В.Б., Дуда Т.И., Васильев А.А., Корпан Я.И., Белоиван О.А. Амперометрический биосенсор, модифицированный многостеночными углеродными нанотрубками, для определения глюкозы. // «Біотехнологія».— 2011, — Т.6, — С. 53–61.
19. Сабурова Е.А., Тиноненко С.А., Дыбовская Ю.Н., Сухоруков Б.И. Изменения активности и структуры уреазы при взаимодействии с полиэлектролитами. // Журнал Физической Химии.— 2008, — Т.3, — С. 554–561.
20. Садовникова И.И. Циррозы печени. Вопросы этиологии, патогенеза, клиники, диагностики, лечения. // Болезни органов и пищеварения.— 2003, — Т.2, — С. 37.
21. Сосимчик И.А., Черкашина Д.В., Сомов А.Ю., Петренко А.Ю. Определение активных форм кислорода в митохондриях печени крыс с использованием

- дигидрородамина 123. //Вісник проблем біології і медицини.— 2009, — Vol.4.
22. Сухоруков Б.И., Сабурова Е.А., Шабарчина Л.И., Дубровский А.В., Тихоненко С.А. Микродиагностикум и способ ферментативного определения концентрации анализируемого вещества. // Патент RU 2 316 769, МПК G01N 33/68 № 2006134125/15, Заявл. (27.09.2006); Оpubл. (10.02.2008)
23. Сухоруков Б.И., Тихоненко С.А., Сабурова Е.А., Дубровский А.В., Дыбовская, Ю.Н. Шабарчина Л.И. Инкапсулирование белков и полиэлектролитные нано- и микрокапсулы и проблемы разработки ферментного микродиагностикума. //Биофизика.— 2007, — Т.6, — С. 1041–1048.
24. Терновский В.И., Чернохвостов Ю.В., Фомкина М.Г., Монтрель М.М. Потенциометрический Сенсор На Основе Уреазы, Имобилизованной В Полиэлектролитных Микрокапсулах. //Биофизика.— 2007, — Т.52, — № 5, — С. 825–829.
25. Технический регламент на соковую продукцию из фруктов и овощей — 2011,. URL: <https://docs.cntd.ru/document/902125438> (дата обращения: 14.02.2022)
26. Фомкина М.Г., Монтрель А.М., Гульчачак М.М. Способ получения подложек с многослойным покрытием на основе полиэлектролитных микрокапсул, содержащих биологически активные материалы // Патент RU 2 567 320, МПК C09D 201/02, B05D 1/36, G01N 33/48 № 2011103074/05 , Заявл. (28.01.2011); Оpubл. (10.11.2015)
27. Шабанов П.Д. Основы наркологии. СПб.: Лань, 2002 г. 560 с.
28. Юрова Е.А. Исследование влияния состава и свойств молочного сырья на качество молочной продукции. Москва, 2012.
29. Al-Adhami A.J.H., Bryjak J., Greb-Markiewicz B., Peczyńska-Czoch W. Immobilization of wood-rotting fungi laccases on modified cellulose and acrylic carriers. //Process Biochemistry.— 2002, — Vol.37, — № 12, — P. 1387–1394.

30. Alvarez-Lorenzo C., Blanco-Fernandez B., Puga A.M., Concheiro A. Crosslinked ionic polysaccharides for stimuli-sensitive drug delivery. //Advanced Drug Delivery Reviews.— 2013, — Vol.65, — № 9, — P. 1148–1171.
31. Amiot C., Xu S., Liang S., Pan L., Zhao J. Near-Infrared Fluorescent Materials for Sensing of Biological Targets. //Sensors.— 2008, — Vol.8, — № 5, — P. 3082–3105.
32. Andreeva D. V., Fix D., M^ohwald H., Shchukin D.G. Self-Healing Anticorrosion Coatings Based on pH-Sensitive Polyelectrolyte/Inhibitor Sandwichlike Nanostructures. //Advanced Materials.— 2008, — Vol.20, — № 14, — P. 2789–2794.
33. Antipina M.N., Kiryukhin M. V., Chong K., Low H.Y., Sukhorukov G.B. Patterned microcontainers as novel functional elements for μ TAS and LOC. //Lab on a Chip.— 2009, — Vol.9, — № 10, — P. 1472.
34. Antipov A.A., Shchukin D., Fedutik Y., Petrov A.I., Sukhorukov G.B., M^ohwald H. Carbonate microparticles for hollow polyelectrolyte capsules fabrication. //Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects.— 2003, — Vol.224, — № 1–3, — P. 175–183.
35. Antonov M., Mazzawi M., Dubin P.L. Entering and Exiting the Protein–Polyelectrolyte Coacervate Phase via Nonmonotonic Salt Dependence of Critical Conditions. //Biomacromolecules.— 2010, — Vol.11, — № 1, — P. 51–59.
36. Araujo J. V., Davidenko N., Danner M., Cameron R.E., Best S.M. Novel porous scaffolds of pH responsive chitosan/carrageenan-based polyelectrolyte complexes for tissue engineering. //Journal of Biomedical Materials Research Part A.— 2014, — P. n/a-n/a.
37. Bajaj A., Miranda O.R., Kim I.-B., Phillips R.L., Jerry D.J., Bunz U.H.F., Rotello V.M. Detection and differentiation of normal, cancerous, and metastatic cells using nanoparticle-polymer sensor arrays. //Proceedings of the National Academy of Sciences.— 2009, — Vol.106, — № 27, — P. 10912–10916.
38. Barr C.S., Newman T.K., Becker M.L., Champoux M., Lesch K.P., Suomi S.J., Goldman D., Higley J.D. Serotonin Transporter Gene Variation is Associated with

