



Под ред. А.Н. Огурцова

АКТУАЛЬНЫЕ ПРОБЛЕМЫ БИОТЕХНОЛОГИИ и БИОИНЖЕНЕРИИ

МИНИСТЕРСТВО ОБРАЗОВАНИЯ И НАУКИ УКРАИНЫ
НАЦИОНАЛЬНЫЙ ТЕХНИЧЕСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ
«ХАРЬКОВСКИЙ ПОЛИТЕХНИЧЕСКИЙ ИНСТИТУТ»

АКТУАЛЬНЫЕ ПРОБЛЕМЫ БИОТЕХНОЛОГИИ И БИОИНЖЕНЕРИИ

Под ред. А. Н. Огурцова

Монография

Харьков
«Типография Мадрид»
2019

Рецензенты:

И. М. Рыщенко – д-р тех. наук, директор Учебно-научного института химических технологий и инженерии, Национальный технический университет «Харьковский политехнический институт»;

А. В. Мартынов – д-р фарм. наук, проф., зав. лаб. и клиническим отд. молекулярной иммунофармакологии, ДУ «Институт микробиологии и иммунологии им. И. И. Мечникова НАМН Украины

Публикуется по решению учёного совета Национального технического университета «Харьковский политехнический институт», протокол № 2 от 25.01.2019 г.

Авторы: И. А. Белых, О. Н. Близнюк, А. А. Варанкина, О. В. Звягинцева, Н. Ф. Клещев, Ю. М. Краснополянский, Д. В. Лаврик, Н. Ю. Масалитина, А. Н. Огурцов, Д. М. Пилипенко, С. И. Самойленко

А43 **Актуальные** проблемы биотехнологии и биоинженерии / под ред. А. Н. Огурцова. – Харьков : «Типография Мадрид», 2019. – 240 с. : ил. 48., табл. 17., библиогр. 432 назв.

ISBN 978-617-7683-53-6

Рассмотрены и обобщены научные, технологические и методические подходы к решению современных задач биотехнологии и биоинженерии на молекулярном уровне в нанобиотехнологии, биокатализе, биосенсорике и нанофармации.

Монография рекомендуется научным сотрудникам, аспирантам и студентам, специализирующимся в области биотехнологии и биоинженерии.

Розглянуті та узагальнені наукові, технологічні та методичні підходи до вирішення сучасних задач біотехнології та біоінженерії на молекулярному рівні у нанобіотехнології, біокаталізі, біосенсоріці та нанофармації.

Монографія рекомендується науковим співробітникам, аспірантам та студентам, що спеціалізуються в галузі біотехнології та біоінженерії.

УДК 577.2+606.2

Содержание

Предисловие	5
1. Нанобиотехнологические формы гидрофобных антиоксидантов: научные основы получения, фармакологические и терапевтические свойства (Д.М. Пилипенко, О.В. Звягинцева, Ю.М. Краснополянский)	9
1.1. Введение	9
1.2. Технологические аспекты получения липосом	10
1.3. Липосомальная форма Куркумина	14
1.4. Липосомальная форма Кверцетина	36
1.5. Липосомальная форма Коэнзима Q ₁₀ (Убидекаренона)	57
2. Прикладные аспекты использования протеолитических ферментов в процессах биокатализа и биотрансформации (А.А. Варанкина, Д.В. Лаврик)	72
2.1. Актуальность исследования активности протеолитических ферментов с целью их практического использования	72
2.2. Характеристика протеолитических ферментов	74
2.3. Постановка задач исследования активности протеолитических ферментов с целью их практического использования	84
2.4. Определение зависимости протеолитической активности фермента от концентрации его растворов	88
2.5. Исследование влияния температуры на протеолитическую активность ферментного препарата	90
2.6. Исследование влияния pH среды на протеолитическую активность ферментного препарата	91

2.7. Исследование влияния стабилизаторов на протеолитическую активность фермента	93
2.8. Исследование влияния добавок различной химической природы на способность фермента к удалению белковых загрязнений	95
2.9. Обоснование состава ферментного препарата	103
2.10. Рекомендации по применению протеолитических ферментов для удаления белковых загрязнений	104
3. Перспективы применения сенсоров в анализе биологических и биофармацевтических систем (И.А. Белых, С.И. Самойленко)	113
3.1. Биотехнологические аспекты применения иммобилизованных биологических объектов в биосенсорах	113
3.2. Принципы иммобилизации биологического материала на поверхности биосенсоров	139
3.3. Электронные системы типа «электронный нос» и «электронный язык»	153
3.4. Сенсоры для определения этилового спирта	170
4. Нанобиофизика в бионанотехнологии и нанофармации (Н.Ю. Масалитина, О.Н. Близнюк, Н.Ф. Клещев, А.Н. Огурцов)	191
4.1. Введение	191
4.2. Специфика бионаноматериалов	192
4.3. Иерархическое самоассемблирование белков	196
4.4. Самоассемблирование в нанофармации	215

Предисловие

В широком смысле термин биотехнология применим к любому производству коммерческих продуктов, образуемых микроорганизмами в результате их жизнедеятельности. Более формально биотехнология определяется как применение научных и инженерных принципов к переработке материалов живыми организмами с целью создания товаров и услуг.

Исторически биотехнология возникла тогда, когда дрожжи были впервые использованы при производстве пива, а бактерии – для получения йогурта. Термин «биотехнология» был придуман в 1917 г. венгерским инженером Карлом Эреки для описания процесса крупномасштабного выращивания свиней с использованием в качестве корма сахарной свёклы. По определению Эреки, биотехнология – это все виды работ, при которых из сырьевых материалов с помощью живых организмов производятся те или иные продукты. Однако это определение не получило широкого распространения и долгое время термин «биотехнология» относился главным образом к процессам промышленной ферментации. И только с 1961 года, когда научный журнал «Journal of Microbiological and Biochemical Engineering and Technology», специализировавшийся на публикации работ по прикладной микробиологии и промышленной ферментации, был переименован на «Biotechnology and Bioengineering», биотехнология оказалась чётко и необратимо связана с исследованиями в области промышленного производства товаров и услуг при участии живых организмов, биологических систем и процессов.

Современная биотехнология ведёт отсчёт от 15 октября 1980 г., когда на Нью-Йоркской фондовой бирже стоимость одной акции биотехнологической компании Genentech поднялась с 35 до 89 долларов. За два года до этого учёным компании удалось выделить фрагменты гена, кодирующие человеческий инсулин, и перенести их в клонирующие векторы, способные реплицироваться в клетках *Escherichia coli*.

Биоинженерия использует понятия и методы биотехнологии и генной инженерии для проектирования и получения в промышленных масштабах широкого спектра биологических объектов от искусственных органов и тканей или целых генетически модифицированных организмов до молекулярного конструирования отдельных биомакромолекул. Особенно важным приложением биоинженерии является анализ и эффективное решение проблем, связанных со здоровьем людей.

Первый раздел монографии посвящён биотехнологическому получению липосомальных наночастиц, содержащих кверцетин, куркумин, коэнзим Q₁₀ и изучению их фармакологической и терапевтической активности. Второй раздел посвящён прикладным аспектам использования протеолитических ферментов в процессах биокатализа и рекомендациям по применению протеолитических ферментов для удаления белковых загрязнений. В третьем разделе анализируются вопросы применения сенсоров в анализе биологических и биофармацевтических систем. В четвёртом разделе монографии рассматривается применение нанобиофизических процессов самосборки и самоассемблирования для решения задач бионанотехнологии и в синтезе нанофармацевтических препаратов для использования в наномедицине.

Авторы монографии

1. **Белых Ирина Анатольевна**, кандидат биологических наук, доцент, Национальный технический университет «Харьковский политехнический институт».

2. **Близнюк Ольга Николаевна**, доктор технических наук, профессор, Национальный технический университет «Харьковский политехнический институт».

3. **Варанкина Александра Александровна**, кандидат технических наук, доцент, Национальный технический университет «Харьковский политехнический институт».

4. **Звягинцева Оксана Викторовна**, кандидат биологических наук, доцент, Национальный технический университет «Харьковский политехнический институт».

5. **Клещёв Николай Федосович**, доктор технических наук, профессор, Национальный технический университет «Харьковский политехнический институт».

6. **Краснопольский Юрий Михайлович**, доктор фармацевтических наук, профессор, Национальный технический университет «Харьковский политехнический институт».

7. **Лаврик Дмитрий Владимирович**, начальник производственного участка, Бориспольский филиал ООО «Procter & Gamble Ukraine».

8. **Масалитина Наталия Юрьевна**, кандидат технических наук, доцент, Национальный технический университет «Харьковский политехнический институт».

9. **Огурцов Александр Николаевич**, доктор физико-математических наук, профессор, заведующий кафедрой биотехнологии, биофизики и аналитической химии, Национальный технический университет «Харьковский политехнический институт».

10. **Пилипенко Дарья Михайловна**, аспирант, Национальный технический университет «Харьковский политехнический институт».

11. **Самойленко Сергей Иванович**, кандидат технических наук, доцент, Национальный технический университет «Харьковский политехнический институт».

Список сокращений

АОА – антиоксидантная активность

АТФ – аденозинтрифосфат

ГЭБ – гематоэнцефалический барьер

ДК – диеновые конъюгаты

ИБС – ишемическая болезнь сердца

МДА – малоновый диальдегид

ОАА – общая антиокислительная активность

ПОЛ – перекисное окисление липидов

ПЭГ – полиэтиленгликоль

СМС – синтетические моющие средства

СРО – свободнорадикальное окисление

ACT – аспаргатаминотрансфераза
ALT – аланинаминотрансфераза
AuNP – наночастица золота
Chol – холестерин
CoQ₁₀ – убидекаренон (коэнзим Q₁₀)
Cryo-ET – крио-электронная томография
Cur – куркумин
HCC – гепатоцеллюлярная карцинома
DHFR – дигидрофолат редуктаза
DOPE – диолеил-sn-глицеро-3-фосфоэтаноламин
DOTAP – диолеил-триметиламмоний-пропан
DMPC – димиристоилфосфатидилхолин
DPPG – дипальмитоилфосфатидилглицерин
DPPC – дипальмитоилфосфатидилхолин
DPPS – дипальмитоилфосфатидилсерин
DSPE – дистеаролфосфатидилэтаноламин
EGF – эпидермальный фактор роста
EPC – фосфатидилхолин яичного желтка
GNCI – гуанидин гидрохлорид
HSPC – гидрированный соевый фосфатидилхолин
LDH – лактатдегидрогеназа
LS – липосома
LS-CoQ₁₀ – липосомальная форма коэнзима CoQ₁₀
LS-Cur – липосомальная форма куркумина
LS-Queg – липосомальная форма кверцетина
MG – малахитовый зелёный
PC – фосфатидилхолин
PE – фосфатидилэтаноламин
PL – фосфолипиды
Queg – кверцетин
SFPC – фосфатидилхолин подсолнечника
SOD – супероксиддисмутаза
SPC – соевый фосфатидилхолин

1. НАНОБИОТЕХНОЛОГИЧЕСКИЕ ФОРМЫ ГИДРОФОБНЫХ АНТИОКСИДАНТОВ: НАУЧНЫЕ ОСНОВЫ ПОЛУЧЕНИЯ, ФАРМАКОЛОГИЧЕСКИЕ И ТЕРАПЕВТИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА

Д.М. Пилипенко, О.В. Звягинцева, Ю.М. Краснопольский

1.1. Введение

Ряд заболеваний сопровождается снижением АОА и изменением в звеньях антиоксидантной системы защиты, что сопровождается повышением уровня продуктов ПОЛ.

В настоящее время для снижения уровня продуктов ПОЛ применяются препараты антиоксидантов различного происхождения. Особый интерес представляют экзогенные продукты – биофлавоноиды, например, Queg, Cur или эндогенные, например, CoQ₁₀ [1–4].

Благодаря высокой АОА биофлавоноиды ограничивают СРО, предотвращают избыточное окисление липидов, белков, нуклеиновых кислот, тем самым, защищая мембраны клеток от повреждения оксидантами. Накоплена обширная доказательная база относительно их ангиопротекторного, антиоксидантного, противовоспалительного, ранозаживляющего, противоопухолевого и противовирусного действия.

Антиоксидант CoQ₁₀ в течение многих лет успешно применяется в кардиологии. Реагируя со свободными радикалами, CoQ₁₀ приводит к снижению уровня супероксида и, тем самым, ингибирует процессы ПОЛ биомембран и липопротеидов циркулирующей крови, а также окисление ДНК и белков организма. Особым свойством CoQ₁₀ является способность

восстанавливаться под действием ферментных систем организма, в то время как другие антиоксиданты окисляются необратимо.

Лекарственные формы Cur, Queg и CoQ₁₀, в основном, представлены препаратами для приёма *per os*. Биодоступность этих препаратов крайне мала и не превышает 10 %, что связано с низкой растворимостью, а, следовательно, и с низкой адсорбцией в организме. В настоящее время в/в форма CoQ₁₀ и Cur отсутствует в клинической практике. Большинство фармакокинетических исследований CoQ₁₀ и Cur проведено при его в/м введении или приёме *per os*. Для увеличения биодоступности гидрофобных антиоксидантов необходимо создание препарата с повышенной растворимостью в воде, что позволит увеличить биодоступность продукта. В такой стратегии может быть эффективно применение LS форм [5–7]. Многие компании по всему миру ведут исследования направленные на получение терапевтических LS препаратов, а арсенал врачей постоянно пополняется препаратами на их основе [5–7].

Использование LS препаратов на основе растительных гидрофобных соединений, обладающих разнообразной фармакологической активностью позволит расширить арсенал высокоэффективных лекарственных препаратов.

Данная глава посвящена биотехнологическому получению наночастиц, содержащих Queg, Cur, CoQ₁₀ и изучению их фармакологической и терапевтической активности.

1.2. Технологические аспекты получения липосом

Первоначально необходимо рассмотреть основные методы получения LS- наночастиц, которые наиболее активно используются в современной нанобиотехнологии.

Проанализировав технологии, используемые для получения LS-наночастиц, можно выделить следующие основные этапы: образование липидной плёнки, обработка ультразвуком, спонтанная везикулизация, инъекция, экструзия и лиофилизация [5, 7, 8]:

Метод липидной плёнки. Включение лекарственных веществ в LS, при использовании метода липидной плёнки, позволяет получать лекарственные препараты преимущественно с липофильными субстанциями. Этот метод в ряде случаев можно использовать для гидрофильных субстанций. Однако, если для липофильных активных фармацевтических субстанций включение в LS составляет не менее 85–90%, то для гидрофильных – не более 30–50 %.

Принцип метода заключается в получении раствора липидов и липофильной лекарственной субстанции в органических растворителях (этанол, метанол, хлороформ и др.) с последующим образованием плёнки, содержащей липиды и лекарственную субстанцию.

Получение липидной плёнки проводят при постоянном перемешивании раствора липидов в органическом растворителе при температуре 37–43 °С. При использовании гидрофобной субстанции её растворяют в соответствующем органическом растворителе и смешивают с раствором липидов.

Липидную плёнку или плёнку липидов с лекарственной субстанцией гидратируют в буферном растворе (или воде) для получения мультиламеллярных везикул. При использовании гидрофильных субстанций плёнку гидратируют буферным раствором, содержащим лекарственную субстанцию. Необходимо отметить, что температура в процессе ресуспендирования должна быть выше температуры фазового перехода используемого липида. При получении везикул необходимо учитывать, кроме температуры, ряд факторов: величину pH и ионную силу буфера, концентрацию липидов и соотношение липид:лекарственное вещество, физико-химические свойства используемых компонентов. Размер образующихся везикул определяется также интенсивностью и временем перемешивания. Кроме этого, необходимо в каждом конкретном случае учитывать заряд липидов. Для предотвращения процессов ПОЛ полученную эмульсию насыщают инертным газом.

Ультразвуковая обработка – процесс получения LS с помощью ультразвука. Недостатком этого метода является крайне низкая производительность, окисление и гидролиз липидов, длительность технологиче-

ского процесса, повышение температуры реакционной смеси. Серьёзным недостатком данного метода также является то, что полученные LS недостаточно устойчивы в процессе хранения и требуют дополнительных мероприятий по стабилизации. Кроме того, обнаружена низкая стандартность полученных препаратов, проявляющаяся в неоднородности состава. Использование озвучивания неэффективно в ряде случаев, т.к. некоторые лекарственные вещества не выдерживают режимов обработки ультразвуком. Обработка ультразвуком приводит к развитию процессов перекисного окисления PL компонентов LS. Так, например, по нашим данным, ультразвуковая обработка PL смесей различного состава при 22 кГц в течение 10–45 минут при температуре 25 ± 5 °C сопровождается увеличением индекса окисленности в 2–3 раза.

Рядом авторов предложено комбинированное использование методов для получения LS. Так, например, при получении LS, первоначально проводили ультразвуковую обработку при 22 кГц в течение 3–5 минут, а затем замораживание в жидком азоте, с последующим оттаиванием при комнатной температуре. Процесс повторяли 3–6 раз.

Метод спонтанной везикуляции – основан на спонтанном образовании LS при быстром подщелачивании водных дисперсий, содержащих PL. К недостаткам данного метода можно отнести ограниченность в использовании PL состава (PC, фосфатидная кислота), высокую скорость процесса, что затрудняет использование этого метода в промышленных условиях при получении больших объёмов LS препаратов. Кроме того, высокое значение pH (более 9,0), а так же определяющее значение температурного режима, делает данный метод не приемлемым для ряда лекарственных и биологически активных веществ.

Инжекция – получение LS путём впрыскивания в водную среду раствора PL и гидрофобной лекарственной субстанции в летучем органическом растворителе. К недостаткам этого метода необходимо отнести низкую эффективность включения в LS лекарственных веществ, необходимость удаления растворителя из препарата, нестандартность состава LS. Кроме того, LS, полученные инъекцией или методом удаления детер-

гента, отличаются низкой стабильностью. К преимуществам метода можно отнести возможность влияния на размер LS за счёт температуры водной среды, растворителя, скорости перемешивания и концентрации PL.

Экструзия – данный процесс осуществляется в гомогенизаторах высокого давления, в результате происходит разрушение крупных мицелл при пропускании липидной эмульсии под высоким давлением через специальный клапан при температуре выше фазового перехода липидов, используемых в составе LS. Преимуществами этого метода являются стандартность состава LS, высокая производительность метода, минимальное окисление и гидролиз PL, сохранность лекарственного препарата, стабильность LS. Существенное значение имеет наличие стандартного промышленного оборудования для работ под высоким давлением и получение препарата в асептических условиях в закрытом режиме, при этом в ходе процесса возможен контроль значений температуры и давления.

Лиофилизация. Проведение процесса лиофилизации определяется рядом факторов: величиной и зарядом LS, составом PL и физико-химическими свойствами вводимого в них вещества, структурой бислоя и другими факторами. Вследствие этого, режим лиофилизации и подбор криопротектора необходимо определять для каждого исследуемого препарата.

Список литературы

1. Ковалев В.Б. Механизмы действия биофлавоноида кверцетина / В.Б. Ковалев, В.В. Ковзан, Е.Ю. Кончина // Украинский медицинский альманах. – 1999. – Т. 2, № 4. – С. 176–184.
2. Коэнзим Q10 (убихинон) в клинической практике / под ред. Л.П. Грицио. – М. : Медицина, 2006. – 120 с.
3. Пилипенко Д.М. Применение нанобиотехнологических форм куркумина / Д.М. Пилипенко, Д.В. Безрукавый, Ю. М. Краснопольский // Вісник НТУ «ХПІ» серія «Нові рішення в сучасних технологіях». – 2018. – № 9 (1285). – С. 218–229.

4. Shakhmaiev A.E. Preparation and Cardioprotective Effect Analysis of Liposomal Coenzyme Q10 / A.E. Shakhmaiev, T.V. Gorbach, L.A. Bobritskaya, Yu.M. Krasnopolsky // The Pharma Innovation J. – 2015. – V. 4, №. 9. – P. 22–26.
5. Швец В.И. Липосомальные формы лекарственных препаратов: технологические особенности получения и применение в клинике / В.И. Швец, Ю.М. Краснополяский, Г.М. Сорокоумова. – М. : Ремедиум, 2016. – 200 с.
6. Krasnopolskii Y.M. Prospective Clinical Applications of Nanosized Drugs / Y.M. Krasnopolskii, V.Y. Balabanyan, D.L. Shobolov, V.I. Shvets // Russian J. of General Chemistry. – 2013. – V. 83, №. 12. – P. 2524–2540.
7. Technologies and Perspectives of Liposomal Drug Application in Clinical Practice / Yu.M. Krasnopolskii, A.S. Grigor'eva, A.G. Katsai [et al.] // Rossiiskie Nanotekhnologii. – 2017. – V. 12, №. 7 – 8. – P. 449–458.
8. Feng T. Liposomal Curcumin and its Application in Cancer / T. Feng, Y. Wei, R. Lee, L. Zhao // Int. J. Nanomedicine. – 2017. – V. 12, №. 9. – P. 6027–6044.

1.3. Липосомальная форма Куркумина

Cur – биофлавоноид, природное соединение ярко жёлтого цвета, экстрагированное из корневища растения *Curcuma longa*, которое выращивается в Юго-Восточной Азии. Существует три основных типа куркуминоидов (рисунок 1.1): 1,7-бис-4-гидрокси-3-метоксифенилгепта-1,6-диен-3,5-дион (Cur I, ~ 77 %), 1,4-гидрокси-3-метоксифенил-7,4-гидезоксифенилгепта-1,6-диен-3,5-дион (Cur II, ~ 17 %) и 1,7-бис-4-гидезоксифенилгепта-1,6-диена-3,5-дион (Cur III, ~ 3 %). Наиболее активно используется Cur I, легко проникающий в клеточную мембрану за счёт своей гидрофобности. Cur I представлен молекулярной формулой $C_{21}H_{20}O_6$ с М.м. 368,37 и температурой плавления 183 °С. Cur термостабилен (выдерживает до 250 °С), но весьма чувствителен к свету. В растворе, когда значение $pH > 5$, Cur I нестабилен и его скорость разложения значительно ускоряется с увеличением значения pH раствора. Транс-6-(4'-гидрокси-3'-

метоксифенил)-2,4-диоксо-5-гексенал является основным продуктом разложения Cur, а ванилин ($C_8H_8O_3$) и феруловая кислота ($C_{10}H_{10}O_4$) представлены в незначительных количествах [1–3].

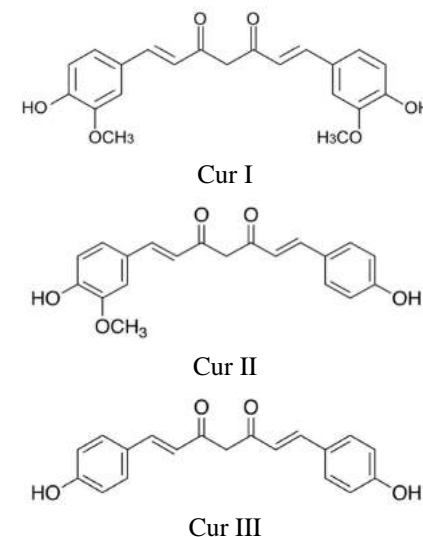


Рисунок 1.1 – Строение молекул куркуминоидов

В настоящее время накоплен обширный материал, подтверждающий высокую фармакологическую активность Cur: противовоспалительную, антиоксидантную, противоопухолевую и др. [1, 4–7].

Cur является полифенолом и представляет собой оранжево-жёлтые кристаллы не растворимые в воде, но легко растворимые в спирте. Постоянное употребление Cur уменьшает концентрацию Chol в крови, предотвращает окисление липидов крови, подавляет агрегацию тромбоцитов и их адгезию на сосудистой стенке, снижает развитие катаракты, обладает противоопухолевой активностью. Исследователи из Мичиганского Университета установили, что Cur является эффективным средством для предотвращения болезни Паркинсона. Первым шагом к возникновению этой болезни, является слияние молекул белка α -синуклеина. Cur может помочь предотвратить слияние белка, прочно связываясь с α -синукле-

ином, тем самым, ускоряя его движение и препятствуя слипанию [4, 8]. Существует мнение, что образование телец Леви при болезнях Паркинсона и Альцгеймера связано с патологической агрегацией α -синуклеина. Необходимо отметить, что Cur практически не проникает через ГЭБ. Лекарственный препарат (*per os*), созданный на основе Cur, позволяет больным с инсультом быстрее восстанавливаться. На лабораторных животных с моделью инсульта препарат уменьшает последствия паралича и способствует улучшению движения. Cur не вызывает столь сильных нежелательных реакций организма как нестероидные противовоспалительные препараты или инъекции стероидов.

Трудность применения Cur прежде всего связана с его гидрофобностью, что в свою очередь снижает его проникновение в клетки организма [6, 7]. Существенно изменяет положение возможность включения Cur в LS или полимерные наночастицы. Показано [8], что Cur в LS из природного PC в виде пищевой добавки позволяет в 4 раза увеличить проникновение Cur в ткани лабораторных животных. Размер таких LS составлял около 260 нм, а степень включения Cur в бислой – до 68 %. Результаты показали, что содержание Cur введённого в форме LS в крови (320 мкг/л) в 5 раз превышало его количество в крови животных, получавших свободную форму Cur (65 мкг/л). По мнению исследователей, препарат обладает противораковым и антиоксидантным эффектом. Обнаружено влияние LS-Cur на модели болезни Альцгеймера, инфаркта миокарда и инсульта [6–9]. При этом снижается накопление β -амилоида в мозге.

Особое внимание уделяется PL составу LS. В работе [10] получены три вида LS, содержащих Cur. Для их получения были использованы три вида PL: SPC, EPC и HSPC. Все LS содержали Chol и были получены методом липидной плёнки, которую гидратировали фосфатным буфером (рН 6,5), содержащим Твин 80, который необходим для повышения эффективности инкапсуляции. LS получали ультразвуковой обработкой при 80 Вт в течение 3 минут. LS были стабильны в течение 2 месяцев при температуре 4 °С В таблице 1.1 представлены данные, полученные при изучении трёх видов LS.

Таблица 1.1 – Характеристика LS, полученных с использованием PC из разного сырья

Вид PC	SPC	EPC	HSPC
Размер LS, нм	82,37	83,13	92,42
Включение Cur в LS, %	82,32±3,91	81,59±2,38	80,77±4,12
Проникновение LS через кожу, мкг/ см ⁻²	34,84	31,97	21,87

Как видно из приведенных данных, полученные LS достаточно близки по размерам и по степени включения Cur в LS. Однако по тесту трансдермального эффекта наилучшие результаты получены при использовании SPC. Это может быть связано с разницей в температурах фазового перехода. SPC и EPC имеют более низкую температуру (ниже 0 °С), чем HSPC (около 50 °С), что связано с ненасыщенностью жирных кислот. Температура фазового перехода влияет на высвобождение Cur из LS.

Для улучшения качественных характеристик в ряд LS вводят DPPC, DMPC и другие PL. LS-Cur также модифицируют церамидом, γ -циклодекстрином и другими веществами. При изучении состава LS-Cur было показано, что модификация поверхности LS карбоксиметилдекстраном приводит к повышению противоопухолевой активности. Причём, сравнение с LS-Cur, модифицированными ПЭГ, и свободным Cur продемонстрировало большую эффективность LS-Cur с карбоксиметилдекстраном [11]. В работе [12] включение в LS комплекса γ -циклодекстрина с Cur позволило повысить степень включения Cur до 50 %, в то время как LS-Cur без γ -циклодекстрина обеспечивал 30,7 % включения.

Установлена высокая противоопухолевая активность LS-Cur против различных видов рака: остеосаркомы, плоскоклеточного рака головы и шеи, рака поджелудочной железы и других видов. Проведённые исследования LS-Cur [1, 13] для лечения раковых заболеваний доказывают, что Cur активно ингибирует активность универсального фактора транскрипции NF- κ B, который контролирует экспрессию генов иммунного ответа,

апоптоза и клеточного цикла и играет важную роль в установлении связи между воспалением и раком, а также связанных с NF-κB путей для индукции клеточного апоптоза. Очень важно, что LS, содержащие синтетический аналог Cur, эффективны *in vitro* против клеточных линий плоскоклеточного рака CCL-23R и YM-SCC-1R резистентных к цисплатину.

Получены данные об эффективном лечении опухолевых заболеваний при использовании LS-Cur: снижение ангиогенеза и регрессия опухоли поджелудочной железы в модельных экспериментах [9]. Проведено изучение противоопухолевой активности LS-Cur на модели ксенотрансплантата у мышей клеток опухоли рака поджелудочной железы человека MiaPaCa. LS-Cur вводили животным в/бр 3 раза в неделю в течение 4-х недель по 20 мг/кг. Обнаружено уменьшение образования кровеносных сосудов и снижение экспрессии фактора роста эндотелия сосудов. Показано подавление роста опухоли поджелудочной железы на 42 %. Авторами отмечено, что 20 мг/кг LS-Cur, вводимые экспериментальным животным, в 100 раз ниже, чем LD₅₀ для мышей. Исходя из данных, эквивалентная доза для человека составит 1360 мг для взрослого человека. Исследования препарата продемонстрировали отсутствие побочных эффектов. В результате проведённых исследований установлено снижение роста клеток рака поджелудочной железы [14].

В работе [15], предложен препарат LS-Cur для лечения онкологических заболеваний, в котором в качестве мембранообразующего липида использовали DMPC в соотношении DMPC:Cur 10:1. Для растворения липидов авторы предлагают трет-бутанол, а для растворения Cur – диметилсульфоксид. Смесь компонентов подвергали лиофилизации, и полученный продукт хранили при –20 °С. Размер LS варьировался от 200 до 400 нм. Противоопухолевую активность LS-Cur изучали на культурах клеток различных видов рака *in vitro*: клетки поджелудочной железы, груди и меланомы инкубировали в течение различного времени с препаратом, растворённым в 0,9 % NaCl. Антипролиферативная активность LS-Cur была выше, чем его свободной формы.

Изучение противоопухолевой активности LS-Cur *in vitro* [12] показало, что эффективная доза LS-Cur по сравнению со свободным Cur уменьшилась в 4 раза на линии клеток остеосаркомы (KHOS), и в 2 раза

на линии клеток рака молочной железы (MCF-7), при этом выживаемость культуры здоровых клеток при этой дозе LS-Cur снижалась незначительно. Таким образом, включение Cur в LS позволило повысить эффективность ингибирования роста раковых клеток и снизить токсический эффект на здоровые клетки. Ещё одним преимуществом LS-Cur является активация наиболее предпочтительного способа гибели раковых клеток – апоптоза, тогда как свободный Cur вызывал аутофагию в исследовании *in vivo*.

Ингаляционный препарат на основе LS-Cur был предложен для лечения рака легкого [16]. LS-Cur были получены методом липидной плёнки из SPC и Chol в соотношении 5:1, растворённых в тетрагидрофуране, и лиофилизированы с добавлением маннитола. Лиофилизированный LS-Cur характеризовался меньшим размером и плотностью высушенных частиц, чем кристаллы свободного Cur, что делает LS-Cur более предпочтительными для ингаляционного введения. Крысам с опухолью лёгкого в лёгкие вводили свободный и LS-Cur в дозе 1 мг/сутки в течение 4 дней с помощью мягкой пластиковой трубки. В контрольной группе, не получавшей лечения, наблюдались многочисленные опухолевые узлы и кровотечения в лёгких крыс, в группе, получавшей свободный Cur, опухолевые узлы и кровотечение в лёгких заметно уменьшались, а в группах LS-Cur и гемцитабина (препарат сравнения) – были минимальными, причём вид лёгкого был сходный с гладкими поверхностями лёгких здоровых крыс. При этом, по данным иммуноферментного анализа тканей лёгких крыс LS-Cur проявлял наибольший из всех групп антиоксидантный и противовоспалительный эффекты, снижая уровень MDA и провоспалительного цитокина TNF-α, а также LS усиливают проапоптотические свойства Cur, повышая его биодоступность. *In vitro* LS-Cur с дозах 25 и 50 мкмоль/л показывал более чем в 3 раза больший цитотоксический эффект на культуру клеток рака лёгкого, чем свободный Cur и гемцитабин, при этом выживаемость нормальных человеческих бронхиальных эпителиальных клеток при обработке LS-Cur и гемцитабином оставалась более 60 %, в отличие от свободного Cur. Таким образом, включение Cur в LS способствовало селективному увеличению цитотоксичности относительно раковых клеток и снижению токсичности для здорового эпителия.

Для подтверждения противоопухолевого действия LS-Cur и синергизма с цитостатическими препаратами авторы [17] провели изучение LS-Cur с оксалиплатином и без него, а именно, влияние на рост клеток, апоптоз и ангиогенез при колоректальном раке. Исследования проведены на двух линиях колоректального рака: COLO и 205 LOVO на самках мышей. Получение LS проведено с использованием DMPC или DMPC-ПЭГ-2000. Соотношение липиды : Cur исследовали в диапазоне от 10:1 до 4:1. по методу, описанному в работе [15]. Влияние LS-Cur и оксалиплатина на пролиферацию клеточных линий колоректального рака проводили с помощью 3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-5-(3-карбоксиметоксифенол)-2-(4-сульфофенил)-2Н-тетразолиевой соли на луночном планшете (5×10^3 клеток в каждой лунке) с инкубацией 72 часа. Абсорбцию измеряли при 490 нм. Также проводили изучение антипролиферативной активности препаратов *in vivo* на животных после введения 1×10^7 клеток в бок каждой мыши с последующим в/бр введением препаратов. Авторами показано, что LS-Cur оказывает противоопухолевое и антиангиогенное действие против колоректального рака как *in vitro*, так и *in vivo*. Также установлено, что LS-Cur поглощается клетками в той же степени, что и свободный Cur с дополнительным преимуществом для LS-Cur с потенциально заметно большей биодоступностью. Авторы приходят к выводу о необходимости его в/в введения. По нашему мнению, в/бр введение LS препаратов значительно снижает биодоступность лекарственной субстанции. Авторами также обнаружено синергетическое действие используемых препаратов, причем, более выраженное при использовании *in vitro*.

Особый интерес представляет работа [18], авторы которой предложили комбинированный препарат, содержащий LS форму Cur и ресвератола. Ресвератол ($C_{14}H_{12}O_3$) обнаруживается в чёрном винограде, чернике, арахисе и других растительных объектах и представляет собой плохо растворимое в воде соединение, обладающее рядом фармакологических свойств: противоопухолевое, нейропротекторное, противовоспалительное, кардиопротекторное действия. Показано, что ресвератол увеличивает апоптоз и замедляет рост опухолевых клеток. В то же время на сегодняшний день отсутствуют данные о применении ресвератола на людях. Полученный комплексный препарат значительно уменьшает развитие адено-

карциномы *in vivo*. *In vitro* LS комбинация ресвератола и Cur ингибирует клеточный рост и индуцирует апоптоз. Результаты анализа тканей предстательной железы методом ВЭЖХ показали значительное накопление Cur в случае их одновременного введения.

Комплексный цитотоксический эффект Cur и С6-церамида при их совместном включении в LS показан в тестах *in vitro* и *in vivo* [19]. Анализы клеточного цикла клеток линии KHOS показали, что инкубация с LS-Cur предотвращала индукцию стадии G2/M клеточного цикла путём повышения активности циклина B1, тогда как LS-C6 продлевал стадию G1 путём подавления циклина D1, а комплекс LS-Cur-C6 проявлял комбинированный цитостатический эффект на уровнях регулирования экспрессии циклина D1 и циклина B1. При этом LS-Cur-C6 проявлял меньший цитостатический эффект в отношении здоровых мезенхимальных стволовых клеток человека по сравнению с клеточными линиями остеосаркомы. Таким образом, инкапсуляция двух гидрофобных лекарственных веществ, Cur и С6, в LS повышает цитотоксический эффект и подтверждает потенциал комбинированной композиции. Эффективность *in vivo* тестировали на мышах с использованием ксенотрансплантата остеосаркомы человека. При в/бр введении каждые 48 часов в течение 2-х недель LS-Cur-C6, покрытых ПЭГ для увеличения периода полувыведения из организма и обеспечения достаточной кумуляции, наблюдалось значительное (в 4 раза по сравнению с контролем) уменьшение размера опухоли.

Изучение протекторных свойств LS-Cur, полученной на основе PC и Chol, при облучении опухоли лёгкого проведены на мышах линии C57BL/6J [20]. LS-Cur в дозе 10 мг/кг вводили в хвостовую вену в течение 7 дней. Гистологический анализ показал, что введение LS-Cur не только тормозило развитие пневмонита и уменьшало его последствия, но также снижало уровень фиброза лёгочной ткани по сравнению с группой, получавшей пустые LS. Показано, что LS-Cur ингибирует активность NF-κB и снижает уровень воспалительных цитокинов в плазме. Авторы пришли к выводу, что LS-Cur сенсibiliзирует раковые клетки для радиационной терапии: группы, получающие LS-Cur или радиационную терапию отдельно демонстрировали близкий апоптический индекс опухоли, тогда

как их совместное использование приводило к увеличению апоптоза в более чем 4 раза и способствовало существенному уменьшению опухоли. Кроме того, совместное применение LS-Cur и радиационной терапии ингибирует ангиогенез, существенно снижая плотность кровеносных сосудов опухоли.

При дальнейшем изучении [21] *in vivo* на модели опухоли лёгкого мышей линии LL/2 было подтверждено, что противоопухолевое действие LS-Cur основано на его способности ингибировать ангиогенез. Введение в/в LS-Cur в дозе 10 мг/кг в течение 19 дней обеспечивало уменьшение объёма опухоли в 3 раза по сравнению с контролем, а также значительно меньшее количество сосудов опухоли. При этом на эмбрионах рыбок Данио было продемонстрировано, что ингибирование роста сосудов LS-Cur является неспецифичным к опухолевым клеткам, что позволяет говорить о возможном проявлении токсичности LS-Cur при некоторых физиологических процессах, таких как заживление ран.

Способность Cur ингибировать ангиогенез может быть полезна в комплексном лечении рака, усиливая эффективность стандартной терапии [22]. Кроликам с опухолью печени проводили транскатетерную артериальную эмболизацию липидолом и поливиниловым спиртом, после которой возникали гипоксия и некроз опухоли. Недостатком этого метода лечения опухоли является ангиогенез в остаточной опухоли под действием факторов роста, индуцируемых гипоксией. При введении LS-Cur, полученной методом липидной плёнки смеси SPC, Chol и Cur в соотношении 15:5:1, в дозе 20 мг/кг наблюдалось менее интенсивное развитие сосудов, вызванное гипоксией после эмболизации, повышая эффективность лечения.

Проведено [23] изучение нейропротективного эффекта Cur как в свободной, так и в LS форме. В качестве нейротоксина использовали органическое производное ртути – метилированную ртуть. Клетки нейробластомы, обработанные метилированной ртутью, инкубировали с двумя формами Cur в течение 48 часов. Авторами показано, что Cur обладает нейропротекторным действием, защищая клетки от действия метилированной ртути. Установлена более высокая активность LS-Cur по сравнению с его свободной формой.

Исследования [24] показали, что включение Cur в LS позволяет преодолеть ГЭБ. При введении в каудальную вену крыс в дозе 20 мг/кг LS-Cur локализовался в гиппокампе, полосатом теле конечного мозга и стволовой части мозга.

Изучено влияние связанных с Cur липидных лигандов в составе LS [25] на способность ингибировать образование фибриллярного β -амилоида *in vitro*. Исследовали влияние различных типов нано-LS, связанных с Cur, фосфатидной кислотой, кардиолипином, ганглиозидом GM1 при агрегации β -амилоида при болезни Альцгеймера. Наносистему, содержащую Cur, получали его добавлением в липидную фазу во время приготовления LS. Минорные компоненты были включены в LS во время их формирования. Все LS, содержащие Cur, были способны значительно ингибировать образование фибриллярного β -амилоида *in vitro*. Авторами предложено использовать LS препараты Cur для лечения болезни Альцгеймера.

Повышение терапевтической эффективности Cur при его включении в LS продемонстрировано на экспериментальной модели мигрени у крыс, индуцированной нитроглицерином [26]. Cur в свободной и LS форме вводили в/бр в дозе 1–2 мг/100 г как дополнение к лечению суматриптаном. Оценка показателей окислительного стресса, таких как общий окислительный стресс плазмы, уровень МДА, оксида азота, тиола, ОАА показала, что LS-Cur в дозе 2 мг/100 г/сутки усиливает антиокислительный эффект суматриптана – показатели животных, получавших комбинированную терапию, были близки к интактным. Также наблюдалось уменьшение нейrogenного воспаления – ноцицепции.

Учитывая высокую антиоксидантную и противовоспалительную активность Cur актуальна работа [27], авторы которой подтвердили гепатопротекторные свойства LS-Cur на модели поражения печени CCl₄. За 2 часа до введения CCl₄ крысам вводили свободный Cur (*per os*) и LS-Cur (в/в) в дозе 8,98 мкмоль. У животных, получавших LS-Cur, наблюдалась существенное уменьшение концентрации ферментов, характеризующих гепатотоксичность: щелочной фосфатазы, ALT, АСТ, а также улучшение показателей перекисного окисления клеток печени. Включение Cur в LS позволило повысить его биодоступность более чем в 6 раз, что способствовало увеличению эффективности по сравнению со свободным Cur.

Также интересным является изучение гепатопротекторной активности одного из аналогов Cur – BDMCA (bis-demethoxy curcumin analogue) в свободной и LS форме [28]. В данной работе использовали два вида LS: нейтральные и положительно заряженные. В качестве компонентов использовали SPC и Chol, а также стеариламин (для получения положительных LS). Для получения LS использован метод гидратации липидной плёнки. Первоначально получали мультимеллярные LS, а затем униламеллярные, используя обработку ультразвуком. Размер полученных LS составлял для двух видов около 327–328 нм. Z-потенциал для нейтральных LS составлял –16,9 мВ, для положительных – +2,16 мВ. В качестве модели использовали поражение печени при в/бр введении CCl₄. Препараты LS вводили в/в, а свободный Cur – *per os* в этаноле. Фармакологическую активность оценивали по изменению активности ферментов печени: ALT и АСТ. Показано, что LS-Cur более активен по сравнению с его свободной формой. Изучение гепатопротекторной активности двух видов LS не продемонстрировало достоверных отличий. По мнению авторов, повышенная фармакологическая активность LS препаратов может быть связана с более высоким поглощением лекарственного препарата купферовскими и синусоидальными эндотелиальными клетками.

Выраженные противовоспалительные и антиоксидантные свойства LS-Cur, полученной на основе EPC, также продемонстрированы на модели ишемии почек [29]. LS-Cur в дозе 150 мкл вводили в/в мышам линии C57BL/6, после чего воспроизводили 30 минутную ишемию почек с последующей реперфузией. По результатам гистологического анализа почек через 4 и 24-часа после ишемии было показано, что LS-Cur уменьшает последствия ишемии, снижая уровень сывороточной мочевины и креатинина, снижает показатели оксидативного и нитрозативного стресса. Противовоспалительный эффект также проявлялся в снижении экспрессии NF-κB в тубулярных эпителиальных клетках почек (в 4 раза по сравнению с пустыми LS) и антиген презентующих клетках (в 3 раза), снижении экспрессии провоспалительных цитокинов, таких как TLR4, HSP70, TNF-α и др., снижении инфильтрации нейтрофилами.

В работе [30] описана технология получения LS-Cur для вагинального применения. LS получали из SPC и Chol в различных соотношениях

4:1 и 2:1. Авторы предложили использовать оригинальный метод для очистки порошка природного Cur путём последовательной обработки водой, спиртом и этилацетатом. Для получения LS использовали метод липидной плёнки. Авторы использовали два известных технологических приёма: обработку ультразвуком и экструзию через поликарбонатные мембраны с размером пор около 400 нм. Отделение невключённого Cur проводили ультрацентрифугированием. Установлены основные технологические характеристики процесса получения. Приведена аналитическая характеристика полученных LS: эксклюзионная хроматография, определение размера частиц и АОА.

Проведено изучение антиоксидантной активности Cur в LS и свободной форме при приёме *per os* [31]. Крысам вводили образцы Cur в количестве 100 мг/кг. Включение Cur в LS составляет 68 %, средний размер LS – 263 нм. Изучение биодоступности показало, что Cur, инкапсулированный в LS, находится в крови в большей концентрации – 320 мг/л, то время как свободный Cur – 65 мг/л. Авторы установили не только большую биодоступность LS-Cur, но и высокую антиоксидантную активность LS препарата.

Авторы [32] провели изучение влияния Cur в свободной форме на окислительный стресс людей, вызванный физической нагрузкой. Эксперименты проведены на 10 добровольцах с возрастом 26,8±2,0 лет. Пациенты *per os* принимали 90 мг Cur за 2 часа перед тренировкой и сразу после тренировки. Показано, что применение Cur позволяет ослабить окислительный стресс, вызванный физическими нагрузками. Кроме того, Cur безопасен и хорошо переносится в очень высоких дозах [33] – приём *per os* по 8 г ежедневно в течение 3 месяцев не вызывал токсических эффектов. При введении 100 мг Cur в каудальную вену мышей концентрации Cur, определяемые методом ВЭЖХ в печени, почках, лёгких и сердце, составили: 8,0 мкг/г, 0,35 мкг/г, 0,17 мкг/г и 0,06 мкг/г соответственно. Через 40 минут Cur обнаруживали только в печени, а через 100 минут Cur не обнаруживали ни в одном органе. Авторы приходят к выводу о высокой скорости метаболизма у мышей.

При в/в ведении LS-Cur собакам в дозе 10 мг/кг посредством 2-часовой (концентрация Cur 0,5 мг/мл) и 8-часовой инфузии (концентра-

ция Cur 0,125 мг/мл) максимальные концентрации Cur наблюдались в лёгких, печени, селезёнке, а продукта его метаболизма – тетрагидрокуркумина – в мозге, лёгких. Причём, при более медленном 8-часовом введении наблюдалось увеличение накопления Cur во всех тканях по сравнению с 2-часовой инфузией [34]. В аналогичных условиях эксперимента максимальная концентрация в плазме крови в обоих случаях достигалась через 1,5-2 часа после начала введения. На основе этих наблюдений авторами сделано заключение, что в случае лечения лейкемии и лимфомы 2-часовая инфузия может быть более предпочтительной на основе более высоких профилей концентрации [35].

При дальнейшем изучении авторами сделан вывод о том, что метаболизм Cur является видозависимым. В работе [36] культуры клеток эритроцитов, лимфоцитов и гепатоцитов собак и человека культивировали с LS-Cur («LipocurTM», Австрия) на основе DMPC и DMPG. Препарат характеризовался средним размером частиц 117 нм, Z-потенциалом –36 мВ при pH 5,0. Сравнение начальной концентрации Cur в клетках и после 15 минутной инкубации показало, что в культурах эритроцитов обоих видов концентрация Cur существенно снижалась, причём в клетках собак в большей степени (на 92 %), чем в клетках человека (на 67 %), а метаболизм Cur в культурах лимфоцитов отличался: у собак немного снижался (10 %), у человека – увеличивался (7 %). По мнению авторов накопление Cur лимфоцитами наряду с быстрым метаболизмом в эритроцитах позволяет говорить о его перспективности для лечения онкологических заболеваний лимфоцитарного происхождения. Относительно клеток гепатоцитов концентрация Cur в клетках человека (на 25 %) снижалась значительно медленнее клеток собак (на 48 %).

В другом исследовании изучение влияния LS-Cur на основе DMPC и DMPG в соотношении 9:1 на эритроциты крови здорового человека показало дозозависимое изменение морфологии до эхиноцитов в цельной крови *in vitro*, что может представлять собой ранний признак токсичности *in vivo* [37]. Изменения наблюдались при инкубации крови с LS-Cur в количестве 10–100 мкг/мл, а также со свободным Cur и пустыми LS в эквивалентных дозах, однако объём клеток во всех группах увеличивался

незначительно. При этом концентрации Cur и продукта его метаболизма – тетрагидрокуркумина – в плазме при инкубации с LS-Cur были на порядок выше в сравнении со свободным Cur, что говорит о повышенной биодоступности LS-Cur.

Нами проведены эксперименты по определению липидного состава и оптимальных параметров технологической платформы получения эмульсий. Проведено изучение влияния pH, температуры, условий эмульгирования, жирнокислотного состава, присутствия этанола, размера частиц в эмульсии на стабильность продукта. В качестве липидной основы использовали PC, выделенные из сои, подсолнечника и яичного желтка. В качестве стандарта использовали препарат «Liposomal Curcumin» производства Acti Novo, Германия. В исследуемых образцах содержание PC составляло не менее 95 %, фосфора – не менее 3,7 %. Время гомогенизации от 10 до 30 минут при температуре от 20 до 40 °C. В результате проведённых исследований наиболее стабильная эмульсия получена из PC, выделенного из подсолнечника. Содержание этанола не более 15,0 %. Размер частиц полученной эмульсии соответствовал размеру частиц стандартного образца и составлял: 250,4 нм – 94,5 %, 4 мкм – 5,5 %, pH 5,3–5,8 [38].

Представленные выше результаты невозможно оценить однозначно. Последнее связано с различным составом LS, их характеристиками и методами получения (таблица 1.2).

В заключении хотелось бы отметить, что в наше время уже предложены коммерческие препараты LS-Cur для применения *per os*. «Liposomal Curcumin», эмульсия по 170 мл во флакон – в 5 мл эмульсии содержится 170 мг Cur и 500 мг SPC. В состав продукта входят: вода очищенная, кунжутное масло, витамин E, сорбат калия (консервант). Авторы рекомендуют перед употреблением эмульсию взбалтывать. Проведено изучение LS-Cur на модели болезни Паркинсона. Лечение животных препаратом «LipocurTM» улучшило состояние двигательной активности, обнаружена стимуляция нейронов. Впервые показано нейротрофические эффекты на модели болезни Паркинсона [48].

Таблица 1.2 – Характеристика LS, полученных с применением различных методов

№	Состав LS	Характеристика LS	Метод получения	Ссылка
1	Природные PL и Chol, Cur	Средний размер – 120,1 нм; Z-потенциал: -50,5 мВ; Степень включения – 95,5 %	Тонкоплёночная гидратация	39
2	Сукцинат SPC, N-триметилхитозан, Cur, Chol, D-α-токоферил – ПЭГ-1000 сукцинат	Средний размер – 657,7 нм; Z-потенциал: +15,64 мВ; Степень включения – 86,7 %	Тонкоплёночная гидратация	40
3	Гидрированный PC, Chol, поли-(амиидосаминол)-декстримеры и дендроны, Cur	Средний размер – 97,08 нм; Степень включения – 86,7 %.	Тонкоплёночная гидратация и ультразвуковая обработка	41
4	ЕPC, Chol, полисорбат 80, Cur – отриц. LS или + стеариламин – полож. LS	Для положительных LS: Средний размер – 265,2 нм; Z-потенциал: + 48,2 мВ; Степень включения – 54,5 %. Для отрицательных LS: Средний размер – 225,7 нм; Z-потенциал: -48,7 мВ; Степень включения – 77,8 %	Тонкоплёночная гидратация и ультразвуковая обработка	42
5	Природные PL, Chol, криопротектор сахараза, Cur	Средний размер 131,1 нм Степень включения – 75,5 %	Замораживание и оттаивание	43
6	Природные PL, EUDRAGIT S100 (анионный со-полимер на основе метакриловой кислоты и метилметакрилата) и гиалурон	Средний размер – 220-287 нм Степень включения – 78,5–82,0 %	Гидратация плёнки и лиофилизация	44
7	PC, Chol, Cur	Средний размер – 830 нм Степень включения – 72,3 %	Метод инъекции растворителя	45
8	PL, пропиленгликоль, Cur	Средний размер – 182,4 нм Степень включения – 92,74%	Метод инъекции растворителя	46

Продолжение таблицы 1.2

№	Состав LS	Характеристика LS	Метод получения	Ссылка
9	Chol, Cur, PL: SPC, DPPC, DPPG или DPPC+DPPG	Средний размер от 120 нм до 400 нм в зависимости от соотношения компонентов, причём, для SPC и DPPC увеличивается с ростом pH, а для негативно заряженных DPPG и DPPC+DPPG – уменьшается. Индекс полидисперсности уменьшается в ряду SPC > DPPC+DPPG > DPPC > DPPG. Z-потенциал: SPC и DPPC -5±2 мВ, DPPC+DPPG -27±3 мВ, DPPG -37±3 мВ. Степень включения (pH 6,0): DPPC >65%, DPPC+DPPG >60%, DPPG, >55%, SPC >20%, причём, степень включения обратно пропорционально pH.	Гидратация липидной пленки, метод замораживания-оттаивания, ультразвуковая обработка	47
10	PL, Cur, стабилизатор NF	Средний размер – 90,0 нм; Z-потенциал: 15 мВ; Степень включения – 85 %.	Гомогенизация высокого давления	48
11	DPPC, DMPG, γ-циклодекстран Cur,	Средний размер: без γ-циклодекстрана 105±23 нм, с γ-циклодекстраном 98±3 нм; Степень включения: без γ-циклодекстрана 30,7 %, с γ-циклодекстраном 50 %	Гидратация липидной и экструзия через поликарбонатную мембраны 400 нм и 100 нм.	12
12	PC, Chol, Cur	Средний размер – 114,9±7,3 нм; Z-потенциал: -2,62±0,51 мВ; Степень включения – 90,1±1,7 %.	Гидратация липидной пленки и экструзия через поликарбонатную мембраны 400 нм и 100 нм.	20
13	DPPC, DPPS, Chol, Cur, холат натрия, сывороточный альбумин	Средний размер – 60-100 нм; Z-потенциал: -30 мВ.	Гидратация липидной пленки и ультразвуковая обработка	49

Окончание таблицы 1.2

№	Состав LS	Характеристика LS	Метод получения	Ссылка
14	SPC, EPC, SFPC, Chol, Cur, ПЭГ	Средний размер – 100-120 нм; Z-потенциал: -12±3 мВ; Степень включения – 80 %.	Гидратация липидной пленки, замораживание-оттаивание, ультразвуковая обработка	50
15	PE, Chol, Cur, дицетилфосфат	Средний размер – 140±60 нм; Степень включения – 84±3 %.	Гидратация липидной пленки и ультразвуковая обработка	27
16	DPPC, Chol, Cur, ПЭГ-2000-DSPE	Средний размер 140 нм; Z-потенциал: -50 мВ; Степень включения – 80 %.	Гидратация липидной пленки	26

В 2012–2015 гг. при разрешении FDA была проведена I фаза клинического изучения LS-Cur «Lipocure™» при в/в введении. Исследования проводили на здоровых добровольцах обоего пола, 18–45 лет в количестве 50 человек. Результат исследования подтвердил безвредность и переносимость препарата «Lipocure™» в дозе 120 мг/м².