- Alcohol Sensitivity in Rhesus Macaques Exposed to Early-Life Stress. //Alcoholism: Clinical & Experimental Research.— 2003, — Vol.27, — № 5, — P. 812–817.
- 39.Barroso da Silva F.L., Boström M., Persson C. Effect of Charge Regulation and Ion–Dipole Interactions on the Selectivity of Protein–Nanoparticle Binding. //Langmuir.— 2014, — Vol.30, — № 14, — P. 4078–4083.
- 40.Bisswanger H. Enzyme assays. //Perspectives in Science.— 2014, — Vol.1, — № 1–6, — P. 41–55.
- 41.Borodina T.N., Rumsh L.D., Kunizhev S.M., Sukhorukov G.B., Vorozhtsov G.N., Feldman B.M., Markvicheva E.A. Polyelectrolyte microcapsules as the systems for delivery of biologically active substances. //Biochemistry (Moscow) Supplement Series B: Biomedical Chemistry.— 2008, — Vol.2, — № 1, — P. 88–93.
- 42.Bryjak J., Anilyte J., Liesiene J. Evaluation of man-tailored cellulose-based carriers in glucoamylase immobilization. //Carbohydrate Research.— 2007, — Vol.342, — № 8, — P. 1105–1109.
- 43.Carlsson F., Linse P., Malmsten M. Monte Carlo Simulations of Polyelectrolyte–Protein Complexation. //The Journal of Physical Chemistry B.— 2001, — Vol.105, — № 38, — P. 9040–9049.
- 44.Chen J., Lin Y., Jia L. Preparation of anionic polyelectrolyte modified magnetic nanoparticles for rapid and efficient separation of lysozyme from egg white. //Journal of Chromatography A.— 2015, — Vol.1388, — P. 43–51.
- 45.Chen K., Rana S., Moyano D.F., Xu Y., Guo X., Rotello V.M. Optimizing the selective recognition of protein isoforms through tuning of nanoparticle hydrophobicity. //Nanoscale.— 2014, — Vol.6, — № 12, — P. 6492.
- 46.Chen K., Xu Y., Rana S., Miranda O.R., Dubin P.L., Rotello V.M., Sun L., Guo X. Electrostatic Selectivity in Protein–Nanoparticle Interactions. //Biomacromolecules.— 2011, — Vol.12, — № 7, — P. 2552–2561.
- 47.Colmati F., Flório Sgobbi L., Ferreira Teixeira G., Silva Vilela R., Duque Martins T., Oliveira Figueiredo G. Electrochemical Biosensors Containing Pure Enzymes or Crude Extracts as Enzyme Sources for Pesticides and Phenolic Compounds with

- Pharmacological Property Detection and Quantification, in: Biosensors for Environmental Monitoring— 2019,. IntechOpen.
- 48.Cooper C.L., Dubin P.L., Kayitmazer A.B., Turksen S. Polyelectrolyte–protein complexes. //Current Opinion in Colloid & Interface Science.— 2005, — Vol.10, — № 1–2, — P. 52–78.
- 49.Cousin F., Gummel J., Ung D., Boué F. Polyelectrolyte–Protein Complexes: Structure and Conformation of Each Specie Revealed by SANS. //Langmuir.— 2005, — Vol.21, — № 21, — P. 9675–9688.
- 50.Creran B., Li X., Duncan B., Kim C.S., Moyano D.F., Rotello V.M. Detection of Bacteria Using Inkjet-Printed Enzymatic Test Strips. //ACS Applied Materials & Interfaces.— 2014, — Vol.6, — № 22, — P. 19525–19530.
- 51.da Silva F.L.B., Jönsson B. Polyelectrolyte–protein complexation driven by charge regulation. //Soft Matter.— 2009, — Vol.5, — № 15, — P. 2862.
- 52.Dairaku T., Iwamoto T., Nishimura M., Endo M., Ohashi T., Eto Y. A practical fluorometric assay method to measure lysosomal acid lipase activity in dried blood spots for the screening of cholesteryl ester storage disease and Wolman disease. //Molecular Genetics and Metabolism.— 2014, — Vol.111, — № 2, — P. 193–196.
- 53.Datta S., Christena L.R., Rajaram Y.R.S. Enzyme immobilization: an overview on techniques and support materials. //3 Biotech.— 2013, — Vol.3, — № 1, — P. 1–9.
- 54.de Grooth J., Haakmeester B., Wever C., Potreck J., de Vos W.M., Nijmeijer K. Long term physical and chemical stability of polyelectrolyte multilayer membranes. //Journal of Membrane Science.— 2015, — Vol.489, — P. 153–159.
- 55.De M., Rana S., Akpınar H., Miranda O.R., Arvizo R.R., Bunz U.H.F., Rotello V.M. Sensing of proteins in human serum using conjugates of nanoparticles and green fluorescent protein. //Nature Chemistry.— 2009, — Vol.1, — № 6, — P. 461–465.
- 56.de Vos W.M., Leermakers F.A.M., de Keizer A., Cohen Stuart M.A., Kleijn J.M. Field Theoretical Analysis of Driving Forces for the Uptake of Proteins by Like-

- Charged Polyelectrolyte Brushes: Effects of Charge Regulation and Patchiness. //Langmuir.— 2010, — Vol.26, — № 1, — P. 249–259.
- 57.Decher G., Hong J.D., Schmitt J. Buildup of ultrathin multilayer films by a self-assembly process: III. Consecutively alternating adsorption of anionic and cationic polyelectrolytes on charged surfaces. //Thin Solid Films.— 1992, — Vol.210–211, — P. 831–835.
- 58.Delcea M., Madaboosi N., Yashchenok A.M., Subedi P., Volodkin D. V., De Geest B.G., Möhwald H., Skirtach A.G. Anisotropic multicompartiment micro- and nanocapsules produced via embedding into biocompatible PLL/HA films. //Chem. Commun.— 2011, — Vol.47, — № 7, — P. 2098–2100.
- 59.Delvaux M., Walcarius A., Demoustier-Champagne S. Bienzyme HRP–GOx-modified gold nanoelectrodes for the sensitive amperometric detection of glucose at low overpotentials. //Biosensors and Bioelectronics.— 2005, — Vol.20, — № 8, — P. 1587–1594.
- 60.Dezott M., Innocentini-Mei L.H., Durán N. Silica immobilized enzyme catalyzed removal of chlorolignins from eucalyptus kraft effluent. //Journal of Biotechnology.— 1995, — Vol.43, — № 3, — P. 161–167.
- 61.Donath E., Sukhorukov G.B., Caruso F., Davis S.A., Möhwald H. Novel Hollow Polymer Shells by Colloid-Templated Assembly of Polyelectrolytes. //Angewandte Chemie International Edition.— 1998, — Vol.37, — № 16, — P. 2201–2205.
- 62.Dong X.-L., Guan F., Xu S.-J., Zhu L.-X., Zhang P.-P., Cheng A.-B., Liu T.-J. Influence of blood glucose level on the prognosis of patients with diabetes mellitus complicated with ischemic stroke. //Journal of Research in Medical Sciences.— 2018, — Vol.23, — № 1, — P. 10.
- 63.Du X., Dubin P.L., Hoagland D.A., Sun L. Protein-Selective Coacervation with Hyaluronic Acid. //Biomacromolecules.— 2014, — Vol.15, — № 3, — P. 726–734.
- 64.Duncan B., Le N.D.B., Alexander C., Gupta A., Yesilbag Tonga G., Yazdani M., Landis R.F., Wang L.-S., Yan B., Burmaoglu S., Li X., Rotello V.M. Sensing by Smell: Nanoparticle–Enzyme Sensors for Rapid and Sensitive Detection of

- Bacteria with Olfactory Output. //ACS Nano.— 2017, — Vol.11, — № 6, — P. 5339–5343.
65. Durdenko E. V., Kuznetsova S.M., Tikhonenko S.A., Emelyanenko V.I., Saburova E.A. Temperature stability of lactate dehydrogenase in complex with anionic polyelectrolyte poly(styrenesulfonate). //Biophysics.— 2010, — Vol.55, — № 4, — P. 535–543.
66. Fatjó F., Sancho-Bru P., Fernández-Solà J., Sacanella E., Estruch R., Bataller R., Nicolás J.-M. Up-Regulation of Myocardial L-Type Ca²⁺ Channel in Chronic Alcoholic Subjects Without Cardiomyopathy. //Alcoholism: Clinical and Experimental Research.— 2007, — Vol.31, — № 7, — P. 1099–1105.
67. Feng J., Wang B., Gao C., Shen J. Selective Adsorption of Microcapsules on Patterned Polyelectrolyte Multilayers. //Advanced Materials.— 2004, — Vol.16, — № 21, — P. 1940–1944.
68. Gao Q., Guo Y., Liu J., Yuan X., Qi H., Zhang C. A biosensor prepared by co-entrapment of a glucose oxidase and a carbon nanotube within an electrochemically deposited redox polymer multilayer. //Bioelectrochemistry.— 2011a, — Vol.81, — № 2, — P. 109–113.
69. Gao Q., Guo Y., Zhang W., Qi H., Zhang C. An amperometric glucose biosensor based on layer-by-layer GOx-SWCNT conjugate/redox polymer multilayer on a screen-printed carbon electrode. //Sensors and Actuators B: Chemical.— 2011b, — Vol.153, — № 1, — P. 219–225.
70. Guru S.C., Taranath Shetty K. Methodological aspects of aldehyde dehydrogenase assay by spectrophotometric technique. //Alcohol.— 1990, — Vol.7, — № 5, — P. 397–401.
71. Haložan D., Riebentanz U., Brumen M., Donath E. Polyelectrolyte microcapsules and coated CaCO₃ particles as fluorescence activated sensors in flowmetry. //Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects.— 2009, — Vol.342, — № 1–3, — P. 115–121.
72. Han J., Bender M., Hahn S., Seehafer K., Bunz U.H.F. Polyelectrolyte Complexes Formed from Conjugated Polymers: Array-Based Sensing of Organic Acids. //Chemistry - A European Journal.— 2016, — Vol.22, — № 10, — P. 3230–3233.

73. Hartvig R.A., van de Weert M., Østergaard J., Jorgensen L., Jensen H. Protein Adsorption at Charged Surfaces: The Role of Electrostatic Interactions and Interfacial Charge Regulation. // *Langmuir*.— 2011, — Vol.27, — № 6, — P. 2634–2643.
74. Hawkins K.E., DeMars K.M., Yang C., Rosenberg G.A., Candelario-Jalil E. Fluorometric immunocapture assay for the specific measurement of matrix metalloproteinase-9 activity in biological samples: application to brain and plasma from rats with ischemic stroke. // *Molecular Brain*.— 2013, — Vol.6, — № 1, — P. 14.
75. Henzler K., Haupt B., Lauterbach K., Wittemann A., Borisov O., Ballauff M. Adsorption of β -Lactoglobulin on Spherical Polyelectrolyte Brushes: Direct Proof of Counterion Release by Isothermal Titration Calorimetry. // *Journal of the American Chemical Society*.— 2010, — Vol.132, — № 9, — P. 3159–3163.
76. Hoogeveen N.G., Cohen Stuart M.A., Fler G.J., Böhmer M.R. Formation and Stability of Multilayers of Polyelectrolytes. // *Langmuir*.— 1996, — Vol.12, — № 15, — P. 3675–3681.
77. Huang R., Lau B.L.T. Biomolecule–nanoparticle interactions: Elucidation of the thermodynamics by isothermal titration calorimetry. // *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects*.— 2016, — Vol.1860, — № 5, — P. 945–956.
78. Huang X.-J., Chen P.-C., Huang F., Ou Y., Chen M.-R., Xu Z.-K. Immobilization of *Candida rugosa* lipase on electrospun cellulose nanofiber membrane. // *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*.— 2011, — Vol.70, — № 3–4, — P. 95–100.
79. Huggett A.S.G., Nixon D.A. Use of glucose oxidase, peroxidase, and o-dianisidine in determination of blood and urinary glucose. // *The Lancet*.— 1957, — Vol.270, — № 6991, — P. 368–370.
80. Idris N.M., Gnanasammandhan M.K., Zhang J., Ho P.C., Mahendran R., Zhang Y. In vivo photodynamic therapy using upconversion nanoparticles as remote-controlled nanotransducers. // *Nature Medicine*.— 2012, — Vol.18, — № 10, — P. 1580–1585.