Анализируя, имеющиеся в литературе данные можно говорить о том, что LS-Cur проявляет высокую фармакологическую активность:

- ингибирует деление и увеличивает гибель раковых клеток;
- тормозит рост кровеносных сосудов опухоли;
- снижает метастазирование;
- проявляет противовоспалительную и антиоксидантную активность;
- проявляет кардиопротекторную, гепатопротекторную и нейропротекторную активность.

Необходимо отметить, что LS-Cur обладает значительным потенциалом в качестве средства доставки лекарственного препарата.

Список литературы

1. Feng T. Liposomal Curcumin and its Application in Cancer / T. Feng, Y. Wei, R. Lee, L. Zhao // *Int. J. Nanomedicine*. – 2017. – V. 12, №. 9. – P. 6027–6044.
2. Shen L. Theoretical Study on Physicochemical Properties Curcumin / L. Shen, H-F. Ji // *Spectrochimica Acta part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*. – 2007. – V. 67, №. 3-4. – P. 619–623.
3. The Essential Medicinal Chemistry of Curcumin / K.M. Nelson, J.I. Dahlin, J. Bisson [et al.] // *J. of Medicinal Chemistry*. – 2017. – V. 60. – P. 1620–1637.
4. Ahmad B. Aggregation on of a-Synuclein is Kinetically Controlled by Intramolecular Diffusion / B. Ahmad, Y. Chen, L. J. Lapidus // *Proc. Nat. Acad. Sci USA*. – 2012. – V. 109, N 7. – P. 2336–2341.
5. Ahmad B. Curcumin Prevents Aggregation in a-Synuclein by Increasing Reconfiguration Rate / B. Ahmad, L. J. Lapidus // *J. Biol. Chem*. – 2012. – V. 287, №12. – P. 9193–9199.
6. Braiteh F. Liposome – Encapsulated Curcumin: in vitro and in vivo Effects on Proliferation, Apoptosis, Signaling and Angiogenesis / F. Braiteh, L. Li, R. Kurzrock // *Cancer*. – 2005. – V.104, № 6. – P. 1322–1331.
7. Bisht S. Polymeric Nanoparticle – Encapsulated Curcumin (Nanocurcumin): a Novel Strategy for Human Cancer Therapy / S. Bisht, G. Feldmann, S. Soni // *Journal of Nanobiotechnology*. – 2007. – V. 11, №. 10. – P. 1551–1601.
8. Properties of Liposome-Encapsulated Curcumin / M. Takahashi, S. Uechi, K. Takara [et al.] // *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. – 2009. – V. 57, № 19. – P. 9141–9146.
9. Patra D. Effect of Curcumin in Liposome: Curcumin as a Molecular Probe for Monitoring Interaction of Ionic Liquids with 1,2 Dipalmitoyl-sn-glycerol-3-phosphocholine Liposome / D. Patra, E. Al-Khonry, D. Ahmadich // *Photochem. Photobiol*. – 2012. – V. 88, № 2. – P. 317–327.
10. Preparation of Curcumin – Loaded Liposomes and Evaluation of their Skin Permeation and Pharmacodynamics / Y. Chen, Q. Wu, L. Zhang [et al.] // *Molecules*. – 2012. – V. 17, № 5. – P. 5972–5987.

11. Coating of Carboxymethyl Dextran on Liposomal Curcumin to Improve the Anticancer Activity / C. Huang, L. Zhang, X. Sun [et al.] // *RSC Advances*. – 2014. – V. 4, № 103. – P. 59211–59217.
12. Dhule S.S. Curcumin-Loaded γ -Cyclodextrin Liposomal Nanoparticles as Delivery Vehicles for Osteosarcoma / S.S. Dhule, P. Penfornis, T. Frazor [et al.] // *Nanomedicine*. – 2012. – V. 8, № 4. – C. 440–451.
13. Li L. Liposomo-Encapsulated Curcumin: In vitro and in vivo Effects on Proliferation, Apoptosis, Signaling and Angiogenesis / Li L., Kurzrock R., Braiteh F. // *Cancer*. – 2005. – V. 104, N. 6. – P. 1322–1331.
14. Efficacy of Liposomal Curcumin in a Human Pancreatic Tumor Xenograft Model: Inhibition of Tumor Growth and Angiogenesis / A.P. Ranjan, A. Mukerjee, L. Helson [et al.] // *Anticancer Res*. – 2013. – V. 33, № 9. – P. 3603–3609.
15. Pat. 200600667998 A1 United States, Int. Cl. A61K 9/127, A61K 31/12, U.S. Cl. 424/450, 514/688. Liposomal Curcumin for treatment of Cancer / Kurzrock R., Li L., Mechta K., Aggarawal B; assignee Board of regents, the University of Texas system. – US11221179; filed 07.08.2005; pub. 30.03.2006.
16. Inhalation treatment of primary lung cancer using liposomal curcumin dry powder inhalers / T. Zhang, Y. Chen, Y. Ge [et al.] // *Acta Pharmaceutica Sinica B*. – 2018. – V. 8, № 3. – C. 440–448.
17. Li L. Liposomal Curcumin with and without Oxaliplatin: Effect on Cell Growth Apoptosis and Angiogenesis in Colorectal Cancer / L. Li, B. Ahmed, K. Mehta, R. Kurzrock // *Molecular Cancer Therapeutics*. – 2007. – V. 6, № 4. – P. 1276–1282.
18. Narayanan N.K. Liposome Encapsulation of Curcumin and Resveratrol in Combination Reduces Prostate Cancer Incidence in PTEN Knockout Mice / N.K. Narayanan, D. Narqi, C. Randolph, B.A. Narayanan // *Int. J Cancer*. – 2009. – V. 125, № 1. – P. 1–8.
19. The Combined Effect of Encapsulating Curcumin and C6 Ceramide in Liposomal Nanoparticles against Osteosarcoma / S.S. Dhule, P. Penfornis, J. He [et al.] // *Molecular Pharmaceutics*. – 2014. – V. 11. – P. 417–427.
20. A Systemic Administration of Liposomal Curcumin Inhibits Radiation Pneumonitis and Sensitizes Lung Carcinoma to Radiation / H.-S. Shi, X. Gao, D. Li [et al.] // *International Journal of Nanomedicine*. – 2012. – V. 7. – P. 2601–2611
21. Liposomal Curcumin Inhibits Lewis Lung Cancer Growth Primarily Through Inhibition of Angiogenesis / L. Wang, J. Zhang, L. Cai [et al.] // *Oncology Letters*. – 2012. – V. 4, № 1. – C. 107–112.
22. Dai F. Liposomal Curcumin Inhibits Hypoxia-Induced Angiogenesis after Transcatheter Arterial Embolization in VX2 Rabbit Liver Tumors / Dai F., Zhang X., Shen W. [et al.] // *OncoTargets and Therapy*. – 2015. – V. 8. – P. 2601–2611.
23. Petroni D. H. Examination of the Neuroprotective Effects of Liposome Encapsulated Curcumin Against Methylmercury Induced Neurotoxicity in SH-SY5Y Cells / D.H. Petroni, D. Mondal, J. Tsai, W. George // *The FasEB Journal*. – 2010. – V. 24, № 1. – Supplement.
24. Differential Distribution of Intravenous Curcumin Formulations in the Rat Brain / S.S. Chiu, E. Lui, M. Majeed [et al.] // *Anticancer Research*. – 2011. – V. 31, № 3. – C. 907–911.
25. Effect of Curcumin-Associated and Lipid Ligand-Functionalized Nanoliposomes in Aggregation of Alzheimer's A β -peptide / M. Taylor, S. Moore, S. Mourtas [et al.] // *Nanomedicine*. – 2011. – V. 7, N.5. – P. 541–550.
26. The Effect of Intravenous Administration of Liposomal Curcumin in Addition to Sumatriptan Treatment in an Experimental Migraine Model in Rats / A.E. Bulboacă, S.D. Bolboacă, I.C. Stănescu [et al.] // *International Journal of Nanomedicine*. – 2018. – V. 13. – P. 3093–3103.
27. Chowdhury S. T. Vesicular (Liposomal and Nanoparticulated) Delivery of Curcumin: a Comparative Study on Carbon Tetrachloride Mediated Oxidative Hepatocellular Damage in Rat Model / S.T. Chowdhury, N. Das, S. Ghosh [et al.] // *International Journal of Nanomedicine*. – 2016. – V. 11. – P. 1–15.
28. Preparation, Characterization and Evaluation of Hepatoprotective Activity of an Intravenous Liposomal Formulation of Bis-Demethoxy Curcumin Analogue / J. Aukunury, S. Saginapally, N. Gaddam [et al.] // *Int. J. Drug Development and Research*. – 2009. – V. 1, № 1. – P. 37–46.
29. Amelioration of Renal Ischaemia-Reperfusion Injury by Liposomal Delivery of Curcumin to Renal Tubular Epithelial and Antigen-Presenting Cells

- / N.M. Rogers, M.D. Stephenson, A.R. Kitching [et al.] // British Journal of Pharmacology. – 2012. – V. 166. – P. 194–209.
30. Haider H. Development of Liposomal Curcumin for Vaginal Drug Delivery [Thesis for the Degree Master of Pharmacy] / H. Haider. – Universitete Tromso, 2010. – 72 p.
 31. Evaluation of Oral Carrier System in Rats: Bioavailability and Antioxidant Properties of Liposome-Encapsulated Curcumin / M. Takahashi, S. Uechi, K. Takara [et al.] // J. Agric Food Chem. – 2009. – V. 57, № 19. – P. 9141–9146.
 32. Effect of Curcumin Supplementation on Exercise-Induced Oxidative Stress in Human / M. Takahashi, K. Suzuk, H. K. Kim [et al.] // Int. J. Sports Med. – 2014. – V. 35, № 6. – P. 469–475.
 33. Phase I Clinical Trial of Curcumin, a Chemopreventive Agent in Patients with High-Risk or Premalignant Lesions / A.L. Cheng, C.H. Hsu, S.K. Lin [et al.] // Anticancer Res. – 2001. – V. 21. – P. 2895–2900.
 34. Tissue Distribution of (Lipocurc™) Liposomal Curcumin and Tetrahydrocurcumin Following Two- and Eight-hour Infusions in Beagle Dogs / D. Matabudul, K. Pucaj, G. Bolger [et al.] // Anticancer Research. – 2012. – V. 32, № 10. – P. 4359–4364.
 35. Infusion Pharmacokinetics of Lipocurc™ (Liposomal Curcumin) and its Metabolite Tetrahydrocurcumin in Beagle Dogs / L. Helson, G. Bolger, M. Majeed [et al.] // Anticancer Research. – 2012. – V. 32, № 10. – P. 4365–4370.
 36. Distribution and Metabolism of Lipocurc™ (Liposomal Curcumin) in Dog and Human Blood Cells: Species Selectivity and Pharmacokinetic Relevance / G.T. Bolger, A. Licollari, A. Tan [et al.] // Anticancer Research. – 2017. – V. 37, № 7. – P. 3483–3492.
 37. Effect of Liposomal Curcumin on Red Blood Cells In Vitro / A. Storka, B. Vcelar, U. Klickovic [et al.] // Anticancer Research. – 2013. – V. 33, № 9. – P. 3629–3634.
 38. Пилипенко Д.М. Разработка липосомальных форм куркумина / Д.М. Пилипенко, Е.С. Подпоронова, Ю.М. Краснопольский // Химия, био- и нанотехнологии, экология и экономика в пищевой и косметической промышленности: Сборник материалов V Международной

- научно-практической конференции, 17–18 октября 2017 г. – X. : 2017. – С. 177–178.
39. Lin Q.P. Preparation and Quality Evaluation of Curcumin Liposomes for Injection / Q.P. Lin, R.P. Guo, X.Y. Xu // Chin. J. Nat. Med. – 2007. – V. 5, № 3. – P. 207–210.
 40. N-Trimethyl Chitosan Chloride-Coated Liposomes for the Oral Delivery of Curcumin / H. Chen, J. Wu, M. Sun [et al.] // J. Liposome Res. – 2012. – V. 22, № 22. – P. 100–109.
 41. Sun J. Preparation of Novel Curcumin Liposomes and Associated Preliminary Stability Study / J. Sun, M. Han // World Sci. Technol. – 2008. – V. 10, № 4. – P. 66–72.
 42. Pamunuwa G. Effect of Lipid Composition on in vitro Release and Skin Deposition of Curcumin Encapsulated Liposomes / G. Pamunuwa, V. Karunaratne, D. Nedra Karunaratne // J. Nanomaterials. – 2016. – V. 9. – P. 1–9.
 43. Rahul D.J. Effect of Freeze-Thawing Study on Curcumin Liposomes for Obtaining Better Freeze-Dried Product / D.J. Rahul, T.N. Bhaskar // Drying Technology – 2013. – V. 31, № 9. – P. 966–974.
 44. Freeze-Dried Endragit-Hyaluronan Multicompartment Liposomes to Improve the Intestinal Bioavailability of Curcumin / L.A. Catalan, M. Ravaghi, M.L. Manca [et al.] // Eur. J. Pharm Biopharm. – 2016. – V. 107. – P. 49–55.
 45. Preparation of Liposomal in Curcumin Using Ethanol Injection Method / C.F. Ou, Y.L. Liang, S.W. Shen [et al.] // J. South Agric. – 2011. – V. 42, № 10. – P. 1259–1264.
 46. Selection of High Efficient Transdermal Lipid Vesicle for Enhanced Oral Bioavailability of Curcumin / Y.Z. Zhao, C.T. Lu, Y. Zhang [et al.] // Int. J. Pharm. – 2013. – V. 454, № 1. – P. 302–309.
 47. Influence of Lipid Composition, pH and Temperature on Physicochemical properties of Liposomes with Curcumin as Model Drug / B. Roy, P. Cuha, R. Bhattarai [et al.] // J. of Oleo Science. – 2016. – V. 65, № 5. – P. 399–411.
 48. Preparation Characterization and *in vitro* Study of Liposomal Curcumin Powder by Cost Effective Nanofiber Weaving Technology / S. Copi,

- A. Armalraj, S. Jacob [et al.] // *New J. of Chemistry*. – 2018. – V. 42, № 7. – P. 5117–5127.
49. Nanoparticles Containing Curcumin Useful for Suppressing Macrophages in vivo in Mice / C. Amano, H. Minematsu, K. Fujita [et al.] // *PLoS ONE*. – 2015. – V. 10, № 9. – P. 15.
50. Шульга С.М. Створення та характеристика ліпосомальної форми куркуміну / Шульга С.М. // *BIOTECHNOLOGIA ACTA*. – 2014. – Т. 7, № 5. – С. 55–61.

1.4. Липосомальна форма Кверцетина

Quer представлен молекулярной формулой $C_{15}H_{10}O_7$ (рисунок 1.2) с М.м. 302,24 и температурой плавления 314 °С. Quer представляет собой кристаллы жёлтого цвета, почти нерастворимые в воде, слабо растворимые в спирте, хлороформе и диэтиловом эфире, но хорошо растворимы в щелочах, уксусной кислоте и кипящем спирте.

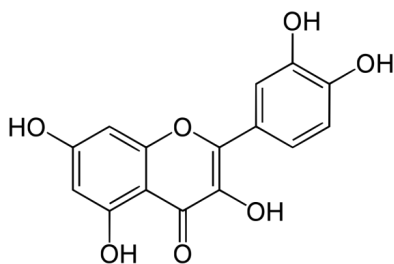


Рисунок 1.2 – Строение молекулы Quer

Биофлавоноид Quer обладает высокой фармакологической активностью [1]. Сложность использования Quer в клинике прежде всего связана с его гидрофобностью. В литературе описаны попытки преодоления низкой растворимости Quer в водной фазе с помощью LS-наночастиц [2, 3].

Группой украинских учёных разработана технологическая схема получения препаратов на основе LS платформы, в состав которой вклю-

чена гидрофобная лекарственная субстанция – Quer [4–7]. Полученный препарат лицензирован в Украине под названием «Липофлавоноид». В состав препарата входят LS из PC, в число которых введён биофлавоноид – Quer. В качестве криопротектора использована лактоза [4–7]. Препарат получен методом образования липидной плёнки, гидратации и гомогенизации высокого давления (около 1000 бар). Степень инкапсуляции составляет не менее 90 %, средний размер наночастиц – не более 200 нм. Препарат применяется в виде инъекционной формы в кардиологии и в виде глазных капель в офтальмологии [8].

Терапевтический эффект «Липофлавоноида» обусловлен комплексным действием компонентов препарата и его LS структурой: блокадой липоксигеназного пути метаболизма арахидоновой кислоты за счёт присутствия в препарате Quer, а также антигипоксическим, антиоксидантным и мембранопротекторным действием LS из PC [1, 8, 9]. «Липофлавоноид» назначают в комплексном лечении острого инфаркта миокарда без зубца Q, нестабильной и стабильной стенокардии, миокардитов, для предупреждения развития кардиодистрофии при полихимиотерапии рака молочной железы. «Липофлавоноид» обладает антиоксидантным, антигипоксическим и противовоспалительным действием, проявляет противоаритмический и кардиопротекторный эффект. Препарат восстанавливает функциональную активность сосудистого эндотелия, синтез и/или выделение эндотелиального фактора расслабления (оксида азота). «Липофлавоноид» тормозит процессы ПОЛ в крови и тканях, поддерживает метаболизм клеток, проявляет мембрано- и эндотелиозащитное действие. Кумулятивные свойства препарата отсутствуют.

Известно, что препараты Quer существенно уменьшают как гемодинамические нарушения, так и объём некротического повреждения при острой ишемии и реперфузии миокарда. Этот эффект обусловлен мембраностабилизирующим действием Quer, о чем свидетельствует резкое торможение деградации мембранных ферментов в ишемизированном миокарде, а также торможение активности липоксигеназ и неферментных прооксидантных реакций [10, 11]. Существует мнение, что важным фактором, определяющим кардиопротекторные свойства Quer, является его

способность повышать уровень оксида азота в тканях и эндотелии миокарда. Этот эффект был экспериментально доказан в опытах на культуре эндотелиоцитов пупочной вены человека и в экспериментах *in vivo* с прямым определением уровня оксида азота в миокарде и стенке сосудов кролика и при моделировании процессов ишемии/реперфузии миокарда у собак.

Проведены исследования [12] эффективности «Липофлавона» в комбинации с другим известным антигипоксантом – ацелизином в условиях экспериментальной хронической сердечной недостаточности. Предметом исследования было изучение влияния приведённой комбинации на состояние энергетических ресурсов, активности ферментов энергетического метаболизма – лактатдегидрогеназы и креатинфосфокиназы. Было показано, что использование LS-Quer в комбинации с ацелизином на 7 сутки наблюдения позволяет существенно снизить интенсивность СРО в сыворотке крови и миокарде. Лечение позволяет предупредить снижение активности ферментов, таких как SOD и каталаза. Было установлено, что «Липофлавон» обладает антирадикальными и антиоксидантными свойствами. Установлено, что исследуемая комбинация лекарственных средств: «Липофлавона» и ацелизина, применяемых при хронической сердечной недостаточности проявляет высокую антиоксидантную активность с антирадикальными свойствами. «Липофлавон» в комбинации с ацелизином весьма эффективно предупреждает гиперактивацию свободнорадикальных цепных реакций как в сыворотке крови, так и в миокарде экспериментальных животных. Кардиопротекторное действие «Липофлавона» проявляется также сохранением пула высоко энергетических фосфатных связей и устранением дисбаланса в системе адениловых нуклеотидов [12].

Проведены исследования по изучению возможности коррекции цитокинового гомеостаза и диастолической функции левого желудочка у больных артериальной гипертензией. Установлено, что применение «Липофлавона» приводит к нормализации уровня ряда противовоспалительных цитокинов и улучшению диастолической функции сердца. «Липофлавон» оказывает ингибирующее действие на синтез IL-1 β , IL-4, ФНО- α [13]. Влияние «Липофлавона» на лечение больных с хронической

сердечной недостаточностью проведено как *in vitro*, так и *in vivo*. В исследованиях *in vitro* использование «Липофлавона» приводит к снижению продукции мононуклеарными клетками периферической крови больных артериальной гипертензией и хронической сердечной недостаточностью интерлейкина-1 β и фактора некроза опухоли. Включение «Липофлавона» в комплексное лечение 89 пациентов (30 мг Quer и 1000 мг РС), страдающих артериальной гипертензией с хронической сердечной недостаточностью способствует улучшению диастолической функции сердца в виде уменьшения длительности IVRT на 6,9 % ($p < 0,05$), повышения Е/А на 16,9 % ($p < 0,05$) и снижения функционального класса сердечной недостаточности на 12,9 % ($p < 0,05$) через 6 месяцев после проведённого курса лечения [14].

Использование LS-Quer и нормобарической гипокситерапии в лечении сердечной недостаточности у 139 пациентов с хронической ревматической болезнью сердца показало, что комплексная терапия с использованием LS препарата «Липофлавона» и интервальной нормобарической гипокситерапии патогенетически обоснована и способна улучшить состояние при сердечной недостаточности, состояние показателей малого круга кровообращения, функции внешнего дыхания и сократительной способности миокарда [15].

В другой работе [16] проведено изучение динамики NT-proBNP у пациентов с дилатационной кардиомиопатией при лечении с использованием стандартной схемы терапии хронической сердечной недостаточности и использования LS препаратов. Проводили в/в введение LS препаратов утром и ингаляцию препарата «Липин» в ультразвуковом небулайзере (500 мг) днём. Применение «Липофлавона» и «Липина» в сочетании с базисной терапией при хронической сердечной недостаточности эффективнее улучшает субъективное состояние пациентов, а также объективные показатели работы сердечно-сосудистой системы.

Введение PL компонентов, входящих в состав клеточных мембран и стенок альвеол, способствует статистически достоверному приросту дифференциальной способности лёгких для газов, что является проявлением оптимизации процессов оксигенации малого круга кровообращения в

условиях изменения его гемодинамических характеристик при пороках сердца [17]. Используемые в работе препараты («Липофлавон», «Липин») обладают способностью избирательного депонирования в мембранах клеток, находящихся в состоянии гипоксии и гипертонии, что открывает новые горизонты по применению LS терапии при состояниях ассоциированных с тканевой гипоксией и ишемией [18].

На основании проведённых исследований в клинике было рекомендовано применение «Липофлавона» в комплексной терапии при остром инфаркте миокарда без патологического зубца Q и нестабильной стенокардии приводит к более быстрой положительной динамике активности МВ-фракции креатинфосфокиназы в сыворотке крови, препятствует повышению уровня провоспалительного цитокина IL-8, способствует электрической стабильности миокарда; при лечении стабильной стенокардии способствует уменьшению тяжести приступов стенокардии, снижению агрегации тромбоцитов, улучшению реологических показателей крови (снижению вязкости крови и агрегации эритроцитов) и микроциркуляции. Использование препарата может позволить повысить эффективность лечения и безопасность тромболитической терапии у больных пожилого возраста [19–21]

Применение LS препаратов «Липофлавона» и «Липина» в раннем периоде инфаркта миокарда значительно снижает риск развития небезопасных нарушений ритма желудочка, повышает эффективность и безопасность лечения наиболее тяжёлой категории больных. Применение LS препаратов снижает процессы ПОЛ, поддерживает активность антиоксидантных систем организма, проявляет мембранопротекторное действие. У больных, которым для уменьшения негативного действия реперфузии вводился «Липин», не было отмечено нарушений ритма сердца, проявлений сердечной недостаточности, случаев развития аневризмы. Использование «Липина» и «Липофлавона» может позволить повысить эффективность лечения и безопасность тромболитической терапии у больных пожилого возраста [22, 23].

Нельзя не остановиться ещё на одном вопросе применения препарата «Липофлавона», а именно, для предупреждения развития кардиологи-

ческих осложнений у больных операбельным раком молочной железы, получавших лечение антрациклиновыми антибиотиками при раке молочной железы. Исследования проводили на 180 больных. Контроль основных показателей деятельности сердца проводился до и после каждого курса химиотерапии антрациклинами. Физиологическая активность сердца оценивалась на основании клинического анализа по динамике уровня кардиоспецифичных тропонинов, а также данных электрокардиографии. Установлено, что при введении больным «Липофлавона», препарат оказывает выраженный противоаритмический эффект во время химиотерапии по сравнению с группой контроля не получающий LS-Quer. Таким образом, добавление к базовой терапии антрациклиновыми антибиотиками «Липофлавона» весьма перспективно, т.к. снижает частоту осложнений со стороны сердечно-сосудистой системы. Кардиопротекторная активность «Липофлавона» на модели доксорубициновой кардиомиопатии продемонстрирована рядом авторов [24–26].

Широко известно офтальмологическое действие LS-Quer. «Липофлавон» в форме глазных капель применяется при поражении роговицы (проникающие и не проникающие), послеоперационных ранах роговицы (после экстракции катаракты), кератитах различного генеза, воспалительных состояниях глаз. Действие препарата основано на противовоспалительных, ранозаживляющих, ангиопротекторных эффектах Quer [1]. Quer также обладает антиоксидантным и противовирусным действием, снижает синтез лейкотриенов и патологически повышенную сосудистотканевую проницаемость и способствует нормализации тканевой трофики. LS структура «Липофлавона» обеспечивает растворимость и офтальмобиодоступность при инстилляциях в форме глазных капель [27–29].

«Липофлавон» хорошо переносится больными, не вызывает побочных эффектов и аллергических реакций. Препарат эффективен при лечении больных травматическими кератитами, при этом ускоряется время эпителизации, уменьшается длительность сохранения болевых ощущений по сравнению с больными контрольной группы. При применении препарата исчезновение субъективных и объективных жалоб пациентов наступает на 3-4 день после начала лечения. Применение «Липофлавона»

способствовало быстрой регрессии воспалительного процесса при комплексном лечении больных после экстракции катаракты с последующей имплантацией. Выявлена эффективность «Липофлавона» в комплексном лечении дегенеративных заболеваний сетчатки [27–29], например, при не пролиферативной диабетической ретинопатии. При этом происходит длительная стабилизация патологического процесса в сетчатке, повышение зрительных функций. Применение «Липофлавона» способствовало быстрой регрессии воспалительного процесса, повышению активности ферментов антиоксидантной защиты [27–29]. Важной отличительной способностью глазных капель «Липофлавона» является отсутствие какого-либо консерванта в составе препарата. По нашему мнению, предлагаемый LS препарат, содержащий включённый в липидный бислой биофлавоноид Quer, может быть использован для лечения и других заболеваний. Наше мнение основано на широком диапазоне действия Quer [1]: антибактериальном, противовирусном, антиоксидантном, противовоспалительном и противоопухолевом.

При изучении влияния «Липофлавоном» на течение воспалительного процесса в послеоперационном периоде у больных, установлено, что «Липофлавоном» достоверно уменьшает показатели светорассеяния на вторые сутки послеоперационного периода. Применение препарата уменьшает признаки воспалительной реакции. Эффективность капель «Липофлавона» показана при совместном применении с циклофероном при лечении больных первичной открытоугольной глаукомой.

Выявлена эффективность «Липофлавона» в комплексном лечении дегенеративных заболеваний сетчатки. Применение комбинации «Липофлавона» и иммунофана у 123 больных с непролиферативной диабетической ретинопатией привело к нормализации показателей местного иммунитета: снижению воспалительных цитокинов, повышению активности лизоцима и IgA, что позитивно отражается на клинических и функциональных данных органов зрения, например, при не пролиферативной диабетической ретинопатии [30]. При этом происходит длительная стабилизация патологического процесса в сетчатке, повышение зрительных функций. Необходимо отметить, что применение только базисной тера-

пии приводило к значительно меньшему эффекту.

Установлено, что введение «Липофлавона» при диабетической ретинопатии приводит высокой эффективности лечения, что сопровождается уменьшением противовоспалительных цитокинов IL-1 β и TNF- α на 17,0% и 14,5 %, соответственно. При использовании терапии без «Липофлавона» уменьшение цитокинов составляло: IL-1 β на 9,5% и TNF- α на 4,9 %. Необходимо отметить отсутствие влияния «Липофлавона» на уровень противовоспалительного цитокина IL-4 [31, 32].

Работы по исследованию эффективности применения LS препарата «Липофлавона» при различных патологиях появляются постоянно [33]. Только за последние годы появились сообщения об успешном применении «Липофлавона» при лечении кардиологических заболеваний [34], установлена возможность коррекции изменения цитокинового гомеостаза и диастолической дисфункции левого желудочка у больных артериальной гипертензией, моторной дисфункции желудка на фоне сахарного диабета 1 и 2 типов, уменьшения клинических симптомов, а также «Липофлавоном» способствует возобновлению функционального состояния эндотелия слизистой оболочки желудка [35]. Установлено влияние LS препаратов на альвеолярно-капиллярную проницаемость при коморбидной ренопульмональной патологии [11]. Ингаляционное введение «Липина» и «Липофлавона» способствовало увеличению альвеолярно-капиллярной проницаемости лёгких. Изучено влияние «Липофлавона» на уровень антиэндоксиновых антител и дисфункцию эндотелия при объединённом действии *Helicobacter pylori* – хронического эрозивного гастрита и хронического обструктивного заболевания лёгких [36]. Доказана клиническая эффективность использования «Липофлавона» для коррекции антиэндоксиновых антител у больных.

«Липофлавоном» широко используется в комплексном лечении хронических обструктивных заболеваний лёгких. Проведено изучение влияния «Липофлавона» на остеопротегерин-опосредованную лимфоидную (лейкоцитарную) регуляцию синтеза клетками эпителия бронхов у больных хроническим обструктивным заболеванием лёгких, перенёсших туберкулёз лёгких. Установлено, что у 83 больных хроническим

обструктивными заболеваниями лёгких I–II стадии, прежде всего у больных перенёсших туберкулёз лёгких, выявлена возможность коррекции «Липофлавоном» остеопротегерин-зависимого лейкоцин-опосредованного синтеза клетками бронхиального эпителия уровня противовоспалительных цитокинов: IL-1 β и TNF- α +, цитокина IL-4 и активной формы TGF- β 1. Указанные факты расцениваются как патофизиологическое обоснование целесообразности местного (ингаляционное, эндобронхиальное введение) использования «Липофлавона» у подобных больных для коррекции дисбаланса цитокинового гомеостаза на регионарном (ткани бронхов) уровне [37].

Используя «Липофлавоном» в количестве 30 мг Queg проводили лечение хронических обструктивных заболеваний лёгких у 122 больных. До начала процесса лечения у больных было обнаружено повышение уровня IL-1 β в системном кровотоке. Уровень IL-1 β в различных группах увеличивался в пределах 64,1 % – 87,5 % ($p < 0,001$). Уровень TNF- α был также повышен в пределах 50,5 % – 75,5 % ($p < 0,001$). В группе, в которой применялись антицитокиновые препараты с доказанным действием, не было обнаружено статистически значимого снижения цитокинов. В группе больных принимавших «Липофлавоном» количество цитокинов IL-1 β и TNF- α снижается соответственно на 25,8 % и 17,4 %. Авторами доказана эффективность лечения «Липофлавоном» больных с хроническим обструктивным заболеванием лёгких [38].

Постоянно появляются работы по лечению псориаза «Липофлавоном» [39–41]. Опубликованы данные, подтверждающие возможность в/в использования «Липофлавона» для лечения больных псориазом и псориатической артропатии. При введении препарата отмечено снижение содержания противовоспалительных цитокинов (IL-1 и TNF) и наблюдается положительная динамика течения псориатической болезни.

Проведено лечение «Липофлавоном» больных (98 пациентов) неалкогольным стеатогепатитом, осложнённым гипертонической болезнью. Проводили определение в крови простагландинов (E2 та F2a), которые являются маркерами оксидантного стресса при многих острых и хронических заболеваниях. Установлено, что лечение приводит к нормализации в

крови простагландинов и сопровождается достижением у больных клинико-биохимической ремиссии [42, 43].

«Липофлавоном» для инъекций и «Амизон» применяли для комплексной терапии генерализованного пародонтита. Данное лечение обеспечивает положительный лечебный эффект в течение 6 месяцев наблюдения. Успешное лечение пародонта приведено и в других работах [44–46].

Продолжаются работы по изучению эффективности «Липофлавона» в модельных экспериментах на животных. Проведено изучение нефропротекторной активности двух препаратов, содержащих Queg: комплексный препарат «Корвитин» и LS-препарат «Липофлавоном». Исследования проведены на трёх моделях острой почечной недостаточности: токсическая модель, вызванная подкожным введением мышам этиленгликоля 10 мг/кг; миоглобинурическая, вызванная в/м введением крысам 50 % глицерина (8 мг/кг); гентамициновая, вызванная в/м введением крысам гентамицина сульфата (80 мг/кг). Применение препаратов в условиях этиленгликолевой модели значительно увеличивало продолжительность жизни мышей. При этом «Липофлавоном» по активности значительно превышал «Корвитин». При использовании миоглобинурической и гентамициновой модели введение препаратов усиливало диурез и скорость клубочковой фильтрации. Обнаружено, что улучшение морфофункциональных показателей сопровождалось уменьшением степени окислительного стресса в ткани почек и в крови животных, а также повышением фибринолитической активности плазмы крови, мочи и тканей почек [33, 47].

Применение «Липофлавона» на полисахаридной модели воспалительного процесса в пародонте существенно снижало повышение в крови и пародонте содержания нитратов и нитритов, ТБК-активных продуктов, предотвращало снижение активности SOD и уменьшение содержания восстановленного глутатиона. Введение «Липофлавона» может быть эффективным средством коррекции нарушений окислительных процессов в пародонте при действии эндотоксинов грамотрицательной микрофлоры [48].

Особо хотелось бы отметить возможность регенерации нервной

ткани LS-Quer. Установлено, что при травмах периферических нервов при добавлении LS-Quer увеличивается количество нервных волокон и активируется регенерация, что ускоряет прорастание и миелинизацию нервных волокон [49]. На модели разрушения периферического нерва изучена восстановительная способность LS-Quer – «Липофлавона». Препарат оказывает эффективное влияние, что проявляется в активации ангиогенеза в зоне травмирования и снижении образования соединительно-тканевых рубцов [50].

Проведено изучение биомеханических свойств костей крыс разного возраста при использовании способов повышения устойчивости к действию гравитационных перегрузок. Введение «Липофлавона» крысам с моделью костной травмы приводило к повышению устойчивости к действию гравитационных перегрузок [51].

Особый интерес представляет работа [3] в которой изучено влияние LS-Quer на развитие фиброза печени. На мышцах линии BaLb воспроизведена модель острого гепатита путём введения конканвалина А. Через 30 минут после введения конканвалина А в/в вводили LS-Quer в дозе 2,5 мг/кг. Были получены LS следующего состава PC : Chol : ПЭГ-4000 : Quer в соотношении 13:4:1:6 с размером 170–200 нм. Препарат получали, используя метод липидной плёнки с последующей лиофилизацией эмульсии. В крови животных определяли ALT и АСТ. Лечение LS-Quer уменьшало уровни ALT и АСТ и ослабило патологические процессы в печени. Иммунный ответ играет важную роль в развитии фиброза печени, вызванного иммунологическими механизмами. Изучено влияние Quer на NF-κB – универсальный фактор транскрипции, контролирующий экспрессию генов иммунного ответа, апоптоза и клеточного цикла (nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated β-cells) и TGF-β – трансформирующий ростовой β-фактор, белок который контролирует пролиферацию клеточной дифференцировки. Обнаружено снижение выработки NF-κB и TGF-β после лечения животных LS-Quer. Авторы пришли к выводу о том, что Quer может влиять на выработку указанных факторов и именно с этим связан антифибринолитический эффект препарата.

Таким образом, создание LS-Quer, обладающей кардиопротектор-

ной активностью позволяет надеяться на эффективность терапии кардиологических заболеваний различной этиологии. Поэтому на сегодняшний день одним из перспективных направлений фармакотерапии в кардиологии является поиск оптимальных методов миокардиальной цитопroteкции и, в частности, препаратов, обладающих свойствами антиоксидантов, мембранопротекторов и ингибиторов каталитических ферментов.

Исходя из роли процессов ПОЛ в формировании сердечно-сосудистой патологии, LS могут быть успешно использованы для предотвращения СРО в клетках, проявляя антиоксидантное действие.

В настоящее время активно проводится поиск лекарственных препаратов на основе антиоксидантов, включённых в LS для лечения сердечно-сосудистых заболеваний.

Патогенетическим базисом для создания LS-Quer, например, «Липофлавона», явились данные, свидетельствующие о роли активации СРО и повреждении мембран кардиомиоцитов при ишемии, нарушении функционирования мембранных и внутриклеточных ферментных систем, усилении катаболических процессов в кардиомиоцитах.

В настоящее время доказано, что одним из ведущих механизмов повреждения кардиомиоцитов при острой и хронической ишемии миокарда является активация СРО. На сегодняшний день с позицией свободнорадикальной теории можно объяснить практически все ключевые моменты атерогенеза: образование пенистых клеток и липидоза аорты, миграцию и пролиферацию гладкомышечных клеток, развитие эндотелиальной дисфункции, активацию тромбообразования [52]. Доказана роль активации СРО в патогенезе инфаркта миокарда и реперфузионном синдроме. Выявлено преобладание процессов СРО при снижении активности антиоксидантных ферментов у лиц со стабильной стенокардией [53–56]. Доказано, что избыточное образование свободных радикалов лежит в основе дисфункции эндотелия и ремоделирования сосудов, характерных для гипертонической болезни [57].

Выявлена важная роль СРО в процессах ремоделирования сосудистой стенки, что связано с несколькими механизмами: в первую очередь кислородные радикалы могут повреждать клеточный цитоскелет, вызывая

выраженные морфологические и структурные изменения клеток. Также супероксид полимеризует гиалуроновую кислоту и модулируют активность металлопротеиназ MMP-2 и MMP-9, что приводит к разрушению протеогликанов и коллагена, а в итоге – к нарушению состава внеклеточного матрикса и структуры артериальной клетки [53].

Помимо влияния на рост и структуру сосудов реактивные формы кислорода способны изменять их сократительные и дилататорные свойства. Радикалы мобилизуют кальций из саркоплазматического ретикулума и митохондриального депо и активируют Na^+/H^+ -каналы, что приводит к защелачиванию среды и оказывает прямое стимулирующее влияние на сократимость гладкой мышцы сосуда [40]. Доказано, что свободные радикалы многопланово влияют также на функциональное состояние эндотелия. Во-первых, взаимодействие свободных радикалов с оксидом азота приводит к инактивации последнего и соответственно, влечёт за собой нарушение сосудодвигательной функции эндотелия [53, 54]. Во-вторых – СРО оказывает стимулирующее влияние на iNOS, высвобождающую избыточное количество NO, что потенцирует дальнейшее развитие воспалительной реакции [53, 55].

В заключение необходимо отметить, что приведённые выше данные подтверждают возможность применения LS в медицинской практике. Интерес к нанотехнологиям в фармакологии обусловлен не наноразмерами частиц, а, прежде всего, возможностью получения новых высокоэффективных лекарственных препаратов, в которых LS содержат активные фармацевтические субстанции. Сегодня это направление признано приоритетным во многих странах мира с развитой фармацевтической наукой и промышленностью. LS являются эффективными наноконтейнерами для доставки лекарственных препаратов. Особо актуальна разработка наночастиц для соединений с низкой проницаемостью и биодоступностью, что диктует объясняет их включение в микроэмульсии, нанокристаллы, микронаночастицы, полимерные мицеллы, и конечно, в LS. Исследования проводятся по созданию нескольких форм лекарственных препаратов: инъекционных, дермальных, назальных, для приёма *per os*. При этом необходимо учитывать, что низкая биодоступность, например, Querc при

введении *per os* может быть связана с ингибированием мицеллами липидов, присутствующими в тонком кишечнике. Разрабатываемые наночастицы содержат как один лекарственный компонент так и несколько, например Querc и ресвератол. При этом для получения LS используется не только природные и синтетические липиды, но вспомогательные компоненты значительно усиливающие биодоступность, пролонгированность и стабильность частицы, такие ПЭГ, хитозан, ганглиозиды и др. [58–61].

Опыт, накопленный при разработке и изучении рассматриваемых препаратов позволяет нам надеяться на возможность создания новых оригинальных LS лекарственных препаратов для применения в онкологии, кардиологии и других направлениях медицины.

Список литературы

1. Ковалев В.Б. Механизмы лечебного действия биофлавоноида кверцетина (обзор литературы) / В.Б. Ковалев, В.В. Ковган, Е.Ю. Колчина // Украинский медицинский альманах. – 1999. – Т. 2, № 4. – С. 176–184.
2. Alexopoulou E. Preparation and Characterization of Lyophilized Liposomes with Incorporated Quercetin / E. Alexopoulou, A. Georgopoulos, K.A. Kagkadis, C. Demetzos // J. of Liposome Research. – 2006. – V. 16, № 1. – P. 17–25.
3. Prin K.M. Preparation, optimization and in vivo hepatoprotective evaluation of Quercetin Liposome / K.M. Prin // Int. J. of Current Pharm. Research. – 2012. – V. 4, № 2. – P. 24–32.
4. Пат. 021352 В1 Российская Федерация, МПК А61К 31/352, А61К 9/127. Способ получения липосомальной формы кверцетина / Шоболов Д.Л., Краснопольский Ю.М., Ульянов А.М., Натекан А.А., Тарасов В.В., Балабаньян В.Ю., Швецов В.И.; заявитель и патентообладатель ООО «Технология лекарств». – № 201201593; заявл. 24.12.2012; опубл. 29.05.2015, Бюл.№ 6.
5. Пат. 76393 С2 Патент України, МПК А61К 9/127, А61К 31/353, А61К 47/44, А61Р 39/06, А61Р 31/00, А61Р 35/00. Спосіб отримання ліпосомального засобу, що містить кверцетин / Стефанов О.В., Григорьева Г.С., Соловьев А.И., Пасечникова Н.В., Хромов А.С., Кона-

- хович Н.Ф., Краснопольський Ю.М.; заявник та патентовласники Інститут фармакології та токсикології академії медичних наук України, Стефанов О.В., Григор'єва Г.С., Солов'єв А.И., Пасечникова Н.В., Хромов А.С., Конахович Н.Ф., Краснопольський Ю.М. – № а 200604675; заявл. 27.04. 2006; опубл. 17.07.2006, Бюл. №7.
6. Пат. 111762 С2 Патент України, МПК А61К 9/1217, А61К 47/44, А61К 31/353, А61Р 39/06, А61Р 9/10, А61Р 27/02. Спосіб отримання фармакологічно активного ліпосомального засобу, що містить кверцетин / Григор'єва Г.С., Краснопольський Ю.М., Конахович Н.Ф., Пасечникова Н.В.; заявник та патентовласник ТОВ «НАНОМЕДТРАСТ». – № а 201407695; заявл.08.07.2014; опубл.10.06.2016, Бюл. №11.
7. Pat. 20170196808 A1 United States, Int. Cl. A61K 9/127, A61K 31/353, U.S. Cl. A61K 9/127, A61K 31/353. Method of obtaining a pharmacologically active liposomal quercetin-containing product / Grygorieva G.S., Krasnopolskay Y.M., Konachovich N.F. Pasychnikova N.V.; assignee To-varistvo z obmezhenou vidpovidalnisru "NANOMEDTRAST". – PCT/UA2015/000059; filed 08.07.2015; pub. 13.07.2017.
8. Компедіум 2009 – Лекарственные препараты / Под ред. В.Н. Коваленко, А.П. Викторова. – К. : Морион, 2009. – 2224 с.
9. Кожанова Т.А. Возможности коррекции изменении цитокинового гомеостаза и диастолической дисфункции левого желудочка у больных артериальной гипертензией / Т.А. Кожанова // Таврический медико-биологический вестник. – 2010. – Т. 13, № 3. – С. 117–122.
10. Мойбенко О.О. Нові аспекти патогенезу та терапії гострого інфаркту міокарда / О.О. Мойбенко, О.М. Пархоменко // Тези Доповідей II Національного з'їзду фармакологів України, 2–4 жовтня 2001, Дніпропетровськ. – Дніпропетровськ, 2001. – С. 169–170.
11. Мухин И.В. Мембранопротективные свойства липосомальных препаратов при коморбидной ренопульмональной патологии / И.В. Мухин, И.Н. Родин // «Питання експериментальної та клінічної медицини». Збірник статей. – 2009. – Т. 2, Вип. 13. – С. 63–67.
12. Афонина Т.В. Экспериментальное обоснование целесообразности комбинированного применения липофлавона с ацелизином при хронической сердечной недостаточности : дис. на соиск. учен. степ. канд. мед. наук : 14.03.05 – фармакология / Т.В. Афонина. – К., 2009. – 200 с.
13. Кожанова Т.О. Вплив змін цитокинового гомеостазу та їх корекція на морфо-функціональні показники серця хворих на артеріальну гіпертензію : автореф. дис. на здобуття наук. ступеня канд. мед. наук : спец. 14.01.11 «Кардіологія» / Т.О. Кожанова. – Сімферополь, 2011 – 23 с.
14. Кожанова Т.А. Возможности коррекции изменений цитокинового гомеостаза и диастолической дисфункции левого желудочка у больных артериальной гипертензией / Т.А. Кожанова // Таврический медико-биологический вестник. – 2010. – Т. 13, № 3(51). – С. 117–122.
15. Торгалло Є.О. Вплив кверцетину та ліпофлавонолу на ферменти антиоксидантного захисту при цереброваскулярній патології (геморагічному інсульті) / Є.О. Торгалло, Я.Б. Раснька, Т.П. Гарник, Л.І. Остапенко // Фітотерапія: Науково-практичний часопис. – 2010. – № 1. – С. 19–22.
16. Дубовик А.В. Изменение клинического течения дилатационной кардиомиопатии и сывороткой концентрации натрий-уритического пептида при применении липосомальных препаратов в схеме лечения / А.В. Дубовик // Кровообіг та гемостаз. – 2012. – № 3. – С. 63–66.
17. Вплив ліпіну на тлі застосування кверцетину на перекисне окислення ліпідів в крові та органах вагітних щурів-самиць при максимальному фізичному навантаженні / О.В. Стефанов, В.А. Туманов, Н.О. Горчаков [та ін.] // Ліки. – 2002. – № 3-4. – С. 70–72.
18. Зміни когнітивних реакцій та при дії антиоксиданту кверцетину в ліпосомальній формі / А.О. Васильєва, К.В. Тарапон, С.В. Кириченко, О.К. Ярош // Ліки. – 2006. – № 3 – 4. – С. 46–50.
19. Белік Г. В. Порівняння кардіопротекторної активності ліпосомальної та водорозчинної лікарських форм кверцетину / Г.В. Белік, Ю.В. Столетов, С.М. Дроговоз, Г.С. Григор'єва // Фармаком. – № 4. – 2005. – С. 107–110.
20. Белік Г.В. Перекисне окислення ліпідів у патогенезі атеросклерозу та можливості його корекції ліпофлавоном / Г.В. Белік, Т.О. Куценко,

- Ю.В. Столетов, Н.І. Прокопішак // Медична хімія. – 2007. – Т. 9, № 1. – С. 57–61.
21. Владимиров Ю.А. Дигидрохверцетин и другие флавоноиды как ингибиторы образования свободных радикалов на ключевых стадиях апоптоза / Ю.А. Владимиров, Е.В. Проскурина, Е.М. Демин // Биохимия. – 2009. – Т. 74, № 3. – С. 372–379.
22. Заремба Е.Х. Вплив препарату ліпофлавоу на показники варіабільності серцевого ритму у хворих на нестабільну стенокардію / Е.Х. Заремба, О.О. Капустинський, О.В. Заремба // Львівський медичний часопис. – 2007. – Т. 13, № 1–2. – С. 36–38.
23. Заремба Е.Х. Динаміка показників оксипроліну в хворих із нестабільною стенокардією при застосуванні ліпофлавоу / Е.Х. Заремба, О.О. Капустинський // Практична медицина. – 2010. – Т. 16, № 3. – С. 129–135.
24. Ель Аараж Ахмад Вплив комбінації хверцетину з похідним глюкозаміну на перебіг доксорубіцинової кардіоміопатії у щурів / Ель Аараж Ахмад, І.А. Зупанець, С.К. Шубеко, І.А. Отрішко // Клінічна фармація. – 2012. – Т. 16, № 3. – С. 24–27.
25. Белік Г.В. Особливості дії ліпосомальної форми хверцетину на моделі доксорубіцинової кардіоміопатії у щурів / Г.В. Белік, Г.С. Григор'єва, Л.В. Деримедвідь // Ліки. – 2004. – № 5–6. – С. 60–64.
26. Щетинина Т.А. Оценка эффективности применения Липофлавоу для предупреждения развития кардиологических осложнений у больных операбельным раком молочной железы, получающих лечение антрациклинами / Т.А. Щетинина, А.В. Шепиль // Украинский медицинский альманах. – 2008. – Т. 11, № 5. – С. 207–208.
27. Пасечникова Н.В. Клинико-биохимическое обоснование применения препарата «Липофлавоу» у больных возрастной катарактой после операции экстракции катаракты и имплантации продуктов перекисного окисления / Н.В. Пасечникова, Р.А. Горшкова // Украинский мед. альманах. – 2006. – Т. 9, № 1. – С. 219–221.
28. Петруня А.М. Оценка эффектов применения препарата «Липофлавоу» в комплексной терапии больных непролиферативной диабетической ретинопатии / А.М. Петруня, А.В. Спектор // Украинский медицинский альманах. – 2006. – Т. 9, № 2. – С. 120–122.
29. Петруня А.М. Применение препарата липофлавоу в офтальмологической практике / А.М. Петруня, А.С. Григорьева // Фармакологія та лікарська токсикологія. – 2011. – №5. – С. 241–242.
30. Спектор А.В. Оценка эффективности липофлавоу и иммунофана в комплексной терапии больных непролиферативной диабетической ретинопатией и их влияние на показатели местного иммунитета глаз / А.В. Спектор // Проблемы экологической та медичної генетики і клінічної імунології. – 2009. – № 7. – С. 329–336.
31. Иванова Н.В. Применение модифицированного способа лечения диабетической ретинопатии / Н.В. Иванова, Н.А. Ярошева // Таврический медико-биологический вестник. – 2010. – Т. 13, № 1. – С. 72–78.
32. Иванова Н.В. Патогенетическое обоснование применения Липофлавоу у больных с различными формами диабетической ретинопатии / Н.В. Иванова, Н.А. Ярошева // Клиническая фармакология. – 2008. – Т. 12, № 2. – С. 11–16.
33. Вплив тривалого введення препаратів хверцетину на фібролітичну активність плазми крові / О.М. Горошко, І.І. Заморський, В.М. Драчук [та ін.] // Клініка та експериментальна патологія. – 2017. – Т. 16, № 3(61). – Ч.2. – С. 32–33.
34. Третьякова О.С. Кардиопротекторные возможности липосом в терапии гипоксически поврежденного миокарда новорожденных / О.С. Третьякова, И.В. Заднипрятский // Перинатология и педиатрия. – 2011. – Т. 46, № 2. – С. 122–126.
35. Нечепай Ж.А. Роль расстройств углеводного обмена в прогрессировании моторной дисфункции желудка на фоне сахарного диабета 1 и 2 типов в динамике лечения Липофлавоу и Ребамипида / Клиническая и эксперимент. патология. – 2009. – Т. 8, № 3. – С. 67–69.
36. Нилова А.М. Вплив ліпофлавоу на рівень антиендотоксинів антитіл і дисфункцію ендотелію при поєднаному перебігу *Helicobacter pylori*-негативного та хронічного ерозивного гастриту та хронічного обструктивного захворювання легенів / А.М. Нилова // Кримський