81. Imam H.T., Marr P.C., Marr A.C. Enzyme entrapment, biocatalyst immobilization without covalent attachment. //Green Chemistry.— 2021, — Vol.23, — № 14, — P. 4980–5005.
82. Inturi S., Wang G., Chen F., Banda N.K., Holers V.M., Wu L., Moghimi S.M., Simberg D. Modulatory Role of Surface Coating of Superparamagnetic Iron Oxide Nanoworms in Complement Opsonization and Leukocyte Uptake. //ACS Nano.— 2015, — Vol.9, — № 11, — P. 10758–10768.
83. Islam M.S., Choi H.N., Choi W.S., Lee H.-J. Polyelectrolyte-mediated hierarchical mesoporous calcium silicates: a platform for drug delivery carrier with ultrahigh loading capacity and controlled release behavior. //Journal of Materials Chemistry B.— 2015, — Vol.3, — № 6, — P. 1001–1009.
84. Jegannathan K.R., Jun-Yee L., Chan E.-S., Ravindra P. Production of biodiesel from palm oil using liquid core lipase encapsulated in κ -carrageenan. //Fuel.— 2010, — Vol.89, — № 9, — P. 2272–2277.
85. Karlheinz D. and Herbert W.,. Enzyme Catalysis in Organic Synthesis: A Comprehensive Handbook— 2008,. Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA.
86. Karyakin A.A., Gitelmacher O. V., Karyakina E.E. A High-Sensitive Glucose Amperometric Biosensor Based on Prussian Blue Modified Electrodes. //Analytical Letters.— 1994, — Vol.27, — № 15, — P. 2861–2869.
87. Kayitmazer A.B., Quinn B., Kimura K., Ryan G.L., Tate A.J., Pink D.A., Dubin P.L. Protein Specificity of Charged Sequences in Polyanions and Heparins. //Biomacromolecules.— 2010, — Vol.11, — № 12, — P. 3325–3331.
88. Kayitmazer A.B., Strand S.P., Tribet C., Jaeger W., Dubin P.L. Effect of polyelectrolyte structure on protein-polyelectrolyte coacervates: coacervates of bovine serum albumin with poly(diallyldimethylammonium chloride) versus chitosan. //Biomacromolecules.— 2007, — Vol.8, — № 11, — P. 3568–77.
89. Kazakova L.I., Shabarchina L.I., Anastasova S., Pavlov A.M., Vadgama P., Skirtach A.G., Sukhorukov G.B. Chemosensors and biosensors based on polyelectrolyte microcapsules containing fluorescent dyes and enzymes. //Analytical and Bioanalytical Chemistry.— 2013,.

90. Kazakova L.I., Shabarchina L.I., Sukhorukov G.B. Co-encapsulation of enzyme and sensitive dye as a tool for fabrication of microcapsule based sensor for urea measuring, in: *Physical Chemistry Chemical Physics*— 2011,.
91. Kikuta K. Impaired glucose tolerance in acute pancreatitis. // *World Journal of Gastroenterology*.— 2015, — Vol.21, — № 24, — P. 7367.
92. Kilic E., Novoselova M. V., Lim S.H., Pyataev N.A., Pinyaev S.I., Kulikov O.A., Sindeeva O.A., Mayorova O.A., Murney R., Antipina M.N., Haigh B., Sukhorukov G.B., Kiryukhin M. V. Formulation for Oral Delivery of Lactoferrin Based on Bovine Serum Albumin and Tannic Acid Multilayer Microcapsules. // *Scientific Reports*.— 2017, — Vol.7, — № 1, — P. 44159.
93. Kim A.L., Musin E.V., Dubrovskii A.V., Tikhonenko S.A. Determination of urea concentration using urease-containing polyelectrolyte microcapsules. // *Analytical Methods*.— 2019, — Vol.11, — № 12.
94. Kiryukhin M. V., Gorelik S.R., Man S.M., Subramanian G.S., Antipina M.N., Low H.Y., Sukhorukov G.B. Individually Addressable Patterned Multilayer Microchambers for Site-Specific Release-On-Demand. // *Macromolecular Rapid Communications*.— 2013, — Vol.34, — № 1, — P. 87–93.
95. Kiryukhin M. V., Man S.M., Gorelik S.R., Subramanian G.S., Low H.Y., Sukhorukov G.B. Fabrication and mechanical properties of microchambers made of polyelectrolyte multilayers. // *Soft Matter*.— 2011a, — Vol.7, — № 14, — P. 6550.
96. Kiryukhin M. V., Man S.M., Sadovoy A. V., Low H.Y., Sukhorukov G.B. Peculiarities of Polyelectrolyte Multilayer Assembly on Patterned Surfaces. // *Langmuir*.— 2011b, — Vol.27, — № 13, — P. 8430–8436.
97. Kiryukhin M. V., Man S.M., Tonoyan A., Low H.Y., Sukhorukov G.B. Adhesion of Polyelectrolyte Multilayers: Sealing and Transfer of Microchamber Arrays. // *Langmuir*.— 2012, — Vol.28, — № 13, — P. 5678–5686.
98. Klein M.P., Scheeren C.W., Lorenzoni A.S.G., Dupont J., Frazzon J., Hertz P.F. Ionic liquid-cellulose film for enzyme immobilization. // *Process Biochemistry*.— 2011, — Vol.46, — № 6, — P. 1375–1379.