- терапевтичний журнал. – 2008. – Т. 2, № 1. – С. 51–53.
37. Обухова Н.В. Влияние Липофлавона на остеопротегерин-опосредованную лимфоидную (лейкоцитарную) регуляцию синтеза клетками эпителия бронхов у больных хроническим обструктивным заболеванием лёгких, перенёсших туберкулёз лёгких / Н. В. Обухова // Буковинский медицинский вестник. – 2013. – Т. 17, № 1. – С. 71–75.
38. Асмолов А.К. Применение Липофлавона в комплексном лечении хронических обструктивных заболеваний лёгких / А.К. Асмолов, Т.А. Рыбак, Е.А. Бабурина, Н.А. Герасимова // Buletinal academie stiinte Moldovei. – 2011. – № 4 (32). – S. 199–200.
39. Беляев Г.М. Современное представление о патогенезе псориазической артропатии и лечения этих больных / Г.М. Беляева // Дерматология и венерология. – 2010. – Т. 47, № 1. – С. 7–30.
40. Кауд Д. Особенности эндотоксин- и липофлавонозависимой лимфоидной регуляции синтеза цитокинов IL-1 β , IL-4, TNF- α эндотелиальными клетками сосудов у больных псориазом протекающими в сочетании с метаболическим синдромом / Д. Кауд // Дерматология и венерология. – 2008. – № 1. – С. 34–39.
41. Притуло О.А. Клиническая эффективность использования липофлавона для коррекции цитокинового дисбаланса у больных псориазом / О.А. Притуло, Д. Кауд // Дерматология, косметология, сексопатология. – 2008. – № 1–2. – С. 57–59.
42. Харченко В.В. Динаміка простагландинів (E2 та F2a) у крові хворих на неалкогольний стеатогепатит, сполучений з гіпертонічною хворобою, при застосуванні ліпофлавона та цитраглініну / В.В. Харченко // Український медичний альманах. – 2009. – Т.12, № 5. – С. 196–199.
43. Харченко В.В. Вплив комбінації ліпофлавоноу та цитраглініну на стан мікроциркуляторного русла хворих на неалкогольний стеатогепатит в поєднанні з гіпертонічною хворобою / В.В. Харченко // Український морфологічний альманах. – 2009. – Т.9, № 4. – С. 139–142.
44. Кукурудз Н.І. Стан процесів вільнорадикального окислення ліпідів у хворих на генералізований пародонтит та їх корекція амізоном у поєднанні з ліпофлавоном / Н.І. Кукурудз, В.І. Горелюк // Медична хімія. – 2006. – Т.8, № 4. – С. 74–78.
45. Рябоконт Е.М. Вміст IL-1 β у ротовій рідині хворих на генералізований пародонтит хронічного перебігу I-II ступеня при місцевому медикаментозному лакуванні ліпосомальним кверцетин-лецитиновим комплексом / Е. М. Рябоконт, М. Б. Худакова, Ю.А. Черепінська // Стоматолог. – 2010. – № 2. – С. 55–57.
46. Скидан М.И. Пародонтопротекторное действие кверцетина при токсическом гепатите у крыс / М.И. Скидан, К.В. Скидан, А.П. Левицкий // Вісник стоматології. – 2012. – №3. – С. 12–15.
47. Заморский И.И. Нефропротекторные эффекты препаратов кверцетина / И.И. Заморский, А.М. Горошко, С.Ю. Штриголь : материалы IV съезда фармакологов России «Инновации в современной фармакологии», 18–21 сентября 2012, Казань. – М. : Фолиум, 2012. – С. 69.
48. Сопотницька В.В. Корекція ліпофільних порушень окислювальних процесів при пародонтиті / В.В. Сопотницька, М.М. Корда // Медична хімія. – 2012. – Т. 14, № 4 (53). – С. 44–47.
49. Храпай Е.В. Липофлавоны повышают регенерацию нервных волокон в условиях экспериментальной модели травмы периферического нерва / Е.В. Храпай // Актуальные проблемы современной медицины. – 2010. – Т. 10, № 1. – С. 116–119.
50. Чайковский Ю.Б. Восстановительная фармакотерапия травмы периферического нерва в эксперименте / Ю.Б. Чайковский, Е.В. Храпай // Клінічна анатомія та оперативна хірургія. – 2010. – Т. 9, № 4. – С. 6–11.
51. Кутя С.А. Биомеханические свойства костей крыс разного возраста при использовании способов повышения устойчивости к действию гравитационных перегрузок / С.А. Кутя // Экспериментальна і клінічна медицина. – 2010. – № 3 (48). – С. 69–73.
52. Пархоменко А.Н. Метаболический подход к лечению острых и хронических форм ишемической болезни сердца / А. Н. Пархоменко // Журнал практ. лікаря. – 1999. – № 1. – С. 22–25.
53. Bonnini M.G. Carbon Dioxide Stimulates the Production of Thiyl Sulfinyl, and Disulfide Radical Anion from Thiol Oxidation by Peroxynitrite /

- M.G. Bonnini, O. Augusto // J. Biol. Chem. – 2001. – № 276. – P. 9749–9754.
54. Direct EPR Detection of the Carbonate Radical Anion Produced from Peroxynitrite and Carbon Dioxide / M.G. Bonnini, R. Radi, G. Ferrer-Sueta [et al.] // J. Biol. Chem. – 1999. – № 274. – P. 10802–10806.
55. Reduction of the Inflammatory Response Following Coronary Bypass Grafting with Total Minimal Extracorporeal Circulation / Y. Fromes, D. Gaillard, O. Ponzio [et al.] // Eur. J. Cardiothorac. Surg. – 2002. – V. 22, № 4. – P. 527–533.
56. Bioflavonoides Quercetin Scavenges Superoxide and Increases Nitric Oxide concentration in ischemic-reperfusion injury: an experimental study / I. Huc, V. Drovkovich, V.J. Nanobash [et al.] // Br. J. Surg. – 1998. – № 85. – P. 1080–1085.
57. Манухина Е.Б. Роль оксида азота и кислородных радикалов в патогенезе артериальной гипертензии / Е.Б. Манухина, Н.П. Лямина, П.В. Долотовская // Кардиология. – 2002. – № 11. – С.73–84.
58. Gillian T.R. Towards an Understanding of the Low Bioavailability of Quercetin: A study of Its Interaction with Intestinal Lipids / T.R. Gillian, M. Buchwetz, M.S. Winterbone // Nutrients. – 2017. – V. 9, № 2. – P. 111–122.
59. Physico-Chemical Characterization of Succinyl Chitosan-Stabilized Liposomes for the Oral Co-delivery of Quercetin and Resveratrol / C. Caddeo, R. Pons, C. Carbone [et al.] // Carbohydrate Polymers. – 2017. – V. 157. – P. 1853–1861.
60. Quercetin: An Overview of Biological Effects and Recent Development of Drug Delivery Systems / D. Aluani, V. Trankova, Y. Yordanov [et al.] // Pharmacia. – 2016. – V. 63, № 4. – P. 52–60.
61. Jangde R. Preparation and Optimization of Quercetin Loaded Liposomes for Wound Healing Using Response Surface Methodology / R. Jangde, D. Singh // Artif Cells Nanomed Biotechnol. – 2016. – V. 44, № 2. – P. 635–641.

1.5. Липосомальная форма Коэнзима Q₁₀ (Убидекаренона)

CoQ₁₀ представлен молекулярной формулой C₅₉H₉₀O₄ (рисунок 1.3) с М.м. 863,34 и температурой плавления 49 °С и представляет собой жёлто-оранжевые кристаллы, нерастворимые в воде, малорастворимые в этаноле и хорошо растворимые в диэтиловом эфире. CoQ₁₀ представляет собой липидрастворимое соединение, которое находится в большинстве эукариотов. Его роль заключается в переносе электронов и генерации энергии в митохондриях.

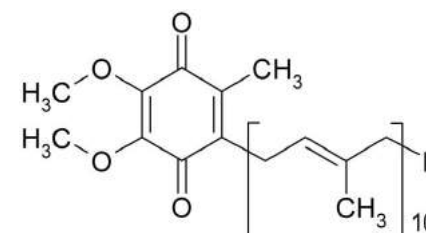


Рисунок 1.3 – Строение молекулы CoQ₁₀

Хорошо известен эффект CoQ₁₀ при применении *in vivo* в качестве антиоксиданта в лечебных и косметических целях. Однако в связи с гидрофобностью субстанции биодоступность свободного CoQ₁₀ при местном применении крайне низкая. Для повышения биодоступности гидрофобного соединения возможным является включение его в наночастицы [1]. CoQ₁₀ было предложено инкапсулировать в LS, состоящие из SPC. Размер полученных LS был представлен в узком интервале распределения, не более 200 нм. Инкапсуляция CoQ₁₀ в LS достоверно ($p < 0,05$) увеличивала его накопление в коже крыс по крайней мере в два раза, по сравнению со свободной формой CoQ₁₀. Данные исследования демонстрируют перспективность применения LS формы эндогенного клеточного антиоксиданта CoQ₁₀ для применения в дерматологии и косметологии [2–4]. Получение LS-CoQ₁₀ проводили с использованием техники сверхкритического антирастворителя [5]. В качестве липидов были выбрана смесь SPC и Chol в

соотношении 3:1. Суммарное соотношение липидов к CoQ₁₀ составляло 10:1. Определены оптимальные условия получения LS: давление, температура, количество циклов экструзии. Первоначально были получены пролипосомы, а затем путём гидратации – LS с размером частиц около 50 нм. Степень включения CoQ₁₀ в LS достигала 82,28 %. Получена характеристика наночастиц: морфология LS была изучена сканирующим электронным микроскопом, а их твёрдое состояние – рентгеновским дифрактометром.

В работе [6] изучено протективное действие LS-CoQ₁₀ у кроликов с моделью острого инфаркта миокарда. Животным вводили интактные LS и LS с включенным в них CoQ₁₀. Оба препарата были введены с помощью внутрикоронарной инфузии. Установлено, что LS-CoQ₁₀ эффективно защищает ишемическую сердечную мышцу за счёт повышения внутриклеточной доставки LS-CoQ₁₀ в гипоксические кардиоциты у кроликов, что подтверждается значительным снижением доли необратимого повреждённого сердца в общей зоне риска с 60 % в контроле до 30 % при использовании LS. По выводам авторов LS-CoQ₁₀ может служить эффективным экзогенным источником CoQ₁₀ *in vivo* для ишемических клеток.

В течение последних лет в офтальмологии проводятся исследования, направленные на создание лекарственных препаратов, например, глазных капель на основе LS [7]. Представляет интерес работа, посвящённая лечению катаракты с помощью LS, в состав которых входит CoQ₁₀ и покрытых триметилхитозаном. Катаракту у лабораторных животных индуцировали действием селенита. Антикатарактный эффект оценивали по морфологическому исследованию и анализу биохимических изменений. Установлено, что LS, покрытые триметилхитозаном высокой молекулярной массы, удерживались в ткани глаза почти в 4,8 раза дольше. LS-CoQ₁₀ проявлял высокий эффект против катаракты при 53 % помутнении хрусталика. Активность SOD и восстановленного глутатиона была значительно выше в группе, получавшей LS-CoQ₁₀ по сравнению с контролем, не получавшим лечения. Исследовано влияние молекулярной массы и концентрации триметилхитозана на характеристику LS с включённым CoQ₁₀ и покрытых триметилхитозаном. Эффективность LS была изучена

на модели селенит-индуцированной катаракты. Подтверждено существование плотного слоя полимера на поверхности LS. Антикатарактный эффект оценивали по морфологическому исследованию и анализу биохимических изменений. LS-CoQ₁₀ проявлял высокий эффект против катаракты даже в тех случаях, когда помутнение хрусталика было около 53 %. Введение в LS триметилхитозана приводило к увеличению времени удерживания CoQ₁₀ и замедлению селенит-индуцированной катаракты. Установлено увеличение синтеза SOD и восстановленного глутатиона под действием LS-CoQ₁₀ [8–10].

Исследования в США (университет в Техасе) показали, что у 75 % всех пациентов с заболеваниями сердца обнаруживается существенное снижение содержания в тканях организма CoQ₁₀. В Дании проведены исследования больных раком молочной железы (32 человека). В этом исследовании изучена эффективность CoQ₁₀ в качестве дополнительной терапии. В результате все пациенты, принимавшие CoQ₁₀, сообщали, что они использовали меньше обезболивающих препаратов и не теряли вес во время химиотерапии. Кроме того, у 6 пациентов выявлены признаки полной ремиссии, которые не были предусмотрены у онкологов. CoQ₁₀ можно включать в состав LS вместе с другими антиоксидантами. При этом CoQ₁₀ способен регенерировать витамин E, что позволит использовать этот гидрофобный антиоксидант в меньшей концентрации.

За последнее время опубликованы результаты исследований по получению LS-CoQ₁₀ различного состава и приведены методы их анализа. В зависимости от состава LS их размер варьировал от 50 нм до 80 нм. Степень включения CoQ₁₀ в LS составляла от 82,28 % до 95 %. В состав LS входили SPC и Chol в различных соотношениях: PC:CoQ₁₀ – от 2,5:1 до 10:1; Chol:PC – 1:3. Температура получения LS составляла 35–37 °C при давлении 8,0 МПа [5]. В работе [11] авторы предложили получение LS при pH 7,0 из DMPC:DPPC:DSPC в соотношении 62:29:9. Содержание CoQ₁₀ в препарате составляло 1 мг/мл. Степень инкапсуляции CoQ₁₀ является важным показателем в оценке качества LS продукта. Предложен простой метод освобождения инкапсулированного CoQ₁₀ из LS эмульсии при использовании установленных количеств неионного поверхностно-

активного вещества Твин-80 для образования смешанных мицелл, содержащих PL, CoQ₁₀ и Твин-80. Измерение проводили УФ-спектроскопией при добавлении в эмульсию NaBH₄ (7 мг на 1 мл). Средний восстановленный уровень CoQ₁₀ из пустых LS составлял 99,46±1,54%. Разница в результатах между методом экстракции органическим растворителем и методом солюбилизации Твин-80 не была статистически значимой ($p > 0,05$). Данный метод удобен для обнаружения включённого CoQ₁₀ в LS [12].

В настоящее время существует два коммерческих LS препарата, содержащих CoQ₁₀: «LiQsorb^R Drops» (liposomal CoQ₁₀), зарегистрированный в октябре 2005 года (США) и «Liposomal Q₁₀» – для применения *per os* (эмульсия по 150 мл во флаконе). Поэтому создание инъекционного LS-CoQ₁₀ является весьма перспективным.

Нами в течение последних лет проведены исследования, направленные на разработку состава LS и метода включения в них CoQ₁₀. Получена LS-CoQ₁₀, в состав которой входили EPC и DPPG в соотношении 9:1. Содержание CoQ₁₀ – 1 мг/мл [13, 14]. Инкапсуляция CoQ₁₀ в LS составила 82–86 %, размер наночастиц – 140–190 нм.

Фармакологическая и антиоксидантная активность изучена нами на модели инфаркта миокарда. Полученные данные приведены в таблицах 1.3–1.6.

Данные приведённые в таблицах 1.3–1.6, продемонстрировали антиоксидантную активность LS-CoQ₁₀, которая проявляется в снижении продуктов перекисного окисления в модельных экспериментах при введении образцов LS, содержащих CoQ₁₀, и восстановлении этих соединений до их содержания у контрольных животных. При изучении фармакологической активности препарата установлена антиоксидантная активность водорастворимой формы LS-CoQ₁₀ на модели инфаркта миокарда [15–18].

При многих заболеваниях, обнаруживается снижение АОА и изменения в звеньях антиоксидантной системы защиты, что сопровождается повышением уровня продуктов ПОЛ.

В настоящее время для снижения уровня продуктов ПОЛ применяются препараты антиоксидантов различного происхождения.

Таблица 1.3 – Результаты исследования антиоксидантной активности LS-CoQ₁₀ на модели инфаркта миокарда (сыворотка крови)

Группа	ДК, мкмоль/л	МДА, мкмоль/л	Изопростан-8, нг/мл	ОАА, %
Контроль, n=8	52,34±2,02	2,45±0,21	5,42±0,34	57,48±3,11
Инфаркт, n=8	92,14±6,34 ¹	6,59±0,32 ¹	12,58±1,02 ¹	45,38±2,18 ¹
Введение препарата, 5 дней, n=8	60,48±3,11 $p < 0,05$ $p_1 < 0,001$	3,00±0,25 $p > 0,05$ $p_1 < 0,001$	5,00±0,37 $p > 0,05$ $p_1 < 0,001$	60,49±3,02 $p > 0,05$ $p_1 < 0,001$
Одноразовое введение, n=8	81,25±3,11 $p_1 < 0,01$	5,42±0,32 $p_1 < 0,02$	7,48±0,66 $p_1 < 0,01$	59,32±2,11 $p_1 < 0,02$

¹ – $p < 0,001$; p – достоверность отличий с контролем; p_1 – достоверность отличий с инфарктом; ОАА выражена в процентах ингибирования; 50% ингибирования – 1 ед. активности

Таблица 1.4 – Результаты исследования антиоксидантной активности LS-CoQ₁₀ на модели инфаркта миокарда (сердечная мышца)

Группа	ДК, мкмоль/л	МДА, мкмоль/л	ОАА, %
Контроль, n=8	1,72±0,11	0,325±0,008	63,28±3,12
Инфаркт, n=8	4,79±0,21 ¹	0,589±0,031 ¹	57,48±2,34 ¹
Введение препарата, 5 дней, n=8	2,05±0,18 $p > 0,05$ $p_1 < 0,01$	0,402±0,021 $p < 0,05$ $p_1 < 0,01$	76,49±2,64 $p < 0,05$ $p_1 < 0,01$
Одноразовое введение, n=8	3,89±0,28 $p < 0,01$ $p_1 < 0,02$	0,419±0,021 $p < 0,02$ $p_1 < 0,01$	69,45±3,64 $p < 0,05$ $p_1 < 0,01$

¹ – $p < 0,001$; p – достоверность отличий с контролем; p_1 – достоверность отличий с инфарктом

Таблица 1.5 – Результаты исследования антиоксидантной активности LS-CoQ₁₀ на модели ИБС (сыворотка крови)

Группа	ДК, мкмоль/л	МДА, мкмоль/л	Изопростан-8, нг/мл	ОАА, %
Контрольная группа, n=8	52,34±2,02	2,45±0,21	5,42±0,34	57,48±3,11
ИБС, n=8	76,48±3,05 p < 0,001	4,93±0,31 p < 0,001	9,78±0,55 p < 0,001	44,85±2,11 p < 0,001
Препарат 5 дней, n=8	61,22±4,17 p < 0,01 p ₁ < 0,001	3,37±0,28 p < 0,01 p ₁ < 0,02	6,00±0,34 p > 0,05 p ₁ < 0,01	52,88±1,84 p < 0,05 p ₁ < 0,01

p – достоверность отличий с контролем; p₁ – достоверность отличий с ИБС

Таблица 1.6 – Результаты исследования антиоксидантной активности LS-CoQ₁₀ на модели ИБС (сердечная мышца)

Группа	ДК, мкмоль/л	МДА, мкмоль/л	ОАА, %
Контроль, n=8	1,78±0,12	0,325±0,008	63,23±3,11
ИБС, n=8	3,47±0,18 p < 0,001	0,489±0,007 p < 0,01	53,23±2,77 p < 0,01
Препарат, 5 дней, n=8	2,03±0,11 p > 0,05 p ₁ < 0,01	0,332±0,008 p > 0,05 p ₁ < 0,01	65,33±4,13 p > 0,05 p ₁ < 0,01

p – достоверность отличий с контролем; p₁ – достоверность отличий с ИБС

Интерес представляют как экзогенные продукты – биофлавоноиды, например, Querc, так и эндогенные, например, CoQ₁₀. CoQ₁₀ является антиоксидантом, успешно применяемым в кардиологии, и в отношении кото-

рого накоплена обширная доказательная база, существует многолетний мировой опыт наблюдения пациентов принимающих *per os* CoQ₁₀, подтверждающий его безопасность и эффективность. CoQ₁₀ представляет собой эндогенно синтезируемое соединение, играющее особую роль в окислительном фосфорилировании и синтезе АТФ. CoQ₁₀ реагируя со свободными радикалами, приводит к снижению уровня супероксида и, тем самым, ингибирует процессы ПОЛ биомембран и липопротеидов циркулирующей крови, а также окисление ДНК и белков организма. В кардиомиоцитах содержание CoQ₁₀ выше, чем в тканях других органов, что объясняется наибольшими энергетическими потребностями миокарда. Уровень CoQ₁₀ в плазме крови, в целом, отражает его содержание в тканях. Особым свойством CoQ₁₀ является способность восстанавливаться под действием ферментных систем организма, в то время как другие антиоксиданты окисляются необратимо [19, 20].

Как было продемонстрировано в предыдущей главе по АОА биофлавоноид Querc является одним из известных антиоксидантов, ограничивающих протекание цепных реакций СРО, предотвращающих избыточное окисление липидов, белков, нуклеиновых кислот, защищающих мембраны клеток от повреждения оксидантами. Querc обладает ангиопротекторным, антиоксидантным, ранозаживляющим и противовирусным действием [21].

Учитывая высокую антиоксидантную активность CoQ₁₀ и Querc и их действие на разные звенья антиоксидантно системы, весьма перспективным является создание на их основе комплексного LS антиоксидантного препарата.

Изучение проведено на модели ИБС у крыс. При изучении механизмов развития ИБС и его осложнений установлены основные факторы, приводящие к ИБС, патогенетические механизмы, разработаны клинические критерии, методы диагностики и лечения. Причём, большое значение придаётся изучению окислительного стресса при ИБС. Установлено, что за защиту от последствий окислительного стресса отвечает система АОА. Нарушение работы антиоксидантной системы играет важнейшую роль в развитии ИБС. К основным звеньям АОА относятся: глутатион,

аскорбат, CoQ₁₀, SOD, каталаза и другие соединения. Так, например, глутатион участвует в детоксикации ксенобиотиков и продуктов метаболизма, оказывает влияние на активность ферментов, регулирует обмен эйкозаноидов и простагландинов, влияет на синтез нуклеиновых кислот и выполняет ряд других функций в организме [22]. CoQ₁₀ – является эндогенным антиоксидантом и антигипоксантом с эффективным антирадикальным действием и защищает липиды биологических мембран от ПОЛ, предохраняет ДНК и белки организма от окислительной модификации. Защитная функция CoQ₁₀ при ИБС определяется его участием в процессах энергетического метаболизма кардиомиоцитов и антиоксидантными свойствами. Определение системы АОА (глутатиона, SOD и каталазы) при ИБС имеет существенное прогностическое значение и может способствовать изучению механизмов развития заболевания, позволяя обосновать применение лекарственной коррекции, в частности, антиоксидантных препаратов. Результаты исследования АОА образцов комплексного препарата, содержащего LS формы Quer и CoQ₁₀, на модели ИБС в сыворотке и сердечной мышце животных приведены в таблицах 1.7 и 1.8.

Таблица 1.7 – Результаты исследования АОА на модели ИБС (сыворотка крови крыс, ежедневно 10 мг/кг, 5 инъекций)

Группа	МДА, мкмоль/л	ДК, мкмоль/л	SOD, у.е/сек/л	Каталаза, мкмоль/л	SH-группы, мМ/л	ОАА, %	ПОБ, Ед/мг белка
Контроль	1,996±0,09	48,92± 2,1	32,92±1,38	21,14±1,00	12,2±0,43	52,58±2,1	0,116±0,005
ИБС	5,46± 0,22	90,33± 3,8	40,10±1,73	29,53±1,35	6,05±0,24	35,73±1,58	0,31±0,011
ИБС+Quer	3,44±0,15	65,04±2,75	51,19±2,02	39,57±1,5	7,83±0,21	55,63±2,38	0,113±0,004
ИБС+CoQ ₁₀	2,99± 0,14	60,32± 3,0	56,44±2,6	47,19± 2,02	9,68±0,42	58,62±2,67	0,162±0,007
ИБС+Quer+CoQ ₁₀	1,77±0,056	42,14±1,85	60,04±2,56	43,65±2,105	8,75±0,33	76,22±2,94	0,0766±0,0035

Примечание: ПОБ – перекисноокисленные (карбонизированные) белки; SH – сульфгидрильные группы

Таблица 1.8 – Результаты исследования АОА на модели ИБС (ткани сердца крыс, ежедневно 10 мг/кг, 5 инъекций)

Группа	МДА, мМ/г белка	ДК, мМ/г белка	SOD, у.е./г белка	Каталаза, мкмоль/г белка	Глутатион, мМ/г белка	АТФ, мМ/г белка
Контроль	1,806±0,07	14,87±0,68	100,08±4,65	25,25±1,05	89,46±3,75	3,10±0,123
ИБС	3,967±0,15	27,79±1,26	117,13±5,13	30,89±1,46	61,09±2,85	1,52±0,06
ИБС + Quer	2,35±0,11	19,58±0,87	138,31±5,65	44,18±2,03	65,12±2,45	1,81 ±0,08
ИБС + CoQ ₁₀	1,83±0,065	18,17±0,89	140,3±5,8	49,58±2,23	81,04±4,0	2,134 ±0,09
ИБС+Quer+CoQ ₁₀	1,00±0,047	9,9±0,42	152,88±7,1	53,92±2,45	74,04 ±3,68	2,074±0,09

При изучении АОА монопрепаратов LS форм Quer и CoQ₁₀ на модели ИБС (таблица 1.7) показано снижение содержания МДА на 37,0 % и ДК на 28,0 % в сыворотке крови при введении LS-Quer, а при введении LS-CoQ₁₀ – снижение содержания МДА на 46,0 % и ДК на 33,2 % по сравнению с животными с ИБС (p < 0,005). В то же время использование комплексного препарата позволило снизить количество МДА на 69,0 % и ДК на 53,25 %, практически до уровня интактного контроля (p < 0,001). Применение монопрепаратов позволило повысить АОА близко к уровню контроля 55,63 % и 58,62 % (при ИБС – 35,73 %). При использовании комплексного препарата величина АОА составляла 76,22 % (при исходной АОА – 52,58 %) (p < 0,005). Также, установлена более высокая АОА комплексного препарата при определении ПОБ. При определении содержания SH-групп в сыворотке крови установлено АОА исследуемых препаратов. Однако с применением LS формы не удалось достичь показателей интактного контроля. По всей видимости, АОА липидов зависит как от количества используемых антиоксидантов (Quer и CoQ₁₀), так и от их взаимовлияния. Кроме того, необходимо учитывать возможность влияния на АОА веществ, которые сами не оказывают анти- или прооксидантного действия, но способны усиливать или ингибировать действие антиоксидантов в условиях эксперимента. Одновременно установлена более высокая АОА CoQ₁₀ по сравнению с Quer.

При изучении АОА монопрепаратов LS форм Queg и CoQ₁₀ на модели ИБС (таблица 1.8) показано снижение содержания МДА на 40,80 % и ДК на 29,5 % в ткани сердца при введении Queg и снижение содержания МДА на 54,0 % и ДК на 34,6 % при введении CoQ₁₀ по сравнению с животными с моделью ИБС. В то же время использование комплексного препарата позволило снизить количество МДА на 75,0 % и ДК на 64,4 % ($p < 0.005$) практически до уровня интактного контроля.

Полученные данные (таблицы 1.7 и 1.8) демонстрируют повышение уровня SOD и каталазы как в сыворотке крови, так и в сердечной мышце на модели ИБС. Эти данные согласуются с результатами имеющимися в литературе [2, 3]. Так, например, препараты Queg и дигидрокверцетин, снижающие содержание продуктов ПОЛ или сдерживающие их накопление во время гипоксического действия, повышают активность антиоксидантных ферментов за счёт устранения ингибирующего влияния на них продуктов перекисного метаболизма, а также возможно, что флавоноиды способны вызывать прямое влияние на ферменты, взаимодействуя с аминокислотными радикалами полипептидной цепи, тем самым, изменяя конформацию белковой молекулы, что способствует изменению свойств фермента. С этим может быть связано увеличение активности SOD и каталазы выше контрольного уровня [23–25]. Показано, что на 1–2 сутки после инфаркта миокарда у человека повышается содержание SOD в 2,1 раза, по сравнению со здоровыми людьми, что может быть связано с её компенсаторной аллостерической активацией в условиях гиперпродукции супероксидного анион-радикала, который является активатором и одновременно ингибитором каталазы. К 10–14 дню активность SOD снижается и тем не менее содержание выше в 1,4 раза по сравнению с контролем [24, 25]. Установлено, что мощные антиоксиданты не только обладают высокой функцией «ловушек» свободных радикалов, но и повышают ферментативную активность SOD. Применение CoQ₁₀ вызывало достоверное увеличение эндотелий-зависимой релаксации плечевой артерии за счёт, как предположили авторы, повышения активности SOD при ИБС у людей [26].

Таким образом, полученные нами данные демонстрируют эффективность антиоксидантного действия при в/в введении комплексного препарата, содержащего Queg и CoQ₁₀ в LS форме. Показано снижение продуктов ПОЛ и повышение активности системы АОА на модели ИБС у крыс, получавших комплексный препарат, по сравнению с монопрепаратами в LS форме. При оценке исследования маркеров окислительного стресса необходимо учитывать возможное влияние свободнорадикальных реакций на липиды мембран, белки, ДНК и углеводы.

LS-CoQ₁₀ вводят в/в, ингаляционно, *per os* и наружно. Возможность местного применения LS-CoQ₁₀ показана в работе [27]. Получена LS композиция, состоящая из SPC и α -токоферола. Получены LS с размером менее 200 нм, при достаточно узком распределении их по размеру. В качестве модели использовали кожу крыс. Кожу животных обрабатывали эмульсией LS-CoQ₁₀. Обработка LS эмульсией кожи достоверно ($p < 0,05$) увеличивало накопление CoQ₁₀ в коже в 2 раза по сравнению с неинкапсулированной суспензией. Авторы считают, что обработка LS-CoQ₁₀ является весьма перспективным для местного применения.

За последние годы интерес к LS-CoQ₁₀ не уменьшается. Появляются новые оригинальные работы, направленные на создание комплексных LS препаратов антиоксидантов, включающих CoQ₁₀. В работе [28] проведено создание препарата содержащего CoQ₁₀ и D-пантотол триацетат. Последнее соединение является производным пантотола (провитамин B₅), способного стимулировать восстановление кожи, ликвидировать раздражение и опрелости. Кроме того, D-пантотол триацетат обладает увлажняющим и противовоспалительным действием и необходим для синтеза коэнзима А в эпителии. Были получены LS, содержащие оба компонента, где на 100 мг SPC приходилось 4,17 мг CoQ₁₀, 4,22 мг D-пантотол триацетата, 13,95 мг Chol. Эффективность включения в LS для CoQ₁₀ составляла 90,89 %, а для D-пантотол триацетата 87,84 %. Средний размер наночастиц составлял $161,6 \pm 3,6$ нм. При помощи электронной микроскопии была подтверждена сферическая и гомогенная форма частиц. LS получены технологией гидратации липидной плёнки, содержащей все компоненты забуференным фосфатным 0,9 % раствором натрия хлорида, затем для

уменьшения размера эмульсию пропускали через поликарбонатные мембраны с размером пор 200 нм – 15 раз. Полученные однослойные частицы центрифугировали при 3000 g в течение 10 минут, проводя отделение избыточных липидов и невключённых субстанций. Авторы подтвердили стабильность полученных LS и изучили высвобождение действующих веществ *in vitro*.

Для получения длительно циркулирующих LS с CoQ₁₀ используют ряд соединений, защищающих наночастицы путём экранирования поверхности [8, 29, 30]. Получены LS, содержащие CoQ₁₀ и состоящие из нескольких компонентов: DSPE-PEG-2000, DPPG, Chol, витамин E. Все компоненты растворяли в хлороформе. Наночастицы получали, используя метод липидной плёнки, которую получали упариванием в вакууме при 25 °C, с последующей обработкой газообразным азотом. Плёнку гидратировали водой, обрабатывали ультразвуком и проводили экструзию через поликарбонатные фильтры с размером пор 0,22 мкм. Полученные LS лиофилизировали. Авторами предложен метод для определения инкапсуляции в наночастицы CoQ₁₀. Для определения включения использовали протамин сульфат, который взаимодействует с LS и образует комплекс (адсорбция за счёт электростатического взаимодействия). Свободный CoQ₁₀ с протамином сульфатом не взаимодействует. В связи с низкой растворимостью CoQ₁₀ в воде авторами не использованы методы: высокоскоростного центрифугирования, равновесного диализа, фильтрация через сефадекс для отделения свободного CoQ₁₀. В работе приводится характеристика препарата: Z-потенциал -22,2 мВ; средний размер 166 нм, LS гомогенны, включение CoQ₁₀ 93,2 – 98,2 %.

Список литературы

1. Шахмаев А.Е. Получение липосомальных форм гидрофобных антиоксидантов / А.Е. Шахмаев, Ю.М. Краснополский // Вісник НТУ «ХП». – 2012. – № 66 (972). – С. 141–157.
2. Аронов Д.М. Применение Коэнзима Q10 в кардиологической практике / Д.М. Аронов // Российский медицинский журнал. – 2004. – 12(15). – С. 905–909.

3. Коэнзим Q10 (убихинон) в клинической практике / Под ред. Л.П. Гринио. – М.: Медицина, 2006. – 120 с.
4. Zittarru G. Coenzyme Q10 and Statins: Biochemical and Clinical Implications / G. Zittarru, P. Zangsoen // Mitochondrion. – 2007. – V.7, № 2. – P. 168–174.
5. Xia F. Preparation of Coenzyme Q10 Liposomes Using Supercritical anti-Solvent Technique / F. Xia, H. Jin, Y. Zhao, X. Guo // J. of Microencapsulation. – 2012. – V.29, №1. – P. 21–29.
6. Protective Effect of Coenzyme Q10-Loaded Liposomes on the Myocardium in Rabbits with an Acute Experimental Myocardial Infarction / D.D. Verma, W.C. Hartner, V. Thakkar [et al.] // Pharmaceutical Research. – 2007. – V. 24, № 11. – P. 2131–2137.
7. Ebrahim S. Application of Liposomes in Ophthalmology / S. Ebrahim, G. A. Peyman, P.J. Lee // Survey of Ophthalmology. – 2005. – V. 50, № 2. – P. 167–181
8. Zhang J. Topical Use of Coenzyme Q10-Loaded Liposomes Coated with Trimethyl Chitosan: Tolerance, Precorneal Retention and Anti-Cataract Effect / J. Zhang, S. Wang // International Journal of Pharmaceutics. – 2009. – V. 372, № 1–2. – P. 66–75.
9. Coenzyme Q10 Protect the Aging Heart Against Stress: Studies in Rats, Human Tissues, and Patients / F.L. Rosenfeldt, S. Pepe, A. Linnane [et. al] // Ann. N. N. Acad. Sci. – 2002. – V. 959, № 3. – P. 355–359.
10. Coenzyme Q10 Improves Psychiatric Symptoms in Adult-Onset Mitochondrial Myopathy, Encephalopathy, Lactic Acidosis and Stroke-Like Episodes: A Case Report / T. Shinkai, M. Nakashima, O. Ohmori [et al.] // Aust. N. Z. J. Psychiatry. – 2000. – V. 34, № 6. – P. 1034–1038.
11. ESP and Monolayer Study of the Localization of Coenzyme Q10 in Artificial Membranes / M. Grzybek, K. Stebelska, P. Wyrozumska [et al.] // Gen. Physiol. and Biophys. – 2005. – V. 24, № 4. – P. 449–460.
12. Xia S. Improved Assay of Coenzyme Q10 From Liposomes by Tween 80 in Solubilisation and UV Spectrophotometry / S. Xia, S. Xu // J. of the Science of Food and Agriculture. – 2006. – V. 86, № 13. – P. 2119–2127.
13. Шахмаев А.Е. Исследование влияния технологических параметров на свойства липосомальных наночастиц / А.Е. Шахмаев, И.В. Волчик,

- Ю.М. Краснопольский, В.И. Швец // Фармаком. – 2011. – № 3. – С. 88–96.
14. Исследование влияния технологических параметров на свойства липосомальных наночастиц / А.Е. Шахмаев, Д.С. Бида, И.В. Волчик [и др.] // Фармаком. – 2012. – № 1–2. – С. 82–87.
 15. Шахмаев А.Е. Технологические принципы получения липосомальных лекарственных препаратов / А.Е. Шахмаев, И.В. Волчик, Ю.М. Краснопольский, В.И. Швец // Украинский биофармацевтический журнал. – 2012. – Т. 21, № 4. – С. 4–14.
 16. Шахмаев А.Е. Изучение фармакологической активности препарата, содержащего гидрофобные биологически активные компоненты / А.Е. Шахмаев, И.В. Волчик, Ю.М. Краснопольский // Украинский Биофармацевтический журнал. – 2013. – № 4. – С. 40–43.
 17. Шахмаев А.С. Створення ліпосомальної форми гідрофобного антиоксиданту убіхінону / А.С. Шахмаєв, Т.В. Горбач, І.В. Волчик, Ю.М. Краснопольський // Фармаком. – 2014. – № 3. – С. 27–36.
 18. Исследование методов включения лекарственных субстанций в липосомальные наночастицы / А.Е. Шахмаев, А.Л. Кацай, В.В. Прохоров [и др.] // Ремедиум. – 2015. – № 12. – С. 56–59.
 19. Lenaz G. Mobility and Function of Coenzyme Q (Ubiquinone) in the Mitochondrial Respiratory Chain / G. Lenaz, M.L. Genova // Biochim Biophys Acta. – 2009. – V.1787, № 6. – P. 563–573.
 20. Linnane A.W. Coenzyme Q10 – Its Role as a Prooxidant in the Formation of Superoxide Anion/Hydrogen Peroxide and the Regulation of the Metabolome / A.W. Linnane, M. Kios, L. Vitetta // Mitochondrion. – 2007. – 7S. – S. 51–61.
 21. Ковалев В.Б. Механизмы действия биофлавоноида кверцетина / В.Б. Ковалев, В.В. Ковзан, Е.Ю. Кончина // Украинский медицинский альманах. – 1999. – Т. 2, № 4. – С. 176–184.
 22. Rangar S. Nanoparticle-Based Drug Delivery System / S. Rangar, P. Sirohi, P. Verma, V. Agarwal // Brazilian Archives of Biology and Technology. – 2014. – V. 57, № 2. – P. 209–222.
 23. Ключкова Г.Р. Ремоделирование миокарда и перекисное окисление липидов при ишемической болезни сердца : авт. дис. на соиск. уч. степ. канд. мед. наук : спец. 14.01.05 «Кардиология» / Г.Р. Ключкова. – Уфа, 2010. – 23 с.
 24. Клинико-фармакологические аспекты применения антиоксидантных лекарственных средств / О.А. Горошко, В.Г. Кукес, А.Б. Прокофьев [и др.] // Междунар. журнал прикладных и фундамент. исследований. – 2016. – № 4(5). – С. 905–912.
 25. Накусов Т.Т. Влияние кверцетина и дигидрокверцетина на свободно радикальные процессы в разных органах и тканях крыс при гипоксии : авт. дис. на соиск. уч. степ. канд. биол. наук : спец. 03.01.04 «Биохимия» / Т.Т. Накусов. – Ростов-на Дону, 2010. – 23 с.
 26. Effect of Coenzyme Q10 Administration on Endothelial Function and Extracellular Superoxide Dismutase in Patients with Ischaemic Heart Disease: A Double-Blind, Randomized Controlled Study / L. Tian, S. Belardinelli, P. Carnevali [et al.] // Eur. Heart J. – 2007. – V. 28, № 18. – P. 2249–2255.
 27. Lee W.C. Preparation and Characterization of Liposomal Coenzyme Q10 for *in vivo* Tropical Application / W.C. Lee, T.H. Tsai // Int. J. Pharmaceutics. – 2010. – V. 395, № 1. – P. 78–83.
 28. Celik B. Design, Optimization and Characterization of Coenzyme Q10 – and D-Pathenyl Triacetat-Loaded Liposomes / B. Celik, A.A. Sagiroglu, S. Ozdemir // Int. J. of Nanomedicine. – 2017. – V. 12. – P. 4869–4878.
 29. Li H. Preparation and Quality Evaluation of Coenzyme Q10 Long-Circulating Liposomes / H. Li, F. Chen // Saudi J. Biol. Chem. – 2017. – V. 24, № 4. – P. 797–802.
 30. Zhao G.D. Development and Characterization, of a Novel Chitosan-Cjated Antioxidant Liposome Containing Both Coenzyme Q10 and Alpha-Lipoic Acid / G.D. Zhao, R. Sun, S. L. Ni, Q. Xia // J. of Microencapsulation. – 2015. – V. 32, № 2. – P. 157–165.

2. ПРИКЛАДНЫЕ АСПЕКТЫ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ ПРОТЕОЛИТИЧЕСКИХ ФЕРМЕНТОВ В ПРОЦЕССАХ БИОКАТАЛИЗА И БИОТРАНСФОРМАЦИИ

А.А. Варанкина, Д.В. Лаврик

2.1. Актуальность исследования активности протеолитических ферментов с целью их практического использования

Ферменты или энзимы – вещества биологического происхождения, которые ускоряют химические реакции. По своей природе практически все ферменты являются белками или комплексами, содержащими как белковый компонент (апофермент), так и небелковый компонент (кофактор). Ферменты обладают специфичностью действия на определённое вещество (субстрат) и играют ключевую роль в регуляции протекания химических реакций в живых системах, а также в последнее время активно используются человеком в различных отраслях народного хозяйства [1].

Протеолитические ферменты, или пептидазы (пептид-гидролазы, протеазы), катализируют гидролитический распад, как пептидной связи белков, так и некоторые другие связи, например, эфирные, амидные. Пептидазы принадлежат к наиболее распространённым гидролитическим ферментам [1–3]. Основным показателем, по которому определяют качество ферментных препаратов данной группы, является протеолитическая активность. Знать ее значение необходимо для определения количества и условий внесения препарата при проведении различных биотехнологических процессов.

Протеолитическая активность – показатель, который является характеристикой эффективности действия протеолитического фермента и представляет собой количество субстрата, который был преобразован в единицу времени. Кроме специфичности активность, как показатель, играет ключевую роль при подборе фермента для конкретного преобразования и определении оптимальной его концентрации. Однако при разработке новых видов комплексных или моноферментных препаратов и изменении сфер их применения необходимо в каждом отдельном случае предварительно проводить исследования по определению протеолитической активности, которая не является универсальным или постоянным показателем, а может меняться в зависимости от условий производства. Поэтому, изучение протеолитической активности ферментов с целью включения их в состав различных продуктов или для использования в процессах биокатализа или биотрансформации является актуальным и перспективным.

В последнее время все большую роль начинают играть продукты промышленных биотехнологий, которые используются в повседневной жизни. Одной из сфер применения ферментных препаратов протеолитического действия является включение их в состав моющих средств в качестве активных веществ, способствующих очищению тканей и материалов от белковых загрязнений.

Моющие средства (синтетические сухие, жидкие моющие и другие) с ферментами в настоящее время пользуются повышенным спросом у потребителей, и их использование имеет ряд преимуществ по сравнению с химическими средствами без биологически активных веществ:

- экологическая безопасность (биоразложение активных веществ после использования);
- «мягкие» условия протекания реакции;
- энергетическая эффективность (уменьшение расходов за счёт понижения температуры и сокращения времени протекания реакции);
- максимальная эффективность за счёт ферментативной субстратной специфичности.

Однако для «разумного» использования моющих средств, нужно очень хорошо понимать, как они работают и при каких условиях. Это поможет оптимизировать формулы потребительских товаров и использовать минимально допустимые количества активных веществ. Первым шагом, который нужно сделать для использования ферментов в промышленности, является определение специфичности реакции и подбор активных компонентов, которые были бы способны удовлетворить цель. Известно, что наиболее распространёнными и сложными для удаления являются загрязнения белковой природы (кровь, пот и т.д.), поэтому в работе акцент сделан именно на удаление этих веществ.

Цель исследования заключается в определении условий, при которых фермент будет проявлять максимальную протеолитическую активность для обоснования композиции препарата для применения в составе моющего средства.

Объект исследования – процесс распада белков под действием ферментов, который лежит в основе определения протеолитической активности и действия данной категории препаратов.

Предмет исследования – ферментный препарат протеолитического действия (смесь протеолитических ферментов в сухом виде); протеолитическая активность ферментного препарата, загрязнения белкового происхождения.

2.2. Характеристика протеолитических ферментов

Классификация протеолитических ферментов. Все ферменты делятся на шесть основных классов, в зависимости от типа реакции, которую они катализируют. Оксидоредуктазы – катализируют окислительно-восстановительные реакции. Трансферазы – переносят функциональные группы с одного субстрата на другой. Гидролазы – участвуют в переносе групп; акцептором является молекула воды. Лиазы (синтазы) – катализируют расщепление или образования химических соединений с исчезновением двойных связей. Изомеразы – катализируют реакции изомеризации. Лигазы (синтетазы) – катализируют энергозависимые реакции присоединения [1, 2, 4, 5].

Протеолитические ферменты относятся к классу гидролаз, в составе которого образуют особый подкласс пептидаз или пептид-гидролаз (в качестве синонима возможно использовать термин «протеаза»). Пептид-гидролазы катализируют реакцию расщепления пептидной связи в белках и пептидах, которая изображена на рисунке 2.1. Многие ферменты этой группы, вместе с реакциями гидролиза пептидных связей, катализируют реакции переноса аминокислотных остатков на другие акцепторы, так называемые реакции транспептидации [6, 7].

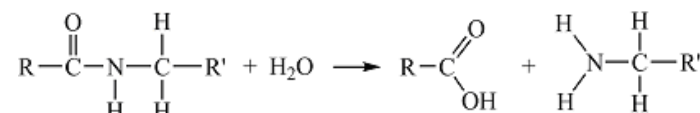


Рисунок 2.1 – Схема действия протеолитического фермента

Пептид-гидролазы делятся на две группы: экзопептидазы, расщепляющие пептидную связь вблизи концов белковой молекулы, и эндопептидазы, расщепляющие внутренние пептидные связи в белках. Классификация протеолитических ферментов основана на принципах каталитического механизма действия ферментов, зависящих от субстратной специфичности, природы нескольких аминокислот, расположенных вблизи участка гидролиза, конформации аминокислот. Группа экзопептидаз делится на несколько субподклассов: аминопептидазы, отщепляющие один аминокислотный остаток от N-конца полипептидной цепи; дипептидилпептидазы, отщепляющие дипептид от N-конца, и трипептидилпептидазы, отщепляющие трипептид от N-конца; карбоксипептидазы, отщепляющие аминокислоту с C-конца, которые на основе каталитического механизма делятся на сериновые, цистеиновые и металлокарбоксипептидазы; пептидил-дипептидазы, осуществляющие гидролиз дипептидов с C-конца белковой молекулы; дипептидазы, отщепляющие дипептиды с любого конца полипептидной цепи; омега пептидазы, отщепляющие терминальные остатки, которые представлены циклическими аминокислотами или связаны изопептидной связью. Эндопептидазы делятся на следующие субподклассы в зависимости от каталитического механизма: сериновые эндопептидазы; цистеиновые эндопептидазы; аспартатные

эндопептидазы; металлоэндопептидазы; треониновые эндопептидазы; эндопептидазы, которые не могут быть отнесены ни к одному из выше перечисленных субподклассов. С появлением новых исследований по установлению механизмов действия протеолитических ферментов в их классификации происходят изменения, в результате чего некоторые ферменты могут быть отнесены к другим субподклассам [1, 5, 8, 9, 10].

По характерной рН активности протеолитических ферментов их разделяют на три типа: кислые, нейтральные и щелочные. В настоящее время производят различные протеазы, которые действуют в широких зонах рН – от 1,8 до 10,5 и выше [3, 11].

Механизм действия протеолитических ферментов. Гидролиз амидной связи является многостадийным процессом, сопровождающимся ступенчатым снижением энергии связи за счёт её поляризации. Резонансная дестабилизация амидной группы играет доминирующую роль в образовании её реакционной формы [12, 13].

На первой стадии ассоциации фермент и субстрат образуют первичный нековалентный комплекс, в котором оба компонента теряют почти все трансляционные степени свободы. В этом комплексе происходит присоединение субстрата и, возможно, вытеснение молекул воды, расположенных в активном центре фермента. На следующих этапах реализуется максимально возможное число взаимодействий между субстратом и центром белка, и в ходе этого процесса создаются условия для образования реакционной формы субстрата [12, 13].

В продуктивном комплексе эта активная резонансно-дестабилизированная форма стабилизируется благодаря взаимодействию изменённого реакционного фрагмента субстрата с соответственно изменёнными группами активного центра фермента. Это осуществляется путём конформационных перестроек, вероятно сопровождаясь перераспределением электронной плотности. Итак, в продуктивном комплексе фермент является комплементарным субстрату с дестабилизированной амидной связью, то есть в его термодинамически невыгодной реакционной форме. Ряд экспериментальных данных подтверждает существование такой активной формы в исходном комплексе. Так, свободная энергия гидролиза

амидов, которая является мерой их резонансной стабилизации, коррелирует со скоростью расщепления протеолитическим ферментом только в случае полуспецифических субстратов, а не специфических дипептидных субстратов, имеющих такие группы, как глицин и аланин. Это указывает на разный тип связывания полуспецифических и специфических субстратов в комплексах. Также сопоставление скоростей гидролиза амидов и скоростей образования полуацетала кетонов показывает, что резонансная стабилизация вносит основной вклад в свободную энергию преобразования амида в промежуточное соединение. Присоединение же нуклеофила к резонансно-дестабилизированным амидам происходит практически без затраты энергии [12, 13].

Скорость действия фермента может быть лимитирована способностью молекулы фермента выполнить нужные конформационные изменения. Если форма и конфигурация молекул протеаз и белка подобные, то каталитическое действие активного центра фермента окажется настолько сильным, что приведёт к расщеплению С–N-связи. Гидролиз пептидной связи белковой молекулы различные протеазы катализируют по-разному. Определяющим фактором является природа аминокислотных боковых цепей и других групп по соседству с гидролизованной связью. Некоторые протеазы действуют на одну из возможных пространственных конфигураций, другие – на их группу, сходных по структуре, и характеризуются широкой белковой специфичностью. В зависимости от происхождения протеаз продукты гидролиза (свободные аминокислоты, дипептиды, полипептиды, пептоны) различаются между собой. Для разных целей и разных белков используют различные протеазы [2, 3, 12, 13].

Протеазы имеют широкую специфичность: они могут расщеплять различные связи в молекулах белков – быстро разрывают определённые связи в пептидных цепях, а также медленнее разрушают и множество других нехарактерных связей. Поэтому необходимо в каждом отдельном случае очень тщательно подбирать используемый протеазный комплекс или комбинацию ферментов. При правильном подборе ферментов и соответствующих условий (рН, температуры, времени действия и количества фермента) большинство белков может быть расщеплено до желаемой степени гидролиза вплоть до отдельных аминокислот [4].