99. Kochetkova O.Y., Kazakova L.I., Moshkov D.A., Vinokurov M.G., Shabarchina L.I. Incorporation of proteins into polyelectrolyte microcapsules by coprecipitation and adsorption. //Russian Journal of Bioorganic Chemistry.— 2013, — Vol.39, — № 5, — P. 504–509.
100. Koegler P., Clayton A., Thissen H., Santos G.N.C., Kingshott P. The influence of nanostructured materials on biointerfacial interactions. //Advanced Drug Delivery Reviews.— 2012, — Vol.64, — № 15, — P. 1820–1839.
101. Kohler D., Madaboosi N., Delcea M., Schmidt S., De Geest B.G., Volodkin D. V., Möhwald H., Skirtach A.G. Patchiness of Embedded Particles and Film Stiffness Control Through Concentration of Gold Nanoparticles. //Advanced Materials.— 2012, — Vol.24, — № 8, — P. 1095–1100.
102. Kreft O., Javier A.M., Sukhorukov G.B., Parak W.J., Polymer microcapsules as mobile local pH-sensors. //Journal of Materials Chemistry.— 2007, — Vol.17, — № 42, — P. 4471.
103. Krystal J.H., Staley J., Mason G., Petrakis I.L., Kaufman J., Harris R.A., Gelernter J., Lappalainen J. γ -Aminobutyric Acid Type A Receptors and Alcoholism. //Archives of General Psychiatry.— 2006, — Vol.63, — № 9, — P. 957.
104. La Vignera S., Condorelli R.A., Balercia G., Vicari E., Calogero A.E. Does alcohol have any effect on male reproductive function? A review of literature. //Asian Journal of Andrology.— 2013, — Vol.15, — № 2, — P. 221–225.
105. Labus K., Turek A., Liesiene J., Bryjak J. Efficient Agaricus bisporus tyrosinase immobilization on cellulose-based carriers. //Biochemical Engineering Journal.— 2011, — Vol.56, — № 3, — P. 232–240.
106. Li X., Kong H., Mout R., Saha K., Moyano D.F., Robinson S.M., Rana S., Zhang X., Riley M.A., Rotello V.M. Rapid Identification of Bacterial Biofilms and Biofilm Wound Models Using a Multichannel Nanosensor. //ACS Nano.— 2014, — Vol.8, — № 12, — P. 12014–12019.
107. Liao W.-C., Tu Y.-K., Wu M.-S., Lin J.-T., Wang H.-P., Chien K.-L. Blood glucose concentration and risk of pancreatic cancer: systematic review and dose-

- response meta-analysis. //BMJ.— 2015, — Vol.349, — № jan02 3, — P. g7371–g7371.
108. Lud S.Q., Nikolaides M.G., Haase I., Fischer M., Bausch A.R. Field Effect of Screened Charges: Electrical Detection of Peptides and Proteins by a Thin-Film Resistor. //ChemPhysChem.— 2006, — Vol.7, — № 2, — P. 379–384.
109. Lund M., Jönsson B. Charge regulation in biomolecular solution. //Quarterly Reviews of Biophysics.— 2013, — Vol.46, — № 3, — P. 265–281.
110. Lvov Y., Antipov A.A., Mamedov A., Möhwald H., Sukhorukov G.B. Urease Encapsulation in Nanoorganized Microshells. //Nano Letters.— 2001, — Vol.1, — № 3, — P. 125–128.
111. MacLachlan J., Wotherspoon A.T.L., Ansell R.O., Brooks C.J.W. Cholesterol oxidase: sources, physical properties and analytical applications. //The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology.— 2000, — Vol.72, — № 5, — P. 169–195.
112. Magonet E., Hayen P., Delforge D., Delaive E., Remacle J. Importance of the structural zinc atom for the stability of yeast alcohol dehydrogenase. //Biochemical Journal.— 1992, — Vol.287, — № 2, — P. 361–365.
113. Marangoni V.S., Paino I.M., Zucolotto V. Synthesis and characterization of jacalin-gold nanoparticles conjugates as specific markers for cancer cells. //Colloids and Surfaces B: Biointerfaces.— 2013, — Vol.112, — P. 380–386.
114. Mayya K.S., Schoeler B., Caruso F. Preparation and Organization of Nanoscale Polyelectrolyte-Coated Gold Nanoparticles. //Advanced Functional Materials.— 2003, — Vol.13, — № 3, — P. 183–188.
115. Miranda O.R., Chen H.-T., You C.-C., Mortenson D.E., Yang X.-C., Bunz U.H.F., Rotello V.M. Enzyme-Amplified Array Sensing of Proteins in Solution and in Biofluids. //Journal of the American Chemical Society.— 2010, — Vol.132, — № 14, — P. 5285–5289.
116. Mohamad N.R., Marzuki N.H.C., Buang N.A., Huyop F., Wahab R.A. An overview of technologies for immobilization of enzymes and surface analysis techniques for immobilized enzymes. //Biotechnology & Biotechnological Equipment.— 2015, — Vol.29, — № 2, — P. 205–220.