Сырье для получения протеолитических ферментов. В настоящее время мировая промышленность выпускает протеолитические ферменты, которые выделяют из различных источников сырья, секретирующих ферменты. Для получения ферментов используют клеточную массу микроорганизмов, реже – культуру клеток или тканей растительного или животного происхождения; семена, проростки или органы растений; органы и ткани животных.

Так, например, источником сериновых протеаз (литических протеаз, химотрипсина, проназы, трипсина, щелочной бактериальной протеазы, римопротелина) является сырье животного и микробного происхождения. Сырье растительного происхождения (ананас *Ananas spp.*, инжир *Ficus spp.* и др.) используют для производства тиоловых протеолитических ферментов: бромелаина, фицина, папаина, химопапаинов А и В. Производство протеаз растительного происхождения, в основном, ограничено тропическими и субтропическими зонами. Источником кислых протеаз может служить сырье животного происхождения. Например, ферментный комплекс, секретируемый в поджелудочной железе млекопитающих, состоящий из ферментов различной субстратной специфичности: трипсина, химотрипсинов А и В, химотрипсина С, карбоксипептидазы. Микроскопические грибы (аспергиллы, пенициллы, мукооровые) служат сырьем для получения протеолитических ферментов, входящих в состав комплексных препаратов: амилоризина, пектаваморина, целловиридина и других [14, 15, 16, 17].

Синтез протеолитических ферментов микроорганизмами. Получение ферментных препаратов с помощью микроорганизмов является наиболее перспективным способом, так как не связано с ограничениями климата и поставкой сырья животного происхождения. Многие микроорганизмы в состоянии синтезировать различные по специфичности протеолитические ферменты. Из ферментов микробного происхождения чаще всего используют бактериальные и грибные протеазы. Последние, являясь в большинстве случаев смесью нескольких ферментов, обладают более широкой субстратной специфичностью.

Так, например, *Asp. oryzae*, *Asp. flavus*, *Asp. fumigatus*, *Asp. terricola*, *Asp. sojae*, *Pen. chrysogenum*, *Monilia sitophila* продуцируют протеазы, зо-

на действия которых варьирует от pH = 3,7 до 10 с проявлением оптимума вблизи pH = 6,5; отмечается слабая активность при pH = 3,0. *Asp. awamori*, *Asp. saitoi*, *Asp. usamii*, *Rhizopus javanicus*, *Pen. expansum*, *Pen. sponolasum* образуют главным образом протеазы с оптимумом pH = 2,5–3,0 [3].

Большая группа микроскопических грибов (*Pen. luteum*, *Rhizopus formosensis*, *Mucor hiemalis*, *Mucor racemosus*) синтезирует протеазы, активные при pH 6,0. Актиномицеты *Streptomyces (Actinomyces) griseus* (4 штамма), *Act. streptomycinicus kras.*, *Str. fradiae*, *Str. faecalis* производят нейтральные и щелочные протеазы с оптимумом pH 7,5–10,8, а *Asp. sojae* – pH = 9–10. Некоторые виды и штаммы плесневых грибов синтезируют кислую протеазу, как единственный компонент протеолитических ферментов. К таким микроорганизмам относятся *Asp. saitoi* (штаммы R-0221A, R-3813, мутант UV-13), мутанты *Asp. awamori* 78-2, *Asp. fumigatus u Asp. oryzae* 251-90, *Asp. flavus* 74 [3].

В настоящее время известны штаммы грибов и бактерий, которые активно продуцируют ферменты, обладающие способностью коагулировать белки молока. Для получения микробного сычужного фермента используют такие микроорганизмы: *Mucor pusilus* F-27, *Rhizopus peka* 1, *Monascus anka*, *Ascochyta visa*, *Sclerotium ozyzae-sativa*, *Colletotrichum atramentarium*, *Asp. candidus*, *Bac. subtilis*, *Bac. mesentericus*, *Endothia parasitica* [3, 18].

Многие микроскопические грибы – *Str. griseus*, *Rhiz. javanicus*, *Pen. chrysogenum*, *Pen. luteum*, *Asp. terricola*, *Bac. mesentericus*, *Micromonospora vulgaris* 42, *Act. rimosus*, наоборот, в состоянии производить одновременно несколько протеаз, которые проявляют каталитическую действие при кислой, нейтральной и щелочной реакции среды. Кроме того, препараты протеаз, выделенные из *Str. griseus* (протелин) и *Act. rimosus* (римопротелин) оказались весьма активными. В частности, при гидролизе проколлагена распад достигает 70 % полного расщепления до аминокислот [3].

Сырьем бактериального происхождения для получения протеаз может служить биомасса микроорганизмов следующих видов: *Bac. circulans*, *Bac. subtilis*, *Bac. sphaericus*, *Bac. thermophilus*, *Bac. aerothermophilus*, *Bac. thermoacidurans*, *Bac. thermoproteolyticus*, *Bac. brevis* № 2, *Bac. brevis* № 224, *Bac. mesentericus* и других бактерий, относящиеся к роду

Bacillus или *Thermobacillus*. Протеазы, образованные данными микроорганизмами, сохраняют активность в широком интервале рН, с оптимумом при рН = 6,6–7,0 [3].

Анаэробные бактерии *Cl. perfringens*, *Cl. histolyticum* и *Cl. sporogenes* образуют настоящие коллагеназы, действующих на коллаген, т. е. фибриллярные белки соединительной ткани сухожилий, связок, кожи (дермы). Фермент проявляет оптимум действия при рН = 7,7–8,0 [3].

Процесс получения протеолитических ферментов. Биотехнологический процесс производства ферментных препаратов включает два основных этапа:

- 1) культивирование микроорганизмов, реже – клеток и тканей растительного или животного происхождения, с целью получения культуральной жидкости, содержащей фермент с заданными свойствами;
- 2) выделение из культуральной жидкости или органов и тканей растительного или животного происхождения необходимых ферментов в виде комплекса, или в виде отдельных очищенных препаратов [4].

Первый этап является преимущественно задачей биотехнологов, второй – биохимиков [4].

Необходимо, чтобы сырье или материал для выделения ферментов были легкодоступными в больших количествах. Также желательно, чтобы содержание ферментов в таком сырье составляло более 1 % от общего количества белков, что облегчает процесс их выделения [4].

Увеличения концентрации ферментов в биомассе можно достичь в условиях их индуцированного образования. Например, содержание в клетках кишечной палочки кислой фосфатазы (относится к гидролазам) при ее индуцированном синтезе доходит до 6 % (и выше) от общего сухого веса клеток. В этом и аналогичных случаях для получения чистого фермента достаточно 50 – 200 г клеточной массы. В тканях животных активность некоторых ферментов может быть повышена путём предварительного введения в организм субстрата определённого состава. Также

доказано, что активность многих ферментов значительно повышается при прорастании семян растений, поэтому при выделении растительных ферментов нередко используют 5 – 10-дневные проростки [4].

При выделении ферментов из тканей животного происхождения необходимо все операции проводить при охлаждении, учитывая лабильность большинства ферментов. Желательно, чтобы ткани животных после механического отделения жира и соединительной ткани были немедленно охлаждённые и использованы для обработки. Иногда свежий материал замораживают и хранят при минус 20 °С, что позволяет сохранять активность некоторых ферментов в течение месяцев. Замораживание способствует выходу ферментов из клеток в раствор, вызывая денатурацию неактивных белков. При выделении ферментов из ткани печени рекомендуется предварительно выдерживать животных короткое время без пищи для снижения содержания в печени гликогена, присутствие которого часто мешает при определении активности и очистке ферментов [4].

Практическое использование протеолитических ферментов.

Протеолитические ферменты играют важную роль в обмене веществ всех живых организмов, начиная от бактерий и низших грибов, и заканчивая высшими животными и человеком. Помимо своей основной функции – расщепление белков пищи до аминокислот, протеолитические ферменты несут ряд более специфических функций. Так, протеолиз лежит в основе таких жизненно важных процессов, как свёртывание крови и лизис тромбов, образовании ряда белковых гормонов (например, инсулина) и других физиологически активных пептидов [6, 19, 20].

Широко используют протеолитические ферменты в белковой химии: для изучения первичной структуры белков и пептидов; протеазы в чистом виде и в сравнительно больших количествах сами являются объектом для изучения первичной, вторичной и третичной структуры белков, строения активных центров ферментов, регуляции ферментативной активности [6].

Протеолитические ферменты широко используют в народном хозяйстве: в пищевой (сыроварение, производство хлеба, мясных продуктов), лёгкой промышленности, медицине, сельском хозяйстве. Исполь-

зуют протеазы животного происхождения (трипсин, пепсин, химотрипсин, сычужный фермент) и растительного происхождения (папаин, фицин, бромелаин). Однако больше всего используют протеазы микроорганизмов. Препараты бактерий и грибов, применяемых в практике, обычно представляют собой смеси эндопептидаз и экзопептидаз [4, 14, 15–22].

Протеолитические ферменты используют в пищевой промышленности. Протеазы относят к пищевым добавкам группы с индексом E1101, в которую входят: протеаза (*i*), папаин (*ii*), бромелаин (*iii*) и (*iv*) фицин. Например, в хлебопечении протеазы используют для изменения свойств клейковины благодаря их действию на внутренние пептидные связи белков. Наиболее подходящей для теста считается протеаза, полученная от *Bacillus subtilis*. Протеаза в тесте используется для снижения вязкости и эластичности, что желателно для машинной обработки, особенно при использовании муки с очень сильной клейковиной [21].

В мясной, птицеперерабатывающей, рыбной промышленности протеолитические ферменты используются для получения гидролизатов сырья и для мягчения (тендеризации) мяса, мясных изделий, рыбы, что облегчает и ускоряет обработку полупродуктов, повышает их качество [14, 18, 22].

В молочной промышленности протеазы применяют при производстве творога и сыров. Широко используют молокосвёртывающий сычужный препарат, который представляет собой смесь протеолитических ферментов. Наиболее качественный сычужный препарат, получаемый из желудка молочных телят, содержит: химозин, пепсина А и В. Также широкое распространение получили сычужные препараты микробного происхождения, продуцентами которых являются *Endothia parasitica*, *Mucor pusillus*, *Mucor miehei*. В производстве мягких сыров с дополнительным использованием растительного сырья (например, сои) протеолитические ферменты применяют для протеолиза растительных белков, входящих в состав эмульсии [18].

Протеолитические ферментные препараты успешно используют в крахмало-паточной промышленности для выделения особо чистого крахмала без сопутствующих белков [18]. Протеазы используют в процессах производства пива, винодельческой продукции, плодово-ягодных соков

для удаления различного рода белковых помутнений и для ускорения фильтрационных процессов [18].

Протеолитические ферменты входят в состав многих ферментных препаратов, применяемых для лечения заболеваний желудочно-кишечного тракта (при нарушении процесса пищеварения в тонком кишечнике; для коррекции секреторной дисфункции желудка). Так, лекарственные средства, содержащие пепсин из экстрактов слизистой оболочки желудка, используют при гастрите с пониженной кислотностью. Препараты, содержащие ферменты поджелудочной железы домашних животных (например, панкреатин), способствуют купированию клинических признаков внешнесекреторной недостаточности поджелудочной железы (снижение аппетита, тошнота, метеоризм и др.) [23].

В медицине протеолитические ферменты используют не только в лечении заболеваний пищеварительной системы, но и в качестве средств биологической антисептики (химотрипсин, трипсин, террилитин, коллагелизин, стрептокиназа, аспераза, коллагеназа, клостридиопептидаза А), которые не уступают по эффективности другим биологическим антисептикам. Протеазы используют в хирургии, офтальмологии, пульмонологии, отоларингологии, стоматологии. Протеазы вводят в состав зубных паст для обеспечения антимикробного действия и защиты зубов от кариеса. Протеазы оказывают фибринолитическое, некролитическое, противоотечное и противовоспалительное действия; обладают иммуномодулирующим эффектом, регулируют регенеративные процессы, улучшают микроциркуляцию крови [24].

В сельском хозяйстве, например, применение экзогенных ферментов является одной из наиболее хорошо изученных областей в птицеводческой науке. К 2010 году использование экзогенных ферментов получило признание в качестве эффективного способа улучшения использования питательных веществ и снижения затрат на корма. Из всех применяемых в кормлении ферментов наиболее широко используется фитаза (гидролаза), она входит в состав более 94 % кормов для бройлеров во всём мире. Однако в корма для бройлеров вводят не только фитазу, но и экзогенные карбогидразы и протеазы. Применение комбинаций экзогенных карбо-

гидраз, протеазы и фитазы может быть экономически оправданным, поскольку позволяет улучшить выход мяса тушки и её состав [22].

В текстильной промышленности при производстве ткани используют протеазы для снятия излишка белковых «масел», которые используют для повышения прочности нити. Используют препараты протеаз растительного или грибного происхождения, но наиболее эффективными являются бактериальные ферменты. Их действие наиболее интенсивно, в наибольшей степени повышается капиллярность ткани и её сорбционные свойства, что способствует лучшему отбеливанию и обесцвечиванию [4].

Протеолитические ферменты используют для очистки, так как они обладают моющим действием. Их используют в определённых количествах при стирке белья, для чистки одежды и тканей мебели, автомобилей, для удаления белковых пятен. Чаще всего применяются ферменты бактерий, затем грибов и, реже, панкреатин (трипсин), причём для чистки выпускаются специальные запатентованные препараты. Они служат, в частности, для выведения пятен крови, что очень важно при стирке в медицинских учреждениях, госпиталях, а также для выведения пятен молока, яиц и др. Органические растворители таких пятен не снимают, а, наоборот, закрепляют их на ткани. Протеазы же снимают их легко, гидролизуют белок и переводят его в растворимое состояние. В наше время для подобных целей применяют не только протеазы, но и амилазы, гидролизующие крахмал, а также липазы, расщепляющие жир. Синтетические моющие средства (СМС), применяемые вместе с ферментами (протеазами, липазами и амилазами), при соответствующих физико-химических условиях и надлежащем составе дают значительно лучшие результаты, чем обычные моющие препараты при удалении стойких пятен, образованных белками, крахмалом и жирами [4].

2.3. Постановка задач исследования активности протеолитических ферментов с целью их практического использования

Свойства и преимущества практического использования ферментов. Свойства обуславливают рентабельность и эффективность прак-

тического использования ферментных препаратов. Преимущества использования ферментов, в том числе и протеолитических, состоят в следующем [1, 4]:

1. Ферменты действуют в очень малых количествах, превращая при этом огромные массы субстратов, на которые они влияют. Например, 1 г пепсина, способен расщепить 50 кг свернувшегося яичного белка; 1 г кристаллического реннина заставляет свернуться 72 т молока.

2. Высокая скорость действия ферментов, которую легко регулировать, изменяя условия протекания реакций (рН, температуру, количество внесенного биокатализатора).

3. «Мягкие» условия действия ферментов (невысокие температуры обычно в интервале 30–60 °С; нейтральная или близкая к нейтральной реакция среды; отсутствие необходимости в вакууме или поддержании высоких значений давления, что позволяет упростить, а следовательно удешевить аппаратуру, используемую при проведении ферментативных процессов по сравнению с химическими технологиями).

4. Высокая специфичность действия ферментов (способность катализировать чётко определённую биохимическую реакцию, не меняя других веществ). Это позволяет, например, из сложной смеси белковых веществ с помощью ферментов отделить целевые белки от балластных. Также с помощью ферментного гидролиза можно избавиться от загрязняющих примесей углеводов, белков и других веществ.

5. Ферментативную реакцию можно легко остановить, инактивируя биокатализатор.

6. Ферменты являются веществами природного происхождения и при гидролизе не требуют удаления из катализируемой среды.

7. Сырьём для получения ферментов являются, в основном, доступные и недорогие отходы животного и растительного происхождения, отходы пищевых производств.

8. Препараты ферментов имеют определённую стабильностью и могут храниться длительный срок в виде высушенных порошков (наиболее устойчивая форма), а также других форм, содержащих фермент в высокой концентрации [1, 4].

Факторы, влияющие на ход ферментативных реакций и требующие дополнительного изучения. Однако для практического использования ферментов необходимо проведение дополнительных исследований основных факторов, влияющих на ход ферментативных реакций. К таким факторам относят: температуру, pH, окислительно-восстановительный потенциал среды, концентрацию в среде ионов, наличие ингибиторов (активаторов) специфического или неспецифического действия, концентрацию фермента и концентрацию субстрата.

При температуре, близкой к 4 °С ферментативные реакции практически не идут. Повышение температуры до определенных значений, с одной стороны, ускоряет ферментативную реакцию, с другой стороны, превышая эти значения, приводит к инактивации ферментного белка. При температуре выше 60 °С большинство ферментов полностью инактивируется. Температура, при которой активность фермента максимальна, называется температурным оптимумом и для большинства ферментов наблюдается в пределах 40–60 °С [2, 4].

Ферменты, в том числе и протеолитические, проявляют оптимальную активность при различных pH. Оптимум pH для большинства ферментов лежит в пределах от 6 до 8. Однако, на примере протеаз, есть ферменты, которые действуют в кислой (или щелочной) зонах. При подборе условий протекания ферментативных реакций количественное определение ферментов проводят при оптимальном для данного фермента pH. При значительном изменении диапазона реакции среды может происходить денатурация белка с полной потерей ферментативной активности [2, 4].

Существенно влияет на ход ферментативных реакций окислительно-восстановительный потенциал среды вследствие изменения состояния окислительных групп внутри молекулы белка, в результате чего меняется его структура. Например, папаин, относящийся к протеазам, действует только тогда, когда SH-группы в нем находятся в восстановленном состоянии. Чтобы данный фермент мог проявить свою активность, необходимо наличие восстановителей [2, 4].

Действие фермента зависит и от присутствия солей в среде (специфических активаторов и ингибиторов). Концентрация ионов влияет на степень гидратации и стабильность белковых молекул, их форму, частич-

но структуру, реакционную способность и некоторые другие свойства. Кроме общего действия, неорганические ионы могут еще оказывать на ферменты специфические действия, воздействуя как активаторы, стабилизаторы, специфические ингибиторы, агенты денатурации и другие [2, 4].

Также, одним из существенных факторов, влияющих на скорость ферментативной реакции, является концентрация субстрата и продукта. При увеличении количества субстрата в системе скорость реакции постепенно увеличивается при постоянной концентрации фермента до определенного момента, после которого концентрация субстрата не оказывает влияния на скорость реакции. Наступает насыщение фермента, концентрация которого становится лимитирующим фактором. Скорость любой ферментативной реакции зависит от концентрации фермента. Существует линейная зависимость между скоростью ферментативной реакции и концентрацией фермента, однако она справедлива в начальный период, когда концентрация продукта реакции невелика и не происходит обратимая реакция.

Необходимость определения активности ферментных препаратов. Силу каталитического действия ферментов оценивают по их активности. В оптимальных для фермента условиях активность фермента пропорциональна его концентрации в системе и поэтому может использоваться для оценки его концентрации. Активность ферментов можно определять двумя способами: по скорости накопления продукта реакции или по скорости исчезновения субстрата. Ферменты обладают способностью менять свою активность в различных условиях [2, 4]. Поэтому важным является исследование данного параметра, характеризующего силу каталитического действия, для целей практического использования ферментов в той или иной отрасли.

Направления экспериментальных исследований. Проанализировав свойства ферментов и некоторые специфические черты протеаз, для построения процесса с высокой эффективностью и разработку ферментного препарата с оптимальным составом были проведены экспериментальные исследования в следующих направлениях:

- определение зависимости протеолитической активности фермента от его концентрации;
- определение зависимости протеолитической активности фермента от температуры среды;
- определение зависимости протеолитической активности фермента от водородного показателя среды;
- определение зависимости протеолитической активности фермента с течением времени и исследование действия стабилизаторов активности;
- исследование влияние добавок различной химической природы на способность фермента к удалению белковых загрязнений;
- обоснование состава ферментного препарата для применения в составе моющего средства.

2.4. Определение зависимости протеолитической активности фермента от концентрации его растворов

Для определения зависимости протеолитической активности фермента от концентрации его растворов, использовали растворы с массовой концентрацией фермента от 0,5 до 20 %, которые готовили непосредственно перед испытанием. Протеолитическую активность определяли по методу ФОЛП, основанному на определении тирозина, получаемого в результате гидролиза белка, с реактивом Фолина. За единицу протеолитической активности принимали способность фермента катализировать гидролиз 1 г белка (казеина) в строго определённых условиях: температура 40 °С, рН = 10,5, продолжительность гидролиза 1 час [25]. Исследования проводили в двукратном повторении. Относительная ошибка измерений не превышала 3,45 % при доверительной вероятности 95 %. Результаты исследований приведены на рисунке 2.2.

В результате эксперимента установлено, что при концентрации 0,5, 0,25 и 0,125 % фермент не проявляет свою активность, поэтому на графической зависимости эти данные не отображены. Как видно из рисунка 2.2

при увеличении концентрации фермента в растворе до 5 % протеолитическая активность растёт. Диапазон концентраций от 2 до 8 % соответствует высоким значениям протеолитической активности растворов фермента (примерно 50000 – 63000 ед/г).

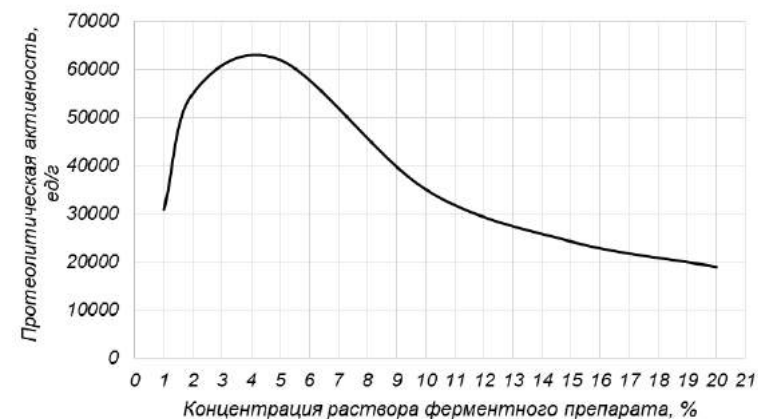


Рисунок 2.2 – Зависимость протеолитической активности от концентрации фермента

Высокие значения протеолитической активности находятся в диапазоне концентраций от 4 до 5 % по содержанию фермента (примерно 60000 – 60000 ед/г). При дальнейшем увеличении концентрации до 10 % наблюдается снижение значений протеолитической активности почти вдвое по сравнению с максимальными значениями. А увеличение концентрации до 20 % приводит к снижению активности раствора примерно до 19000 ед/г. Снижение протеолитической активности при увеличении концентрации фермента от 5 % можно связать со следующим – для полного биокатализа субстрата (казеина) достаточно 5 % раствора, а при увеличении концентрации раствора соответственно увеличивается и масса фермента в фильтрате, что приводит к уменьшению протеолитической активности при её расчёте.

Таким образом, для дальнейшего использования в исследованиях выбраны образцы с 5 % массовой концентрацией фермента в растворе с

соответственно максимальными значениями протеолитической активности.

2.5. Исследование влияния температуры на протеолитическую активность ферментного препарата

Температура является одним из важнейших факторов, который обуславливает активность ферментного препарата. Температурный диапазон действия фермента невелик. При слишком высоких температурах белок денатурирует, при низких – теряет активность из-за низкой подвижности молекул. Определение температуры среды, при которой будут установлены максимальные значения протеолитической активности фермента, позволит сократить расходы препарата при использовании в различных отраслях народного хозяйства, в том числе при производстве моющих средств с содержанием биологически активных веществ. Влияние температуры на процесс ферментативного действия препарата определяли путём измерения протеолитической активности раствора с концентрацией 5 %. Температуру варьировали в диапазоне от 20 °С до 60 °С с шагом в 10 °С. Исследования проводили в двукратном повторении. Относительная ошибка измерений не превышала 3,45 % при доверительной вероятности 95 %. Результаты исследований приведены на рисунке 2.3.

Результаты исследований, которые проводили в температурном диапазоне до 30 °С и более 50 °С, не отображены на рисунке 2.3, потому что фермент при низких температурах проявлял очень низкую активность, а при высоких – денатурировал, что вызвало полную потерю активности.

Как видно из рисунка 2.3 увеличение температуры протекания ферментативной реакции до определённого значения (40 °С) приводит к значительному увеличению протеолитической активности (примерно 53000 ед/г). Диапазон температуры от 35 °С до 43 °С соответствует условиям, которые способствуют проявлению высокой ферментативной активности (45000–53000 ед/г). При дальнейшем увеличении температуры

до 50 °С наблюдается потеря активности за счёт начала денатурации отдельных белков ферментного препарата, что приводит к уменьшению активности до 12000 ед/г. Дальнейшее повышение температуры приводит к полной денатурации фермента и потере ферментативной активности.

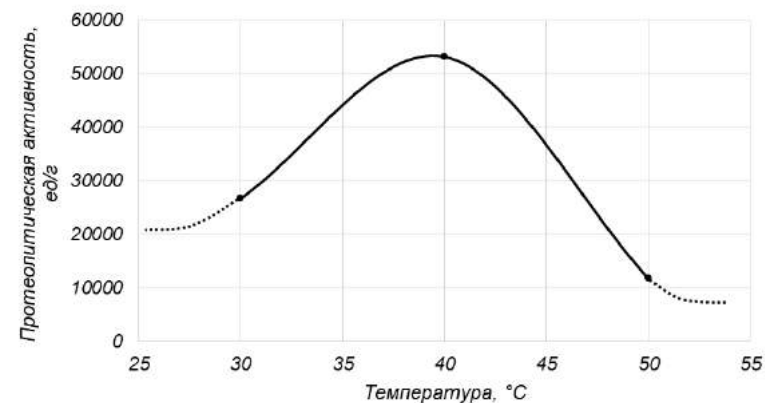


Рисунок 2.3 – Зависимость протеолитической активности фермента от температуры

Также из рисунка видно, при температуре 40 °С проявляется наивысшая активность протеолитического фермента. Поэтому, исходя из полученных результатов, для дальнейших исследований была выбрана температура 40 °С.

2.6. Исследование влияния pH среды на протеолитическую активность ферментного препарата

Кислотно-основной состав среды вместе с температурой является важным фактором, который необходимо учитывать при разработке того или иного препарата на основе активно действующего химического или биологического реагента. Несмотря на то, что исследуемый фермент относится к основным (то есть проявляет наибольшую активность в диапазоне pH = 8,0–14,0), это не означает, что при любом значении из этого

диапазона он будет проявлять одинаковую активность. Изменение кислотно-основного состава влияет на степень диссоциации, что может привести к изменениям химического состава и конформации фермента. В этом случае действующий каталитический центр, который обуславливает распад белков, прекращает выполнять свои функции. Именно поэтому необходимым этапом исследований является определение специфически узкого диапазона рН, в котором должен «работать» фермент.

Влияние рН среды на процесс ферментативного действия препарата определяли путём измерения протеолитической активности 5 % растворов фермента. Активную кислотность среды измеряли методом потенциометрии и варьировали в диапазоне от 9,5 до 11,5 [26, 27, 28]. Исследования проводили в двукратном повторении. Относительная ошибка измерений не превышала 1,96 % при доверительной вероятности 95 %. Результаты исследований приведены на рисунке 2.4 [29].

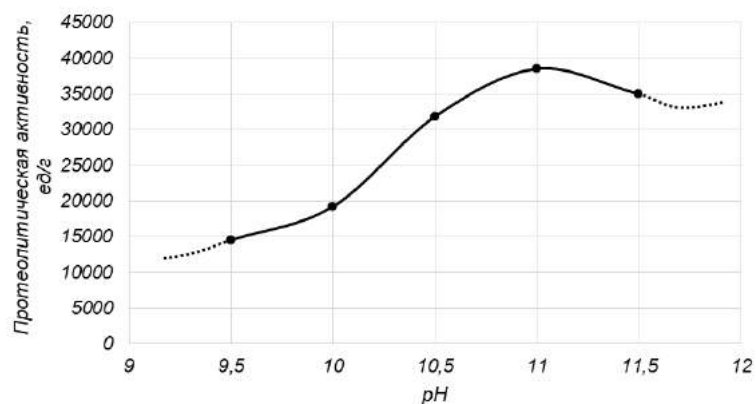


Рисунок 2.4 – Зависимость протеолитической активности фермента от рН среды

Как видно из рисунка 2.4 постепенное увеличение рН от 9,5 до 11,0 приводит к увеличению протеолитической активности от 15000 до 3800 ед/г. Диапазон водородного показателя среды 10,5–11,5 соответствует условиям, которые способствуют проявлению высокой ферментатив-

ной активности (33000 – 38000 ед/г). При дальнейшем увеличении водородного показателя до 12 наблюдается потеря активности за счёт изменения конформации белка в щелочной среде и «исчезновения» каталитически активного центра.

Исходя из результатов исследований оптимальной средой, в которой будет проявляться максимальная активность ферментного препарата протеолитического действия, будет среда с водородным показателем рН = 11,0.

2.7. Исследование влияния стабилизаторов на протеолитическую активность фермента

Как известно из литературных данных, фермент в сухом и, особенно, в растворенном состоянии теряет свою активность. Это связано с его низкой способностью противодействовать условиям окружающей среды и реакциям, которые могут происходить между одинаковыми молекулами и с окружающими веществами.

Поэтому в целях сохранения ферментативной активности препарата и увеличения срока действия нужно проводить исследования в направлении разработки стабилизаторов активности. На основе анализа современных исследований в качестве стабилизатора активности был выбран хлорида кальция [30].

Влияние действия стабилизатора активности на процесс ферментативного действия препарата определяли путём измерения протеолитической активности раствора с одной концентрацией (а именно – 5 %). Для исследований были выбраны растворы с массовым содержанием хлорида кальция 0,3 % (образец 1) и 0,6 % (образец 2). Результаты опытов приведены на рисунке 2.5.

Из графика можно сделать вывод, что хлорид кальция действительно способствует сохранению активности. Однако увеличение концентрации добавки не приводит к увеличению эффекта её действия. Как видно из рисунка 2.5 протеолитическая активность фермента уменьшается вдвое по сравнению с начальной (от 55000 ед/г до 27000 ед/г) уже через 100 минут. После этого наблюдается потеря активности в среднем на 10000 ед/г

каждые 100 минут (или на 100 ед/г в минуту). Через 6 часов после приготовления раствора скорость потери активности уменьшается, однако эффективность действия фермента уменьшается до 10000 ед/ч. Из рисунка видно, для образцов 1 и 2 добавления хлорида кальция способствует сохранению активности в диапазоне до 380 минут на величину от 1000 ед/ч до 10000 ед/ч. Следует отметить, что значительной разницы при использовании между образцами 1 и 2 не выявлено.

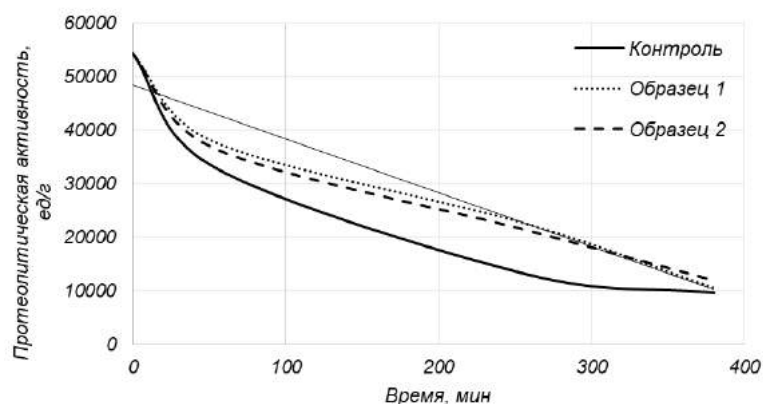


Рисунок 2.5 – Зависимость протеолитической активности фермента от содержания и концентрации хлорида кальция: контроль – раствор с концентрацией фермента 5 %; образец 1 – раствор фермента с массовым содержанием 0,3 % CaCl₂; образец 2 – раствор фермента с массовым содержанием 0,6 % CaCl₂

В диапазоне времени 50–400 мин наблюдается линейная зависимость, которая позволяет описать зависимость протеолитической активности растворов фермента с добавлением хлорида кальция и без него от времени:

1) для контрольного образца:

$$y = -74,495x + 35842; \quad (R = 0,9709);$$

2) для образцов 1 и 2:

$$y = -75,4x + 40750; \quad (R = 0,9968),$$

где y – протеолитическая активность ферментного препарата, ед/г;

x – время после приготовления, мин;

R – коэффициент корреляции.

Уравнения регрессии, полученные путём аппроксимации данных, адекватно описывают вышеприведенные зависимости (проверено с помощью критерия Фишера). Значения коэффициентов корреляции линейной регрессии $R > 0,97$ свидетельствуют об очень плотной прямой (линейной) зависимости между протеолитической активностью ферментного препарата от времени, прошедшем после приготовления раствора. По шкале Чеддока значениям коэффициента корреляции от 0,9 до 0,99 отвечает очень высокая степень зависимости. Чем больше R приближаются к 1, тем выше степень близости расчётных данных к экспериментальным [31–34].

Доказано, что для описания процесса можно использовать линейное уравнение регрессии при $R > 0,9$. Таким образом, уравнения регрессии, полученные путём аппроксимации данных, точно описывают полученные зависимости и могут быть использованы при дальнейшем прогнозировании изменения протеолитической активностью ферментного препарата с течением времени.

Также данные исследования показывают, что использование стабилизатора в среднем приводит к увеличению активности на 5000 ед /ч в течение хранения ферментного препарата по сравнению с препаратом без стабилизирующих добавок. Исходя из результатов, концентрацией хлорида кальция в качестве стабилизатора, при которой наблюдается наиболее длительное сохранение активности, следует считать 0,3 %.

2.8. Исследование влияния добавок различной химической природы на способность фермента к удалению белковых загрязнений

Общая характеристика загрязнений. Загрязнение одежды могут быть общими, когда они располагаются по всей поверхности изделия более или менее равномерно, и местными, когда загрязнение расположены в

виде отдельных пятен. Обычно встречается сочетание общих и местных загрязнений [35].

Все пятна, которые встречаются на одежде, можно условно разбить на три основные группы:

- содержащие жировые вещества и жирорастворимые красители;
- содержащие белковые вещества (кровь, пот, молоко);
- содержащие танин и красящие вещества (вино, кофе, фрукты).

Определение вида пятен и их удаление является одной из наиболее сложных и ответственных операций [35].

Способ удаления пятен зависит от состава пятнообразующих загрязнений. При удалении пятен возможны растворение, эмульгирование, диспергирование, солублизация, химические и биологические воздействия на загрязнения. Процесс пятновыведения можно ускорить за счёт механических воздействий, а в ряде случаев за счёт подогрева [35].

Удаление различных пятен обычно проходит достаточно легко, если эти пятна свежие. Вместе с влиянием света и тепла также существуют факторы, которые усложняют выведения пятен. Например, сильное влияние растворителей, входящих в состав препарата для выведения пятен, на волокна ткани, на которой находится пятно. Так, удаление жировых пятен с тканей, содержащих хлориновые волокна, а также с прорезиненных тканей, является очень трудоёмким; чаще всего невозможно без повреждения ткани. Часто происходит разрушение ткани в результате воздействия веществ, которые образуют пятна. Так, при попадании минеральных кислот на полиамидные и целлюлозные волокна последние разрушаются. Хлорорганические растворители разрушают ПВХ волокна, щёлочи – шерсть и натуральный шёлк. Также нежелательное влияние оказывает сочетание различных веществ пятен, которые образует сложный для удаления комплекс (сургуч, дёготь, смола, крем для обуви и т.д.) [35].

Для удаления пятен с одежды разработано большое количество пятновыводителей. В последние годы наметилась тенденция к созданию препаратов группового действия, когда большое количество пятновыводителей можно заменить на сравнительно малое, доведя их необходимое

количество до трёх-четырёх. Универсального препарата, который включал бы в себя компоненты, обеспечивающие вывод всех видов пятен, не существует, так как различные группы пятен могут требовать использования различных, противоположных по свойствам реагентов (например, белковые пятна – щелочных препаратов, танина – кислотных) [35].

Характеристика белковых загрязнений. Белковые пятна обычно имеют резко очерченные контуры. Их можно определить цветными реакциями, частично переводя вещество пятен на кусочек белой хлопчатобумажной ткани, смоченной водой. При добавлении к белку нескольких капель концентрированной уксусной и серной кислот появляется красно-фиолетовая окраска. Тепловая обработка опасна для пятен белкового происхождения [35].

Одним из видов белковых загрязнений являются загрязнения, образующиеся при попадании крови человека и животных на ткань. Кровь состоит из жидкой части – плазмы и форменных элементов: эритроцитов, лейкоцитов и тромбоцитов. У взрослого человека форменные элементы крови составляют 36–48 %, а плазма – 52–64 % [36]. Состав крови человека и животных различен и представлен в таблицах 2.1 и 2.2 [36, 37]. Основную массу твердых веществ крови составляют белки и, в первую очередь, гемоглобин. Последний относится к белковым веществам группы хромопротеидов; он способен кристаллизоваться, причем кристаллы его у различных животных резко различны по своей форме.

Гемоглобин – вещество очень неустойчивое, что затрудняет определение его химического состава. Гемоглобин и оксигемоглобин содержатся только в эритроцитах крови. Среди других белков крови преобладают сывороточный альбумин и глобулин. Оба эти белка (входящих в группу простых белков – протеинов) относятся к числу коагулирующих белков, так как сворачиваются при нагревании. Они легко растворяются в слабых растворах кислот, щелочей и солей, выпадая из этих растворов в виде осадка при дальнейшем увеличении кислоты. В плазме же крови находится особое белковое вещество – фибриноген. Количество фибриногена в крови обычно равно 0,4–0,5 %.

Таблица 2.1 – Состав крови человека [36]

Компонент	Содержание	Компонент	Содержание
Вода	900 - 910 г/л	Глюкоза	3,6 – 6,5 ммоль/л
Белки	65 - 5 г/л	Мочевая кислота	179 – 476 мкмоль/л
Альбумины	38 - 50 г/л	Креатинин	44 – 150 ммоль/л
α_1 – глобулины	1,4 – 3,0 г/л	Натрий	135 – 145 ммоль/л
α_2 – глобулины	5,6 – 9,0 г/л	Калий	3,3 – 4,9 моль/л
β - глобулины	5,4 – 9,0 г/л	Кальций общий	2,23 – 2,57 моль/л
γ – глобулины	9,0 – 14,5 г/л	Кальций свободный	1,15 – 1,27 моль/л
Фибриноген	2,0 – 4,0 г/л	Магний	0,65 – 1,1 моль/л
Билирубин	3,4 - 22 г/л	Хлориды	97 – 110 моль/л
Липиды	2,0 – 4,0 г/л	Железо	9 – 31 моль/л
ЛПОНП	0,8 – 1,5 г/л	Медь	11,0 – 24,3 моль/л
ЛППП	0,2 – 0,75 г/л	Гидрокарбонат	23 – 33 моль/л
ЛПНП	3,2 – 4,5 г/л	Фосфат	0,8 – 1,2 моль/л

Таблица 2.2 – Состав крови животных [37]

Компонент	Концентрация, ‰			
	Крупный рогатый скот	Овцы	Кони	Свиньи
Вода	808,9	821,6	790,5	790,6
Гемоглобин	103,1	92,9	125,8	142,2
Белок (без гемоглобина)	69,8	70,8	62,7	46,6
Сахар	0,7	0,7	0,9	0,7
Холестерин	1,9	1,3	0,6	0,4
Лецитин	2,3	2,2	3,0	2,3
Жир	0,56	0,94	0,50	1,09
Натрий	3,63	3,64	2,62	2,41

Сахара в крови представлены главным образом глюкозой. Из липидов в крови постоянно присутствуют как нейтральные жиры, так и холестерин, и лецитин [37]. Минеральные вещества крови примерно на 75 %

состоят из хлоридов и на 25 % из карбонатов и фосфатов (последних очень немного). Таким образом, в плазме крови отсутствует гемоглобин, а, следовательно, и окись железа, зато почти все количество сахаров, жиров и жирных кислот крови сконцентрировано именно в плазме. Для плазмы характерны наличие фибриногена и большое количество альбуминов и глобулинов. Из минеральных веществ преобладают соли Na, особенно NaCl [37].

Методики оценки действия средств для удаления загрязнений.

В литературе описано несколько методов количественной характеристики степени загрязнения ткани. Они базируются на измерении показателей разного направления и включают в себя:

- 1) измерение электрохимических показателей (дзета-потенциал, электрохимический градиент);
- 2) хроматографирование (анализ раствора после вымачивания в ней образцов ткани; позволяет определить химический состав);
- 3) определение физических характеристик (измерение нагрузки на разрыв и увеличение длины);
- 4) визуальную оценку загрязнения [30].

Исследования проводили с использованием визуальной оценки степени загрязнения.

Приготовление образцов тканей с пятнами белковой природы.

Льняную ткань разрезали на квадратные куски размером со стороной 4 см и помещали на 5 минут в мерный стакан, заполненный свежей кровью свиньи. Затем ткань высушили на воздухе (без дополнительного источника нагрева).

Приготовление ферментных препаратов с добавками солей и перекиси водорода. В качестве добавок к ферментному препарату использовали пять веществ, которые имеют разную направленность их потенциального использования. Их можно разделить на несколько групп [30]. В первую группу входят соли металлов, которые облегчают

процесс десорбции белковых загрязнений с поверхности текстильных материалов, улучшает моющую способность активных веществ. Это происходит за счет перезарядки волокон и изменения потенциала. В данной работе были исследованы добавки натрия хлорида (NaCl) и натрия триполифосфата ($\text{Na}_5\text{P}_3\text{O}_{10}$) с концентрацией растворов 3, 5 и 7 г/дм³. Вторую группу составляют окислительно-восстановительные системы, которые также способствуют процессу перезарядки волокон, увеличивают моющую способность средств против удаления пятен. В зависимости от природы загрязнения используют или добавку-восстановитель, или добавку-окислитель. В данной работе были использованы добавки-восстановители (натрия дитионит и натрия сульфит с концентрациями растворов 3 г/дм³, 5 г/дм³ и 7 г/дм³) и пероксид водорода в качестве окислителя с концентрациями растворов 3 г/дм³ и 5 г/дм³).

Растворы ферментных препаратов с добавками солей и перекиси водорода готовили следующим образом. В чашку Петри при перемешивании помещали 15 см³ раствора ферментного препарата с концентрацией 5 % и рассчитанный объем ранее приготовленного раствора добавляемого вещества. Для сравнения использовали образцы дистиллированной воды и раствора ферментного препарата с концентрацией 5 % без добавок.

Исследование действия протеолитического ферментного препарата на белковые загрязнения. После приготовления растворов чашки Петри с тканью помещали в лабораторный термостат, в котором поддерживали температуру 40 °С и выдерживали в течение 60 минут. Перед этим проверяли, чтобы плёнка раствора в чашке полностью покрывала ткань. По окончании отведённого времени чашки Петри выкладывали на ровную поверхность, на которую предварительно помещали чистый белый лист бумаги. На рисунке 2.6 показана часть исследуемых образцов загрязнённой ткани в растворах ферментного препарата с добавками и без них.

Визуальную оценку выполняла группа исследователей – сотрудников кафедры биотехнологии, биофизики и аналитической химии НТУ «ХПИ». После получения образцов для сравнения исследователи помещали все образцы на плоскую поверхность и при хороших условиях

освещённости проводили визуальную оценку. Исследования проводили в двукратном повторении. Результаты представляли в виде среднего арифметического двух определений.

Для оценки обесцвечивания раствора была разработана и использована относительная 10-балльная шкала. Оценка «1» отвечала наибольшей степени обесцвечивания тканевого образца и, соответственно, высокой активности ферментного препарата; оценка «10» отвечала наименьшей степени обесцвечивания тканевого образца и наименьшей активности препарата. Подробная характеристика шкалы, по которой проводили оценку, приведена в таблице 2.3.



Рисунок 2.6 – Изображение исследуемых образцов ткани в чашках Петри в опыте по определению влияния добавок на способность фермента к удалению белковых загрязнений

Результаты, которые были получены в ходе проведённых экспериментов, приведены в таблице 2.4.

В ходе эксперимента было установлено, что хуже происходило расщепление белков под действием натрия триполифосфата и натрия дитионита с концентрацией 7 г/дм³ (оценка: 8,5 ... 9,0). Несколько лучшие

результаты показало использование растворов с концентрацией 3 г/дм³ и 5 г/дм³ большинства веществ (оценка в пределах 4,0 ... 7,0), что можно назвать средним результатом. К ним следует отнести действие следующих растворов: натрия триполифосфата с концентрацией 3 г/л; натрия дитионита – 3 г/дм³ и 5 г/дм³; натрия хлорида – 3 г/дм³, 5 г/дм³ и 7 г/дм³; натрия сульфита – 3 г/дм³ и 7 г/дм³ пероксида водорода – 3 г/дм³. Наилучшие результаты (оценка 1,0 ... 3,5) были получены для растворов натрия триполифосфата с концентрацией 5 г/дм³, натрия сульфита – 5 г/дм³ и пероксида водорода – 5 г/дм³.

Таблица 2.3 – Характеристика визуальной шкалы для оценки загрязнений исследуемых материалов

Оценка	Цвет материала	Характеристика действия растворов с содержанием ферментного препарата
1	От белого до бледно-розового.	Высокая степень расщепления белковых загрязнений; полное или почти полное обесцвечивание исследуемого образца.
2		
3		
4	От бледно-розового до красного.	Средняя степень расщепления белковых загрязнений; окраска, свойственная содержанию остатков белков.
5		
6		
7		
8	Низкая степень расщепления белковых загрязнений; лишь небольшая часть белков поддалась гидролизу.	
9		
10	От красного до бордового / темно-красного.	Очень низкая степень расщепления белковых загрязнений; почти не наблюдается изменений в окраске исследуемых образцов после экспозиции с ферментным препаратом.

В качестве добавок с наибольшим эффектом усиления моющей способности были выбраны следующие вещества: окислитель – пероксид водорода (5 г/дм³) и соль металла – натрия триполифосфат (5 г/дм³). Восстановительные системы также имели положительный эффект, однако меньше окислительных. Однако совместное использование окислительных и восстановительных систем в составе моющего средства не является целесообразным в виду их взаимной реакции.

Таблица 2.4 – Результаты исследований по оценке загрязнений исследуемых материалов при использовании растворов фермента и смесей на его основе

Добавка	Оценка в баллах при концентрации добавляемого вещества		
	3 г/дм ³	5 г/дм ³	7 г/дм ³
Na ₅ P ₃ O ₁₀	6,5	3,5	9
Na ₂ S ₂ O ₄	5,5	4,5	8,5
NaCl	6	4	6,5
Na ₂ SO ₃	5,5	3	5
H ₂ O ₂	6,5	1	–
Вода	7	–	–
Фермент без добавок	3,5	–	–

2.9. Обоснование состава ферментного препарата

В экспериментальной части работы исследован процесс ферментативного действия протеолитического фермента на распад белков в различных условиях. Для эффективного процесса распада белков под действием фермента нужно удовлетворить следующие условия:

- использовать концентрацию фермента, которая отвечает самой высокой активности фермента (высокая концентрация приведет к снижению экономической эффективности без увеличения эффективности действия препарата);

- использовать препарат в температурном диапазоне и в диапазоне значений водородного показателя, которые соответствуют высокой активности фермента;
- включить в состав ферментного препарата стабилизаторы для сохранения его активности с течением времени;
- включить в состав ферментного препарата добавки для увеличения активности средства.

Для данного фермента были определены следующие условия протекания реакции и состав препарата, при которых он проявляет максимальную протеолитическую активность и эффективность действия: концентрация – 5 %; температура – 40 °С; водородный показатель – от 10,5 до 11,5; дополнительные вещества: хлорид кальция 0,3 %, перекись водорода – 5 г/дм³, триполифосфат натрия – 5 г/дм³ [38].

Использование ферментов в качестве активных веществ в средствах борьбы с загрязнениями является очень перспективным направлением исследований. Разработка моющих средств на основе биокатализаторов позволит оптимизировать их состав и уменьшить негативное влияние синтетических веществ на окружающую среду.

2.10. Рекомендации по применению протеолитических ферментов для удаления белковых загрязнений

Типичный состав моющих средств для удаления загрязнений на основе ферментов. Современные СМС являются сложными по составу многокомпонентными смесями. Катионактивные, анионоактивные, амфотерные и неионогенные поверхностно-активные вещества вводят в состав СМС в качестве основного компонента. Основная функция таких веществ – уменьшение поверхностного натяжения воды, улучшение смачиваемости ткани, повышение пенообразующей и эмульгирующей способностей СМС. Типичные составы композиций СМС приведены в таблице 2.5 [39].

Таблица 2.5 – Составы СМС по данным *Groups / ESA*, % [39]

Компоненты	Страна производства				
	Европейские страны	США	Япония	Страны Азии и Латинской Америки	Российская Федерация
Поверхностно-активные вещества					
Алкилбензол сульфат	4 – 12	7 – 20	8 – 25	4 – 30	6 – 15
Алкилсульфаты	0 – 12	0 – 11	0 – 5	–	–
Этоксилаты оксо спирта	5 – 10	2 – 5	2 – 8	0,1 – 12	0 – 5
Алкилониофенолы	–	–	–	–	0 – 5
Мыло C ₂₀ ~ C ₂₂ или силиконы	1 – 3	0 – 0,5	1 – 12	0 – 4	0 – 3
Комплексообразователи					
Цеолит 4А или Р	20 – 35	10 – 35	10 – 25	5 – 25	0 – 20
Триполифосфат натрия	–	–	–	10 – 23	10 – 35
Карбонат натрия	5 – 20	10 – 35	10 – 28	7 – 45	5 – 30
Отбеливатели					
Перборат натрия	10 – 15	0 – 6	3 – 4	1 – 10	10 – 15
Перкарбонат натрия	12 – 20	Нет данных	3 – 4	1 – 10	10 – 15
ТАЭД (тетраацетилэтилендиамин)	2 – 7	0 – 3	1 – 3	0,1 – 2,5	0 – 5
Оптические отбеливатели	0,1 – 0,3	< 0,5	< 0,5	< 0,5	0,1 – 0,3
Силикаты					
Силикат натрия (жидкий)	0 – 10	1 – 15	0 – 16	2 – 20	2 – 8
Слоистый силикат	0 – 15	–	19	–	–
Полимеры					
Натриевая соль карбоксиметилцеллюлози	1	0 – 4	0,5	0 – 0,5	0,5 – 1,0
Поликарбонат	1 – 4	1 – 6	1 – 5	0,3 – 3,5	0 – 3
Повинилпирролидон	0,2 – 1	0,2 – 1	Нет данных	Нет данных	0 – 1
Другие вещества					
Ферменты (протеаза, амилаза, липаза, целлюлаза)	0,3 – 1,5	< 1	< 1	< 1	0 – 1,5
Ароматизаторы	0,1 – 0,5	0,1 – 0,5	0,1 – 0,5	0,1 – 0,3	0,1 – 0,3
Сульфат натрия	2 – 7	Нет данных	Нет данных	Нет данных	10 – 50

Вещества синтетического происхождения в составе моющих средств способны удалять лишь определённые виды загрязнений. Причём, степень очищения будет зависеть и от характера загрязнений. Так, например, активные вещества химической природы способны удалять жировые загрязнения. С загрязнениями белковой природы лучше справляются биологически активные вещества, способствующие расщеплению больших биомолекул и биополимеров. К таким веществам биологического происхождения относят ферменты.

В качестве ферментов используют протеазы, которые катализируют разложение белков до водорастворимых соединений, амилазы – ферменты, гидролизующие углеводы, и липазы – ферменты, способствующие разрушению жировых загрязнений. Для удаления белковых загрязнений целесообразно использовать ферменты протеолитического действия. Протеазы в составе моющих средств способны катализировать расщепление белков с образованием аминокислот вследствие разрушения полипептидных связей. Молекулы аминокислот при стирке легче удаляются с поверхности ткани [34, 35].

Композиция моющего средства с содержанием протеолитических ферментов. Введение в состав СМС биологически активных веществ требует проведения дополнительных исследований касательно состава СМС, сроков и условий его хранения и использования. Известно, что при длительном хранении в присутствии компонентов СМС для стабилизации активности фермента используют сульфированные эфиры многоосновных карбоновых кислот, коллаген и другие вещества. За счёт снижения количества фосфатов в моющих средствах, повышается щёлочность их растворов, что способствует производству и использованию сильно щёлочноактивных ферментов. Эффективность большинства моющих средств с ферментами достигает максимума при температуре моющего раствора 40–45 °С и резко снижается при температуре 60 °С и более. Актуальной является проблема создания ферментов, устойчивых к окислению, что связано с присутствием отбеливателей в составе СМС [39].

После проведённой экспериментальной работы, были получены данные для разработки состава синтетического моющего средства, кото-

рый должен иметь коммерческую выгоду. Используя данные по составу СМС [38] и данные экспериментальных исследований предложен состав синтетического моющего средства для удаления загрязнений белковой природы (таблица 2.6).

Таблица 2.6 – Состав СМС с содержанием протеолитических ферментов

Компоненты		Концентрация, %
Поверхностно-активные вещества	Алкилбензол сульфат	4,00
	Этокилаты оксо спирта	7,50
	Мыло (мыльные кольца, мыльная основа)	1,60
Комплексообразователи	Цеолит 4А или Р	10,00
	Триполифосфат натрия	12,00
	Карбонат натрия	20,00
Отбеливатели	Перборат натрия	10,00
	Перкарбонат натрия	4,00
	Пероксид водорода	10,00
	ТАЭД (тетраацетилэтилендиамин)	2,00
	Оптические отбеливатели	0,20
Силикаты	Силикат натрия (жидкий)	6,00
	Слоистый силикат	4,00
	Поликарбосилат	1,00
	Поливинилпирролидон	0,20
Другие компоненты	Хлорид кальция (II)	6,00
	Протеолитический фермент (в пересчете на 100 % конц.)	1,20
	Другие ферменты (амилазы, другие)	0,20
	Ароматизаторы	0,10

Состав рассчитан с учётом того, что для стандартной загрузки стиральной машины (объем 35 дм³) нужно использовать 150 г стирального

порошка, что соответствует разведению примерно 1:250. Кроме того, концентрации добавок, которые значительно загрязняют окружающую среду, либо не имеют существенного воздействия против удаления загрязнений (ароматизаторы, мыльные кольца), были сведены к минимальным значениям. Также учтена концентрация исследуемого фермента в коммерческом препарате, которая составила 1 %. В составе предложенного моющего средства количество исследуемого фермента приведено в перерасчёте на его 100 % концентрацию. В таблице 2.6 приведены значения для чистого ферментного препарата [38].

Таким образом, рассмотрена возможность использования протеолитических ферментов в качестве активных веществ в составе моющих средств для удаления белковых загрязнений. Теоретически обоснована и доказана целесообразность проведения исследований по определению протеолитической активности ферментного препарата для определения возможности включения его в состав моющих средств. Определено, что 5 % концентрация фермента, температура среды 35–43 °С, водородный показатель среды pH = 10,5–11,5 обеспечивают высокую протеолитическую активности. Исследована зависимость протеолитической активности фермента с течением времени при действии стабилизатора активности. Исследовано влияние добавок различной химической природы на способность фермента к удалению белковых загрязнений. Определён состав ферментного препарата для применения в составе моющего средства: протеолитический фермент – 5 %, хлорид кальция 0,3 %, перекись водорода – 5 г/л, триполифосфат натрия – 5 г/л.

Список литературы

1. Огурцов А.Н. Ферменты и коферменты. / А.Н. Огурцов // Биохимия для студентов. – 2015. – № 3. – С. 2–30.
2. Enzyme Nomenclature. EC 3. Introduction. EC 3. Hydrolases [Electronic resource] / Union of Biochemistry and Molecular Biology (NC-IUBMB) // Nomenclature and Classification of Enzymes by the Reactions they Catalyse. – <http://www.sbc.sqmul.ac.uk/iubmb/enzyme/EC3/intro.html>.
3. Коновалов С.А. Биосинтез ферментов микроорганизмами / С.А. Коновалов – Москва : «Пищевая промышленность», 1972. – 267 с.
4. Цыперович А.С. Ферменты / А.С. Цыперович. – Киев : «Техніка», 2013. – 360 с.
5. Смирнов В.А. Ферменты. Классификация и номенклатура : учеб. пособие. Ч. III. / В.А. Смирнов, Ю.Н. Климочкин. – Самара : Самар. гос. техн. ун-т., 2008. – 42 с.
6. Мосолов В.В. Протеолитические ферменты / В.В. Мосолов. – Москва : «Наука», 1971. – 404 с.
7. Ежова Г.П. Биоинформационные аспекты протеомики и деградации белка : Учебно-методический материал по программе повышения квалификации «Хранение и обработка информации в биологических системах» [Электронный ресурс] // Г.П. Ежова, А.А. Бабаев, В.В. Новиков. – Нижний Новгород : Изд-во ННГУ, 2007. – 86 с. – Режим доступа : <http://www.unn.ru/pages/e-library/aids/2007/34.pdf>.
8. Handbook of Proteolytic Enzymes / Ed. by A.J. Barrett, N.D. Rawlings, J.F. Woessner. – London : Academic Press, 1998. – 1666 p.
9. Rawlings N.D. Evolutionary Families of Peptidases / N. D. Rawlings, A. J. Barret // Biochemical Journal. – 1993. – V. 290. – P. 205–218.
10. Oda K. New Families of Carboxyl Peptidases: Serine-Carboxyl Peptidases and Glutamic Peptidases / K. Oda // Journal of Biochemistry. – 2012. – № 151(1) – P. 13–25.
11. Использование ферментных препаратов для очистки сточных вод: экологический аспект [Электронный ресурс] / Ю.В. Гречишникова, Н.В. Герман, Г.А. Севрюкова, Ю.Н. Картушина // Материалы конференции «Комплексные проблемы техносферной безопасности» – Режим доступа : http://www.xn----9sbb.su/pr_790.html.
12. Антонов В.К. Химия протеолиза / В.К. Антонов. – М. : Наука, 1991. – 504 с.
13. Александров С.А. Эффективность протеолитических ферментов / С.А. Александров // Биоорганическая химия. – 1994. – № 2. – С. 126–133.

14. Бердугина А.В. Разработка технологии белковых гидролизатов из вторичного сырья мясной промышленности : дисс. ... канд. техн. наук : 05.18.04 / А.В. Бердугина. – Москва, 2000. – 186 с.
15. Варанкіна, О. О. Перспективи використання ферменту папаїн [Текст] / О.О. Варанкіна, В.С. Кузьмініх // Інформаційні технології : наука, техніка, технологія, освіта, здоров'я : Тези доповідей XXIV міжнародної науково-практичної конференції, Ч.ІІ (18-20 травня 2016р., Харків). – Харків : НТУ «ХП», 2016. – С. 248.
16. Boshra V. Papaya – An Innovative Raw Material for Food and Pharmaceutical Processing Industry / V. Boshra, A.Y. Tajul // Health and the Environment Journal. – 2013. – V. 4, № 1. – P. 68–75.
17. Feijoo-Siota L. Native and Biotechnologically Engineered Plant Proteases with Industrial Applications / L. Feijoo-Siota, T.G. Villa // Food and Bioprocess Technology. – 2010. – № 4(6). – P. 1066–1088.
18. Новый справочник химика и технолога : справочное издание : Ч. 2 : Сырье и продукты промышленности органических и неорганических веществ / Под ред. В.А. Столярова. – СПб. : Професионал, 2006 – 1142 с.
19. Puente X. S. Genomic Analysis of Rat Proteases and Protease Inhibitors / X.S. Puente, C.A. Lopez-Otin // Genome Research – 2004. – V. 14. – P. 609–622.
20. Bühling F. Proteases and their role in chronic inflammatory lung diseases / F. Bühling, D. Groneberg, T. Welte // Curr. Drug Targets. – 2006. – V. 7, № 6. – P. 751–759.
21. Заниздра В. Дрожжи и ферменты – амилазы, гемицеллюлазы, протеазы, липазы [Электронный ресурс] / В. Заниздра // Сырье и ингредиенты. Baker Group. – Режим доступа : <https://baker-group.net/raw-materials-and-semi-finished-products/487-2015-09-29-20-08-53.html>.
22. Romero, L. F. Преимущества использования экзогенных протеаз в сочетании с карбогидразами в рационах бройлеров. The value of exogenous proteases with carbohydrase enzymes in broiler diets / L.F. Romero // Научно-практический журнал «Птицеводство». – 2015. – № 21. – С. 2–6.
23. Саблин О.А. Ферментные препараты в гастроэнтерологии / О.А. Саблин, Е.В. Бутенко // Гастроэнтерология. Приложение к журналу «Cosilium medicum». – 2004. – № 1. – С. 11–17.
24. Ферменты. Протеолитические ферменты в роли антисептиков [Электронный ресурс] // Интернет-издание Medical Fairway.mobi. – http://medicalfairway.ru/page_stat.php?ids=231&n_word=%D1%84%D0%B5%D1%80%D0%BC%D0%B5%D0%BD%D1%82%D1%8B.
25. ГОСТ 20264.2. Препараты ферментные. Методы определения протеолитической активности. – Введ. 1989–01–01. – Москва : Издательство стандартов, 1988. – 15 с.
26. Сегеда А.С. Аналітична хімія. Кількісний аналіз / А.С. Сегеда. – Київ : Фітосоціоцентр, 2006. – 544 с.
27. Зінчук В.К. Фізико-хімічні методи аналізу : навч. посібник / В.К. Зінчук, Г.Д. Левицька, Л.О. Дубенська. – Львів : Вид. центр ЛНУ ім. І. Франка, 2008. – 361 с.
28. Аналітична хімія : навч. посібник / М.В. Шевряков, М.В. Повстаний, Б.В. Яковенко, Т.А. Попович. – Херсон : Айлант, 2011. – 404 с.
29. Лаврик Д.В. Дослідження активності ферментного препарату протеолітичної дії в залежності від водневого показника середовища / Д.В. Лаврик, О.О. Варанкіна // В кн.: Інформаційні технології: наука, техніка, технологія, освіта, здоров'я: тези доповідей XXV міжнародної науково-практичної конференції MicroCAD-2017, 17–19 травня 2017 р. : у 4 ч. Ч. ІІ. / за ред. проф. Сокола Є.І. – Харків : НТУ «ХП», 2017. – С. 309.
30. Санжеева Е.Б. Разработка технологии удаления белковых загрязнений с изделий из смеси волокон хлопок-полиэфирное волокно с использованием ферментов : автореф. дис. на соискание учен. степени канд. техн. наук / Е.Б.Санжеева. – Москва, 2007. – 16 с.
31. Елисеева И.И. Общая теория статистики : 5-е изд., перераб. и доп. / Под ред. И.И. Елисеевой. – М. : Финансы и статистика, 2004. – 656 с.
32. Роганов, В.Р. Обработка экспериментальных данных : Учебное пособие / В.Р. Роганов, С.М. Роганова, М.Е. Новосельцева. – Пенза : Изд-во ПГУ, 2007. – 172 с.

33. Обработка экспериментальных данных [Электронный ресурс] / Б.Д. Агапьев, В.Н. Белов, Ф.П. Кесаманлы и др. – Санкт-Петербург : Изд-во СПбГТУ, 2001. – Режим доступа : <http://users.kpi.kharkov.ua/fmp/biblio/BOOK1/ref.html>.
34. Орлов А.И. Прикладная статистика : Учебник / А.И. Орлов. – М. : Экзамен, 2004. – 656 с.
35. Руководство для работников приёмных пунктов предприятий химической чистки и крашения : руководство от 20 июня 1990 года утв. Минбытом РСФСР // М. : Минбыт РСФСР, 1990. – 55 с.
36. Покровский В.М. Физиология человека : Учебник / В.М. Покровский, Г.Ф. Коротько. – Москва : Медицина, 2011. – 662 с.
37. Химический состав и физические свойства крови [Электронный ресурс] // Знайтовар.Ру – торговля, бизнес, товароведение, экспертиза. – Режим доступа : <https://znaytovar.ru/>.
38. Лаврик Д.В. Обґрунтування вибору концентрації ферментних препаратів протеолітичної дії у складі миючих засобів / Д.В. Лаврик, О.О. Варанкіна // В кн.: XI Міжнародна науково-практична конференція магістрантів та аспірантів (18–21 квітня 2017 року): матеріали конференції: у 3-х ч. – Ч. 3 / за ред. проф. Є.І. Сокола. – Харків : НТУ «ХП», 2017. – С. 31.
39. Состав и технология производства синтетических моющих средств [Электронный ресурс] // Знайтовар.Ру – торговля, бизнес, товароведение, экспертиза. – Режим доступа : <https://znaytovar.ru/>.

3. ПЕРСПЕКТИВЫ ПРИМЕНЕНИЯ СЕНСОРОВ В АНАЛИЗЕ БИОЛОГИЧЕСКИХ И БИОФАРМАЦЕВТИЧЕСКИХ СИСТЕМ

И.А. Белых, С.И. Самойленко

3.1. Биотехнологические аспекты применения иммобилизованных биологических объектов в биосенсорах

В настоящее время в самых различных областях науки и промышленности – биотехнологической, фармацевтической, медицинской, пищевой, сельскохозяйственной, для экологического мониторинга окружающей среды – учёные открывают новые пути использования уникальной способности биологических систем к распознаванию неизвестных веществ. Это создало предпосылки для создания принципиально новых устройств, предназначенных для биоаналитических целей. Разработка систем иммобилизованных биологических элементов является одним из приоритетных направлений современных биотехнологий и биоинженерии. Первоочередной задачей при разработке методов и приборов, включающих использование в качестве биоиндикаторов биологические объекты, является их стабилизация, и сохранение на протяжении длительного периода использования.

Для качественного, количественного и полуколичественного определения содержания веществ широко используют различного рода устройства, в которых в качестве биораспознающих элементов (биоагентов, тест-объектов) применяют биологические вещества и системы. В настоящее время широко используют ферменты, клетки и ткани расте-

ний и животных, микроорганизмы или их органеллы, нуклеиновые кислоты, антитела, рецепторы, которые находятся в непосредственном контакте или встроены в физико-химический датчик. Эти устройства называют *биосенсорами* [1, 2].

Биосенсоры представляют собой прибор, созданный с применением новейшей биотехнологии. Создание биосенсоров относится к области междисциплинарных исследований и отражает появление союза биологии, химии, физики и микроэлектроники [3]. Основной функцией биосенсоров является преобразование высокоспецифичных биохимических процессов в аналитический сигнал, который улавливается детектором и служит источником информации о качественном и количественном содержании одного или нескольких аналитов в исследуемой пробе [1–3].

Общая схема построения биосенсоров представлена на рисунке 3.1. Под действием анализируемой пробы биологический детектирующий элемент изменяет свои параметры. Преобразователь сигналов (транзьюсер) и сигнальный процессор служат для количественной оценки сдвига этих параметров, детектирующий элемент определяет содержание анализируемого вещества в пробе [3].

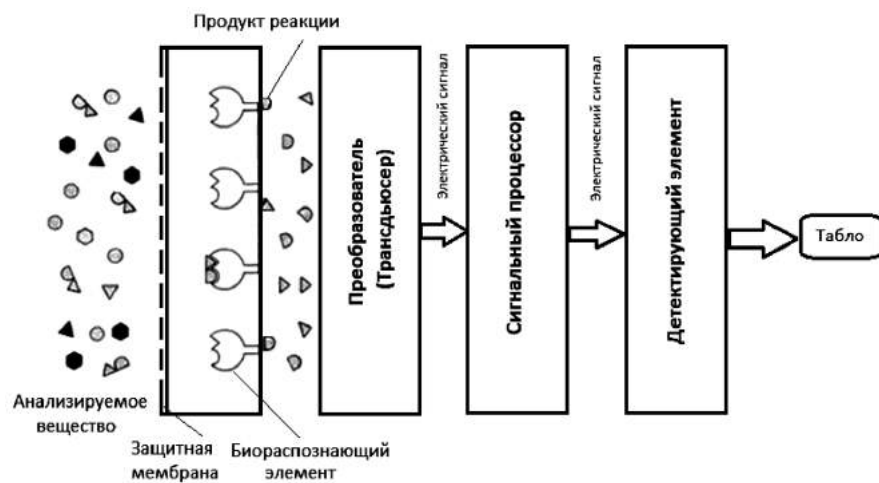


Рисунок 3.1 – Схема биосенсора с иммобилизованным биораспознающим элементом (тест-объектом)

По природе биораспознающего элемента выделяют следующие основные типы биосенсоров.

– *Аффинные биосенсоры* включают в себя сенсоры на основе нуклеиновых кислот и рецепторов. В этом случае молекулы биополимера, образующие чувствительный элемент, «узнают» молекулы вещества, находящиеся в анализируемом растворе. В результате взаимодействия между молекулами образуются комплексы (антиген-антитело или нуклеиновая кислота-белок) и свойства молекул биодатчика изменяются, что является «сигналом» для системы. Величина «сигнала» должна быть пропорциональна концентрации исследуемого вещества [2, 3].

– *Ферментные биосенсоры*. Молекулы фермента, образующие чувствительный элемент, «узнают» молекулы субстрата, присутствующего в растворе. Продукт реакции, образующийся в результате взаимодействия фермент-субстрат, представляет собой «сигнал» для системы, пропорциональный концентрации анализируемого субстрата [2, 3].

– *Клеточные биосенсоры*, в которых в качестве распознающих элементов выступают ферменты, содержащиеся в клетках или их органеллах [2].

– *Микробные биосенсоры*, включают живые микроорганизмы, иммобилизованные к физико-химическому преобразователю. «Сигнал» системы зависит от концентрации метаболитов, выделяемых микроорганизмами [2].

Клеточные и микробные сенсоры в литературе относят к классу *надмолекулярных* сенсоров [3].

Современные тенденции биосенсорного анализа, направлены не только на разработку биораспознающих элементов, но и транзьюсеров [1–3]. Однако, при разработке транзьюсеров необходимо решить ряд аппаратных и математических задач, таких как математическая обработка измеренной информации, использование перекрестных методов распознавания образцов («электронный нос», «электронный язык») и др. [3].

Основной задачей применения тест-объектов в биосенсорах является воспроизводимость (регенерация) сенсорного слоя и стабильность его

параметров (электрохимическая инертность) к реакциям восстановления и окисления, расширение диапазона определяемых концентраций, повышение чувствительности и селективности определяемых концентраций [1].

Сложности, связанные с разработкой биосенсоров напрямую связаны с видом биораспознающего элемента и методом его иммобилизации на поверхности трансдьюсера. Отмеченные проблемы находят отражение в возросшем числе публикаций, посвящённых биосенсорам [1].

Биораспознающий элемент предназначен для работы в электронном электронно-оптическом или пьезоэлектрическом устройстве. Например, светочувствительные биосенсоры – это устройства, содержащие в качестве тест-объекта те или иные фоточувствительные биологические структуры (макромолекулы, фоторецепторные мембраны и т.д.) и предназначенные для регистрации, преобразования и хранения оптической информации. Отправной точкой и стимулом к разработке таких сенсоров служат данные о высокой квантовой эффективности, чувствительности и широком динамическом диапазоне природных светочувствительных систем, принимающих участие в таких процессах, как зрение, фотосинтез и т. д. [3].

Биораспознающий элемент биосенсорного устройства должен удовлетворять ряду требований, главными из которых являются [1–3]:

- 1) доступность;
- 2) должен быть селективным по отношению к определяемому веществу или группе веществ;
- 3) должен обеспечивать воспроизводимость результатов анализа;
- 4) должен обеспечивать работоспособность в заданном диапазоне параметров среды (температура, давление, влажность, рН, ионная сила раствора и т.д.);
- 5) должен обладать относительно невысокой стоимостью;
- 6) должен иметь достаточно продолжительный срок хранения;
- 7) должен быть безопасным в эксплуатации [1–3]. В качестве тест-объекта могут быть использованы бактерии, которые могут вызывать бактериальную контаминацию определяемых веществ. Например, биосенсоры для анализа воды в сети водоснабжения

или внутри работающего биореактора. В этих условиях указанное требование приобретает особую актуальность [3].

Указанный список требований не является полным, и в каждом конкретном случае могут быть оговорены и другие требования. Названным требованиям в той или иной мере отвечают все те упомянутые ранее биологические элементы, применяемые в биосенсорных устройствах. Следует отметить, что идеальный вариант, т.е. биологический тестирующий элемент, полностью удовлетворяющий указанным требованиям, подобрать практически невозможно. Поэтому реально выбирается оптимальный вариант. Вероятно, последнее частично и объясняет наличие значительного разнообразия тест-объектов, даже в однотипных конструкциях биосенсорных устройств, предназначенных для определения содержания какого-либо определённого вещества [1–3].

В качестве распознающих элементов биосенсоров чаще всего используют *ферменты*. Они могут присутствовать как в виде очищенной субстанции, так и в составе микроорганизмов или интактной ткани. Ферменты ускоряют протекание биохимических реакций и специфически связываются со своими субстратами. В биосенсорах их используют именно благодаря их каталитическому действию. Ферменты катализируют такие разнообразные реакции, как гидролиз и дегидрирование, конденсация и изомеризация и многие другие [2, 3]. Ферменты как биологические катализаторы обладают рядом уникальных свойств, которые выделяют их на фоне обычных катализаторов гомогенного типа. Прежде всего, следует указать на их необычайно высокую каталитическую эффективность. Например, добавка незначительного количества фермента приводит к ускорению катализируемой реакции между субстратами более чем в миллион раз. Применение обычных химических катализаторов, как правило, не позволяет достичь столь больших ускорений процесса. Поэтому превращения веществ вне организма происходят с малой скоростью, требуют высоких температур и высоких концентраций протонов или гидроксид-ионов. В организме же, несмотря на отсутствие высокой температуры, концентрированной кислоты и щелочи, скорость химических реакций, происходящих в протоплазме, достаточно высока [2, 3].

Согласно классификации, утверждённой Комиссией по ферментам Международного биохимического союза, ферменты подразделяются на шесть классов: 1) оксидоредуктазы; 2) трансферазы; 3) гидролазы; 4) лиазы; 5) изомеразы; 6) лигазы [3].

По специфичности действия на субстраты ферменты делятся на два класса [3]:

1. Обладающие почти абсолютной специфичностью по отношению к определённому субстрату и почти не взаимодействующие даже с близкородственными соединениями (таблица 3.1) – это ферменты всех классов, взаимодействующие с каким-либо одним субстратом.

Таблица 3.1 – Высокоспецифичные ферменты, применяемые в аналитических системах [3]

Фермент	Субстрат
Аденозинмонофосфатдеаминаза	Аденозин монофосфат
Аспартаза	L-аспартат
Глутаматдекарбоксилаза	L-глутамат
Глутаматдегидрогеназа	L-глутамат
Глюкозооксидаза	D-глюкоза
Инвертаза	Сахароза
Каталаза	Перекись водорода
Лактатдегидрогеназа	L-лактат, пируват
Лизиндекарбоксилаза	L-лизин
Люцифераза светлячков	АТФ
Люцифераза бактерий	Флаavinмоноклетид восст.
Малатдегидрогеназа	Оксалоацетат
Мутаротаза	D-глюкоза
Нитратредуктаза	Нитрат-ион
Нитритредуктаза	Нитрит-ион
Уреаза	Мочевина
Урикиназа	Мочевая кислота
Тирозиндекарбоксилаза	L-тирозин
Фенилаланиндекарбоксилаза	α -фенилаланин
Холестериноксидаза	Холестерин

Другие субстраты с близкородственной структурой расщепляются гораздо медленнее. Характерно, что ферменты класса трансфераз, изомераз и лигаз, осуществляющие тонкие биохимические превращения в клетке, как правило, обладают высокой специфичностью. Уникальной специфичностью обладает люцифераза светлячков, расщепляющая только аденозинтрифосфат (АТФ) [3].

2. Специфичные по отношению к какому-либо определённому классу субстратов (таблица 3.2) – это ферменты, обладающие групповой специфичностью. К ним относятся гидролазы и оксидоредуктазы. Синтезируя эти ферменты, клетки утилизируют источники питания и метаболиты таким образом, чтобы нейтрализовать действие соединений, вредных для жизнедеятельности организма.

Таблица 3.2 – Ферменты, обладающие групповой специфичностью [3]

Фермент	Субстрат
Алкогольдегидрогеназа	Спирты
Арилсульфатаза	Эфиры серной кислоты
β -глюкозидаза	β -глюкозиды
Диаминоксидаза	Биогенные амины
Оксидазы D-аминокислот	D-аминокислоты
Оксидазы L-аминокислот	L-аминокислоты
Пенициллиназа	Производные 6-аминопенициллиновой к-ты
Пенициллинамидаза	Пенициллины и другие соединения
Пероксидаза	Ароматические соединения
Протеазы (химотрипсин, трипсин)	Эфиры аминокислот
Полифенолоксидаза	Замещённые фенолы
Холинэстераза	Эфиры холина и тиохолина
Щелочная фосфатаза	Эфиры фосфорной к-ты

Ферменты, обладающие групповой специфичностью, катализируют окисление аминокислот и ароматических соединений, гидролиз эфиров

сахаров, фосфорной и серной кислот, разрушение лактамного кольца в производных 6-аминопенициллиновой кислоты и др. Кроме того, велика их роль в выявлении молекулярных механизмов катализа специфических химических реакций [3].

Использование высокоспецифичных ферментов позволяет селективно определять субстраты в присутствии других соединений. Вместе с тем ферменты с групповой специфичностью используются для обнаружения таких классов соединений, как антибиотики (пенициллиназа), токсичные гидроксильированные производные бензола (полифенолоксидаза) и т.д. [3]. В обычных методиках анализа процесс контролируется с применением одного из физико-химических способов оценки потребления исходных реагентов или образования продуктов реакции. При этом ферменты расходуются так же, как и другие реагенты. Благодаря иммобилизации ферментов создавалась возможность многократного применения биокатализаторов. На основе гетерогенных ферментов были созданы принципиально новые аналитические системы – биосенсоры, которые нашли широкое применение в научной практике и на производстве [2, 3].

Основой электрохимических биосенсоров являются электроды, которые модифицируются тем или иным ферментом [1–34].

В первых биосенсорных устройствах, обычно упоминают созданный Л. Кларком и К. Лайоном (1962 г.) ферментный электрод для определения глюкозы [2]. В указанном устройстве на поверхности газопроницаемой мембраны амперометрического датчика, предназначенного для определения концентрации молекулярного кислорода (электрод Кларка), был нанесён слой геля, содержащий иммобилизованную глюкозооксидазу – фермент, который катализирует процесс окисления глюкозы молекулярным кислородом до глюконовой кислоты и пероксида водорода. При наличии в тестируемой среде глюкозы концентрация кислорода у поверхности электрода Кларка уменьшается и в цепи электрода снижается электрический ток. При этом величина, тока, проходящего через электрод Кларка пропорциональна содержанию глюкозы в среде для довольно широкого диапазона концентраций углевода [2, 3].

В последнее время широко применяются электроды, изготовленные на базе углерода – это толстоплёночные электроды или *screen-printed*, стеклоуглеродные, углеводородные и угольные пастовые электроды. Модифицированные формазаном толстоплёночные электроды позволяют определить медь, свинец, кадмий и цинк [4].

Фенол и фенольные соединения обнаруживают с помощью пористого гидрофобного углеводородного электрода с иммобилизованным на нем ферментом тирозиназой [5], или угольного пастового электрода, содержащего фермент полифенолоксидазу [6].

Тирозиназный биосенсор позволяет определять не только фенол, но и метаболит допамина 3,4-дегидроксифенилуксусной кислоты [7].

Кроме тиразиназы и полифенолоксидазы [8] для определения фенольных соединений используют лаккозу (фермент, выделяемый грибом *Pycnoporus cinnabarinus*) [9]. Известно, что лаккоза катализирует окисление широкого круга фенольных соединений и аминов, а также некоторых неорганических ионов и сопутствующим восстановлением кислорода непосредственно из воды [4, 8, 9]. Для иммобилизации фермента по поверхности стеклоуглеродного электрода наносят три типа полимерных материалов: положительно заряженные цетил-, этилполиэтапепитин, отрицательно заряженные коммерческие препараты *Nafion* и *Eastman AQ29D* [9, 10].

На основе полимерной плёнки *Nafion* с иммобилизованной на ней диметилсульфоксидредуктазой, нанесённой на стеклоуглеродный электрод определяют диметилсульфоксид [10].

Большую группу ферментных биосенсоров составляют сенсоры для определения сахаров (глюкозы, фруктозы и др.). В качестве биораспознающих элементов применяют такие ферменты, как D-фруктозодегидрогеназа, оксидаза, глюкозооксидаза [11, 12]. В качестве трансдьюсеров в таких биосенсорах используют не только электроды на основе углерода, но и золота, платины и других материалов. Для определения фруктозы фермент D-фруктозодегидрогеназу иммобилизуют на углеродном нанотрубчатом пастовом электроде, модифицированном электрополимеризованной плёнкой 3,4-дегидроксибензальдегида [11], а для детектирования

одновременно глюкозы и фруктозы, применяют тест-объекты из оксидазы, глюкозооксидазы, дигидрогеназы фруктозы и тетрагидрофульвален-3-меркаптопропионовой кислоты, которые наносят монослоем на золотой электрод [12]. В проточно-инжекционной аппаратуре для определения глюкозы, фермент глюкозооксидазу иммобилизуют на природной протениновой мембране в тонком слое ферментной ячейки [13].

Улучшить параметры глюкозных биосенсоров можно за счёт применения микродискового электрода, покрытого плёнкой, содержащей фермент. Продукт ферментной реакции в сенсоре непосредственно реагирует с электродом. Микродиск из платины (Pt-электрод), покрывают пленкой из поливинилового спирта, содержащей глюкозооксидазу [14].

Хорошей адсорбционной платформой для ферментов – глюкозооксидазы, алкогольоксидазы и ферментной системы (алкогольоксидаза совместно с пероксидазой) обладают электропроводные полимеры, такие как полианилин, полифенол, полипиррол, поликарбазон, полиметааминофенол электрохимически осаждённые на поверхности платинового электрода [15].

Определение глюкозы на фоне альбумина и сывороточных белков проводят с помощью биосовместимого сенсора, основанного на использовании эффекта усиления поверхностно-комбинационного рассеяния. Основой такого сенсора является алкантилатный триэтиленгликолевый слой, концентрирующий глюкозу вблизи активной поверхности комбинационного рассеяния [16].

Помимо ферментов животного происхождения в биосенсорике широко применяются ферменты растительного происхождения, например, пероксидаза хрена [17]. Для определения оксидов азота с использованием пиролитического графитового электрода применяют пероксидазу хрена и кизельгур [17]. Полифенолы в растительных экстрактах определяют с помощью биосенсора, основанного на угольной пасте с пероксидазой хрена и дезоксирибонуклеиновой кислотой (ДНК), так называемые гибридные биосенсоры [18, 19], иммобилизованные на окиси кремния и титана [19].

В более современных биосенсорах для иммобилизации ферментов на тех или иных электродах, применяют наночастицы пероксидазы хрена, которая осуществляет детектирование пероксида водорода [17, 20, 22]. Кроме того, используя, свойство электрокаталитического воздействия пероксида водорода, в биосенсоре применяли электрод с адсорбированным красителем нейтрально красным, покрытым коллоидом наночастиц серебра и фосфата цинка, который содержит также пероксидазу хрена, бычий сывороточный альбумин и глутаровый альдегид [21, 23].

Анионная пероксидаза табака, обладает более широким pH оптимумом стабильности, высокой устойчивостью против инактивации пероксидом водорода и большей эффективностью в процессах прямого переноса электронов, по сравнению с традиционно используемой катионной пероксидазой из корней хрена [24]. При её иммобилизации на самоорганизующемся тиоловом монослое на золотом электроде намного превосходит пероксидазу хрена по чувствительности определения пероксида водорода независимо от заряда монослоя [24].

С помощью метода поверхностного плазменного резонанса, заложенного в биосенсоре с использованием в качестве мишеней яичного альбумина и пероксидазы хрена, тестируют загрязнённость воздуха [25].

Все биосенсоры, которые основаны на ферментном ингибировании, применяются для определения загрязнения окружающей среды и токсических соединений в различных пищевых продуктах. В последнее время интерес к холинэстеразным и другим ферментным сенсорам вновь привлекает внимание в связи с угрозой возможного химического терроризма [26, 27, 28].

Было проведено сравнительное изучение потенциометрических холинэстеразных сенсоров на основе стеклогуглеродных электродов, модифицированных полианилином различного строения [28]. Химически синтезированный полианилин, допированный камфорсульфоновой кислотой, показывает более высокий сигнал на субстраты холинэстераз, тогда как полианилин, получаемый электрополимеризацией на тонком слое нафиона, обеспечивает более высокую чувствительность в определении пестицидов [28].

С помощью генетически созданной нитроредуктазы, с дополнительными сконструированными цистеиновыми аминокислотами, можно детектировать взрывоопасные вещества [27, 29].

Включение холестеринэстеразы и холестериноксидазы в проводящую полипирроловую плёнку с использованием электрополимеризации позволило определять холестерин [30].

Существует группа биосенсоров для определения действующих веществ в лекарственных, витаминных и других препаратах. Так антиоксидантную активность лекарственных и витаминных препаратов определяют с помощью фермента супероксиддисмутазы [31].

Помимо амперометрических сенсоров для определения лекарственных препаратов и определения различного рода биохимических аналитов применяются сенсоры, работающие на основе других трансдюсеров. Например, голографические биосенсоры для определения мочевины или пенициллина [32]. Уреаза или пенициллиназа иммобилизовались на решетках, воспроизводящих голограммы отражения, которые меняют цвет в зависимости от концентрации субстрата в контрольных средах [32].

Для определения адреналина и изопреналина применяют интегрированную хемилюминесценцию. Сенсор основан на эффекте усиления тест-объектом эмиссии хемилюминесценции люминола, окисляемого перйодатом в щелочном растворе [33]. Аналитические реагенты люминол и перйодат иммобилизуют на ионообменной смоле. В качестве носителей биораспознающих элементов широко применяют пористые мембраны с хемилюминесцентной детекцией [33].

В настоящее время при создании биосенсоров широко используют целые клетки микроорганизмов, а также ткани и клетки растений и животных. При этом можно выделить следующие их достоинства [2, 3, 34]:

1. Нет необходимости получать очищенные ферменты или другие компоненты клеток, можно непосредственно использовать целые клетки или срезы тканей без выделения и очистки белков. Это в конечном итоге приводит к значительному снижению стоимости [2, 3, 34].

2. Ферменты и другие биомолекулы находятся в их естественном окружении [2, 3, 34].
3. Активность ферментов стабилизирована [2, 3, 34].
4. Биосенсор можно регенерировать погружением в питательную среду. Микроорганизмы сохраняют жизнеспособность довольно долго [2, 3, 34].
5. Целые клетки могут содержать несколько кофакторов и ферментов, катализирующих реакции, которые трудно, если вообще возможно, осуществить с помощью одного иммобилизованного фермента. Кроме того, кофакторы, необходимые для ферментативных реакций, находятся в естественно иммобилизованном состоянии [2, 3, 34].

Однако, у таких биосенсоров есть и недостатки, среди которых обычно отмечают [2, 3, 34]:

1. Низкую селективность, обусловленную присутствием в клетке микроорганизма ряда ферментов, которые могут катализировать побочные реакции [2, 3, 34].
2. Часто наблюдаемый медленный отклик биосенсора, поскольку в диффузионные барьеры в данном случае включается и плазматическая мембрана [2, 3, 34].

В качестве примеров можно привести использование клеток *Neurospora europea* для определения аммиака, *Trichosporon brassicae* для определения уксусной кислоты, *Sarcina flava* (глутаминаза) для определения глутамина, *Azotobacter vinelandii* (нитратредуктаза) для определения нитрат-ионов и срезов почек свиньи для определения глутамина в пищевых продуктах. На основе гриба *Aspergillus niger* созданы биосенсоры для определения биогенных аминов в мясных продуктах [1, 34].

Этот список может быть многократно увеличен, поскольку многие организмы (как одноклеточные, так и многоклеточные) являются источником тех или иных биополимеров, пригодных к использованию в качестве биологических тестирующих элементов биосенсоров. Следует отме-

тить, что замена биомолекул клетками зачастую не приводит к существенному изменению конструкции биосенсора [3, 34].

Применения *клеточных биосенсоров* достаточно многообразны. Созданы биосенсоры для селективного определения фенолов, пролина, глутамина, тирозина, молочной и аскорбиновой кислот, глюкозы. Интересные возможности связаны с анализом ионов сульфата, аммония, монометилсульфата. Уникальные возможности обеспечивают клеточные биосенсоры для экспресс-анализа качества воды и сточных вод. Существует метод определения биологического потребления кислорода (БПК) – анализ на определение совокупности органических соединений, которые могут быть использованы микроорганизмами. Традиционный метод требует для получения данных несколько дней. Биосенсор с иммобилизованными клетками позволяет получать эти же результаты в течение нескольких минут. Коммерчески значимые прототипы биосенсоров для определения качества воды созданы компаниями Японии, Германии и Бельгии [2, 3, 34].

Электрод для определения содержания глюкозы на основе иммобилизованных клеток *Pseudomonas fluorescens* отличается от ферментного электрода Лайона и Кларка лишь тем, что на поверхность электрода Кларка нанесены иммобилизованные бактерии, а не фермент в очищенном виде. Да и по эксплуатационным параметрам упомянутые электроды различаются мало [2, 34].

Разрабатываются *аффинные сенсоры* на основе антител [2, 3, 35, 36].

Наиболее селективными и чувствительными по отношению к бактериям являются *иммуноферментные биосенсоры*, в основу работы которых положен иммуноферментный анализ. В иммуноферментных биосенсорах для получения более чувствительной части тест-объекта проводят, например, совместную иммобилизацию холинэстеразы и антител против соответствующих антигенов на поверхность рабочего платинового электрода. В качестве матричных компонентов используют бычий сывороточный альбумин (БСА), хитозан и нитрат целлюлозы для определения антигенов условно-патогенных микроорганизмов *Streptococcus pyogenes*

(пирогенного стрептококка) и *Staphylococcus aureus* (золотистого стафилококка) [35].

Белки очень часто применяют как одну из составных частей биораспознающего элемента. Для определения иммуноглобулина G (IgG) в качестве чувствительного слоя используют композиционный материал на основе ионообменного для ионов калия стекла с плёнкой окиси титана и белка [35].

Для определения бактерий (антигенов) используют в качестве трансдьюсеров не только иммуоферментные электроды [36], но и такие устройства, как оптические [37], пьезокварцевые [38], и др., на рабочие поверхности которых нанесены антитела или антигены. Для детектирования антигена разработан иммуносенсор с микровесами на пьезоэлектрическом кристалле кварца с плотно упакованным на его поверхности монослоем [38]. Для создания пьезоиммунного сенсора использован переменный одноцепочечный фрагмент, ковалентно-связанный с цистеином [38]. Пьезокварцевые иммуносенсоры успешно применяются в ветеринарии для идентификации возбудителей инфекции у животных, птицы, а также при оценке качества сельскохозяйственной продукции [38].

Иммобилизация антител *Escherichia coli* на электроде выполненного из индий-титан оксида или на оцифрованном матричном микроэлектроде и на основе измерения полного сопротивления фарадеевского тока позволило такими биосенсорами детектировать кишечную палочку [39, 40].

Также в качестве биораспознающих элементов используют *бактериальные структуры, водоросли, тканевые фрагменты* и др. Например, гигантские клетки междоузлий клеток водоросли *Nitella flexilis* используют для определения наличия примесей аммиака, присутствующего в микромолярных концентрациях в воде и различных реактивах [41].

С помощью светящихся бактерий в качестве биораспознающего элемента, таких как *Photobacterium phosphoreum Sq3* и *Vibrio fischeri F1* по их биолюминесценции можно определить токсины [42].

Фотоактивность цианобактерий, зависит от их контакта с определёнными соединениями, например, с компонентами химического и биоло-

гического оружия – это свойство может быть реализовано при создании биораспознающих поверхностей [42].

Помимо клеток животного и растительного происхождения и бактерий в качестве тест-объекта в биосенсорах могут применяться и субклеточные структуры, например, митохондрии сердца быка для селективного контроля фенолов [43]. Весьма перспективным является создание низкотемпературного банка биораспознающих элементов, что было показано на примере митохондриального биосенсора. Для этого типа биосенсоров отмечается хорошая воспроизводимость результатов. Митохондрии из сердца быка легко приготовить без необходимости применения стабилизатора, и они могут храниться в замороженном виде в течение нескольких месяцев [43].

В последнее время в качестве чувствительного элемента в биосенсорах используют *рецепторы* [36]. *Рецепторы* – компоненты биологических мембран, обладающие высокой степенью избирательности по отношению к молекулам, взаимодействующими с ними. Основные концепции теории рецепторов глубоко проникли в идеологию современных исследователей, занятых изучением механизмов действия физиологически активных соединений. Биологически активные соединения обычно подразделяют на *агонисты* (вещества, связывающиеся с рецепторами и индуцирующие биологический ответ) и *антагонисты* (соединения, препятствующие взаимодействию агониста, и не вызывающие или ослабляющие биологическую реакцию). Не исключено, что среди большого количества ксенобиотиков имеются вещества, специфически связывающиеся с рецептором, причём как сами вещества, так и рецепторы пока являются неизвестными [2, 3, 36].

«Теория рецепторов» описана в работах Лэнгли и Эрлиха, согласно которой «вещества не действуют, не будучи связанными» [3]. Дальнейшее развитие теория рецепторов получила при изучении действия различных гормонов. Установленные факты по влиянию гормонов позволили предположить, что последние связываются с расположенными на поверхности специальными структурами – рецепторами, т. е. молекулами, способными «узнавать» гормон, взаимодействовать с ним и передавать информацию о

его присутствии. Однако, достоверно доказать наличие рецепторов на мембранах не так-то просто. Это связано, с одной стороны, с их чрезвычайно низкой концентрацией, лабильностью и неоднородностью. С другой стороны, на поверхности любой клетки имеются мембранные компоненты, неспецифически связывающие тот или иной гормон (эффе́ктор), т.е. не все места, связывающие гормон, являются рецепторами [3].

Трудно дать точное определение понятию «рецептор». Согласно определению, данному Вудом, агонистами рецепторов могут быть вещества со следующими четырьмя признаками [3]:

- 1) они действуют в низких (микромольных) концентрациях [3];
- 2) их активность в значительной мере зависит от изменений в химической структуре [3];
- 3) их активность может подавляться селективными антагонистами. Например, атропин может сильно блокировать действие ацетилхолина на восходящую ободочную кишку морской свинки, но практически не изменяет активность гистамина [3];
- 4) активность антагонистов также сильно зависит от изменений в химической структуре [3].

В определении, данном Куатреказасом, перечисляются следующие основные признаки рецепторов [3]:

- 1) взаимодействие эффе́ктора с рецептором должно отвечать требованиям определенной пространственной и структурной специфичности [3];
- 2) количество связывающих мест должно быть ограниченным, и, следовательно, связывающие места должны быть насыщаемыми [3];
- 3) связывание эффе́ктора должно иметь тканевую специфичность, соответствующую его биологической функции [3];
- 4) связывающие места должны обладать высоким сродством к гормону, а их концентрация должна соответствовать физиологической концентрации гормона [3];

5) связывание эффектора рецептором должно быть обратимым [3].

Для строгого доказательства наличия рецепторов на мембране лучше всего выделить этот компонент, очистить, затем встроить в искусственную бислойную липидную мембрану или липосому и показать, что он сохраняет биологическую активность. Выделенные рецепторы являются гликопротеинами или гликолипидами. Молекула рецептора состоит из полярной и неполярной частей. Полярная часть служит для связывания вещества, например, гормона. Основную роль в этом играют полисахаридные цепи молекулы рецептора. Вторая, менее полярная часть молекулы рецептора служит для её закрепления в липидном бислое и передачи принятого сигнала внутрь клетки. Взаимодействие между связывающими и передающими участками осуществляется благодаря конформационным перестройкам, происходящим в результате присоединения эффектора (агониста) со связывающим участком рецептора. В этом случае происходят небольшие изменения на отдельных участках мембран, результаты которых передаются внутрь клетки, усиливаясь с помощью определённого («релейного») механизма, и, в конце концов, определяют течение внутриклеточных процессов. В основе передачи сигнала в ряде случаев лежит активация и инактивация аденилатциклазы (АЦ), расположенной в мембране. Этот фермент отвечает за синтез циклического нуклеотида – аденозинмонофосфата (цАМФ). В нормальном состоянии активность АЦ подавлена. Но при взаимодействии агониста с рецептором на поверхности мембраны АЦ активируется. В результате усиливается синтез цАМФ, увеличивается концентрация последнего внутри клетки и активируется один или несколько ферментов, расположенных внутри клетки. Таким образом, химический сигнал передаётся от одного посыльного к другому. Первичным посыльным является эффектор (гормон, медиатор), через GTP-связывающий G-белок и АЦ он передаёт сообщение внутрь клетки. Вторичные посредники не только способствуют передаче внешнего сигнала во внутриклеточный, но и обеспечивают значительное усиление первоначального сигнала. Каждая молекула рецептора, присоединившая сигнальную молекулу, активирует много молекул АЦ, которые, в свою очередь, катализируют образование множества молекул цАМФ. В итоге, по

всей цепи от рецептора до клеточной реакции происходит усиление сигнала в 10^7 – 10^8 раз. Таким образом, несколько сигнальных молекул гормона или медиатора могут изменять функциональную или метаболическую активность всей клетки. Признанными вторичными мессенджерами являются ионы кальция. Кальций участвует в регуляции внутриклеточных процессов в комбинации с двумя другими вторичными посредниками – инозитолтрифосфатом и диацилглицеролом [3].

На поверхности плазматических мембран разных клеток число рецепторов варьирует. Так, на поверхности одной клетки печени имеется 250 000 рецепторов инсулина, тогда как на поверхности клеток щитовидной железы их число не превышает 500. Часть рецепторов может «плавать» в плоскости мембраны, но большее их количество фиксировано системой микрофиламентов и микротрубочек [3].

Для рецепторов характерно [3]:

1. Высокое сродство, проявляющееся в том, что агент действует при низкой концентрации (10^{-9} М и ниже) [3].
2. Кривая, описывающая процесс взаимодействия эффектора с местами связывания на мембране от его концентрации, должна выходить на плато, поскольку количество рецепторов ограничено [3].
3. Биологическая активность пар оптических изомеров (стереоспецифичность) различна. Так, например, право- и левовращающиеся формы атропина, морфина и адреналина сильно отличаются друг от друга по биологической активности [3].
4. Имеет место тканевая специфичность биологического действия веществ на рецепторы. Например, адреналин оказывает мощное действие на сердечную мышцу, но очень слабо действует на попеременно-полосатые мышцы [3].

Далее следует отметить, что взаимодействие агонист-рецептор возможно только при строгом соответствии пространственных и зарядовых геометрий. Необходимо учитывать и то, что связывание эффектора с рецептором должно быть обратимым. Так, одна и та же химическая группа в

зависимости от своего химического окружения может обладать действием как агониста, так и антагониста. Как пример можно привести ацетилхолин и тубокурарин. Эти соединения действуют на один и тот же рецептор, но меньшая молекула (ацетилхолин) точно соответствует участку связывания и активирует рецептор. Большая молекула (тубокурарин) перекрывает рецептор и оказывает блокирующее действие. Все вышеуказанное представляет рецепторы как вполне подходящие тест-объекты для биосенсорных устройств. Эти свойства рецепторов проявляются в основном в составе живого организма. Чрезвычайно высокая чувствительность реакции рецептор-эффектор проявляется благодаря биологическому усилению. Например, самцы некоторых видов бабочек обнаруживают феромоны самок при содержании их в воздухе в исключительно низких концентрациях – несколько молекул в одном кубическом метре воздуха. Рецепторы являются перспективным объектом для создания биосенсоров, однако в литературе содержится описание небольшого количества биосенсорных устройств на основе рецепторов. В большинстве случаев используется не изолированный рецептор, а биологический препарат, содержащий множество рецепторов [35].

Проблема экспрессного выявления токсинов и патогенных микроорганизмов состоит в их вредном взаимодействии на животных и человека. Однако, к сожалению, в мире нередко возникают острые ситуации возможного поражения людей опасными для жизни вирусами, что может быть вызвано несоблюдением санитарно-гигиенических норм, действием террористических организаций. Подобная угроза стимулирует исследования, призванные обеспечить разработку методов надежной экспрессной диагностики. Быстро обнаружить токсические агенты можно иммунологическими методами. Высокоспецифично, недорого и с высокой чувствительностью выявить патогенные микроорганизмы позволяют серологические методы, включая традиционные иммунные и иммунохимические методы, основанные на принципах биосенсорики [2, 3, 42].

Перспективными современными методами иммунного анализа, направленного на выявление антител к возбудителям, также являются многопараметрические технологии: иммуноблоттинга, биосенсорная тех-

нология иммуночипов. Многопараметрические технологии дают возможность детекции микроорганизмов без их предварительного культивирования, выявления некультивируемых и трудно культивируемых патогенов, идентификации широкого спектра сопутствующей бактериальной флоры (технологии прямого анализа), выявления антител разной специфичности к одному или нескольким микроорганизмам (технологии непрямого анализа) и позволяют существенно сократить время обследования пациентов [35].

В течение последних десятилетий на основании достижений в различных областях науки предложен ряд новых подходов, которые способствуют тому, чтобы мониторинг токсинов и патогенов в окружающей среде был чрезвычайно быстрым, чувствительным и специфичным. Это стало возможно благодаря получению моноклональных антител и созданию рекомбинантной ДНК-технологии, основанной на полимеразной цепной реакции. Традиционные методы определения специфических нуклеотидных последовательностей достаточно трудоёмки и продолжительны (требуется не менее 10 часов). ДНК-сенсоры или их синтетические аналоги (аптамеры) призваны преодолеть этот недостаток [44–47].

Теоретически любая молекула или биохимическая реакция могут быть использованы для создания биораспознающего элемента сенсорного устройства [46]. Что касается работ, описывающих применение молекул нуклеиновых кислот, то число их ограничено [3].

Рассматривая структуру молекулы ДНК, можно обратить внимание на её особенности, которые могут учитываться при создании биодатчиков [3]:

1. Двухцепочечные ДНК существуют в разных пространственных формах (А, В, Z; линейная, кольцевая, суперспирализованная и др.), заметно различающихся по своим физико-химическим свойствам. Изменение внешних условий инициирует переход между этими формами [3].
2. Двухцепочечные молекулы нуклеиновых кислот, отрицательно заряженные фосфатные группы, которые нейтрализованы

противоионами, являются «жесткими». Одноцепочечные нуклеиновые кислоты – «гибкие» [3].

3. Каждая цепь ДНК содержит азотистые основания – хромофоры, поглощающие свет в ультрафиолетовой области спектра. Причём основания одной цепи образуют комплементарные Н-связи с азотистыми основаниями противоположной цепи (комплементарное «узнавание») [3].
4. Для молекул нуклеиновых кислот характерна оптическая активность, спектр кругового дихроизма [3].
5. Спиральная структура двухцепочечных нуклеиновых кислот в сочетании со специфическим распределением реакционноспособных групп на поверхности этих молекул обеспечивает «адресовку» тех соединений, которые взаимодействуют с молекулами нуклеиновых кислот [3].

Рассмотренные особенности показывают, что для нуклеиновых кислот в отличие от ферментов характерен целый набор возможностей для регистрации взаимодействия их с молекулами анализируемого вещества. Эти уникальные особенности нуклеиновых кислот позволяют на основе их молекул создавать биосенсоры, различающиеся по принципам «узнавания» биологически активных веществ, взаимодействующих с молекулами нуклеиновых кислот. Биосенсоры на основе нуклеиновых кислот могут создаваться с использованием как одно-, так и двухцепочечных молекул нуклеиновых кислот. При этом в датчиках, в зависимости от типа нуклеиновой кислоты, используются разные принципы «узнавания». Например, в основу биодатчиков на базе одноцепочечной нуклеиновой или рибонуклеиновой кислоты (РНК) может быть положен комплементарный вариант «узнавания» азотистых оснований модельной одноцепочечной нуклеиновой кислоты с азотистыми основаниями «чужеродной» нуклеиновой кислоты. В то же время не исключается создание биодатчиков на основе двухцепочечных нуклеиновых кислот, где будут использоваться и иные принципы «узнавания» веществ [3].