117. Morishita Y., Nakane K., Fukatsu T., Nakashima N., Tsuji K., Soya Y., Yoneda K., Asano S., Kawamura Y. Kinetic assay of serum and urine for urea with use of urease and leucine dehydrogenase. //Clinical chemistry.— 1997, — Vol.43, — № 10, — P. 1932–6.
118. Muneer P.M.A., Alikunju S., Szlachetka A.M., Haorah J. Inhibitory effects of alcohol on glucose transport across the blood–brain barrier leads to neurodegeneration: preventive role of acetyl-l-carnitine. //Psychopharmacology.— 2011, — Vol.214, — № 3, — P. 707–718.
119. Najafi P., Zulkifli I., Soleimani A.F. Inhibition of corticosterone synthesis and its effect on acute phase proteins, heat shock protein 70, and interleukin-6 in broiler chickens subjected to feed restriction. //Poultry Science.— 2018, — Vol.97, — № 4, — P. 1441–1447.
120. Namdeo M., Bajpai S.K. Immobilization of α -amylase onto cellulose-coated magnetite (CCM) nanoparticles and preliminary starch degradation study. //Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic.— 2009, — Vol.59, — № 1–3, — P. 134–139.
121. Narsimha Rao M., Kembhavi A.A., Pant A. Immobilization of endopolygalacturonase from *Aspergillus ustus* on silica gel. //Biotechnology Letters.— 2000, — Vol.22, — № 19, — P. 1557–1559.
122. Näslund B., Ståhle L., Lundin A., Anderstam B., Arner P., Bergström J. Luminometric single step urea assay using ATP-hydrolyzing urease. //Clinical Chemistry.— 1998, — Vol.44, — № 9, — P. 1964–1973.
123. Nifontova G., Efimov A., Agapova O., Agapov I., Nabiev I., Sukhanova A. Bioimaging Tools Based on Polyelectrolyte Microcapsules Encoded with Fluorescent Semiconductor Nanoparticles: Design and Characterization of the Fluorescent Properties. //Nanoscale Research Letters.— 2019, — Vol.14.
124. Nifontova G., Zvaigzne M., Baryshnikova M., Korostylev E., Ramos-Gomes F., Alves F., Nabiev I., Sukhanova A. Next-Generation Theranostic Agents Based on Polyelectrolyte Microcapsules Encoded with Semiconductor Nanocrystals: Development and Functional Characterization. //Nanoscale Research Letters.— 2018, — Vol.13, — № 1, — P. 30.

125. Nilsson K.P.R., Herland A., Hammarström P., Inganäs O. Conjugated Polyelectrolytes: Conformation-Sensitive Optical Probes for Detection of Amyloid Fibril Formation †. //Biochemistry.— 2005, — Vol.44, — № 10, — P. 3718–3724.
126. Nishida T. Diagnosis and Clinical Implications of Diabetes in Liver Cirrhosis: A Focus on the Oral Glucose Tolerance Test. //Journal of the Endocrine Society.— 2017, — Vol.1, — № 7, — P. 886–896.
127. Nolte M., Fery A. Microstructuring of Polyelectrolyte Coated Surfaces for Directing Capsule Adhesion. //IEEE Transactions on Nanobioscience.— 2004, — Vol.3, — № 1, — P. 22–26.
128. Pastorino L., Dellacasa E., Noor M.R., Soulimane T., Bianchini P., D’Autilia F., Antipov A., Diaspro A., Tofail S.A.M., Ruggiero C. Multilayered Polyelectrolyte Microcapsules: Interaction with the Enzyme Cytochrome C Oxidase. //PLoS ONE.— 2014, — Vol.9, — № 11, — P. e112192.
129. Petrov A.I., Volodkin D. V., Sukhorukov G.B. Protein-Calcium Carbonate Coprecipitation: A Tool for Protein Encapsulation. //Biotechnology Progress.— 2008, — Vol.21, — № 3, — P. 918–925.
130. Peveler W.J., Landis R.F., Yazdani M., Day J.W., Modi R., Carmalt C.J., Rosenberg W.M., Rotello V.M. A Rapid and Robust Diagnostic for Liver Fibrosis Using a Multichannel Polymer Sensor Array. //Advanced Materials.— 2018, — Vol.30, — № 28, — P. 1800634.
131. Plekhanova Y.V., Tikhonenko S.A., Dubrovsky A.V., Kim A.L., Musin E.V., Wang G.-J., Kuznetsova I.E., Kolesov V.V., Reshetilov A.N. Comparative study of electrochemical sensors based on enzyme immobilized into polyelectrolyte microcapsules and into chitosan gel. //Analytical Sciences.— 2019, — Vol.35, — № 9.
132. Pogorilyi R.P., Siletskaya E.Y., Goncharik V.P., Kozhara L.I., Zub Y.L. Immobilization of urease on the silica gel surface by sol-gel method. //Russian Journal of Applied Chemistry.— 2007, — Vol.80, — № 2, — P. 330–334.
133. Lakowicz J.R. Principles of Fluorescence Spectroscopy // Springer US, Boston, MA, 2006. pp. 529–575.