Молекулы ДНК являются наиболее чувствительными к тяжёлым металлам, что нашло им применение в биосенсорах [45]. Нуклеиновые

кислоты представляют собой уникальный «инструмент» для создания биосенсоров вследствие многообразия механизма связывания белков и низкомолекулярных соединений. К ним относят электростатические взаимодействия с отрицательно заряженным фосфатным остовом, специфическое связывание с нуклеотидами вблизи поверхности спирали ДНК, включение низкомолекулярных соединений внутрь дуплекса между парами комплементарных оснований (интеркалирование). Основное внимание при создании ДНК-сенсоров уделяется изучению характеристик олигонуклеотидов, взаимодействующих с комплементарными нуклеотидными последовательностями (так называемыми ДНК-зондами) на поверхности преобразователя [3]. ДНК либо фрагменты олигодезоксинуклеотидов иммобилизуют на ртутно-плёночные или стеклоглеродные электроды в составе нитроцеллюлозной матрицы. В случае иммобилизации ДНК на поверхность серебряных электродов пьезоэлектрического кварцевого резонатора, оптимальным способом иммобилизации ДНК является сорбция на полиэтиленовый предшественник, что позволяет успешно использовать для определения в крови специфичных нуклеиновых кислот и антител в норме и при различных заболеваниях [45].

Биораспознающие элементы на базе ДНК и её ферментов используют для анализа химических и биохимических реакций. На основе окисления гуанина и аденина в молекуле ДНК судили о взаимодействии алкилирующего агента 4,4'-дигидроксиалкона с односпиральной и двухспиральной ДНК, выделенной из тимуса телёнка [48]. С помощью ДНК-электрохимического биосенсора изучали электрохимическое восстановление бензимидазола до производных гидроксилamina [49]. Для определения полифенолов для растительных экстрактов применяли двухкомпонентный тест-объект в биосенсоре на базе ДНК и фермента пероксидазы хрена иммобилизованных на $\text{SiO}_2\text{-TiO}_2$ [17].

Специфические взаимодействия низкомолекулярных соединений с ДНК определяют действие лекарственных противораковых препаратов, последствия окислительного и термического шока, процессы повреждения и эффективность репарации нуклеиновых кислот [49, 50]. ДНК-сенсоры могут служить удобными моделями для изучения процессов

in vitro в таких областях, как фармакология, экотоксикология и экологическое нормирование содержания токсикантов в окружающей среде. Несмотря на то, что условия взаимодействия нуклеиновых кислот с низкомолекулярными регуляторами и эффекторами различной природы отличаются от таковых в живой клетке, с помощью ДНК-сенсоров можно оценивать специфичность связывания, механизм регуляторного или повреждающего действия и трансформации биологически активных веществ в биохимических реакциях с участием ДНК. Важной задачей является определение эффективных лекарственных доз противораковых препаратов, отличающихся высокой токсичностью, а также их концентраций в биологических жидкостях и товарных формах. ДНК-сенсоры перспективны для скрининга и исследования фармакокинетики новых лекарств и биологически активных пищевых добавок [50]. Возможности генерации аналитического сигнала, обусловленного взаимодействием ДНК с низкомолекулярными соединениями, весьма разнообразны. С одной стороны, это может обеспечить специфичность определения, а с другой – создаёт некоторые трудности для исследователя, который вынужден адаптировать конструкцию биосенсора и протокол измерения для каждого нового объекта анализа. Вероятно, по этой причине сверхпроизводительные флуоресцентные методы измерения с использованием ДНК-чипов для определения низкомолекулярных соединений не применяются. Для практики определения низкомолекулярных соединений рационально применение небольших и относительно недорогих устройств на основе единичных ДНК-сенсоров или небольших их массивов, изготавливаемых методами фотолитографии на единой подложке, ориентированных на анализ десятков и сотен проб в течение рабочего дня. В таком формате анализа определённые преимущества перед флуоресцентными и масс-селективными сенсорами имеют электрохимические принципы регистрации сигнала, которые более простые в аппаратном оформлении, они менее чувствительны к компонентному составу матрицы, имеют более удобный интерфейс управления основными операционными параметрами. [50, 51, 52, 53]. Описано применение микрочипа, используемого при разделении

ДНК, к определению снабжённых флуоресцирующей меткой аминокислот, пептидов и белков [50].

В настоящее время большую конкуренцию биосенсорам могут составить микрофлюидные чипы (рисунок 3.2).

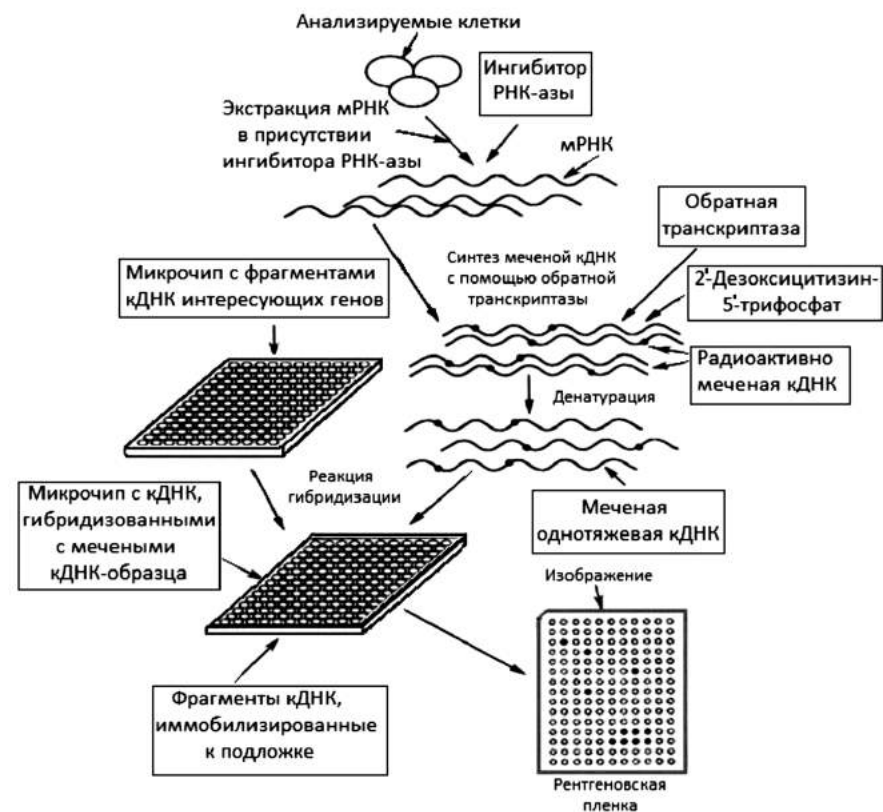


Рисунок 3.2 – Схема микрофлюидного ДНК-чипа [50]

Микрофлюидные чипы позволяют анализировать ДНК, РНК, белки и клетки [50, 53]. Основой микрочипа является микроаналитическая система, которая выполняет большое количество аналитических операций, включая подготовку, ввод и дозирование пробы, перемешивание, смешивание с реагентами, химические реакции, разделение полученного про-

дукта, сбор фракций на заключительной стадии аналитических действий с пробой, детектирование. На микрофлюидном чипе регистрируют продукты анализа высокочувствительными системами детектирования (например, электрохимические, оптические, масс-спектрометрические и др., которые могут быть выполнены конструктивно, отдельно или же быть интегрированы в чип, в том числе и биосенсор) [36, 45–48]. Отмечается более высокая эффективность электрофоретического микрочипа для биоанализа почечных маркеров. В основу работы микрочипа положено сочетание ферментативных реакций на чипе креатина и креатинина с электрофоретическим разделением *n*-аминоглутаровых и мочевых кислот, обеспечивающих быстрые и одновременные измерения содержания основных почечных маркеров [50].

Чувствительность иммунологических чипов для детектирования антигенов вируса лихорадки Денге в 100 раз превышает достигнутую в традиционном сэндвичевом твердофазном иммуноферментном биосенсоре [50].

В последние годы вместо участков нативной ДНК в структуру ДНК-сенсора включают её синтетические аналоги – аптамеры. Применение для аффинного взаимодействия аптамеров молекул некоторых пептидов, коротких полимеров нуклеиновых кислот ДНК или РНК, а также их фрагментов (линейных олигонуклеотидов) явилось началом разработки аптасенсоров. По специфичности взаимодействий аптамеры подобны антителам, но отличаются большей устойчивостью и способностью к обратимой денатурации, осуществляемой в течение нескольких минут. Аптамеры применяются при изучении биохимических процессов, например, специфического распознавания белок-нуклеиновая кислота [46]. Развитие этого направления может стать реальной альтернативой высокочувствительным и селективным иммуносенсорам [46].

Среди новых технологий для прямой идентификации возбудителей заслуживают внимание многопараметрические методы, позволяющие выявлять одновременно несколько возбудителей в одной пробе биологического материала: мультипраймерная полимеразная цепная реакция,

прямая протеомная идентификация патогенов, технология биомикрочипов, технологии секвенирования нового поколения [44, 46].

Таким образом, анализируя вышеизложенное, можно сделать вывод, что независимо от типа сенсора или метода распознавания, используемого в анализе для обеспечения селективности к определяемому веществу, существует общая черта для биосенсоров всех типов – биораспознающий элемент, который иммобилизуют на поверхности преобразователя, детектирующего сигнал [1].

3.2. Принципы иммобилизации биологического материала на поверхности биосенсоров

Принципиальным вопросом при создании биосенсоров является *метод иммобилизации* биологического материала на поверхности сенсора. Первоначально для иммобилизации клеток с сохранением их активности использовали материалы природного происхождения. В последние годы разработаны методы включения живых клеток в синтетические полимерные гели. Особенно интересные и перспективные результаты получены с использованием, так называемого, метода криоиммобилизации клеток [3]. Процедура иммобилизации состоит из нескольких этапов: стадии получения суспензии клеток в растворе полимера; замораживания суспензии с получением криоструктурированных гелей; размораживания с образованием пористого, механически прочного материала, устойчивого к температуре 70–80 °С. Клетки, включённые в такой пористый материал, сохраняют активность и способны функционировать в течение нескольких месяцев [3].

Иммобилизацию можно рассматривать как физическое разделение катализатора (клеток, клеточных фракций или ферментов) и растворителя, при котором молекулы субстрата и продукта могут легко обмениваться между фазами. Разделение катализатора и растворителя может быть достигнуто либо адсорбционным или ковалентным связыванием с нерастворимым органическим или неорганическим носителем, либо связыванием отдельных молекул катализатора друг с другом с образованием

агрегатов или сополимеров. Недостатком таких методов иммобилизации является необходимость использования большого количества катализаторов. Кроме того, химическая модификация, которой подвергаются ферменты или клетки в процессе иммобилизации, может нежелательным образом изменять их каталитические и другие свойства [2, 3].

По этой причине многие исследователи, по выражению Нортон [3], «предпочитают включение», когда клетки или ферменты отделяют от остального объёма включением в носитель или инкапсулированием [2, 3].

Таким образом, катализатор можно включать в полимерную сетку, например, полиакриламидного геля или геля альгината кальция, путём проведения полимеризации или реакции поперечного сшивания геля в присутствии ферментов или клеток. Родственными методиками являются либо инкапсулирование в липосомы, нейлоновые или коллодиевые мембраны, либо их физическое отграничение от других компонентов в аппаратах для ультрафильтрации. Для облегчения работы с частицами, содержащими катализатор, им придают, если это возможно, сферическую форму [2, 51].

При одностадийной катализируемой реакции иммобилизуют или подходящий фермент, или нежизнеспособные клетки, обладающие нужной активностью. В первом случае, чтобы увеличить степень включения и свести к минимуму утечку фермента, требуется высокая степень сшивки носителя. Однако при высокой степени сшивки может ограничиваться диффузия молекул субстрата и продукта внутрь частиц носителя и из них наружу. Эта проблема исчезает в случае иммобилизации клеток. Поскольку размеры клеток относительно велики, можно использовать носители с низкой степенью сшивки и, следовательно, с хорошими диффузионными свойствами. Для катализа многостадийных реакций, например, превращения глюкозы в этанол, где регенерация и удержание кофакторов является обязательным условием, необходимо иммобилизовать живые клетки. В этом случае следует принимать во внимание возможное вредное влияние на жизнеспособность клеток сшивающих агентов. Нужно также позаботиться о подаче необходимого для данных клеток количества кислорода и об удалении диоксида углерода, образующегося в результате

метаболической активности. Включение живых клеток требует мягких условий иммобилизации; носитель должен при этом представлять собой систему открытых пор с хорошими условиями для газообмена. К сожалению, частицы носителя, полученные с учётом этих требований, обладают низкой прочностью. В некоторых системах иммобилизованные клетки сохраняют жизнеспособность в течение многих месяцев [52].

Создание биологической поверхности – сложный технологический процесс [2, 51–56], так как при этом необходимо знать её поверхностные свойства (структуру, реакционную способность, поверхностную энергию, смачиваемость и др.) [53].

Существует пять способов модификации (так называемые «растворимые») биологической поверхности [1, 2, 53]:

- 1) пульверизация;
- 2) центрифугирование;
- 3) испарение капли раствора;
- 4) намазывание (накрашивание);
- 5) погружение в раствор модификатора.

Помимо этих, известны более сложные, чем «растворимые» способы модификации: золь-гель метод; вакуумное напыление; метод Ленгмюра-Блоджет [1, 2, 53].

В свою очередь указанные способы подразделяются на две категории: захват и связывание. Иммобилизация биораспознающего элемента может происходить в один или два этапа. Биораспознающая молекула может присоединяться непосредственно к поверхности преобразователя [22] или модифицировать «несущий субстрат», который впоследствии, а иногда одновременно осаждаётся на преобразователь [44]. Физическая сорбция – наиболее простой вид иммобилизации. Одним из наиболее распространённых адсорбентов служит углерод [11, 17, 55].

Весьма подходящей поверхностью для иммобилизации биораспознающих элементов является полистирол [56, 55, 57]. Однако физическая адсорбция слабо удерживает реагент, который в результате быстро вымывается, поэтому его следует покрывать мембраной, проницаемой для

определяемого вещества. Мембрана также должна обладать способностью удерживать биораспознающие молекулы на поверхности преобразователя, кроме того, в некоторых биосенсорах применяют дополнительные мембраны для устранения помех со стороны легкоокисляемых соединений. Такие биосенсоры состоят из четырёх составляющих: основного амперометрического датчика, ферментного слоя, защитной мембраны и окислительной мембраны, содержащей диспергированный нерастворимый окислитель (BaO_2 , MnO_2 , PbO_2 и др.) в полимерной матрице. Мешающие соединения устраняются посредством их окисления при прохождении через окислительные мембраны. Иммунизацию фермента производят и на природных протеиновых мембранах животного и растительного происхождения [56, 55, 57].

Распространённым методом удерживания ферментов и живых клеток является поперечное сшивание, при котором образуется гелевая матрица, где частицы рецепторов удерживаются физически. Методы получения этого «геля» многочисленны [57, 58]. Наиболее испытанный метод иммобилизации – поперечное сшивание с помощью глутарового альдегида [2, 57, 59]. Помимо глутарового альдегида существуют и другие бифункциональные реагенты, которые связываются преимущественно через группы $-\text{NH}_2$, $-\text{OH}$ и $-\text{SH}$. Это дивинилсульфон, диазобензидин, 4,4'-диазотиоцианато-дифенил-2,2'-дисульфокислота, N-сукцинимидил-4-малеимидобутират, фенол-2,4-бис(сульфонилхлорид), аминосоединения с длинной цепью, гексаметилендиазоцианат, п,п'-дифтор-м,м'-динитродифенилсульфон, диазобензидин-3,3'-дикарбоновая кислота, диметилилимидаат, бисокапроны, 1,5-дифтор-2,4-динитробензол, N,N'-этиленбис (йодацетамид), 2,4-диизоцианотолуол, диазобензидин-3,3'-дианизидин, диабензидин-2,2'-дисульфокислота, реагент К. Вудворда, трихлортриазин, тиолы с длинной цепью [2] (таблица 3.3).

Кроме указанных выше реагентов могут применяться и полимеры: желатин, агар, циклодекстрины, полипиррол, полианилин и многие другие полимеры, фотополимеры и гели в качестве матриц для удерживания [9, 44, 22, 60, 61, 62].

Таблица 3.3 – Бифункциональные реагенты, применяемые для поперечного сшивания биологического материала с поверхностью транс-дьюсера [2]

Название вещества	Структурная формула
Глутаровый альдегид	
Дивинилсульфон	
Гексаметилендиизоцианат	$\text{NOC}-(\text{CH}_2)_6-\text{CNO}$
N,N'-Этиленбис (Йодацетамид)	
Диметиламидаат	
Бисоксираны	
Диазобензидин	
Диазобензидин-3,3'-дикарбоновая кислота	
Диазобензидин-3,3'-дианизидин	

Продолжение таблицы 3.3

Название вещества	Структурная формула
4,4'-Диизотиоцианатодифенил-2,2'-дисульфокислота	
Диазбензидин-2,2'-дисульфокислота	
<i>n,n'</i> -Дифтор- <i>m,m'</i> -динитродифенилсульфон	
Реагент К. Вудворда	
Трихлортриазин	
2,4-Диизоциананотолуол	

Окончание таблицы 3.3

Название вещества	Структурная формула
Фенол-2,4-бис(сульфонилхлорид)	
N-Сукцинимидил-4-малеимидобутират	
1,5-Дифтор-2,4-динитробензол	
Аминосоединения с длинной цепью	$H_2N-(CH_2)_n-R$ ($R = -COOH; -CONH_2; n=2-12$)
Тиолы с длинной цепью	$HS-(CH_2)_n-X$

Операционную стабильность биораспознающего элемента и стабильность при его хранении значительно увеличивают за счет дополнительного включения в матрицу полимеров желатина, предотвращающего инактивацию фермента [9]. Для водных или содержащих воду реагентов важна также способность к гидратации. Для этих целей используют плен-

кообразующие эмульсионные полимеры, для которых рН, изотоничность и гидратационные характеристики можно подобрать в зависимости от конкретной биораспознающей системы [30, 63, 64, 65, 66].

В случае модификации поверхности трансдьюсера подложкой может служить либо сам преобразователь, либо полимерный материал, который будет нанесён на преобразователь в последующей операции. Не все преобразователи имеют подходящие связывающие группы на поверхности, и поэтому часто лучше обеспечить связь с материалом, который в последствии можно нанести на преобразователь. Этим материалом могут быть полимеры, например, сополимеры малеинового ангидрида, сополимеры метакриловой кислоты и др. Такие носители наносятся на преобразователь в виде тонкого слоя. Реакционные группы, к которым будет присоединяться биораспознающая молекула, можно образовать на полимере с помощью дериватизации мономера и сополимеризации, или с помощью прямой реакции с полимером [63, 64].

При модификации очень важно иметь информацию о взаимной ориентации реагирующих молекул (катализатор – субстрат, фермент – ингибитор, антиген – антитело и др.) при протекании реакции. Для этих целей в биосенсорах используют метод поверхностного плазменного резонанса. Метод основан на взаимодействии поляризованного света с тонкой металлической плёнкой (золота, серебра и др.), нанесённой на поверхность диэлектрика (стекло), которое модифицируется различными органическими и неорганическими веществами [2, 65, 66]. Проблема сохранения активности биологического материала на подложке решается путём применения жидких фотополимеризующихся композиций олигомерного и мономерного состава в качестве иммобилизованного матрикса. В качестве таких материалов могут служить олигоуретанакрилат (ОУМ-1000Т и ОУМ-2000Т). Фотоинициатором служит 2-гидрокси-2-метил-1-фенилпропан-1-ОН. Для таких подложек применяют наиболее часто используемые в биосенсорах ферменты β-глюкозооксидазы, выделенной из *Penicillium vitale* [61–64].

Примеры связывания различных реакционных групп на биораспознающей молекуле приведены на рисунке 3.3.

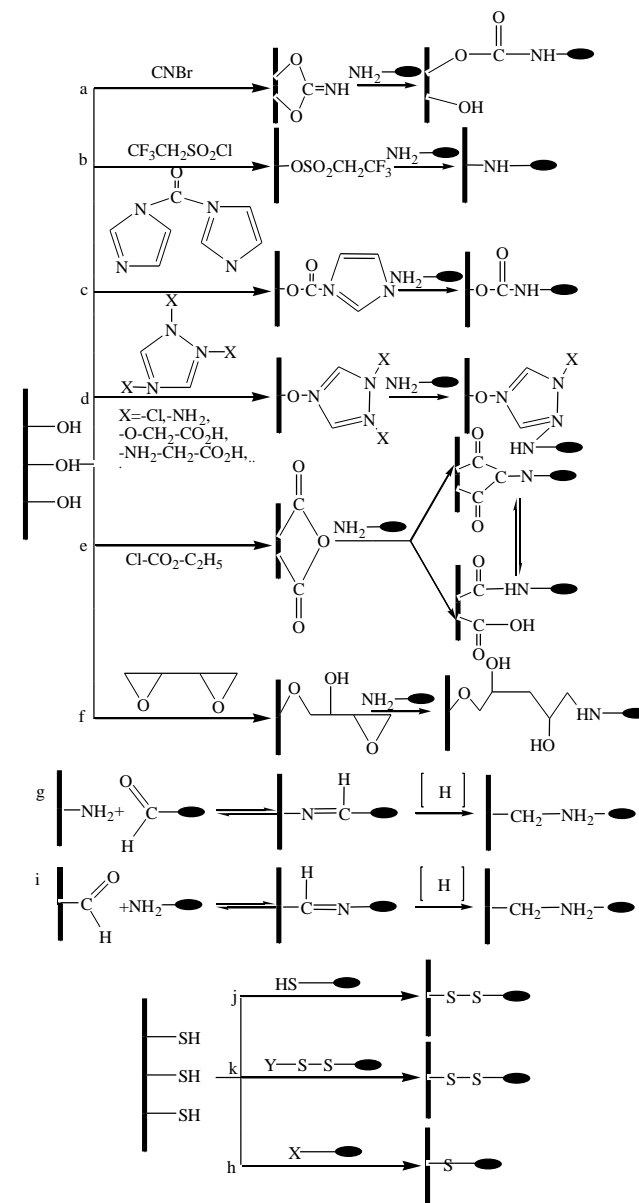


Рисунок 3.3 – Реакция связывания различных реакционных групп с биораспознающей молекулой [1, 2]

Многие другие поверхностные группы на подложке для иммобилизации перед ковалентным связыванием должны быть функционализированы. Например, для функционализации поверхностных OH-групп применяют силановые связывающие агенты типа X_3SiL или X_3SiR_2L , где X – гидролизуемая группа, а L – лиганд (или группа, которую можно превратить в лиганд). Эти реагенты широко используют в случае применения кремнезема. Термическая и гидролитическая стабильность очень высокая для таких типов носителей [1, 2, 19]. При проектировании желаемой модификации поверхности возможны два подхода [1, 2]:

1. Связывающий агент присоединяется к носителю и затем реагирует с макромолекулой, которую нужно иммобилизовать [1, 2] (рисунок 3.4(а)).
2. Получают комплекс макромолекула-силан и затем осаждают прямо на поверхность [1, 2] (рисунок 3.4(б)).

Поверхностные OH-группы часто используют в других реакциях связывания (рисунок 3.3 (а–е)), помимо них можно использовать и другие группы, например, амидо, COOH и т.д. [1, 2] (рисунок 3.3(f)).

Широко используемым приёмом формирования подложки из самоорганизованных монослоев является силанизация с помощью γ -аминопропилтриэтоксисилана и γ -глицидоксипропилтриметоксисилана с активными амино- и алкоксигруппами, соответственно. Прикрепление антител к силоксановым плёнкам, осуществляемое через аминогруппы или карбонильные группы бифункциональных реагентов [1, 2].

Приведём особенности процессов и механизмов взаимодействия макромолекулярного рецептора с лиганд-функционализированной поверхностью [1, 2, 67, 68]:

1. Молекулярное распознавание селективным центром рецептора, иммобилизованного аналога лиганда L. Межмолекулярные взаимодействия определяются комплементарностью распознающего центра рецептора и формой ван-дер-ваальсовой поверхности, зарядовым состоянием и доступностью тех или иных группировок в молекуле лиганда [1, 2, 67, 68].

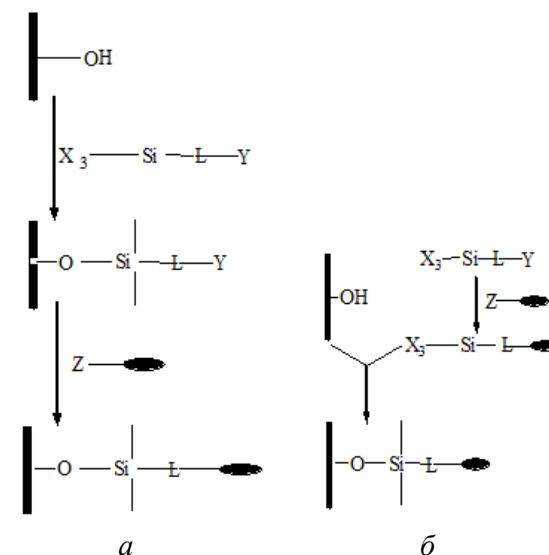


Рисунок 3.4 – Методы иммобилизация: а – на поверхность, модифицированную силаном; б – модифицированной силаном молекулы [1, 2]

2. Пространственное блокирование лиганд-рецепторного взаимодействия в области контакта, обусловленное стерическими ограничениями процесса молекулярного распознавания рецептор-лиганд вследствие наличия дополнительных молекул лиганда в области контакта [1, 2, 67, 68].
3. Подавление взаимодействия R-L в окрестности области контакта вследствие пространственного блокирования макромолекулярным рецептором иммобилизованных аналогов лиганда, находящихся в окрестности и непосредственно в области проекции рецептора на поверхность [1, 2, 67, 68].
4. Стохастическая упаковка рецептора в двумерном слое на поверхности, приводящая к формированию полостей, размер которых меньше площади проекции R на поверхность [1, 2, 67, 68].

На поверхности металлов, таких как серебро, платина и золото [17, 22, 47, 66–69, 71], особенно эффективным способом создания функцио-

нальных групп для иммобилизации является использование самоорганизующихся слоёв [38, 71], таких как из тиолов с длинной цепью (алкантиолов), имеющих концевую группу для связи с распознающей молекулой [71], необратимо сорбирующихся на поверхности металла за счёт координационных связей между атомами серы и металла. Поскольку монослои ориентируются и стабилизируются за счёт ван-дер-ваальсовых сил между метиленовыми группами, увеличение длины цепи алкантиолов (свыше 10 метиленовых групп) приводит к более упорядоченным структурам монослоёв. Биорецепторные слои сенсоров, полученные этими способами, характеризуются высокой механической прочностью, устойчивостью к действию регенерирующих растворов и высокой биологической активностью иммобилизованных конъюгатов. Эффективным представляется комбинирование различных способов прикрепления молекул к поверхности электродов пьезокварцевых гравиметрических сенсоров [71].

В литературе приведены примеры рецептуры иммобилизации некоторых биораспознающих элементов на поверхности трансдьюсера.

Рассмотрим этапы изготовления холинэстеразного (ХЭ) биосенсора для определения фосфорорганических пестицидов [28]. Для создания ХЭ биосенсора использовали ацетилхолинэстеразу (АХЭ) из электрического угря (АХЭ 3.1.1.7) с удельной активностью 463 Е/мг белка и бутирилхолинэстеразу (БуХЭ) из сыворотки крови лошади (БуХЭ.КФ 3.1.1.8) с удельной активностью 580 Е/мг белка (Sigma Chemical Company, США). Иммобилизацию проводили в присутствии бычьего сывороточного альбумина (БСА) и нафиона (5 % эмульсия Aldrich, Германия). Субстратами АХЭ и БуХЭ служили ацетилхолин, ацетилтиохолинхлорид (Sigma Chemical Company, США) соответственно [28].

Углеродные электроды модифицировали гетерогенными медиаторами электронного переноса – полианилином и ферроцианидом (III) (берлинской лазурью). При модификации электрода полианилином использовали два различных покрытия на основе полианилина [28]. В первом случае полианилин (ПАНИ-х) синтезировали низкотемпературным окислением анилина персульфатом аммония, добавляли камфорсульфоновую кислоту, смешивали с фенолом в соотношении 1:1 (масс.)

и растворяли в хлороформе. Затем 5 мкл 0,15 % раствора ПАНИ-х наносили на поверхность электрода и высушивали при комнатной температуре. Второе покрытие получили электрополимеризацией анилина (ПАНИ-э) из серной кислоты на стеклоуглеродном электроде, предварительно обработанном 0,05–0,001 % нафионом (1 мкл/см² геометрической поверхности). Электрополимеризацию проводили многократным циклированием потенциала электрода в диапазоне от минус 200 до 1000 мВ при скорости развёртки потенциала 40 мВ/с. Качество покрытия проверяли по рН-зависимости стационарного потенциала электрода, модифицированного полианилином [28]. Иммобилизацию ХЭ проводили на электроде, покрытом полианилином [28]. На который наносили 3 мкл смеси, содержащей 0,2 АЕ/мг АХЭ или 0,1 АЕ/мг БуХЭ, 1 % альбумина, 1 % глутарового альдегида и 0,1 % нафиона, высушивали при комнатной температуре и промывали в растворе глицина для связывания непрореагировавшего глутарового альдегида. ХЭ сенсоры хранили при 4 °С в рабочем фосфорном буферном растворе [28].

Для получения биочувствительной части иммуноферментных сенсоров (ИФС) проводили совместную иммобилизацию ХЭ и антител против соответствующих антигенов на поверхности рабочего электрода, выполненного из платиновой пасты. Индикаторный электрод изготавливали из платины, из серебра – электрод сравнения. В качестве матричных компонентов для иммобилизации использовали БСА, хитозан и нитрат целлюлозы [72].

ИФС с хитозаном в качестве носителя изготавливали следующим образом. Навеску хитозана растворяли в 1 % CH_3COOH , прибавляли 1 % раствор КОН, образовавшийся гель отфильтровывали, промывали водой и высушивали. Затем гель снова растворяли в 1 % CH_3COOH . Раствор хитозана смешивали с необходимым биореагентом и иммобилизовали. Для получения биочувствительной части ИФС на основе нитрата целлюлозы матричный компонент растворяли в смеси (1:1,6) толуола и бутилацетата, добавляли ХЭ, растворенную в дистиллированной воде и антитела в различных разведениях. После перемешивания добавляли глутаровый

альдегид, тщательно перемешивали и иммобилизовали смесь биореагентов на поверхность рабочего электрода [72].

При разработке ИФС на основе БСА, использовали раствор БСА, фосфатный буферный раствор (50 мМ, рН 7,0) и дистиллированную воду вносили раствор фермента (БуХЭ активностью 29 АЕ/мг) и антитела (*Staphylococcus aureus* и *Streptococcus pyogenes*), добавляли 1 % раствор глутарового альдегида. После энергичного перемешивания на поверхность рабочих электродов наносили по 1 мкл этой смеси. Полученные ИФС оставляли на 12 часов в закрытой чашке Петри при 4 °С. После чего сенсоры промывали водой, высушивали на воздухе и в дальнейшем хранили в холодильнике [72].

В работе использовали антигены *Staphylococcus aureus* и *Streptococcus pyogenes* и соответствующие антитела против них [72]. Методика получения включает механическое разрушение микробных клеток (дезинтеграцию), специфическую экстракцию с помощью боратного буферного раствора с рН 7,2–7,4, отделение не разрушившихся компонентов клеточной стенки, фильтрование и стандартизацию по белковому азоту. Поликлональные антитела получали методом ступенчатой иммунизации. Концентрации водных растворов антител и антигенов определяли спектрофотометрически при температуре 25 °С, при длинах волн 280 и 260 нм. Для *Staphylococcus aureus* исходная концентрация антител составляла 0,995 мл/м², концентрация антигенов – 1,1 мл/м². Для *Streptococcus pyogenes* начальная концентрация антител составляла 0,990 мл/м², антигенов – 1,263 мл/м². Описанный ИФС применяли для диагностики некоторых инфекционных заболеваний [72].

Таким образом, наиболее важной проблемой в создании сенсоров является выбор способа иммобилизации биораспознающих элементов, воспроизводимости (регенерации) сенсорного слоя и стабильности его параметров (электрохимическая инертность), расширение диапазона определяемых концентраций, повышение чувствительности и селективности, увеличение сроков хранения и эксплуатации биосенсоров [1].

3.3. Электронные системы типа «электронный нос» и «электронный язык»

В основу создания сенсорных систем типа «электронный нос» и «электронный язык» была положена идея имитирования строения и свойств биологических сенсорных систем, а именно органов обоняния и осязания млекопитающих. Биологические принципы первоначально пытались реализовать в системах для анализа газов – «электронных носках», а позднее аналогичные принципы использовали для создания анализаторов жидкостей – «электронных языков» [73].

Одним из перспективных направлений в разработке новейших электронных систем является использование инновационных решений в области нанотехнологий и наноматериалов. *Нанотехнология* – это совокупность методов и приёмов, с помощью которых контролируемым образом можно создавать и модифицировать объекты, включающие компоненты с размерами от 1 до 100 нм, хотя бы в одном измерении. Многие наноматериалы обладают принципиально новыми качествами, существенно превосходящими свойства макроразмерных материалов [74, 75].

Термин «*нанoeлектроника*» отражает процесс перехода современной полупроводниковой электроники от элементов микронных и субмикронных размеров к элементам размеров в нанометрах. Особенность нанoeлектроники в том, что в элементах таких размеров начинают преобладать квантовые эффекты. Появляются новые свойства, открываются новые заманчивые перспективы их использования. Если при переходе от микрок нанoeлектронике квантовые эффекты во многом являются паразитными, то электроника, использующая квантовые эффекты, – это уже основа новой, наногетероструктурной электроники. Одним из приоритетных направлений развития нанoeлектроники является технология «кремний-на-изоляторе», которая позволяет получить слои кремния толщины в нанометрах. Это основа для создания кремниевых элементов нанoeлектроники нового поколения, в частности – высокочувствительных сенсоров, предназначенных для обнаружения сверхнизких концентраций газообразных веществ [73].

«Электронным носом» принято называть мультисенсорные системы распознавания газообразных веществ, работающие на различных физических принципах, в частности портативные анализаторы подвижности ионов, портативные газовые хроматографы. В отличие от традиционных сенсорных систем, требующих высокоселективных чувствительных элементов, «электронный нос» использует набор относительно неселективных сенсоров. Реализация систем типа «электронный нос» возможна благодаря современным технологиям нанoeлектроники и методам обработки многопараметрической информации [74].

Нанотехнологии позволяют расширить список материалов, используемых для производства сенсоров, и получить рекордные характеристики устройств. К их числу относятся нанокomпозиционные материалы, содержащие наночастицы металлов, оксидов металлов, полимеры [2]. Эти материалы стали основой нового типа химических сенсоров, обладающих высокой чувствительностью и селективностью, быстрым обратимым адсорбционным откликом и, что очень важно, работающих при комнатной температуре [74]. Для создания «электронного носа» одним из перспективных направлений является совокупность нанокomпозиционных материалов с различным химическим составом. Композиты с полимерной матрицей могут быть синтезированы с использованием различных наполнителей. Изменение вида наполнителя, его концентрации, толщины плёнки обеспечивают требуемый спектр сенсорных свойств, а именно – селективности и чувствительности к различным газам. Изменение содержания металла в композите вблизи порога перколяции существенно меняет морфологию плёнки, следовательно, и её чувствительность к газам [74].

При изготовлении сенсоров для мультисенсорной системы недостатки метода вакуумной сокоонденсации превращаются в его достоинства. Дело в том, что точно воспроизводимые свойства плёнок получить этим методом нельзя, поскольку технологически невозможно создать покрытие с точно заданным содержанием металла вблизи порога перколяции. Для мультисенсорной системы не нужны одинаковые сенсоры, и требование воспроизводимости свойств тонких плёнок снимается, потому что каждая мультисенсорная система должна быть составлена из индиви-

дуального набора сенсоров. Имея набор из нескольких десятков сенсоров с различной близостью к порогу перколяции и с различными видами наночастиц-наполнителей, можно оптимизировать отклик мультисенсорной системы в целом – в зависимости от поставленной аналитической задачи [73, 74, 75] (рисунок 3.5).



Рисунок 3.5 – Схема наносенсорной системы типа «электронный нос»

Наносенсорная нейрорподобная система «электронный нос» включает в себя следующие компоненты [74, 75]:

1. Систему пробоотбора для доставки газовой пробы из анализируемого воздушного объема к сенсорной матрице. В систему пробоотбора входит система регенерации, предназначенная для восстановления работоспособности сенсорной матрицы после воздействия на неё активных компонентов воздушной среды [74, 75].

2. Матрицу высокочувствительных полупроводниковых сенсоров – анализаторов состава газовой фазы. Сенсоры в матрице должны различаться по своим основным параметрам (чувствительность, селективность, воспроизводимость), число их может колебаться от единиц до нескольких десятков в зависимости от назначения и технических возможностей обработки сигнала. В качестве чувствительных элементов мультисенсорной

системы применяются полимерные нанокомпозиты и наноструктурированные материалы, которые по-разному меняют свою электропроводность под воздействием различных веществ [74, 75].

3. Аналоговый преобразователь выходного сигнала сенсоров в цифровой код [74, 75].

Принцип работы системы основан на измерении электропроводности набора химических сенсоров при их взаимодействии с парами летучих веществ. В результате адсорбции молекул исследуемого вещества электропроводность чувствительных материалов сенсоров увеличивается. Каждый сенсор не является строго селективным по отношению к какому-либо газу. Однако величина отклика каждого сенсора из набора на разные газы должна быть индивидуальна. Математическая обработка данных сенсорного массива позволяет сформировать уникальный химический образ анализируемого вещества. Сенсорный массив обычно включает от 4 до 30 элементов. Уникальный образ запаха вещества создаётся в результате использования отличающихся друг от друга чувствительных элементов сенсоров, изготовленных с применением нанотехнологий [75].

Распознавание веществ производится после «обучения» прибора, т.е. записи отклика сенсорного массива при прокачке через него газа, содержащего пары индивидуального вещества (калибровка) [36]. При последовательной прокачке через прибор паров различных веществ формируется библиотека откликов, которая хранится в памяти вычислительного устройства, входящего в состав прибора. Распознавание производится путём сравнения отклика от анализируемого газа с откликами от конкретных веществ, имеющихся в библиотеке откликов. В случае, когда найден похожий отклик или комбинации откликов, прибор выдаёт сигнал о наличии в анализируемом газе паров данного вещества или набора веществ [74, 75].

Особенность новой разработки – использование нового поколения химических сенсоров, основанных на наногетерогенных тонкоплёночных композитах, которые представляют собой матрицу одного материала с диспергированными в ней наночастицами другого. Эти материалы сочетают в себе свойства, характерные только для наночастиц, со свойствами

оксидных сенсоров, выполненных по планарной технологии. Наиболее интересными свойствами, с точки зрения сенсорных элементов, обладают материалы с содержанием наночастиц вблизи порога перколяции, когда среднее расстояние между частицами составляет 1–10 нм и существует возможность обмена заряда между частицами. Такой подход соответствует современным тенденциям в конструировании smart-материалов – материалов, способных к значительным, быстрым и обратимым изменениям своих характеристик при малом внешнем воздействии [74, 75].

Нанокомпозиты получают в процессе вакуумной сококонденсации паров металла или полупроводника и активного прекурсора с последующей его полимеризацией. Варьируя соотношение интенсивностей потоков металла и мономера, можно управлять концентрацией наночастиц в композите, причём размер наночастиц практически не зависит от их концентрации, что является важным достоинством этого метода. Толщина плёнки композита обычно составляет 1 мкм [74].

Сферы применения наносенсорной системы «электронный нос» [75]:

Медицина. Моментальная диагностика заболеваний по запаху дыхания и выделений. Прибор, разработанный Bioengineering Centre (Северная Ирландия), определяет цирроз печени, рак лёгких и диабет. Такая экспресс-оценка незаменима для первой медицинской помощи [75].

Портативные устройства для диагностики в домашних условиях по запаху тела и пота человека помогут неспециалисту быстро диагностировать болезнь и переслать показания по SMS в службу скорой помощи (возможно встраивание в мобильный телефон) – это позволит ранжировать вызовы скорой помощи в соответствии со срочностью и сократить число ложных вызовов. Также прибор обеспечит мониторинг здоровья престарелых одиноких людей, нуждающихся в уходе [75].

Фармация. Скрининг лекарственных препаратов. Исследователи из Университетского медицинского центра в Дурхаме (США) применили коммерческий «электронный нос» с 32 сенсорами на основе проводящих полимеров для выявления источников неприятных запахов в изделиях

фармацевтической промышленности. Данная разработка по своим возможностям превосходит человеческое обоняние [75].

Перфюмерная и косметическая промышленность. С помощью «Электронного носа» возможно дешифровать понравившийся запах и синтезировать любой парфюм с помощью простого прибора, все рецепты парфюмерии утратят ореол секретности [75].

Пищевая промышленность. Разработка ароматов продукции, приправ, ароматических добавок. Контроль качества входящих материалов, оптимизация работы биореакторов, минимизация различий продукции от партии к партии, мониторинг случайных или преднамеренных загрязнений, или несоответствий торговой марке. В государственном университете штата Северная Каролина прибор был использован для оценки запаха нескольких марок кофейных зёрен [75].

Ликёроводочная промышленность. «Электронный нос» уже с высокой степенью точности различает типы красных вин различных наименований, дифференцирует вина одного наименования в зависимости от года урожая, отличает вина одного наименования и урожая, но произведённые из винограда, выращенного в разных регионах. Английские пивовары используют прибор, чтобы следить за малейшими нарушениями запаха солода и вовремя исправлять нарушения технологии [75].

Контроль качества. С помощью прибора профессора Воронежской технологической академии Я.И. Коренмана удалось установить, что почти половина образцов кофе «Нескафе», продаваемого в магазинах, очень далека от эталона. То же и с коньяками [75].

Экология. Контроль вредных выбросов на промышленных предприятиях. Контроль состава выхлопных газов двигателей внутреннего сгорания. Мониторинг природных экосистем через распределённые сети сенсоров [75].

Обнаружение запахов в агрессивных условиях (радиация, отравляющие вещества, высокие температуры и т.п.) [75].

Безопасность. Борьба с контрабандой, наркотиками и терроризмом. Аэропорт Хитроу (Великобритания) использует прибор Sentinel II, способный распознавать наркотики, взрывчатку, некоторые лекарства и дру-

гие запрещённые к провозу предметы. Такие приборы могут найти широкое применение на таможне, на всех видах транспорта, в государственных и общественных учреждениях [75].

«Электронный нос» способен заменить собак-ищейек. Обучение одной собаки-ищейки в США в среднем стоит 14 тыс. долл., она находится на службе в среднем восемь лет. Издержки на содержание одной собаки и ее инструктора оцениваются в 100 тыс. долларов в год. Ни одна собака-ищейка в отличие от прибора не способна уловить запах человека в помещении, где сильно пахнет бензином, ацетоном, краской, или когда следы присыпаны пахучим веществом, например табаком [75].

Криминалистика. Запахи могут помочь в расследовании преступлений для судебно-химической экспертизы. Например, определение половой и индивидуальной характеристик запаха человека по различным запахоносителям – поту, крови, волосам, экскрементам, орудию преступления и другим опосредованным источникам запаха. «Электронный нос» позволит полиции определить, что в помещении недавно применялось огнестрельное оружие, употреблялись алкогольные напитки или наркотические вещества. В Лестерском университете (Великобритания) разработали устройство, способное распознавать людей и местность по запаху. «Электронный нос» может выявить марку духов, владельца дыхания или запаха тела менее чем за минуту, проанализировав летучие органические соединения и сравнивая их с имеющимися в базе данных [75].

С помощью «электронного носа» можно провести идентификацию денежных купюр и ценных бумаг по запаху. Установление факта их соприкосновения с различными предметами и конкретными людьми, определение места их хранения и способа транспортировки [75].

Системы сверххранной пожарной сигнализации. Принцип работы устройства заключается в принудительном отборе проб воздуха из помещения через заборный трубопровод с отверстиями и поиск опасной концентрации дыма или газа с помощью аспирационных анализаторов. Применение аспирационных анализаторов существенно сокращает время обнаружения очага пожара по сравнению с локальными средствами обнаружения. Перспективными направлениями развития таких анализаторов яв-

ляются комбинированные устройства, реагирующие как на дым, так и на газ, в частности на монооксид углерода и водород. Система «электронный нос» функционирует по принципу аспирационного обнаружения летучих продуктов возгорания размерами от 3 до 300 нм, образующихся на стадии нагрева изоляции электрооборудования [75].

Таким образом, наносенсорная нейрноподобная система «электронный нос» в ближайшие 3–10 лет может стать ключевым направлением развития современной электроники. Одним из главных преимуществ мультисенсорной системы перед современными газоанализаторами, является возможность ее использования для комплексного анализа большинства летучих компонентов, формирующих интегральный запах и представлять его в виде характерного «образа» – функционала или системы функций [75].

Организация функционирования органов вкуса аналогична системе обоняния, хотя количество рецепторов осязания у человека значительно меньше, чем обонятельных. Традиционно все вкусовые ощущения разделяют на четыре основных вкуса: сладкий, солёный, кислый и горький. В последнее время часто используется ещё одна, пятая, характеристика вкуса – «юмами» или «вкусоность» (вкус, например, глутамата натрия). Эти пять основных вкусов и их комбинации используют для описания и количественной оценки вкуса съедобных продуктов. Часто используются дополнительные атрибуты, такие как острота вкуса, текстура или фактура продукта, ощущение во рту, продолжительность вкуса и т.д. Следует отметить, что человек вообще испытывает комбинированные ощущения запаха и вкуса совместно с откликами от органов зрения, которые трудно разделить [76].

Наиболее характерной общей чертой систем «электронных носов» и «электронных языков» является сочетание массива сенсоров с невысокой селективностью и обработки данных методами распознавания образов. Сенсорные материалы «электронных носов» и «электронных языков» практически не имеют между собой ничего общего, причём сенсоры для «языков» многочисленнее и намного разнообразнее [36]. Это даёт ряд преимуществ, например, в отличие от «электронных носов», «электрон-

ные языки» применяются не только для распознавания и идентификации, но и для многокомпонентного количественного анализа. В отличие от биологического языка «электронный язык» может работать в любых средах, в том числе в опасных для живых существ [76].

Систему «электронный язык» можно определить как аналитическое устройство, включающее в себя массив химических сенсоров с относительно невысокой селективностью, обладающих чувствительностью к нескольким компонентам анализируемого раствора одновременно (перекрёстной чувствительностью), и использующее соответствующий многомерный метод обработки данных, получаемых от массива сенсоров. Например, метод распознавания образов или многомерной калибровки [76] (рисунок 3.6).

Такая система при воспроизводимом аналитическом поведении сенсоров и применении при необходимости адекватного метода калибровки (градуировки, обучения) способна выполнять функции распознавания (идентификации, классификации, контроля качества) разнообразных жидких сред и многокомпонентного количественного анализа неорганических и органических компонентов [76].

Требования к сенсорным системам типа «электронный язык» [36, 76]:

1. Наличие массива сенсоров с невысокой селективностью [36, 76].
2. Воспроизводимость характеристик является обязательным требованием как по отношению к селективным, так и к перекрёстно-чувствительным сенсорам [36, 76].
3. Высокая перекрёстная чувствительность, под которой понимается чувствительность к нескольким компонентам анализируемого раствора одновременно [36, 76].

Системы типа «электронный язык» могут включать в себя любые химические сенсоры для анализа жидкостей независимо от того, на каком физическом принципе основана их работа [36, 76].

Первой мультисенсорной системой типа «электронный язык» был сенсор вкуса, предложенный японскими учёными из Университета Кюсю

в начале 1990-х годов. Эта система содержит восемь потенциометрических сенсоров с липидными мембранами на поливинилхлоридной матрице [76, 77], обладающими перекрёстной чувствительностью к веществам с различным вкусом. С целью миниатюризации сенсорной системы были сконструированы тонкопленочные сенсоры на основе тех же чувствительных материалов, но реализующие другой принцип детектирования сигнала. Тонкопленочные сенсоры изготавливали нанесением плёнок Ленгмюра-Блоджетт на полупроводниковую подложку. В качестве транзюсеров использовали полевые транзисторы, потенциометрические сенсоры с лазерным сканированием и изменяемым поверхностным фото-потенциалом [76, 78, 79].

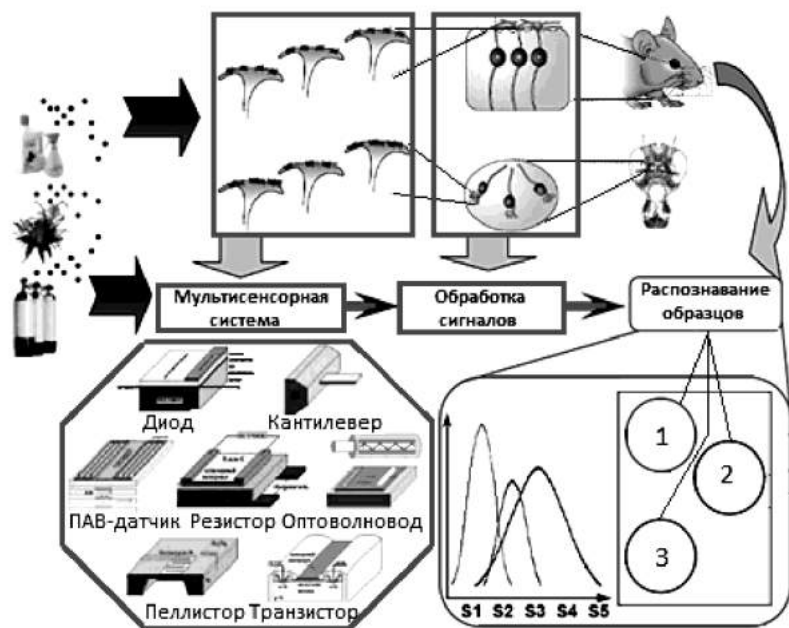


Рисунок 3.6 – Схема мультисенсорной системы типа «электронный язык» [76]

«Электронный язык» на основе потенциометрических сенсоров, в том числе и с неорганическими мембранами, разработан и активно

исследуется уже более 10 лет в Лаборатории химических сенсоров Санкт-Петербургского государственного университета [80]. Авторы этой работы совместно с итальянскими коллегами из университета «Тор Вергата» (Рим) впервые предложили и сам термин «электронный язык» применительно к системам перекрёстно-чувствительных сенсоров с обработкой данных методами распознавания образов. Для изготовления сенсоров использовался широкий круг мембранных материалов, в том числе халькогенидные стекла, допированные различными металлами, пластифицированные полимеры, содержащие активные вещества, а также поликристаллические композиции [76, 80]. Всего было исследовано несколько сотен различных сенсоров, из которых для конструирования «электронного языка» отбирались обладающие наиболее высокой перекрёстной чувствительностью. Как правило, «электронный язык» включает от пяти до 30 сенсоров в зависимости от аналитической задачи. Разработаны также микросенсоры на основе тонких нано плёнок халькогенидных стёкол с использованием новой технологии – абляции под действием импульсного лазера [76, 81]. Состав и свойства полученных пленочных сенсоров и систем в целом мало отличаются от характеристик объёмных халькогенидных стёкол, из которых изготавливались сенсоры [76].

Разработан проточно-инжекционный вариант системы типа «электронный язык» с мультисенсорным детектированием, включающий от трёх до 11 сенсоров [76, 82]. К достоинствам этой мультисенсорной системы относятся возможность проводить многократные и часто повторяющиеся измерения в автоматическом режиме благодаря многоканальному сенсору, а также уменьшенный объем анализируемой пробы. Объем пробы составляет, как правило, 150–500 мкл, но может быть уменьшен до 50 мкл [76, 82].

Описан «электронный язык» на основе потенциометрических сенсоров, изготовленных из плёнок металлопорфиринов на подложке из стеклоуглерода [37]. Металлопорфирины с различными катионами металлов: Mn(III), Fe(III), Co(II), Ni(II), а также тетрафенилпорфирин наносили на подложку методом электрополимеризации [76, 82].

В вольтамперометрическом «электронном языке» реализуется та же идея сочетания неспецифичных электрохимических сигналов и их обработка методами распознавания образов. Полярографическая волна становится неселективным аналитическим сигналом в тех случаях, когда несколько компонентов анализируемого раствора окисляются при одинаковых или близких значениях потенциала. Для разрешения такого сигнала и получения из него аналитической информации, кроме методов обработки данных, используется несколько электродов [76, 83]. В качестве материала рабочих электродов применяются металлы: платина, золото, иридий, родий и рений [36, 76]. Предложена мультисенсорная система на основе электродов, модифицированных монофталоцианинами кобальта и меди и бисфталоцианинами европия, гадолиния, лютеция и замещённым бисфталоцианином празеодима [76]. Модифицированные электроды готовят либо нанесением плёнок Ленгмюра-Блоджетт на стеклянную подложку, либо по технологии приготовления намазного электрода из смеси графитовой пасты с 15 % фталоцианина. Измерения с помощью вольтамперометрических мультисенсорных систем проводят по классической трёхэлектродной схеме: электрод сравнения, стальной вспомогательный электрод и массив рабочих электродов, для переключения которых используется коммутатор [36, 76]. Метод квадратноволновой импульсной вольтамперометрии был выбран для измерений с массивом электродов, изготовленных из благородных металлов. При этом проводится сканирование потенциалов в диапазоне от $-0,4$ В до $+0,6$ В с шагом 100 мВ, в каждой точке записывается 20 значений силы тока. Измерения с помощью массива модифицированных электродов осуществляется также методом циклической вольтамперометрии со скоростью сканирования потенциалов $0,1$ В/с [76]. Прибор изображён на рисунке 3.7.

Дизайн сенсоров типа «электронный язык», основанный на оптических сенсорах, предложен в работе [76]. Сенсоры представляют собой зерна полиэтиленгликоль-полистирольной резины, дериватизированные индикаторными молекулами, в качестве которых были выбраны флуоресцеин, о-крезолфталеинкомплексон, ализаринкомплексон и борный эфир галактозы, дериватизированной резорфуфином (оксазиновый краси-

тель). Отклик сенсоров измеряется относительно контрольного сенсора, который в данном случае представлял собой резиновое зерно с терминальным ацетилованным амином. Зерна-сенсоры размещаются в микрополостях, получаемых с помощью микромашиной техники в Si/SiN-пластинах, что имитирует, таким образом, расположение вкусовых рецепторов на языке [76].



Рисунок 3.7 – Вольтамперометрическая система типа «электронный язык» с набором модифицированных электродов [83]

В качестве сенсорных материалов для электронного языка предложено использовать различные токопроводящие полимеры, такие как полианилин [28, 76], полипиррол [30, 76], а также стеариновую кислоту и их смеси [76]. Полимерные плёнки Ленгмюра-Блоджетт наносили на металлическую подложку. Измерения с помощью полученных электродов проводится методом импедансной электрической спектроскопии. Комплексное сопротивление измеряли при комнатной температуре (20 ± 3) °С в диапазоне частот $20 \cdot 10^5$ Гц. Применение импедансной спектроскопии основывается на том факте, что область низких частот импедансного спектра описывает свойства двойного электрического слоя, который образуется в результате адсорбции веществ, содержащихся в анализируемом рас-

творе, на поверхности сенсоров и, следовательно, может нести полезную аналитическую информацию [36, 76].

Набор возможных сенсорных материалов и методов детектирования не исчерпывается только вариантами, описанными выше. Можно ожидать появления работ по применению других сенсоров в мультисенсорных системах типа «электронный язык» [76].

Если химические сенсоры являются «сердцем» любой мультисенсорной системы, то электронным «мозгом» системы служит другая очень важная составляющая «электронного языка» – адекватные методы обработки данных от массива сенсоров. Отклик перекрёстно-чувствительного сенсора при анализе многокомпонентного раствора сложный, он содержит информацию о различных компонентах, присутствующих в среде. Для того чтобы извлечь эту информацию, необходимо анализировать отклики всех сенсоров системы вместе. Для этого могут использоваться различные методы, в том числе методы распознавания образов и многомерной калибровки [76].

Обработку данных можно свести к трём основным задачам: распознавание и изучение структуры данных; классификация и идентификация; количественный анализ – определение концентраций веществ или других количественных параметров [76].

Перспективной для аналитической практики является способность систем типа «электронный язык» к распознаванию и идентификации многокомпонентных жидкостей примерно так же, как это делают люди. Такой метод обычно называют методом «отпечатка пальцев». Этот вид анализа совершенно нетипичен не только для ионоселективных электродов, но и для других традиционных методов [36]. Результатом работы мультисенсорной системы может быть интегральная оценка, химический образ анализируемой жидкости – её «отпечаток пальцев». Этот образ может совпадать или не совпадать для различных анализируемых жидкостей и на этом основании делается вывод об их идентичности или различии. Особенно необычно то, что «электронный язык» может различать жидкости неизвестного состава без какой-либо предварительной информации о качественном или количественном составе образцов. Для проведения класси-

фикации и идентификации с помощью «электронного языка» необходима предварительная калибровка инструмента. Эта способность «электронного языка» открывает новый и перспективный подход к анализу качества многих продуктов и определению соответствия продукта заданному стандарту. Система калибруется (обучается) по ряду стандартных растворов или образцов продуктов, охарактеризованных дегустаторами с точки зрения типа и количественной оценки (интенсивности) вкуса. Если система способна детектировать ключевые вещества, определяющие вкус (далеко не всегда, кстати, известные в явном виде), то после такого обучения «электронный язык» приобретает способность «дегустировать» неизвестные продукты с выдачей информации о типе и интенсивности их вкуса [76].

Мультисенсорные системы типа «электронный язык» могут применяться для решения разнообразных аналитических задач, как традиционных для химических сенсоров – количественный анализ растворов, так и для нетипичных – распознавание, идентификация и классификация. В последнем случае целью анализа является распознавание различных продуктов или сортов одного и того же продукта, установление соответствия стандарту их качества, а также установление подлинности и выявление подделок. В последнее время большое внимание уделяется использованию «электронных языков» для мониторинга промышленных процессов, контроля качества, продукции, в оценке соответствия технологического процесса или продукта стандарту. Чрезвычайно востребовано искусственное определение вкуса с помощью аналитического инструмента в пищевой и фармацевтической промышленности, что представляется одним из интереснейших будущих практических приложений «электронных языков». Самыми распространёнными объектами анализа с использованием «электронных языков» являются пищевые продукты. В литературе описано применение «электронных языков» для анализа фруктовых соков, минеральных вод, прохладительных напитков, кофе, чая, молока и молочнокислых продуктов, вина, мизо (японская паста из сои), сакэ (японский алкогольный напиток из риса), растительных масел, фруктов, овощей, мяса, рыбы. Как правило, «электронный язык» используется для

распознавания и классификации перечисленных продуктов, реже – для их количественного анализа [76].

С помощью «электронного языка» изучалась возможность оценки вкуса растворов типичных вкусовых веществ как индивидуальных, так и смешанных; смесей растворов вкусовых веществ с продуктами или лекарствами, а также собственно различных продуктов и лекарственных рецептур. Как правило, оцениваются несколько характеристик вкуса, важных для данного конкретного продукта, например, вкус, кислотность и текстура кофе, насыщенность вкуса и привкус топленого молока в молоке и т. д. [76, 83].

Основная задача при оценке вкуса лекарственных препаратов заключается в измерении интенсивности горького вкуса активных веществ и эффективности его маскировки подсластителями и ароматизаторами [76, 83].

«Электронный язык» способен определить количество бактерий в портящемся молоке [84, 85]. Продемонстрирована возможность использования «электронного языка» для мониторинга и определения концентраций ключевых компонентов биотехнологических процессов производства пищевых продуктов, таких как закваска для сыров, мизо и сакэ [76, 84, 85, 86].

Описано применение «электронного языка» для определения концентраций неорганических катионов и анионов, анионов органических кислот, аминокислот, полифенолов [76, 82, 86, 87].

Объекты, анализируемые с помощью «электронного языка», не ограничиваются пищевыми продуктами. В частности, мультисенсорные системы применяли для мониторинга и определения основных компонентов в питательных средах, используемых для выращивания микроорганизмов, для распознавания различных питательных сред, для мониторинга процесса очистки питьевой воды, для определения содержания неорганических анионов и катионов переходных металлов в модельной грунтовой, шахтной и морской водах, а также в дыму мусоросжигательных заводов (после поглощения дыма жидкостью) [76], для количественного

анализа диализирующих растворов, используемых в аппаратах «искусственная почка» и др. [76, 83].

Показано, что необычные возможности систем типа «электронный язык» позволяют проводить даже такие сложные исследования, как распознавание и классификация по возрасту вин определённого типа, в частности, португальского портвейна [76].

Продемонстрирована возможность использования сенсорных систем для определения микробиологической активности, в частности для контроля чистоты (загрязнения) технологического оборудования для микробиологических процессов. В этих случаях детектирование микробиологических эффектов осуществляется путём отслеживания интегрального изменения химического состава среды с помощью сенсоров системы «электронный язык» [76].

На аналогичной идее основано применение сенсоров «электронный язык» для мониторинга биотехнологических, в частности, ферментативных процессов. Это практическая реализация многомерного, так называемого «умного» или «мягкого» варианта промышленного мониторинга. Возможность такого мониторинга особенно ценна, поскольку процесс наблюдения за ферментацией может осуществляться практически в режиме реального времени. Решение, например, о прерывании текущего процесса, режим которого отклонился от нормы, может быть принято оперативно и на ранней его стадии, что экономит много времени, массу средств и материальных ресурсов в промышленных условиях. Такие приложения сенсорных систем особенно важны, так как большинство биотехнологических процессов контролируется крайне слабо и, как правило, вмешательство в ход процесса невозможно, а постфактум изменить уже ничего нельзя. «Умный» мониторинг с помощью системы типа «электронный язык» позволяет контролировать и изменить ситуацию [76, 84–86].

Идея одновременно использовать для анализа пищевых продуктов системы жидкостных и газовых сенсоров возникла в свете того факта, что люди пробуют продукты и оценивают их вкус и аромат одновременно, используя обоняние и чувство вкуса. Важно подчеркнуть, что

чувствительность и селективность сенсоров, используемых в электронных носках и языках, значительно отличаются от откликов биологических рецепторов и, соответственно, роль искусственных сенсорных систем и их вклады в конечный результат могут существенно отличаться от природных аналогов. Тем не менее, гибридные системы «электронный нос совместно с электронным языком» были применены в пищевой промышленности для распознавания вкуса и запаха вина, фруктовых соков, молока. Идея использования гибридных систем представляется интересной, хотя до настоящего времени не было продемонстрировано её реальных преимуществ перед использованием одного только «электронного языка» [83–86].

Мультисенсорные системы типа «электронный язык» представляют собой перспективную междисциплинарную область науки. В настоящее время продемонстрирована возможность использования таких систем для количественного анализа, контроля качества, а также распознавания и классификации в пищевой и фармацевтической промышленности, медицине, для аналитического контроля объектов окружающей среды. Наличие корреляции между откликом «электронного языка» и человеческим восприятием вкуса – важное и очень перспективное свойство таких систем с практической точки зрения. Первые коммерческие электронные системы типа «электронный язык» уже доступны в настоящее время. Необходимы новые усилия по изучению механизма отклика сенсоров к различным анализам, созданию новых сенсорных композиций, а также по разработке методик практического применения «электронного языка» для решения конкретных задач [76–86].

3.4. Сенсоры для определения этилового спирта

Для быстрого определения присутствия этилового спирта в организме в настоящее время используют широкий ряд различных сенсоров и методов. Зачастую определение, как присутствия, так и концентрации этилового спирта в организме проводится косвенными, малоинвазивными методами через анализ небольших проб биологических жидкостей: слю-

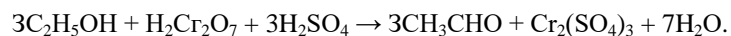
ны, крови, мочи. Также широко применяется анализ состава выдыхаемого воздуха. Этот метод даёт возможность оперативно провести измерение и быстро получить предварительный результат. Хотя этот результат зачастую не может считаться достоверным, и подлежит уточнению другими физико-химическими методами анализа [88–90].

Количественное определение этанола в выдыхаемом воздухе проводится с применением различного рода алкотестеров, которые различаются конструктивными особенностями, а также типом используемого детектирующего устройства, диапазоном измеряемых концентраций и погрешностью измерений. При этом чувствительность прибора определяется встроенным в него датчиком (сенсором). Различают алкотестеры, использующие инфракрасные, электрохимические, полупроводниковые, а также комбинированные (электрохимический и инфракрасный) датчики [88–91].

Индикаторные трубки Мохова-Шинкаренко изготавливаются в промышленных условиях из тугоплавкого стекла. Для исключения воздействия условий внешней среды, трубки, запаивают с двух сторон, заполняют силикагелем, обработанным хромовой и концентрированной серной кислотами. После вскрытия трубки с двух концов через неё продувают выдыхаемый воздух. Вскрытие трубки Мохова-Шинкаренко проводится надламыванием, с помощью специального вскрывателя, встроенного в корпусы коробки или пенала. Трубки Мохова-Шинкаренко обладают большим сопротивлением, что затрудняет её продувание. Облегчить процедуру отбора пробы и контролировать достаточное прохождение выдыхаемого воздуха через наполнитель трубки можно с помощью несложного приспособления. Между обследуемым воздухом и трубкой устанавливается полиэтиленовый пакет вместимостью 650–750 мл, а на противоположный конец индикаторной трубки – полиэтиленовый пакет вместимостью 120–130 мл. Обследуемый выдыхает воздух в мундштук до полного заполнения обоих пакетов. При этом первый пакет заполняется воздухом, так называемого «мёртвого» пространства, а через слой реагента проходит альвеолярный воздух, который заполняет второй, меньший по объёму пакет. Такая простая операция позволяет контролировать ход продувания воздуха через трубку и тем самым исключает симуляцию выдоха.

С помощью описанного метода проводят анализ альвеолярного воздуха, в котором концентрация этанола соответствует его концентрации в крови [88].

При наличии в выдыхаемом воздухе этилового спирта, ионы хрома со степенью окисления (VI) восстанавливаются до хрома со степенью окисления (III). При этом, исходная оранжевая окраска силикагеля (обусловленная наличием дихромат-ионов) изменяется до зелёной (ионы хрома со степенью окисления (III)) [88]:



Реакция, положенная в основу метода индикации этилового спирта не является специфической. Изменение исходной окраски силикагеля, обработанного оксидом хрома (VI) и концентрированной серной кислотой, до зелёной помимо взаимодействия с этанолом наблюдается при наличии в выдыхаемом воздухе следующих соединений: метилового, пропилового, бутилового, амилового спиртов, ацетона, сероводорода, эфиров алифатических спиртов и др. При наличии в выдыхаемом воздухе паров валидола, ментола, хлороформа, керосина, этиленгликоля, оксида углерода (IV), аммиака окраска реагента остаётся оранжевой [88].

Таким образом, данный сенсор и метод не дают информации о количественном содержании этилового спирта в организме, но могут засвидетельствовать его присутствие. При положительном результате следует провести дополнительное инструментальное исследование для получения достоверных результатов об употреблении этанола [88, 91].

Индикаторные полоски предназначены для визуального, качественного и полуколичественного определения этилового спирта в слюне человека. Диапазон определяемых концентраций этанола в слюне составляет от 0,02 до 2,0 ‰. Принцип действия тест-полосок основан на химической реакции, с изменением окраски индикаторного вещества при наличии этилового спирта в слюне [36]. Сравнением окраски индикатора со стандартной шкалой на упаковке определяется примерное количественное содержание этанола. К таким сенсорам относятся индикаторные полоски «Алко-Скрин», предназначенные для качественного и полуколичественного

качественного (*in vitro*) определения содержания этилового спирта в слюне человека ферментативным методом. В основе метода определения этанола в слюне лежит ферментативная реакция окисления первичных спиртов алкогольдегидрогеназой до альдегида и пероксида водорода. Алкогольдегидрогеназа разлагается в присутствии пероксидазы и вызывает окисление хромогена в окрашенный продукт. Окраска полоски и её интенсивность свидетельствует о концентрации алкоголя в анализируемом образце слюны. Полоски чувствительны к метанолу, этанолу, пропанолу, не являются чувствительными к другим спиртам и ацетону. Цветовая шкала содержит пять цветовых зон, соответствующих концентрациям алкоголя 0; 0,2; 0,5; 1,0; 2,0 ‰ [89, 91].

Алкотестеры с инфракрасным сенсором обладают наибольшей стабильностью и надёжностью. Теоретическую основу применения инфракрасной (ИК) спектрофотометрии для определения этилового спирта в выдыхаемом воздухе составляет основной закон светопоглощения Бугера-Ламберта-Бера. Известно, что молекулы поглощают электромагнитное излучение при определённых длинах волн. Иными словами, каждой органической молекуле свойственен свой собственный «отпечаток пальцев». Этиловый спирт поглощает энергию при длинах волн приблизительно 1150, 950, 918, 725, 339, 330 см⁻¹. Ни одно другое соединение не поглощает излучение при этих длинах волн. На рисунке 3.8 представлены ИК-спектры (кривая зависимости поглощения света от длины волны) этанола, метанола и ацетона [91].

Определение концентрации этилового спирта приборами, измеряющими абсорбцию инфракрасного света, осуществляется при так называемых аналитических длинах волн, при которых вещество поглощает наибольшее количество энергии. Наибольшая абсорбция имеет место при длинах волн 1150–1000 см⁻¹, которая соответствует валентным колебаниям карбонильной группы. Кроме того, в ИК-спектре этилового спирта имеется характеристическая полоса частоты колебаний около 3000 см⁻¹, соответствующая связи водород–углерод в молекуле этого соединения; 3650–3200 см⁻¹ – характеристическая полоса поглощения связи углерод–гидроксил. [91]. ИК спектр этанола представлен на рисунке 3.9.

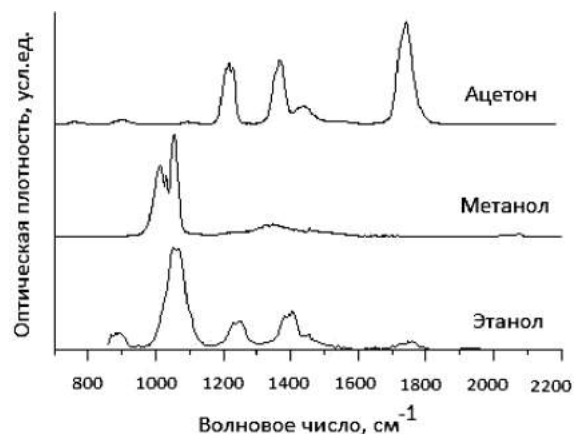


Рисунок 3.8 – ИК-спектрограммы этанола, метанола, ацетона [91]

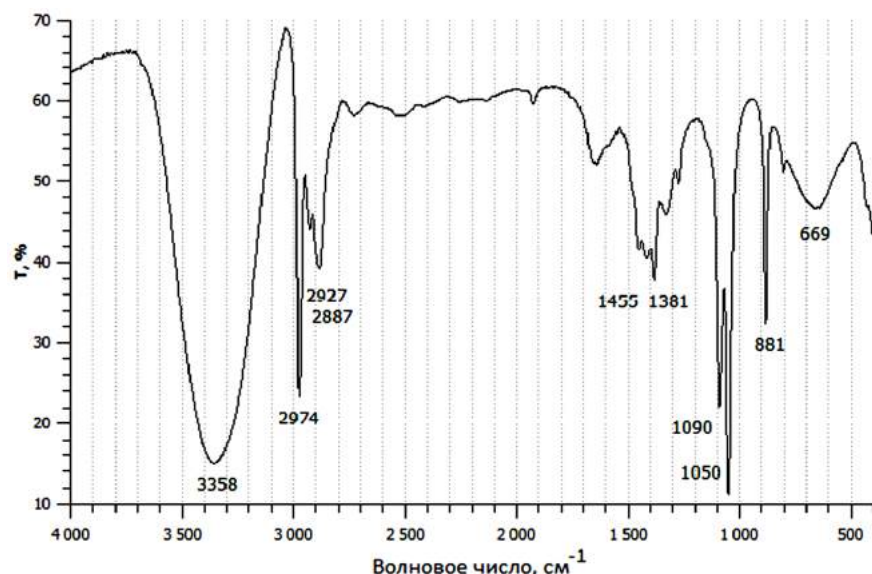


Рисунок 3.9 – ИК-спектр этилового спирта [91]

Приборы с инфракрасным сенсором избирательны к этанолу, обладают высокой чувствительностью, хорошими метрологическими характе-

ристиками и применяются для проведения точных и особо точных количественных определений этилового спирта в организме человека. К тому же приборы такого типа на протяжении длительного времени остаются в рабочем состоянии, сенсоры внутри них обладают достаточно высокой релаксационной способностью и долго дают воспроизводимые результаты без дополнительного обслуживания. Периодичность проверки чувствительности и калибровки приборов – один раз в 12 месяцев [88, 91].

В настоящее время широко используют анализаторы на основе ИК-спектроскопии. К приборам этой группы относятся: анализатор концентрации паров этанола АКПЭ-01, Alcotest-7110 Standart IR, Alcotest-7110 Standart IR + EC, Lion Intoxylizer-1400, Lion Intoxylizer-8000 и др. [88, 92].

Анализатор концентрации паров этанола АКПЭ-01 «Мета» является первым средством измерения содержания исключительно этилового спирта в выдыхаемом воздухе. Прибор избирателен к этанолу и обладает высокой точностью. Конструкция прибора обеспечивает контроль окружающего воздуха на этиловый спирт перед каждым взятием пробы выдыхаемого воздуха, и исследование в выдыхаемом воздухе именно альвеолярной его порции, а также автоматический режим проведения всего рабочего цикла. Идентификация этилового спирта в анализируемой пробе проводится методом ИК-спектроскопии. Время установления рабочего режима составляет 10 минут. Продолжительность подготовки к последующему измерению – не более 60 секунд. Диапазон рабочих температур от 0 до 40 °С. Удобен в обращении и достаточно точен. Кроме того, прибор производит распечатку на бумажном носителе результатов исследования с указанием номера прибора, даты его последней поверки, даты и времени проведения освидетельствования. Диапазон измеряемых концентраций от 0 до 5 ‰. Погрешность измерения составляет ± 1,0 %. Прибор изображён на рисунке 3.10 (а) [88, 92].

Lion Intoxylizer-8000, оборудованный электрохимическим и ИК-сенсорами, что намного повышает надёжность и достоверность анализов, проводимых с использованием этого прибора. Диапазон измеряемых концентраций находится в пределах от 0,03 до 6,9 ‰. Погрешность измерения составляет ± 1,3 %. Диапазон рабочих температур от 0 до 45 °С. Прибор изображён на рисунке 3.10 (б) [88, 92].



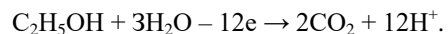
а



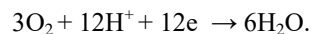
б

Рисунок 3.10 – Приборы для измерения концентрации паров этанола [92]: *а* – ИК-анализатор концентрации паров этанола АКПЭ-01; *б* – прибор Lion Intoxylizer-8000, оборудованный электрохимическим и ИК-сенсорами

Алкотестеры с электрохимическим сенсором. В современных алкотестерах для определения содержания этанола в выдыхаемом воздухе широко применяются электрохимические сенсоры, представляющие собой гальваническую камеру, в которой имеются платиновые электроды, импрегнированные кислотным электролитом [2, 36, 51]. Количественное определение этилового спирта осуществляется электрохимическим методом, вследствие образования ионов в процессе протекания окислительно-восстановительных реакций, представленных ниже. Этанол окисляется на поверхности одного из платиновых электродов (аноде) [88]:



Одновременно кислород воздуха восстанавливается на втором платиновом электроде (катоде) [88]:



Электрохимические сенсоры не реагируют на ацетон, присутствующий в выдыхаемом воздухе. Однако сенсоры данного типа могут отреагировать на метиловый, изопропиловый и другие спирты. Вероятность того, что эти спирты, являющиеся более ядовитыми, чем этанол, присутствуют в выдыхаемом воздухе в концентрациях, фиксируемых алкотесте-

ром, исключительно мала. Более того, если даже допустить, что в выдыхаемом воздухе присутствовали бы указанные выше спирты, то их присутствие оказало бы на организм человека более существенное действие, чем этанол, вплоть до летального исхода. Таким образом, соединения, присутствующие в выдыхаемом воздухе, помимо этанола, не могут в процессе окисления в гальванической ячейке генерировать постоянный ток [88].

Электрохимические сенсоры избирательны к этиловому спирту. Их показания не зависят от температурного фактора. Они применяются для проведения измерений, где необходимо точное количественное определение содержания алкоголя в выдыхаемом воздухе. При этом периодичность проверки чувствительности и калибровки приборов – один раз в шесть месяцев [88]. К приборам этой группы относятся: анализаторы паров этанола Lion Alcometer (SD-400, SD-400P, SD-2), Lion Alkoblow, Alcotest-7410, Alert J4Xec, и др. [88, 92]. Алкометры Alcotest производятся немецкой фирмой Drager. Общим для всех приборов серии Alcotest является применение электрохимического сенсора, высокая избирательность к этанолу и максимальная простота использования. Эти приборы очень точны, избирательны и чувствительны. Они предназначены для профессиональной проверки на степень алкогольного опьянения [88].

Alcotest-7410 Plus – тип датчика электрохимический. Имеет расширенный набор опций по сравнению с Alcotest-7410. Прибор снабжён особо быстрым и долговременно стабильным сенсором. Анализ на наличие и количественное определение этанола может быть произведено без сотрудничества с освидетельствуемым, используя принудительный режим отбора пробы. Пределы измерений находятся в диапазоне от 0 до 3,00 ‰ с возможной индикацией до 9,99 ‰. Точность измерений составляет 0–1,00 ‰ ± 0,05 ‰, а в диапазоне свыше 1,0 ‰ ± 5% от измеряемого значения. Рабочая температура от минус 5 до 45 °С. Время подготовки к повторному тесту колеблется от 10 до 90 секунд, в зависимости от пределов измерения. Прибор сертифицирован и разрешён к применению в медицинской практике [88, 92].

Алкотестер Alert J4Xec снабжён электрохимическим сенсором, что даёт значительное увеличение точности и диапазона измерений. Кроме

того, у прибора появилась память и функция принудительного забора воздуха. Выпускаются две модификации: с портом интерфейса и без такового. Первая модификация может быть соединена с портативным принтером или персональным компьютером. Пределы измерений от 0 до 4,00‰ с возможностью индикации до 9,99‰. Погрешность измерения составляет $\pm 1,0\%$ от измеренного результата. Длительность восстановления сенсора от 30 до 60 секунд. Прибор сертифицирован и разрешён к применению в медицинской практике [88, 92].

Анализаторы паров этанола компании Lion Laboratories Ltd представляют собой портативные автоматические приборы. Анализаторы выпускаются в различных модификациях, в том числе: SD-400, SD-400P, SD-2. Принцип действия анализаторов основан на применении электрохимического датчика, обладающего исключительно высокой избирательностью по отношению к этанолу [88, 92].

Микропроцессор анализаторов управляет всеми режимами работы и преобразует выходные сигналы измерительного датчика в показаниях в единицы измерения. Результаты измерений и сообщения о режимах работы анализаторов отображаются на жидкокристаллическом дисплее. Электропитание приборов осуществляется от щелочных батарей питания или Ni-Cd аккумуляторов. Управление анализаторами осуществляется с помощью кнопок, расположенных на лицевой панели [88].

Lion Alcometer серии SD-400 позволяют проводить тестирование испытуемого в трёх режимах работы [88]:

1. Скрининг – обследуемые лица выдыхают воздух в бесконтактный мундштук-чашечку. Содержание этанола в пробе сравнивается с установленным порогом 0,1 ‰. Если содержание этилового спирта ниже порогового, на дисплее появляется сообщение PASS («прошёл»), при превышении порога измерения – сообщение FAIL («не прошёл») [88].

2. Точное измерение – обследуемые выдыхают воздух в одноразовые мундштуки. Результат измерений предьявляется в цифровом виде в диапазоне от 0 до 4,00 ‰ [88].

3. Скрининг измерение – режим, позволяющий перейти от скрининга к измерению без перезапуска прибора. Обследуемые лица выдыхают

воздух в бесконтактный мундштук-чашечку, содержание этанола в пробе сравнивается с установленным порогом 0,1 ‰. Если содержание этилового спирта ниже порогового, на дисплее появляется сообщение PASS. При обнаружении у обследуемых концентрации этанола, превышающей порог, бесконтактный мундштук-чашечка меняется на одноразовый мундштук и производится точное измерение с предьявлением количественного результата [88].

Время одного анализа составляет от 40 секунд при нулевом уровне; до 4 минут – при уровне 4,0 ‰. Диапазон рабочих температур от минус 5 до 40 °С. Интервал между поверками составляет один год. Настройку чувствительности рекомендуется проводить один раз в шесть месяцев на имитаторе паров этанола или на стандартных газовых смесях. Управление всеми функциями приборов серии Lion Alcometer серии SD-400 осуществляет контроллер. Внутренняя память хранит данные о дате, времени, о результатах тестов, о последней по времени настройке чувствительности и поверке, а также дополнительные настройки прибора. Имеющийся коммуникационный порт предназначен для обмена данными между алкометром и компьютером, а также для вывода данных на принтер. Модель Lion Alcometer серии SD-400P поставляется в комплекте с миниатюрным принтером и зарядным устройством для принтера и прибора [90, 92]. Набор изображён на рисунке 3.11.



Рисунок 3.11 – Анализатор паров этанола Lion Alcometer SD-400P [92]

Индикаторы паров этанола адсорбционного типа с полупроводниковыми датчиками. Принцип работы индикатора паров этанола АГ-1200 основан на изменении электропроводимости адсорбционно-чувствительного элемента при адсорбции паров этилового спирта, воздействующего на его поверхность, с последующим преобразованием электрических сигналов в световую и звуковую сигнализацию. Применяется для контроля трезвости водителей автотранспортных средств, осуществляемого медицинскими работниками и сотрудниками автопредприятий, а также при экспертизе алкогольного опьянения. Время прогрева не более трёх минут. Продолжительность анализа пробы выдыхаемого воздуха с содержанием этанола до 200 мг/м^3 не более 15 секунд. Продолжительность подготовки к последующему анализу после ввода пробы с концентрацией этанола до 500 мг/м^3 не более 50 секунд. Предназначен для выявления паров этилового спирта при его концентрации 100 мкл/л и более в выдыхаемом воздухе; $0,2 \text{ ‰}$ в крови. Прибор сертифицирован и разрешён к применению в медицинской практике [88, 92], изображён на рисунке 3.12 (а).

Алкометр Alert J4X применяется для предрейсового и предсменного контроля водителей. Диапазон измерения находится в пределах от 0 до $4,0 \text{ ‰}$. Погрешность измерения составляет $\pm 2,0 \text{ ‰}$ ($\pm 90,0 \text{ мг/м}^3$). Снабжён полупроводниковым датчиком, цифровым трёхзарядным светодиодным дисплеем. Имеет полностью автоматический режим тестирования и расширенный диапазон рабочих температур от минус 10 до 50 °C . Рабочая температура от минус 5 до 50 °C . Прибор сертифицирован и разрешён к применению в медицинской практике [88, 92], изображён на рисунке 3.12(б).



Рисунок 3.12 – Индикаторы паров этанола адсорбционного типа с полупроводниковыми датчиками [92]: а – прибор АГ-1200; б – алкометр Alert J4X

Приборы с полупроводниковыми датчиками применяются, главным образом, для предварительной оценки содержания этанола в выдыхаемом воздухе. Показания приборов этой группы во многом зависят от температуры окружающей среды и должны работать при комнатной или слегка повышенной температуре. Более того, полупроводниковые датчики не избирательны (или мало избирательны) к этиловому спирту и могут реагировать на различные летучие соединения, содержащиеся в организме человека (ацетон, ацетальдегид и др.). Алкотестеры с полупроводниковыми датчиками достаточно недорогие приборы и, как правило, используются в качестве индикаторов. Периодичность проверки чувствительности и калировки таких приборов – не реже одного раза в два месяца. К приборам этой группы относятся: АГ-1200, Alert J4X, Ensure, Drivesafe, AL-2000, AL-2500, AI-5000, Elan, Tanita HC-207, Динго PRO, «Алкотестер» и др. [88, 92].

В основе работы полупроводниковых сенсоров лежит явление физической и химической адсорбции молекул газовой смеси на поверхности полупроводника [1, 2, 36, 51]. В первом случае молекулы газа связываются с поверхностью полупроводника за счёт сил электростатической природы, а во втором за счёт ковалентного связывания. В результате поверхность полупроводника меняет свои свойства, и в частности электропроводность, которую достаточно просто измерить и связать с концентрацией и природой вещества изменившего её. Чувствительный элемент полупроводниковых сенсоров изготавливают из оксидов различных металлов. Большое применение нашли оксиды цинка, олова, титана, кобальта, циркония. Так как оксиды металлов в основном не стехиометричны, то дефекты их структуры служат центрами адсорбции определённых газов. Этим объясняется активность оксидов и их специфичность к некоторым газам, кроме того селективность можно повысить, иммобилизуя на поверхность чувствительного элемента дополнительные присадки, ферменты, микроорганизмы [2, 36]. Показания таких сенсоров зависят от многих факторов среды [88–90].

Список литературы

1. Белых И.А. Аналиты в биосенсорах / И.А. Белых, А.М. Грек, А.В. Сакун, В.В. Марущенко, С.В. Гаташ // *Биофизический вестник*. – 2010. – Т. 2, № 25. – С. 144–158.
2. Белих И.А. Биологичні та хімічні сенсорні системи / І.А. Белих, М.Ф. Клещев.– Харків : НТУ «ХП», 2011. – 144 с.
3. Кудряшов А.П. Биосенсорные устройства: Курс лекций / А.П. Кудряшов. – Минск : БГУ, 2003. – 113 с.
4. Стожко Н.Ю. Толстоплёночный углеродсодержащий электрод, модифицированный формазаном для определения меди, свинца, кадмия и цинка / Н.Ю. Стожко, Г.Н. Липунова, Т.Н. Маслакова // *Журнал аналитической химии*. – 2004. – Т. 59, № 2. – С. 202–208.
5. Hristov S.M. Tyrosinase Sensor for Amperometric Detection of Phenol / S.M. Hristov, R.I. Boukoureshtieva, A.R. Kaisheva, I.D. Iliev // *Buld. Chem. Commun.* – 2004. – V. 36, № 1. – P. 53–56.
6. Mailley P. Composite Carbon Paste Biosensor for Phenolic Derivatives Based on *in situ* Electrogenerated Polypyrrole Binder / P. Mailley, E.A. Coming, S.C. Mailley // *Anal. Chem.* – 2003. – V. 75, № 20. – P. 5422–5428.
7. Liu A. Electrochemical Biosensor Based on Protein Polysaccharide Hybrid for Selective Detection of Nanomolar Dopamine Metabolite of 3,4-Dihydroxyphenylacetic Acid (DOPAC) / A. Liu, H. Honma, H. Zhou // *Electrochem. Commun.* – 2005. – V. 7, № 2. – P. 233–36.
8. Морозова О.В. Амперометрические биосенсоры на основе медьсодержащих оксидов для определения фенольных соединений / О.В. Морозова, Е.А. Зайцева, А.С. Хадунина // ЭММА – 2004, 6-я Всероссийская конференция по электрохимическим методам анализа с международным участием. – Уфа, 2004. – С. 71–73.
9. Ярополов А.Н. Амперометрические биосенсор для определения фенольных соединений на основе лаккозы, иммобилизованной в полимерные матрицы / А.Н. Ярополов, С.В. Шпеев, О.В. Морозова // *Журнал аналитической химии*. – 2005. – Т. 60, № 6. – С. 624–628.
10. Cheng H.C. Development of Dimethylsulfoxide Biosensor Using a Mediator Immobilized Enzyme Electrode / H.C. Cheng, M. Abo, A. Okubo // *Analyst*. – 2003. – V. 128, № 6. – P. 824–827.
11. Antiochia R. Amperometric Mediated Carbon Nanotube Paste Biosensor for Fructose Determination / R. Antiochia, I. Lavagnini, F. Magno // *Anal. Lett.* – 2004. – V. 37, № 8. – P. 1657–1669.
12. An Integrated Enzyme Glucose Oxidase Fructose Dehydrogenasetetrathiofulvalene-3-mercaptopropionil Acid Gold Electrode for the Simultaneous Determination of Glucose and Fructose / S. Campruzano, O.A. Loaiza, M. Pedrero [et al.] // *Bioelectrochemistry*. – 2004. – V. 63, № 1. – P. 2–8.
13. Investigation of Organic Phase Biosensor for Measuring Glucose in Flow Injection Analysis System / N. Adanyi, M. Toth-Markus, E.E. Szabo [et al.] // *Anal. Chim. Acta.* – 2004. – V. 501, № 2. – P. 219–225.
14. Phanthong C. The Steady State Current at a Microdisk Biosensor / C. Phanthong, M.X. Somasundrum // *J. Electroanal. Chem.* – 2003. – P. 558.
15. Ковальчук Є.П. Синтез дослідження електропровідних полімерних платформ для біосенсорів / Є.П. Ковальчук, Б.Б. Остапович, З.Л. Туррик // *Український хімічний журнал* – 2006. – Т. 72, № 11. – С. 21–36.
16. Yonzon C.R. Based on Surface Enhanced Raman Scattering Improved Partition Layer, Temporal Stability, Reversibility and Resistance to Serum Protein Interference / C.R. Yonzon, C.L. Haynes, X. Zhang, J.T. Walsh // *Anal. Chem.* – 2004. – V. 75, № 1. – P. 78–85.
17. Third Generation Horseradish Peroxidase Biosensor Based on Self-Assembling Carbon Nanotubes to Gold Electrode Surface / H.J. Chen, G. Wang, Q. Zhang [et al.] // *Chin. Chem. Lett.* – 2005. – V.16, № 4. – P. 523–526.
18. Li J.-P. Gaodeng Xuexido Huaxun Xuebao / J.-P. Li, T.-Z. Peng, X.-R. He, H.-J. Xiao // *Chem. J. Chin. Univ.* – 2003. – 24, № 3. – P. 404–409.
19. Будников Г.К. Микроконцентрирование в создании электрохимических сенсоров и биосенсоров в определении органических соединений / Г.К. Будников, Г.А. Евстюгин // *Российский химический журнал*. – 2005. – Т. XLIX, № 2. – С. 22–25.
20. Mello L.D. HRP-based Amperometric Biosensor for the and fast Evaluation of Antioxidant Capacity of Vegetable Extract / L.D. Mello, L.T. Kubota // *Int. Soc. Electrochem.* – 2004. – P. 173.
21. Yang M. Huaxue Xuebao / M. Yang, C. Li, Y. Yang, G. Shen, R. Yu // *Acta China Sin.* – 2004. – V. 62, № 5. – P. 502–507.

22. Liu G. Enzyme Nanoparticles-Based Electronic Biosensor / G. Liu, Y. Lin, V. Ostatna, J. Wang // *Chem. Commun.* – 2005. – № 28. – P. 3481–483.
23. Zhang G. Fenxi Huaxue Chin / G. Zhang, Y. Wang // *J. Anal. Chem.* – V. 31, № 12. – P. 1421–1424.
24. Газарян Н.Г. Пероксидаза табака – новый реагент для амперометрических биосенсоров / Н.Г. Газарян, Л. Гортон, Т. Рузчас // *Журнал аналитической химии.* – 2005. – Т. 60, № 6. – С. 629–638.
25. Airborne Surface Plasmon Resonance Biosensing / T. Chinowsky, A. Naimushin, S. Soelberg [et al.] // *Proc. SPIE.* – 2004. – V. 5270. – P. 182–188.
26. Amine A. Recent Advance on Biosensor Based on Enzyme Inhibition / A. Amine, G. Pallschi // *Congr. ISTISAN.* – 2005. – № 3. – P. 21.
27. Никольская Е.Б. Проблемы и перспективы применения ферментов в анализе объектов окружающей среды / Е.Б. Никольская, Г.А. Евстюгин, Т.Н. Шеховцова // *Журнал аналитической химии.* – 1994. – Т. 49, № 5. – С. 452–461.
28. Евстюгин Г.А. Электрохимические биосенсоры на основе графитовых электродов, модифицированных полианилином для определения фосфорорганических пестицидов / Г.А. Евстюгин, Г.К. Будников, А.А. Иванов // *Укр. хімічний журнал* – 2005. – Т. 71, № 9. – С. 51–58.
29. Gwenin C.D. The Development of a Novel Amperometric Biosensor for the Detection of Nitro explosives / C.D. Gwenin, M. Keleji, P.A. Willifms, R.M. Jonas // *Soc. Electrochem.* – 2004. – P. 360.
30. Singh S. Amperometric Cholesterol Biosensor Based on Immobilized Cholesterolesterase and Cholesteroxidase on Conducting Polypyrrole Films / S. Singh, A. Chenbey, B.D. Malhotra // *Anal. Chem Acta.* – 2004. – V. 502, № 2. – P. 229–234.
31. Campanella L. Comparison of Different Spectrophotometric and Fluorometric Methods and New Biosensor or Voltammetric Methods for Measuring the Antioxidant Capacity of Several Real Matrices / L. Campanella, D. Bellantoni, A. Bonanni // *Congr. ISTISAN.* – 2003. – № 3. – P. 111.
32. Marshall A. Metabolite-Sensitive Holographia Biosensor / A. Marshall, C.R. Lowe // *Anal. Chem.* – 2004. – № 5. – P. 1518–1523.
33. Zhou G.-J. Development of Integrated Chemiluminescence Flow Sensor for the Determination of Adrenaline and Isoprenaline / G.-J. Zhou, G.O-F. Zhang, H.-Y. Chen // *Anal. Chim. Acta.* – 2002. – 463, № 2. – P. 257–263.
34. Варфоломеев С.Д. Биосенсоры / С.Д. Варфоломеев // *Соросовский образовательный журнал.* – 1997. – № 1 – С. 45–49.
35. Стюард М. Аффинность реакции антиген-антитело и её биологическое значение. Структура и функция антител: Пер. с англ. / М. Стюард, Л. Глин. – М. : Мир, 1983. – С.113–114.
36. Эггинс Б. Химические и биологические сенсоры / Б. Эггинс. – М. : Техносфера, 2005. – 336 с.
37. Yimit A.G. Development of a composite optical waveguide sensor for immunoglobulin / A.G. Yimit, X. Huang, Y. Xu // *Chem. Lett.* – 2003. – V. 32, № 1. – P. 86–87.
38. Shen Z. Single-Chain Fragment Variable Antibody Piezoimmunosensor / Z. Shen, G.A. Stryker, R. Mernaugh // *Anal. Chem.* – 2005. – V. 77, № 3. – P. 797–805.
39. Yang Liju. Intendigitated Array Mierodec Trodebased Electrochemical Impedance Immunosensor for Detection of *Escherichia coli* 0157:H7 / Yang Liju, Li Yanbin, Erf Gisela F. // *Anal. Chem.* – 2004. – 76, № 4. – P. 1107–1113.
40. Ruan C. Immunobiosensor Chips for Detection of *Escherichia coli* 0157:H7 Using Electrochemical Impedance Spectroscopy / C. Ruan, L. Yang, Y. Li // *Anal. Chem.* – 2002. – V. 74, № 18. – P. 4814–4820.
41. Кудряшов А.П. Определение микроколичеств аммиака в воде, аминокислотах и аминах по количественным показателям электрофизиологической реакции клеток междуузлий харовой водоросли *Nitella Flexilis* / А.П. Кудряшов, В.М. Юрин // Молекулярно-биологические и физико-химические методы идентификации биологических объектов и материалов различного происхождения. Материалы 2-й республиканской научно-практической конференции. – Минск : РНВШ БГУ, 2003. – С. 56–60.
42. Стародуб Н.Ф. Экспрессный контроль токсичных веществ патогенных микроорганизмов. Иммуный анализ и иммуные сенсоры / Н.Ф. Стародуб, В.Н. Стародуб // *Український біохімічний журнал.* – 2002. – Т. 74, № 4. – С. 5–23.
43. Bragadin M. The Mitochondria from Beer Heart as Biosensors for the Selective Monitoring of Phenols / M. Bragadin, M. Gallo, M. Grasso, S. Ma-

- nente // *Anal. Chem.* – 2003. – V. 93, № 4. – P. 373–379.
44. Phanthong C. The Steady State Current at Microdisk Biosensor / C. Phanthong, M.J. Somasundrum // *Electroanal. Chem.* – 2003. – V. 558. – P. 1–8.
45. Бабкина С.С. Концентрирование тяжёлых металлов на иммобилизированной дезоксирибонуклеиновой кислоте в составе биосенсора с целью их определения в биологических объектах / С.С. Бабкина, Н.А. Ухалович, Е.Н. Моссева, Е.Е. Филюшина // *Журнал аналитической химии.* – 2003. – Т. 58, № 7. – С. 731–732.
46. Song K.-M. Aptamers and their Biological Applications / K.-M. Song, S. Lee, C. Ban // *Sensors.* – 2012. – V. 12. – P. 612–631.
47. Коновалова О.А. ДНК-модифицированный наносенсор на основе пьезокристаллического кварцевого резонатора / О.А. Коновалова, Р.Ф. Фахруллин, Ф. Мухлисулина // *Сборник статей: 7-я Всероссийская молодёжная научная школа «Когерентная оптика и оптическая спектроскопия».* – Казань: Изд-во Казан. ун-та, 2003. – С. 215–221.
48. Meric B. Electrochemical Biosensor for the Interaction of DNA with the Alkylating Agent 4,4'-Dihydroxychalcone Based on Guanine and Adenine Signals / B. Meric, K. Kerman, D. Ozkan // *J. Pharm. and Biomed. Anal.* – 2002. – V. 30, № 4. – P. 1339–1346.
49. La-Scalea M.A. Voltammetric Behavior of Benzimidazole at a DNA-Electrochemical Biosensor / M.A. La-Scalea, S.H.P. Serrano, E.I. Ferreira // *J. Harm. and Biomed. Anal.* – 2002. – 29, № 3. – P. 561–568.
50. Евстратов А.А. Экспресс-анализ олигонуклеотидов на планерном микрофлюидном чипе / А.А. Евстратов, А.Л. Буляница, В.Е. Курочкин // *Журнал аналитической химии.* – 2004. – Т. 59, № 6. – С. 587–594.
51. Дзядевич С.В. Наукові та технологічні засади створення мініатюрних електрохімічних біосенсорів / С.В. Дзядевич, О.П. Солдаткин. – К. : Наукова думка, 2006. – 251 с.
52. Тернер Э. Биосенсоры: Основы и приложения : пер с англ. / Э. Тернер, И. Карубе, Дж. Уилсон. – М. : Мир, 1992. – 614 с.
53. Бидей С.П. Иммобилизованные клетки и ферменты: Методы : кн. 1 : пер. с англ. / С. П. Бидей, П. Броделиус, И.М. Кабрал. – М. : Мир, 1988. – 215 с.
54. Лаврентьева Т.Л. Исследование сорбционной способности покрытий пьезокварцевых сенсоров для определения летучих фенолов и формальдегида : Автореф. дис. канд. хим. наук. / Т.Л. Лаврентьева. – Липецк : Липецкий гос. пед. ун-т., 2001. – 20 с.
55. Ostrovskaya L.Yu. Characterization of Different Carbon Nanomaterials Promising for Biomedical and Sensor Application by the Wetting Method / L.Yu. Ostrovskaya, V.M. Perevertailo, L.A. Matveeva // *Порошковая металлургия.* – 2003. – № 1-2. – С. 1–10.
56. Калач А.В. Пьезосенсоры в мониторинге окружающей среды / А.В. Калач // *Экологические системы и приборы.* – 2004. – № 10. – С. 8–10.
57. Кебец П.А. Применение сульфинированного сверхчистого полистирола в ионной хроматографии / П.А. Кебец, П.Н. Нестеренко // *Журнал аналитической химии.* – 2003. – V. 58, № 7. – С. 720–721.
58. Choi S.H. Amperometric Biosensors Employing an Insoluble Oxidant as an Interference-Removing Agent / S.H. Choi, S.D. Lee, S.J. Ho // *Anal. Chim. Acta.* – 2002. – V. 461, № 2. – P. 251–260.
59. Shang L. Anitric Oxide Biosensor Based on Horseradish Peroxidase. Kieselgur Co-modified Pyrolytic Graphite Electrode / L. Shang, X. Liu, C. Fan, G. Li // *Anal. Chem.* – 2004. – V. 94, № 5–6. – P. 457–462.
60. Heo J. A Microfluidic Bioreactor Based on Hydrogel-Entrapped *E. coli*: Cell Viability, Lysis and Intracellular Enzyme Reaction / J. Heo, K.J. Thomas, G.H. Seong, R.M. Crooks // *Anal. Chem.* – 2003. – V. 75, № 1. – P. 22–26.
61. Wu Z.-S.. Gaodeng Xuexiao Huaxuun Xuebao / Z.-S. Wu, J.-S. Li, M.-H. Luo // *Chem. J. Chin. Unin.* – 2005. – V. 26, № 3. – P. 441–445.
62. Ребриев А.В. Ферментний сенсор на основі фотополімерних мембран для визначення сечовини / А.В. Ребриев // *Український біохімічний журнал* – 2000. – Т. 72, № 6. – С. 141–142.
63. Ребриев А.В. Подбор жидких фотополимеризующих композиций для иммобилизации ферментов / А.В. Ребриев // *Український біохімічний журнал.* – 2002. – Т. 74, № 4. – С. 154–155.
64. Ребриев А.В. Жидкие фотополимеризующиеся композиции в качестве иммобилизационного матрикса биосенсоров / А.В. Ребриев, Н.Ф. Стародуб, А.Ф. Маснюк // *Український біохімічний журнал.* – 2002. – Т. 74, № 4. – С. 91–96.