134. Qin L., Xu Y., Han H., Liu M., Chen K., Wang S., Wang J., Xu J., Li L., Guo X. β -Lactoglobulin (BLG) binding to highly charged cationic polymer-grafted magnetic nanoparticles: Effect of ionic strength. //Journal of Colloid and Interface Science.— 2015, — Vol.460, — P. 221–229.
135. Quesada A.R., Barbacid M.M., Mira E., Fernández-Resa P., Márquez G., Aracil M. Evaluation of fluorometric and zymographic methods as activity assays for stromelysins and gelatinases. //Clinical & experimental metastasis.— 1997, — Vol.15, — № 1, — P. 26–32.
136. Raj S.B., Ramaswamy S., Plapp B. V. Yeast Alcohol Dehydrogenase Structure and Catalysis. //Biochemistry.— 2014, — Vol.53, — № 36, — P. 5791–5803.
137. Rajan S., de Guzman H.C., Palaia T., Goldberg I.J., Hussain M.M. A simple, rapid, and sensitive fluorescence-based method to assess triacylglycerol hydrolase activity. //Journal of Lipid Research.— 2021, — Vol.62, — P. 100115.
138. Ramstedt M. Alcohol and pancreatitis mortality at the population level: experiences from 14 western countries. //Addiction.— 2004, — Vol.99, — № 10, — P. 1255–1261.
139. Rana S., Elci S.G., Mout R., Singla A.K., Yazdani M., Bender M., Bajaj A., Saha K., Bunz U.H.F., Jirik F.R., Rotello V.M. Ratiometric Array of Conjugated Polymers–Fluorescent Protein Provides a Robust Mammalian Cell Sensor. //Journal of the American Chemical Society.— 2016, — Vol.138, — № 13, — P. 4522–4529.
140. Rana S., Singla A.K., Bajaj A., Elci S.G., Miranda O.R., Mout R., Yan B., Jirik F.R., Rotello V.M. Array-Based Sensing of Metastatic Cells and Tissues Using Nanoparticle–Fluorescent Protein Conjugates. //ACS Nano.— 2012, — Vol.6, — № 9, — P. 8233–8240.
141. Reisch A., Klymchenko A.S. Fluorescent Polymer Nanoparticles Based on Dyes: Seeking Brighter Tools for Bioimaging. //Small.— 2016, — Vol.12, — № 15, — P. 1968–1992.
142. Schmidt S., Madaboosi N., Uhlig K., Köhler D., Skirtach A., Duschl C., Möhwald H., Volodkin D. V. Control of Cell Adhesion by Mechanical

- Reinforcement of Soft Polyelectrolyte Films with Nanoparticles. //Langmuir.— 2012, — Vol.28, — № 18, — P. 7249–7257.
143. Seyrek E., Dubin P.L., Tribet C., Gamble E.A. Ionic Strength Dependence of Protein-Polyelectrolyte Interactions. //Biomacromolecules.— 2003, — Vol.4, — № 2, — P. 273–282.
144. Sharma J., Mahajan R., Gupta V. Comparison and Suitability of Gel Matrix for Entrapping Higher Content of Enzymes for Commercial Applications. //Indian Journal of Pharmaceutical Sciences.— 2010, — Vol.72, — № 2, — P. 223.
145. Shchukin D.G., Shutava T., Shchukina E., Sukhorukov G.B., Lvov Y.M. Modified polyelectrolyte microcapsules as smart defense systems. //Chemistry of Materials.— 2004, — Vol.16, — № 18, — P. 3446–3451.
146. Shenoy D.B., Antipov A.A., Sukhorukov G.B., Möhwald H. Layer-by-Layer Engineering of Biocompatible, Decomposable Core-Shell Structures. //Biomacromolecules.— 2003, — Vol.4, — № 2, — P. 265–272.
147. Shioji S., Hanada M., Hayashi Y., Tokami K., Yamamoto H. Continuous surface modification of silica particles for enzyme immobilization. //Advanced Powder Technology.— 2003, — Vol.14, — № 2, — P. 231–245.
148. Silva R.A., Urzúa M.D., Petri D.F.S., Dubin P.L. Protein Adsorption onto Polyelectrolyte Layers: Effects of Protein Hydrophobicity and Charge Anisotropy. //Langmuir.— 2010, — Vol.26, — № 17, — P. 14032–14038.
149. Skirtach A.G., Volodkin D. V., Möhwald H. Bio-interfaces-Interaction of PLL/HA Thick Films with Nanoparticles and Microcapsules. //ChemPhysChem.— 2010, — Vol.11, — № 4, — P. 822–829.
150. Stradner A., Sedgwick H., Cardinaux F., Poon W.C.K., Egelhaaf S.U., Schurtenberger P. Equilibrium cluster formation in concentrated protein solutions and colloids. //Nature.— 2004, — Vol.432, — № 7016, — P. 492–495.
151. Sukhorukov B.I., Tikhonenko S.A., Saburova E.A., Dubrovskii A. V, Dybovskaia I.N., Shabarchina L.I. Incapsulation of enzymes into polyelectrolyte nano- and microcapsules and the problem of the development of enzymatic microdiagnostics. //Biofizika.— 2007a, — Vol.52, — № 6, — P. 1041–8.

152. Sukhorukov B.I., Tikhonenko S.A., Saburova E.A., Dubrovskii A. V., Dybovskaya Y.N., Shabarchina L.I. Protein-filled polyelectrolyte microcapsules in the design of enzymic microdiagnostics. //Biophysics.— 2007b, — Vol.52, — № 6, — P. 575–581.
153. Sukhorukov G., Fery A., Möhwald H. Intelligent micro- and nanocapsules, in: Progress in Polymer Science (Oxford)— 2005,.
154. Sukhorukov G.B., Donath E., Lichtenfeld H., Knippel E., Knippel M., Budde A., Möhwald H. Layer-by-layer self assembly of polyelectrolytes on colloidal particles. //Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects.— 1998, — Vol.137, — № 1–3, — P. 253–266.
155. Sun Y., Song Y., Liu C., Geng J. Correlation between the glucose level and the development of acute pancreatitis. //Saudi Journal of Biological Sciences.— 2019, — Vol.26, — № 2, — P. 427–430.
156. Tabata M., Murachi T. A chemiluminometric method for the determination of urea in serum using a three-enzyme bioreactor. //Journal of Bioluminescence and Chemiluminescence.— 1988, — Vol.2, — № 2, — P. 63–67.
157. Tang R., Kim C.S., Solfiell D.J., Rana S., Mout R., Velázquez-Delgado E.M., Chompoosor A., Jeong Y., Yan B., Zhu Z.-J., Kim C., Hardy J.A., Rotello V.M. Direct Delivery of Functional Proteins and Enzymes to the Cytosol Using Nanoparticle-Stabilized Nanocapsules. //ACS Nano.— 2013, — Vol.7, — № 8, — P. 6667–6673.
158. The Emerging Risk Factors Collaboration, Sarwar N, Gao P, Kondapally S R Seshasai, Gobin R, Kaptoge S, Angelantonio E Di, Ingelsson E, Lawlor D A, Selvin E, M Stampfer, Stehouwer C D A, Lewington S, Pennells L, Thompson A, Sattar N, White I R, Ray K K, Danesh J. Diabetes mellitus, fasting blood glucose concentration, and risk of vascular disease: a collaborative meta-analysis of 102 prospective studies. //The Lancet.— 2010, — Vol.375, — № 9733, — P. 2215–2222.
159. Tikhonenko S.A., Saburova E.A., Durdenko E.N., Sukhorukov B.I. Enzyme-polyelectrolyte complex: Salt effects on the reaction of urease with

- polyallylamine. //Russian Journal of Physical Chemistry A.— 2009, — Vol.83, — № 10, — P. 1781–1788.
160. Tong W., Song X., Gao C. Layer-by-layer assembly of microcapsules and their biomedical applications. //Chemical Society Reviews.— 2012, — Vol.41, — № 18, — P. 6103.
161. Troitsky V., Berzina T., Shchukin D., Sukhorukov G., Erokhin V., Fontana M.P. Simple method of hydrophilic/hydrophobic patterning of solid surfaces and its application to self-assembling of nanoengineered polymeric capsules. //Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects.— 2004, — Vol.245, — № 1–3, — P. 163–168.
162. Tümtürk H., Karaca N., Demirel G., Şahin F. Preparation and application of poly(N,N-dimethylacrylamide-co-acrylamide) and poly(N-isopropylacrylamide-co-acrylamide)/ κ -Carrageenan hydrogels for immobilization of lipase. //International Journal of Biological Macromolecules.— 2007, — Vol.40, — № 3, — P. 281–285.
163. Uyarel H., Ozdol C., Gencer A.M., Okmen E., Cam N. Acute alcohol intake and QT dispersion in healthy subjects. //Journal of Studies on Alcohol.— 2005, — Vol.66, — № 4, — P. 555–558.
164. Van Staden J.F., Taljaard R.E. Determination of ammonia in water and industrial effluent streams with the indophenol blue method using sequential injection analysis. //Analytica Chimica Acta.— 1997, — Vol.344, — № 3, — P. 281–289.
165. Wang B., Zhao Q., Wang F., Gao C. Biologically Driven Assembly of Polyelectrolyte Microcapsule Patterns To Fabricate Microreactor Arrays. //Angewandte Chemie International Edition.— 2006, — Vol.45, — № 10, — P. 1560–1563.
166. Wang S., Chen K., Li L., Guo X. Binding between Proteins and Cationic Spherical Polyelectrolyte Brushes: Effect of pH, Ionic Strength, and Stoichiometry. //Biomacromolecules.— 2013, — Vol.14, — № 3, — P. 818–827.
167. Wang W., Li L., Henzler K., Lu Y., Wang J., Han H., Tian Y., Wang Y., Zhou Z., Lotze G., Narayanan T., Ballauff M., Guo X., Protein Immobilization

- onto Cationic Spherical Polyelectrolyte Brushes Studied by Small Angle X-ray Scattering. //Biomacromolecules.— 2017, — Vol.18, — № 5, — P. 1574–1581.
168. Wang X., Gu H., Yin F. T.Y. Biosensors and Bioelectronics— 2009,.
169. Wang Y., Zhang S., Du D., Shao Y., Li Z., Wang J., Engelhard M.H., Li J., Lin Y. Self assembly of acetylcholinesterase on a gold nanoparticles–graphene nanosheet hybrid for organophosphate pesticide detection using polyelectrolyte as a linker. //Journal of Materials Chemistry.— 2011, — Vol.21, — № 14, — P. 5319.
170. Weinshenker D., Schroeder J.P. There and Back Again: A Tale of Norepinephrine and Drug Addiction. //Neuropsychopharmacology.— 2007, — Vol.32, — № 7, — P. 1433–1451.
171. Xu Y., Mazzawi M., Chen K., Sun L., Dubin P.L. Protein Purification by Polyelectrolyte Coacervation: Influence of Protein Charge Anisotropy on Selectivity. //Biomacromolecules.— 2011, — Vol.12, — № 5, — P. 1512–1522.
172. Xu Y., Seeman D., Yan Y., Sun L., Post J., Dubin P.L. Effect of Heparin on Protein Aggregation: Inhibition versus Promotion. //Biomacromolecules.— 2012, — Vol.13, — № 5, — P. 1642–1651.
173. Yang J., Gao C. Fabrication of microcapsule arrays on chemically patterned surfaces via covalent linking. //Journal of Zhejiang University-SCIENCE A.— 2009, — Vol.10, — № 1, — P. 114–120.
174. Yasar Mahlicli F., Alsoy Altinkaya S., Yurekli Y. Preparation and characterization of polyacrylonitrile membranes modified with polyelectrolyte deposition for separating similar sized proteins. //Journal of Membrane Science.— 2012, — Vol.415–416, — P. 383–390.
175. Yu S., Xu X., Yigit C., van der Giet M., Zidek W., Jankowski J., Dzubiella J., Ballauff M. Interaction of human serum albumin with short polyelectrolytes: a study by calorimetry and computer simulations. //Soft Matter.— 2015, — Vol.11, — № 23, — P. 4630–4639.