65. Yamamoto K. Solid-state pH Ultramicrosensor Based on a Tungstic Oxide Film Fabricated on a Tungsten Nanoelectrode and its Application to the Study of Endothelial aLIs / K. Yamamoto, G. Shi, T. Zhou // *Anal. Chim. Acta.* – 2003. – V. 480, № 1. – P. 109–117.
66. Marzouk Sayed A.M. Improved Electrodeposited Iridium Oxide pH Sensor Fabricated on Ethed Titanium Substrates / A.M. Marzouk Sayed // *Anal. Chem.* – 2003. – V. 75, № 6. – P. 1258–1266.
67. Болтовец П.Н. Ориентация протеинов на поверхности сенсора и оптимизация их иммобилизации путём предварительной защиты активного центра / П.Н. Болтовец, С.В. Веревка, Н.С. Дяченко // *Український біохімічний журнал.* – 2002. – Т. 74, № 4. – С. 71–75.
68. Снопко Б.А. Влияние локального окружения и состояния иммобилизованного лиганда на процесс его взаимодействия с макромолекулярным рецептором / Б.А. Снопко, П.Н. Болтовец, Ф.Д. Ровелл // *Теоретическая и экспериментальная химия.* – 2006. – Т. 42, № 4. – С. 210–216.
69. Медянцева Э.П. Использование амперометрических иммуноферментных сенсоров для определения бактериальных антигенов / Э.П. Медянцева, Г.Р. Сафина, Е.В. Хандеева // *Журнал аналитической химии.* – 2004. – Т. 59, № 2. – С. 109–197.
70. Skubal L.R. Detection and Identification of Gaseous Organics Using TiO₂ Sensor / L.R. Skubal, N.K. Meshkov, M.C. Vogt // *J. Photochem and Photobiol A.* – 2002. – V. 148, № 1-3. – P. 103–108.
71. Reekmans G. Enhanced Performance of an Affinity Biosensor Interface Based on Mixed Self-Assembled Monolayers / G. Reekmans, A. Campitelli, W. Dehaen, G. Maes // *Langmuir.* – 2003. – V. 19, № 10. – P. 4351–4357.
72. Сафина Г.Р. Амперометрические иммуноферментные сенсоры для диагностики некоторых инфекционных заболеваний / Г.Р. Сафина, Э.П. Медянцева, О.Г. Фомина // *Журнал аналитической химии.* – 2005. – Т. 60, № 6. – С. 616–623.
73. Долгополов Н.В. «Электронный нос» – новое направление индустрии безопасности / Н.В. Долгополов, М.Ю. Яблоков // *Мир и безопасность.* – 2007. – № 4. – С. 54–59.
74. Яблоков М.Ю. Самоорганизация наночастиц палладия при формировании металл-полимерных покрытий / М.Ю. Яблоков, С.А. Завьялов, Е.С. Оболонкова // *Журнал физической химии.* – 1999. – Т. 73, № 2. – С. 219–223.
75. Долгополов Н.В. Наносенсорная нейроподобная система «Электронный нос» / Н.В. Долгополов, М.Ю. Яблоков // *Электроника : Наука, Технология, Бизнес.* – 2008. – № 1. – С. 60–65.
76. Власов Ю.Г. Электронный язык – системы химических сенсоров для анализа водных сред / Ю. Г. Власов, А. В. Легин, А. М. Рудницкая // *Российский химический журнал.* – 2008. – Т. LII, № 2. – С. 101–112.
77. Hayashi K. Multichannel Taste Sensor Using Lipid Membranes / K. Hayashi, M. Yamanaka, K. Toko, K. Yamafuji // *Sensors and Actuators.* – 1990. – V. 2. – P. 205–209.
78. Riul A. An Artificial Taste Sensor Based on Conducting Polymers / A. Riul, R. Malmegrim, F. Fonseca, L. Mattoso // *Biosensors and Bioelectronics.* – 2003. – V. 18. – P. 1365–1370.
79. Forster R. Nonlinear Calibration of Ion-Selective Electrode Arrays for Flow Injection Analysis / R. Forster, D. Diamond // *Anal. Chem.* – 1992. – V. 64. – P. 1721–1728.
80. Legin A. Integrated Analytical Systems, Comprehensive Analytical Chemistry / A. Legin, A. Rudnitskaya, Y. Vlasov. – Amsterdam : Elsevier, 2003. – P. 437–445.
81. Thin film sensors on the basis of chalcogenide glass materials prepared by pulsed laser deposition technique. / M.J. Schoning, C. Schmidt, J. Schubert [et al.] // *Sensors and Actuators B.* – 2000. – V. 68, № 1-3. – P. 254–259.
82. Проточно-инжекционный анализ с использованием мультисенсорной системы для определения содержания ионов тяжёлых металлов в дыму мусоросжигательных заводов / Д. Мортенсен, А. Легин, А. Ипатов [и др.] // *Журнал прикладной химии.* – 1999. – Т. 72. – С. 8533–8536.
83. Вольтамперометрическая идентификация антиаритмических лекарственных средств с использованием метода главных компонент / А. Сидельников, Р. Зильберг, Ю. Яркаева [и др.] // *Журнал аналитической химии.* – 2015. – Т. 70, № 10. – С. 1–7.

84. An Electronic Tongue Taste Evaluation: Identification of Goat Milk Adulteration with Bovine Milk / L. Dias, M. Peres, A. Veloso [et al.] // *Sensors and Actuators*, 2009. – V. 136. – P. 209–217.
85. Ntakatsane M. Rapid Detection of Milk Fat Adulteration With Vegetable Oil by Fluorescence Spectroscopy / M. Ntakatsane, X. Liu, P. Zhou // *J. Dairy Sci.* – 2013. – V. 96. – P. 2130–2136.
86. Mobarraz M. Functionalized ZnS Quantum Dots as Luminescent Probes for Detection of Amino Acid / M. Mobarraz, M. Ganjali, M. Chaichi, P. Norouzi // *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy.* – 2012. – V. 96. – P. 801–804.
87. Liao J.-D. Studies on the Early Detection of Wastewater's Toxicity Using a Microbial Sensing System / J.-D. Liao, S.-H. Wang, D.-J. Hsu // *Sens. Actuators B Chem.* – 2001. – V. 72. – P. 167–173.
88. Бушуев Е.С. Определение этилового спирта в выдыхаемом воздухе и биологических жидкостях / Е.С. Бушуев, Р.В. Бабаханян, В.Д. Исаков. – СПб. : Юридический центр пресс, 2008. – 107 с.
89. Зайцева Д.Ю. Биосенсор на основе алкогольоксидазы из метилотрофных дрожжей для определения метилового и этилового спиртов / Д.Ю. Зайцева, М.Г. Зайцев, М.Р. Мингалимов // *Известия ТулГУ. Естественные науки*, 2016.– № 4. – С. 64–74.
90. Асулян Л.Д. Биосенсоры для экспресс определения спиртов на основе дрожжей *Hansenula polymorpha* и *Pichia Angusta*, иммобилизованных в криогель поливинилового спирта / Л.Д. Асулян, И.Н. Старкова, Н.М. Филатова // *Известия ТулГУ. Естественные науки.* – 2008. – № 1. – С. 169–176.
91. Самсонова Л.Г. Применение ИК и ПМР спектроскопии при изучении строения органических молекул / Л.Г. Самсонова. – Томск : Изд. Дом Томского гос. ун-та, 2016. – 60 с.
92. Торгово-консультационный центр – Алкометры. [Электронный ресурс] Режим доступа к ресурсу – <http://www.alkometry.ru>

4. НАНОБИОФИЗИКА В БИОНАНОТЕХНОЛОГИИ И НАНОФАРМАЦИИ

*Н.Ю. Масалитина, О.Н. Близнюк, Н.Ф. Клещев,
А.Н. Огурцов*

4.1. Введение

Предметом нанобиофизики являются физические взаимодействия в биологических системах на наноуровне [1]. Именно нанобиофизика определяет специфику разработки технологий манипулирования отдельными биомолекулами и разработки интерфейсных поверхностей между биомолекулами и наночастицами [2], методологию создания новых бionаноструктур и изучения их свойств [3], определяет спектр потенциально возможных биоподобных наноустройств и специфику их использования в медицине и фармации [4, 5]. Бионанотехнология – это раздел нанотехнологии, в котором необходимые атомные перестройки осуществляются с использованием принципов, методов и способов, подсказанных биологией [6]. Среди прочего, бионанотехнология включает в себя изготовление и самосборку наноматериалов для различных био- и небио- приложений [7]; биомиметические модификации наноматериалов и методы их синтеза для получения конкретных структур для различных биомедицинских целей [8]; модификацию поверхности используемых в настоящее время бionаноматериалов для удовлетворения критериев Крейна [9]. Биологические применения наноструктурных материалов в настоящее время включают в себя различные области, такие как твёрдая и мягкая тканевая инженерия [10, 11], противомикробная и раковая терапия [12, 13], меди-

цинская визуализация [14], доставка лекарств [15], стоматология [16], галеновые препараты и косметика [17]. Недавние разработки в области нанотехнологий и бионанотехнологий [18] создали бесконечные возможности для использования новых нанопрепаратов и наноконтейнеров [19] (например, липосом, наночастиц, макроциклических молекул и т. д. [20]) в качестве новых терапевтических методов при лечении заболеваний [21]. В результате стремительного роста числа исследований в области нанотехнологий и наномедицины за последние годы был разработан запас новых синтетических наноматериалов с уникальными свойствами и функциями [22]. Эти наноматериалы могут быть использованы в качестве новых терапевтических препаратов или в качестве устройств для модификации и повышения эффективности существующих терапевтических средств [23]. Во всех вышеупомянутых наномасштабных явлениях и многочисленных применениях нанобиофизические эффекты играют решающую роль [24], обеспечивая стабильность и функциональную гибкость разработанных нанобиоассоциатов.

4.2. Специфика бионаноматериалов

Иерархические стратегии формирования бионанообъектов. Ещё в 1991 году G.M. Whitesides сформулировал четыре иерархических метода (стратегии), которые позволяют ассемблировать сложные биоструктуры из элементарных компонентов [25].

Первый метод называется последовательный ковалентный синтез (*sequential covalent synthesis*). В случае последовательного ковалентного синтеза функциональные группы или отдельные атомы непосредственно связываются друг с другом в ковалентные молекулы необходимой формы. Преимущества ковалентного синтеза определяются тем разнообразием химических структур, которые могут быть синтезированы. Атомы могут быть скомбинированы практически в любых комбинациях, включая сильно деформированные и напряжённые конструкции, в пределах, конечно, ограничений на геометрию и силу связей, которые обусловлены квантовой природой химических связей [26].

Вторая стратегия называется ковалентная полимеризация (*covalent polymerization*). Структуры строятся из модульных блоков, которые соединяются в линейные или разветвлённые цепи. Большие биологические макромолекулы собираются именно методом ковалентной полимеризации [24]. Синтез в клетках белков из аминокислот, молекул ДНК из нуклеотидов или полисахаридов из моносахаридов – это всё это примеры применения данного метода. Однако есть и ограничения, свойственные именно этой стратегии [27]. Во-первых, после того, как выбран определённый тип связи отдельных мономеров в полимер, свойства всей цепи будут ограничены именно этим типом связи. Например, белки обычно образуются соединением в цепь пептидных групп, но не ангидридов или эфиров. Во-вторых, синтез ограничен использованием только тех мономеров, которые стабильны в условиях протекания реакции полимеризации, поэтому, некоторые полезные химические группы могут быть слишком неустойчивы, чтобы их использовать. Для решения этой проблемы при проведении химического синтеза используются скрупулёзные химические схемы для защиты чувствительных химических групп во время синтеза. В биологических системах эту функцию выполняют ферменты, которые обеспечивают гораздо более «мягкие» условия для полимеризации, позволяя использовать мономеры с более широким спектром химических свойств [28].

Третья стратегия называется самоорганизующийся синтез (*self-organizing synthesis*) или самосборка. В этом случае, как и в случае ковалентной полимеризации, также используется принцип модульной сборки, но модули соединяются в структуру нековалентно. Типичными примерами таких самособранных структур являются мицеллы и биомембраны, собранные из липидов [29]. Следует подчеркнуть отличие самосборки от двух вышеперечисленных иерархических стратегий: последовательного ковалентного синтеза и ковалентной полимеризации. При ковалентном синтезе или полимеризации, которые, как правило, осуществляются ферментативными системами, образуется необходимая молекулярная структура, которая необязательно является энергетически наиболее выгодной, как, например, в случае синтеза таких топливных молекулы, как АТФ и

ГТФ. При самосборке, напротив, молекулы формируют структуру, достигая термодинамического энергетического минимума, спонтанно находя при этом самую энергетически выгодную комбинацию взаимодействий между модулями, но не формируя ковалентных связей между ними [30].

Четвертая иерархическая стратегия это самоассемблирование (*self-assembly*). Самоассемблирование определяется как спонтанное ассемблирование молекул в структурированные, стабильные, нековалентно связанные агрегаты [31]. Два наиболее распространённых процесса самоассемблирования это белковый фолдинг и самоассемблирование мультиглобулярных структур [32]. Оба процесса включают быстрый перебор (вследствие случайных термических флуктуаций) различных возможных конформаций до тех пор, пока не будет достигнут термодинамический минимум [33]. Высокоспецифичные взаимодействия определяют геометрию финальной структуры. Примеры реализации этой стратегии – это и ассемблирование субъединиц рибосомы в ядрышке, и ассемблирование комплексов инициации трансляции, и ассемблирование вирусных капсидов [34]. Самоассемблирование критическим образом зависит от тщательности проработки интерфейсных поверхностей.

Молекулярное узнавание. Ещё до того, как была определена атомная структура первых биомолекул, H.R. Crane сформулировал два принципа, в соответствии с которыми должно происходить макромолекулярное узнавание в самоассемблирующихся системах: множественность слабых парных взаимодействий и комплексная комплементарность [9].

Для обеспечения высокой специфичности между интерфейсными поверхностями обеих взаимодействующих частей должно образовываться много слабых взаимодействий. Этот принцип совсем не очевиден. Может показаться, что, наоборот, лучше использовать одну, но сильную связь. Использование одной или нескольких прочных связей, действительно, обеспечит высокую стабильность. Но не обеспечит специфичность. Поскольку одинаковое пространственное расположение всего двух (или нескольких) атомов может быть (случайно) достигнуто для, вообще говоря, произвольной комбинации взаимодействующих частиц, то это увеличивает риск образования случайных неверных комплексов. А вот использова-

ние целого массива слабых парных взаимодействий гарантирует специфичность, ибо каждая пара взаимодействующих атомов вносит свой вклад в суммарное взаимодействие, обеспечивая тем самым необходимую силу связи между двумя биомолекулами.

Комплексная комплементарность означает, что взаимодействующие поверхности двух биомолекул должны быть геометрически (топологически) подобны, точнее, должны быть комплементарны друг другу. Именно такая комплементарность обеспечивает правильное взаимное расположение атомов так, чтобы сформировалась система множественных взаимодействий. Эта комплементарность включает в себя как «геометрическую комплементарность», когда выступы на поверхности одной молекулы точно совпадают с впадинами на поверхности другой молекулы, так и «химическую комплементарность», при которой в нужных позициях оказываются именно те атомы и функциональные группы, которые и формируют водородные связи или электростатическое притяжение. Такая комплексная геометрически-химическая комплементарность является важной для реализации специфичности взаимодействий. Так, выступ на одной из поверхностей не только должен точно подходить к впадине на другой, комплементарной, поверхности, но и должен не дать сформировать связь с поверхностью, у которой нет соответствующей впадины. Добавление одной метильной группы в роли такого выступа на одной из взаимодействующих поверхностей может быть достаточно для того, чтобы исключить связывание макромолекул, как, например, в случае метилирования рестрикционных сайтов защищает ДНК бактерий от действия рестрикционных ферментов. С другой стороны, если по какой-либо причине одна из множества водородных связей не будет сформирована, это не дестабилизирует фатально процесс межмолекулярного связывания. Грамотно сконструированный белок должен иметь уникальную интерфейсную поверхность, обеспечивающую связь только с необходимым партнёром и исключаящую связь с любыми другими конкурирующими молекулами.

Два принципа Крейна: множественность слабых парных взаимодействий и комплексная комплементарность – работают в сотнях исследо-

ванных природных молекулярных комплексах. Биомолекулы взаимодействуют через развитые интерфейсные поверхности, формируя множественную систему слабых взаимодействий, расположенных вдоль идеально комплементарных поверхностей. В молекулярном узнавании в большинстве случаев используются нековалентные взаимодействия, а ковалентное связывание происходит достаточно редко.

4.3. Иерархическое самоассемблирование белков

Белки являются основой строения и метаболического функционирования живых систем. Нанобиофизические принципы самоассемблирования в результате реализации механизмов молекулярного узнавания приводят к формированию четвертичных структур белков и белковых макромолекулярных комплексов, таких, как комплексы инициации транскрипции и трансляции [35], светособирающие фотосистемы в мембранах тилакоидов [36], вирусные капсиды [37], филаменты цитоскелета [38], плоские слои S-белков в клеточных стенках бактерий [39], ячейки протеасом [40] и шаперонов [41], и т. д. [42]. Использование накопленной в ходе исследования этих систем информации позволяет конструировать для нужд бионанотехнологии и нанофармации иерархические белковые нано- и микро- ассоциаты, сборка которых осуществляется методами самоассемблирования. Условно такие ассоциаты классифицируют как квазиноль-мерные (0d) полиэдрические ячейки, одномерные (1d) нити/кольца/трубки, двухмерные (2d) листы и трёхмерные (3d) конструкции [43].

0d-структуры. В качестве примера самоассемблирующейся квазиноль-мерной структуры рассмотрим 16 нм олигомерную белковую ячейку тетраэдрической формы, самоассемблированную из 12 идентичных белковых мономеров (рисунок 4.1) [44]. Для создания мономеров использовались природные белки: тримерный белок бромопероксидаза и димерный вирусный M1-матричный белок. Одиночные субъединицы этих белков были соединены α -спиральным линкером, обеспечивающим при ассемблировании необходимый угол $109,5^\circ$ между белковыми субъединицами в мономере.

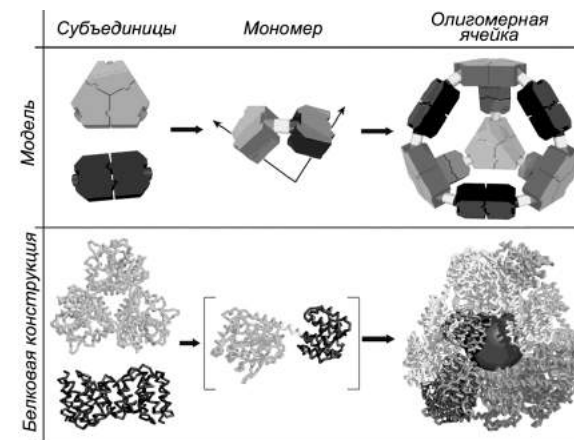


Рисунок 4.1 – Модель и схема ассемблирования (0d) белковой ячейки [44]

Комплементарность интерфейсных поверхностей субъединиц обеспечивала необходимое для самоассемблирования молекулярное узнавание. Показанная на рисунке 4.1 молекулярная структура 16-нм ячейки была экспериментально верифицирована методом рентгеновской кристаллографии с разрешением 0,3 нм.

В дальнейшем авторы усовершенствовали методику такого проектирования 0d-структур, основанных на необходимой симметрии проектируемых структур [45]. На рисунке 4.2(б) представлен результат самоассемблирования 24 субъединиц в кубическую ячейку размером 23 нм с внутренней полостью диаметром 13 нм. Каждая субъединица была образована соединением димерного N-концевого домена белка FcrA *E. coli* и тримерной 2-кето-3-дезоксигалактонат альдозазы (KDPGal) четырёх-аминокислотным линкером. Примечательно, что вследствие гибкости линкера, в системе кроме ячеек кубической формы были обнаружены ещё 12-субъединичные тетраэдрические ячейки и 18-субъединичные ячейки в форме треугольной призмы.

В работе N.P. King et al. было показано, что тщательная проработка интерфейсных поверхностей с учётом всех парных взаимодействий, позволяет с атомной точностью сконструировать белковые 0d-ячейки, имеющие форму октаэдров и додекаэдров [46].

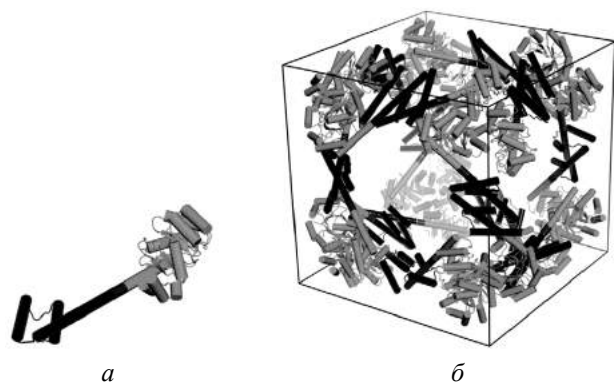


Рисунок 4.2 – Схема кубической (0d) белковой ячейки [45]: *a* – субъединица, состоящая из димерного домена белка FcrA и тримерной KDPGal альдолазы; *b* – кубическая ячейка, самоассемблировавшаяся из 24 субъединиц

1d-структуры. Расположение интерфейсных поверхностей на противоположных концах белковой глобулы позволяет реализовать самоассемблирование одномерных белковых ассоциатов, образующих фибриллярные нити. Если к линейной трансляции добавлена вращательная симметрия относительно трансляционной оси, то получается спиральная структура. Самым характерным представителем такого рода ассемблирования является формирование актиновых нитей микрофиламентов цитоскелета [34].

Размещая интерфейсные области в различных местах субъединиц можно получить самые разные структуры [6]. Например, субъединицы актинового филамента, G-актины, полимеризуясь, образуют стопкообразное волокно. Интерфейсы мономеров тубулина, однако, расположены по всей поверхности субъединицы. Они располагаются как кирпичи в круглой печной трубе, формируя микротрубочку [34]. Линейная (трансляционная или продольная) симметрия представляет собой одномерную трансляцию. Использование в сочетании с трансляционной симметрией осей вращения второго порядка, перпендикулярных трансляционной оси, формирует двойную спираль или переплетённую спираль более высокого порядка.

Ещё задолго до того, как была исследована структура большинства белков, Лайнус Полинг предположил, что белковые субъединицы с двумя комплементарными интерфейсами должны ассемблироваться в полые спиральные фибриллы [47]. С тех пор многие из таких структур были обнаружены и исследованы, включая жгутики бактерий [48] и трубчатый капсид вируса табачной мозаики [49]. Спиральная симметрия также используется для формирования более узких структур без центральной полости, ориентируя интерфейсные области так, чтобы малое число субъединиц входило в каждый шаг спирали. Пример такой структуры – актиновые филаменты [34].

Одной из основных проблем, которые возникают при разработке искусственных белковых филаментов, является проблема дизайна необходимых интерфейсных областей, необходимых для направленного ассемблирования. В некоторых случаях удаётся сконструировать молекулярные линкеры для самоассемблирования белковых субъединиц в нитевой филамент.

Характерным примером такого одномерного самоассемблирования является супрамолекулярное [50] ассемблирование апомиоглобинов apoMb и гомотетрамерных стрептавидинов SAV [51]. Поскольку apoMb селективно связываются с гемами, а SAV – с биотинами, то для ассемблирования этих белков был сконструирован гем-бис-биотиновый линкер (рисунок 4.3(a)), который на рисунке 4.3(б) обозначен «1».

Два мономера apoMb предварительно димеризовались за счёт ковалентного связывания с помощью дисульфидной связи, образуя (apoMb^{A125C})₂-димер, который, после ассемблирования с двумя линкерами «1», обозначен на рисунке 4.3(б) как (rMb^{A125C}(1))₂. Гомотетрамерный стрептавидин SAV имеет структуру B2B2-типа с четырьмя сайтами связывания биотина, расположенными попарно на противоположных концах белка. Взаимодействия apoMb–гем и SAV–биотин белковых мономеров с компонентами линкера «1» приводят к самоассемблированию белковой нити (рисунок 4.3(б)). Аналогично реализовано самоассемблирование цитохромов *cyt b*₅₆₂, с использованием гемов в качестве линкеров в линейные [52] и ветвящиеся структуры [53].

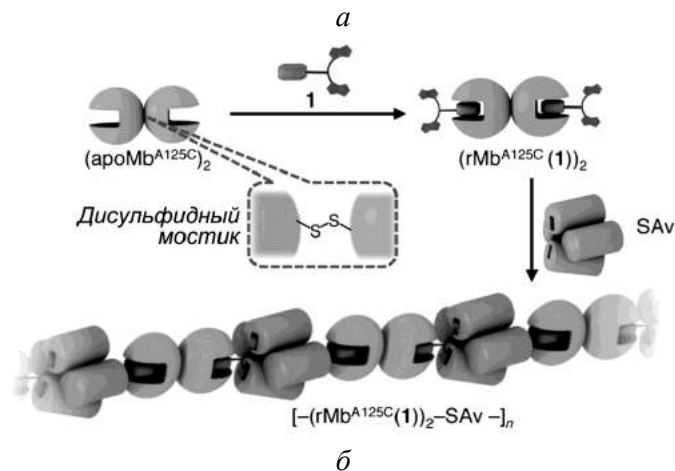
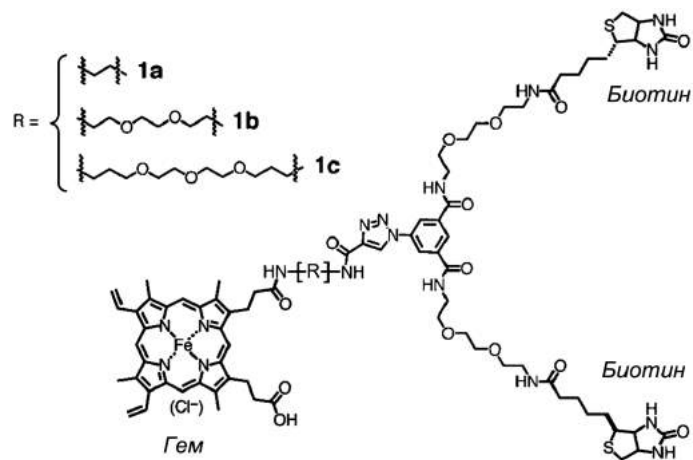


Рисунок 4.3 – Схема сборки апомиоглобинов apoMb и гомотетрамерных стрептавидинов SAh [51]: *a* – схема гем-бис-биотинового линкера «1»; *б* – последовательность самоассемблирования

Для самосборки фибриллярных структур можно использовать неспецифическое электростатическое притяжение разноименно заряженных мономеров. Например, на рисунке 4.4 представлен пример самосборки электроотрицательных белков SP1 (*Stable protein one*) из *Populus tremula* и

положительно заряженных нанодендримеров PAMAM (Poly(amino amine)) [54].

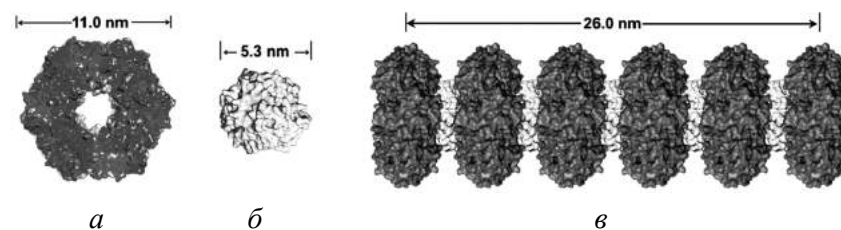


Рисунок 4.4 – Самосборка разноименно заряженных мономеров [54]: *a* – электроотрицательный белок SP1; *б* – нанодендример PAMAM; *в* – фибриллярный ассоциат

Такой линейный ассоциат может быть использован в качестве кронштейна для сборки мультиферментной кооперативной антиоксидантной системы [54].

Следующим этапом развития методов одномерного самоассемблирования белковых ассоциатов стали технологии формирования нанокольца. В этом случае геометрия белковых мономеров и линкеров должна быть разработана так, чтобы образующаяся одномерная белковая цепочка замыкалась сама на себя. Интересным примером такого рода разработок является использование молекулярного узнавания при образовании фермент-субстратных комплексов. При этом используют как высокую аффинность субстрата к активному центру фермента, так и аналогичное средство для систем фермент – конкурентный ингибитор [55].

На рисунке 4.5 представлена разработка системы фермент (дигидрофлат редуктаза) – ингибитор (метотрексат, MTX₂-C₉) [56]. Предварительно ковалентно связанные короткими линкерами димеры дигидрофлат редуктаз (DHFR₂) самособирались в нанокольца с помощью димерных ингибиторных молекул MTX₂-C₉.

Сформированные таким методом нанокольца имели диаметр 8–30 нм, причём размер кольца был тем больше, чем меньше был ковалентный линкер между двумя белками в димере DHFR₂. Более того, если заменить часть такого гибкого линкера жёстким белком Hint1, то можно было получить кольца размером 20–70 нм. Такая технология была

использована для разработки химически самоасSEMBЛИРУЮЩЕГОСЯ КОЛЬЦА антител (chemically self-assembled antibody nanoring, CSAN), содержащим scFv-фрагменты антител, которое селективно связывалось с CD3+-клетками лейкемии [57].

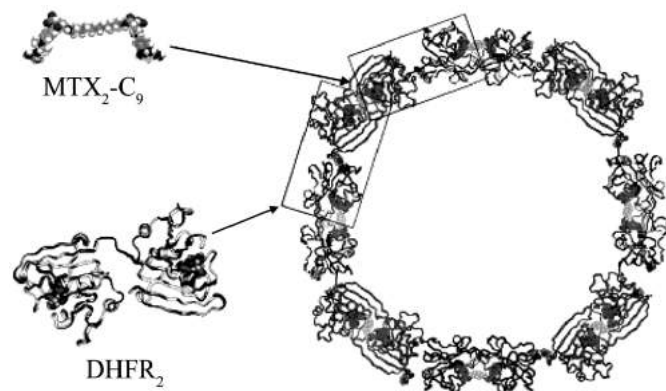


Рисунок 4.5 – Самосборка нанокольца из димеров дигидрофолат редуктазы (DHFR₂), соединённых линкерами метотрексат (MTX₂-C₉) [56]

Дальнейшее увеличение размера нанокольца требует более тщательной проработки как геометрической формы белковых модулей, так и структуры межмодульного интерфейса. Примером удачного подбора необходимых компонентов для формирования таких структур стало использование глутатион S-трансфераз из *Schistosoma japonicum* [58]. После замены методом точечного мутагенеза цистеина Cys138 на гистидин на поверхности трансферазы jsGST расположены два рядом расположенных гистидина 137 и 138. В результате стало возможным использование ионов Ni²⁺ для стимулирования димеризации jsGST-трансфераз и формирования V-образных никель-связанных блоков, самоасSEMBЛИРОВАНИЕ КОТОРЫХ И ПРОВОДИТ К ФОРМИРОВАНИЮ НАНОКОЛЬЦА ИЗ jsGST-ТРАНСФЕРАЗ (РИСУНОК 4.6).

Ион никеля координируется четырьмя гистидинами двух контактирующих димеров jsGST-трансфераз и формирует в результате V-образный никель-связанный блок. И уже эти блоки, координируемые Ni²⁺, формируют нанокольцо диаметром 367 нм.

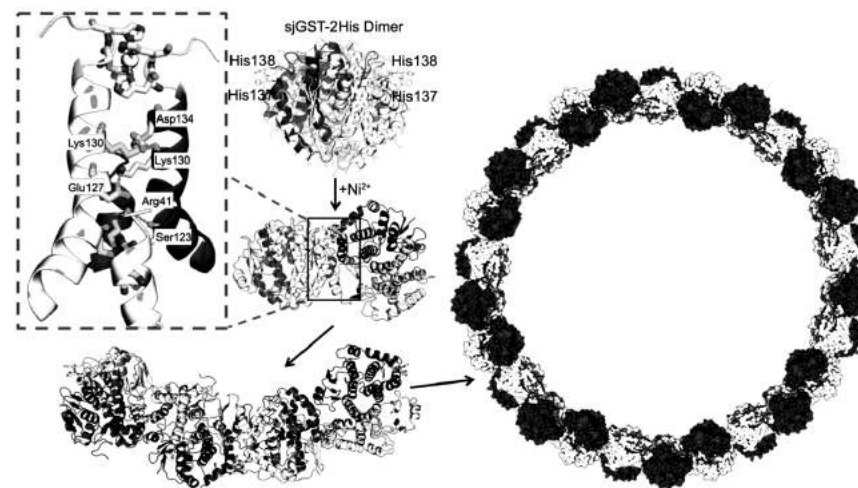


Рисунок 4.6 – Самосборка Ni-связанного нанокольца из мутантных глутатион S-трансфераз [58]

Следующим иерархическим уровнем 1d-самоасSEMBЛИРОВАНИЯ БЕЛКОВЫХ МОДУЛЕЙ ЯВЛЯЕТСЯ ФОРМИРОВАНИЕ БЕЛКОВЫХ МИКРОТРУБОЧЕК. Классическим примером такого рода комплексов в природе являются микротрубочки цитоскелета, в которых, как было сказано выше, к линейной трансляции добавлена вращательная симметрия относительно трансляционной оси. Динамическая ассоциация и диссоциация тубулинов в микротрубочку цитоскелета является функциональной основой механизмов клеточного деления. В последнее время в печати появились сообщения о разработке бионанотехнологий самоасSEMBЛИРОВАНИЯ ИСКУССТВЕННЫХ БЕЛКОВЫХ МИКРОТРУБОЧЕК [59–62]. Например, в работе [62] была разработана самоасSEMBЛИРУЮЩАЯСЯ В МИКРОТРУБОЧКУ СИСТЕМА С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ГЕТЕРОЛИГАНДА С САХАРИД-ГЛИКОПРОТЕИНЫМ МОЛЕКУЛЯРНЫМ УЗНАВАНИЕМ ДЛЯ АССОЦИИАЦИИ БЕЛКОВ (РИСУНОК 4.7).

В качестве мономеров использовались гомотетраммерные молекулы соевых лектинов, вызывающие агглютинацию (soybean agglutinin, SBA) (рисунк 4.7(a)). Тетраммерные SBA содержат четыре идентичных сайта связывания для линкеров R3GN (рисунк 4.7(б) вверху). Пара таких линкеров связывается друг с другом за счёт π-π-стэкинга (рисунк 4.7(б),

внизу). Лиганд-опосредованное формирование микротрубочек из молекул соевых лектинов было экспериментально продемонстрировано с помощью крио-электронной томографии (Стуо-ЕТ) с разрешением 7,9 нм (рисунок 4.7(в)), скэйл-бар на рисунке равен 25 нм). 3d-моделирование позволило реконструировать схему упаковки тетрамеров соевых лектинов в цилиндрический супрамолекулярный спиральный протофиламент с девятью SBA-белками на один шаг спирали, составляющий 19 нм вдоль оси микротрубочки (рисунок 4.7(г)).

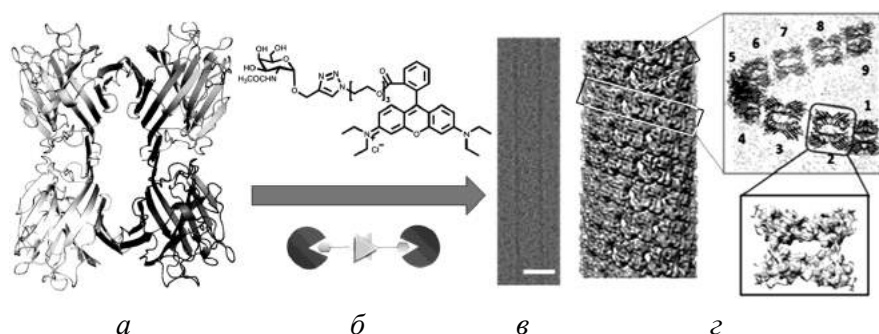


Рисунок 4.7 – Лиганд-опосредованное самоассемблирование микротрубочки из соевых лектинов [62]: *а* – гомотетрамерная молекула соевого лектина (SBA); *б* – линкеры; *в* – Стую-ЕТ-изображение микротрубочки; *г* – схема упаковки тетрамеров соевых лектинов в микротрубочку

В другом эксперименте было показано Zn^{2+} -стимулированное спиральное самоассемблирование в микротрубочку цитохромов RIDC3 [63], полученных из цитохромов *сyt cb-562* методом розетта-дизайна [64]. Цитохромы RIDC3 имеют множество гистидинов на поверхности, и с помощью ионов цинка самоассемблируются сначала в димеры $Zn_2:RIDC3_2$, на которых начинается нуклеация и рост двухмерных белковых плоскостей (рисунок 4.8). При отношении концентраций $[Zn]/[RIDC3] = 8,5$ (при концентрации Zn^{2+} равной 400 μM) происходит формирование спиральных нанотрубок длиной 15 μm и диаметром 80 нм (рисунок 4.8(а)), а при уменьшении отношения концентраций начинается стэкинг плоскостей и рост кристаллов (рисунок 4.8(б)).

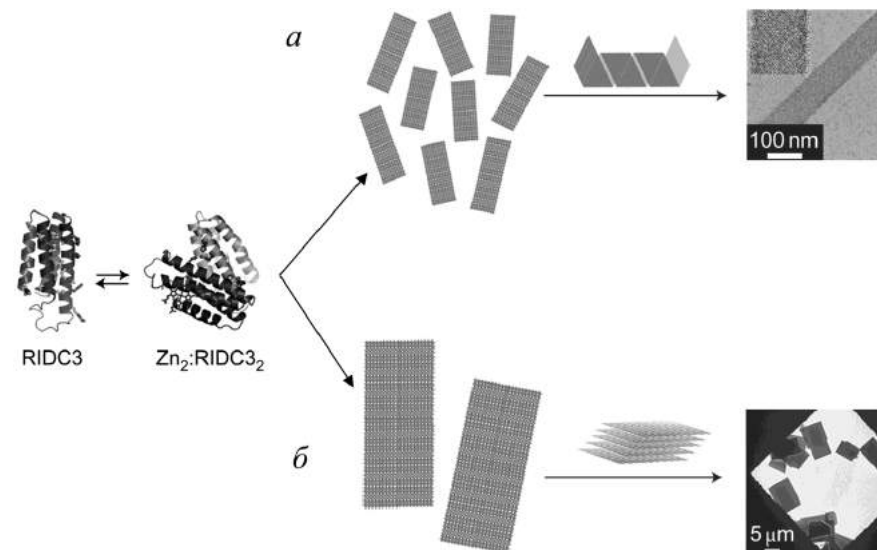


Рисунок 4.8 – Цинк-опосредованное самоассемблирование цитохромов [63]: *а* – самоассемблирование спиральных нанотрубок при отношении концентрации $[Zn]/[RIDC3] = 8,5$; *б* – стэкинг белковых плоскостей при более низком отношении концентраций

Приведённые примеры супрамолекулярных белковых микротрубочек (рисунки 4.7 и 4.8) демонстрируют свойства, которые подобны природным микротрубочкам, и могут быть использованы в бионанотехнологии.

2d-структуры. Двумерные белковые листы формируются, если трансляционная симметрия распространяется в двух измерениях. Примером такого самоассемблирования являются S-слои – плоские решётки S-покровных белков, обнаруженные у сотен видов бактерий, обладающих клеточной стенкой, и у всех археобактерий [65] (рисунок 4.9). За миллиарды лет эволюции сборка S-слоёв стала столь совершенной, что не имеет себе равных по упорядоченности и эффективности самосборки среди двумерных биологических систем.

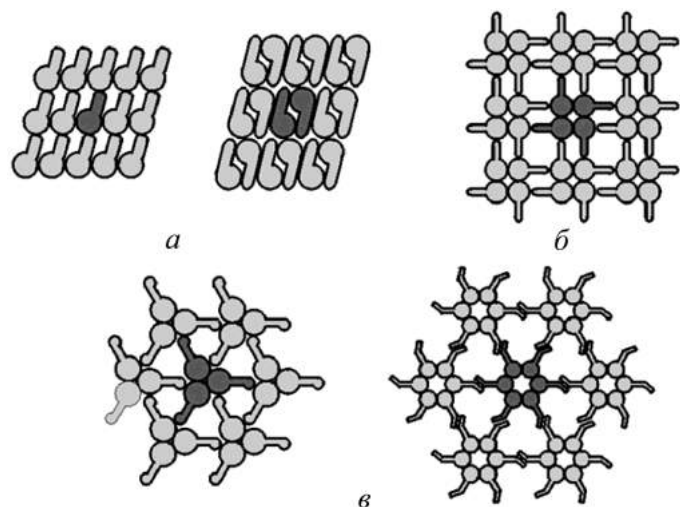


Рисунок 4.9 – Строение решёток S-слоёв [65]: *a* – наклонная; *б* – квадратная; *в* – гексагональная

Плоские S-слои образуются из одинаковых субъединиц-гликопротеинов, которые самоасSEMBЛИРУЮТ упорядоченный белковый монослой толщиной 5–20 нм (а у архей до 70 нм). Этот слой демонстрирует чёткую решёточную структуру. В зависимости от индивидуальной геометрии субъединиц формируются наклонные (*oblique*), квадратные (*square*) или гексагональные (*hexagonal*) решётки (рисунок 4.9).

В зависимости от типа решётки одна морфологическая единица-протомер состоит из одной, двух, трёх, четырёх или шести идентичных белковых субъединиц (выделены тёмно-серым цветом на рисунке 4.9), расположенных на расстоянии 5–30 нм друг от друга [66].

На рисунке 4.10(а) показана микрофотография S-слоя *Lysinibacillus sphaericus*, имеющего квадратную решётку (скэйл-бар на рисунке равен 200 нм), а на рисунке 4.10(б) – микрофотография S-слоя *Thermoplasma thermohydrosulfuricus*, демонстрирующего пример гексагонально упакованного S-слоя (скэйл-бар на рисунке равен 100 нм) [67].

Такая способность S-белков к самоасSEMBЛИРОВАНИЮ в двумерные белковые плоскости была использована в нанолитографии [68]. *In vitro*

очищенные строительные блоки S-слоёв спонтанно образуют высокоупорядоченные двумерные кристаллы, что и было использовано для перекристаллизации субъединиц S-слоёв на различных нанотехнологических субстратах, таких как чипы из кремния или оксида кремния (рисунок 4.11).

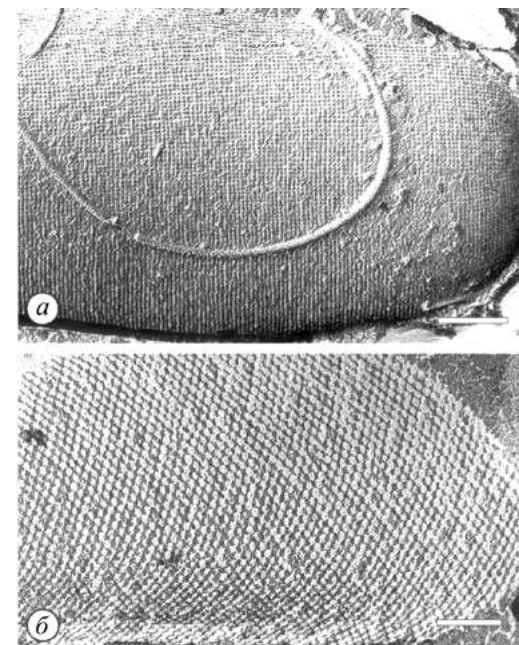


Рисунок 4.10 – Микрофотографии S-слоёв [66]: *a* – *Lysinibacillus sphaericus*; *б* – *Thermoplasma thermohydrosulfuricus*

Эти слои также могут формироваться на липидных мембранах и на поверхности раздела воздушной и водной сред. Такой тип самосборки и взаимодействия молекул позволяет применять кристаллические матрицы для нанесения рисунка в нанолитографии. Также было установлено, что с помощью ультрафиолетового (УФ) облучения можно наносить рисунок на S-слои [69].

На сформированный на поверхности кремниевого чипа S-слой накладывается фотомаска (рисунок 4.11), после чего он подвергается

облучению. На рисунке 4.12(а) представлено изображение с атомно-силового микроскопа, на котором показан наноперфорированный облучением S-слой на поверхности пластины кремния [69]. Литографию, основанную на применении таких слоёв вместе с биомолекулами и неорганическими соединениями, можно применять для производства так называемых лабораторий на чипе (*lab-on-a-chip*).

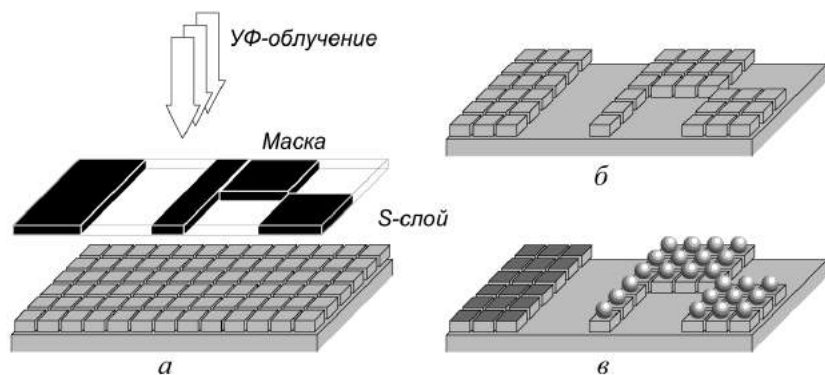


Рисунок 4.11 – Применение S-слоёв в нанолитографии [68]: *a* – облучение ультрафиолетом (УФ); *б* – плёнка после облучения; *в* – функционализация оставшихся участков

S-слои также используются для иммобилизации и пространственного упорядочения биомакромолекул в слое с чётко определённой геометрией. На рисунке 4.12(б) представлена микрофотография с электронного микроскопа, демонстрирующая регулярное расположение поликатионных молекул ферритина, упорядоченных подстилающим их S-слоем с наклонной симметрией [69]. Изолированные нативные или рекомбинантные S-белки обладают свойством реассемблирования как в растворе, так и на интерфейсных поверхностях [70]. S-белки можно получить либо дисасемблируя клеточные стенки грамположительных бактерий или архей, либо трансформировав рекомбинантным экспрессионным вектором, содержащим ген S-белка, организм-производитель, например, *E. coli*. (рисунок 4.13(а)). Разрушить клеточную стенку грамположительных организмов можно при помощи детергентов, например, Тритон-100.

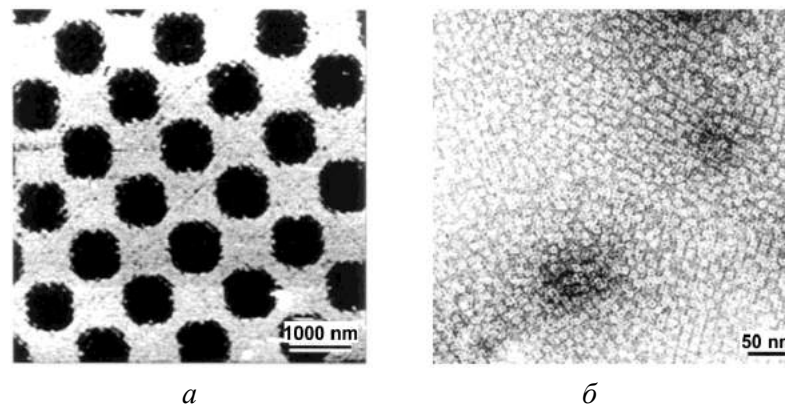


Рисунок 4.12 – Применение S-слоёв [69] для: *a* – нанолитографии; *б* – формирования двумерной решётки белков ферритинов

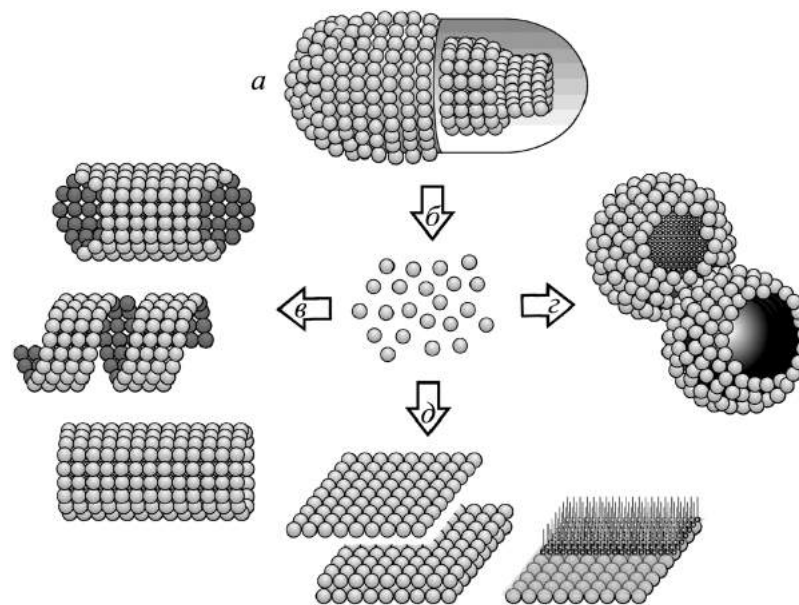


Рисунок 4.13 – Реассемблирование S-белков [71]: *a* – получение S-белков; *б* – дезинтеграция S-слоя; *в* – самоассемблирование цилиндрических структур; *г* – самоассемблирование на липосомах и нанокapsулах; *д* – самоассемблирование моно- и бислоёв в растворе и на различных интерфейсах, включая липидные слои

Относительно большие фрагменты S-слоя можно получить либо ферментативным разрезанием пептидогликанового слоя, например, лизоцимом, либо применяя слабый раствор хаотропных агентов, например, 0,5 М мочевины или 1–2 М гуанидингидрохлорида (GHCl), которые разрушают связи S-белков с подстилающим слоем, но не разрушают решётку S-слоя. Чтобы полностью дезинтегрировать фрагменты S-слоя, используют высококонцентрированные растворы мочевины или GHCl, или хелатирующие агенты, или резко изменяют pH. У грамнегативных эубактерий S-слои удаляют с плазматической мембраны используя мочевины, GHCl, такие хелаты, как EDTA и EGTA, SDS, поверхностно активные вещества и их комбинации.

Удаление из системы дезинтегрирующих агентов приводит к реасемблированию S-белков в объёме раствора в двумерные моно- и бислои, и в цилиндрические структуры (рисунок 4.13(в,д)), на подложках и интерфейсах (рисунок 4.13(д)), на липосомах и нанокapsулах (рисунок 4.13(г)) [71].

Другой пример 2d-самоасемблирования белков был исследован на примере гомотетрамеров C₄-symmetric l-rhamnulose-1-phosphate aldolase (RhuA), формирующих двумерную белковую решётку вследствие образования дисульфидных связей или благодаря координационным взаимодействиям с ионами Zn²⁺ или Cu²⁺ [72] (рисунок 4.14).

В первом случае во все четыре субъединицы гомотетрамерной молекулы RhuA с симметрией C₄ инкорпорировались цистеины в положение C98. Окисление C⁹⁸RhuA с помощью глутатиона стимулировало образование дисульфидных связей и формирование двумерной белковой решётки (рисунок 4.14(а)).

Во втором случае во все четыре субъединицы рамнулозо-фосфат альдолазы точечным мутагенезом были вставлены гистидины в положения H63 и H98. Добавление в систему катионов металлов M²⁺ (где M это или Zn²⁺, или Cu²⁺) стимулировало металл-опосредованное спаривание белков H^{63/98}RhuA за счёт координарования катиона четырьмя гистидинами двух белков, и, как следствие этого, самоасемблирование белков в двумерную решётку (рисунок 4.14(б)).

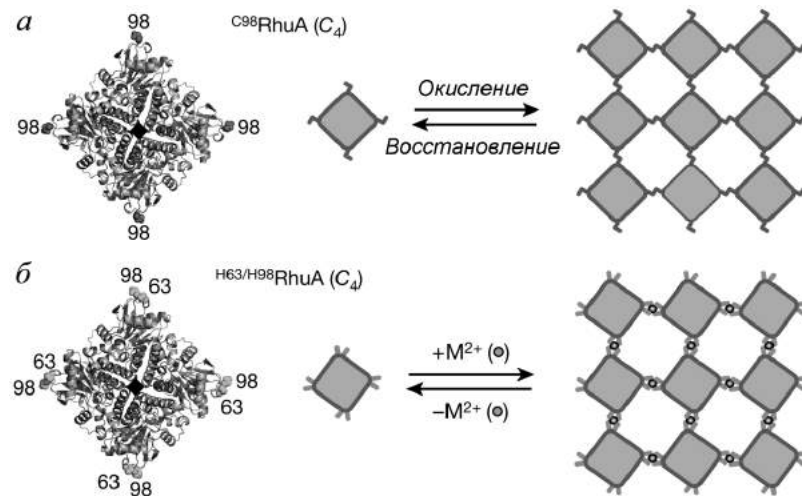


Рисунок 4.14 – Самоасемблирование гомотетрамерных белков рамнулозо-фосфат альдолаза RhuA [72]: *a* – упаковка C⁹⁸RhuA в белковую решётку вследствие формирования дисульфидных мостиков; *б* – упаковка H^{63/98}RhuA в белковую решётку вследствие координарования катиона Me²⁺ четырьмя гистидинами

3d-структуры. Самый простой метод самосборки трёхмерных белковых ассоциатов состоит в использовании электростатического притяжения разноимённо заряженных частиц [73]. Икосаэдрические капсиды вируса соевой полосы хлоротичной пятнистости вигны (cowpea chlorotic mottle virus, CCMV) несут избыточный отрицательный заряд (pI = 3,8) (рисунок 4.15(а), скэйл-бар на рисунке равен 50 нм).

Если использовать положительно заряженные частицы, то капсиды CCMV можно упаковать в NaCl-подобную кубическую решётку. На рисунке 4.15(б) сверху показана элементарная ячейка объёмноцентрированной кубической (body-centred cubic (bcc)) решётки кубического кристалла, в который упаковываются капсиды вируса CCMV с помощью белков авидинов (pI = 10,5) (постоянная решётки *a* = 35 нм). На рисунке 4.15(б) внизу показана схема упаковки такого CCMV-авидинового кристалла.

Аналогичного результата можно добиться, используя в качестве упаковочного агента дендримеры из шести полиамидаминов (РАМАМ-G6). На рисунке 4.15(в) сверху представлена элементарная ячейка грани-

центрированной кубической решётки (face-centred-cubic (fcc)) кубического кристалла, в который упаковываются капсиды вируса ССМV с помощью ПАМAM-G6 (постоянная решётки $a = 40,5$ нм). На рисунке 4.15(в) внизу показана схема упаковки такого ССМV–ПАМAM-G6 кристалла.

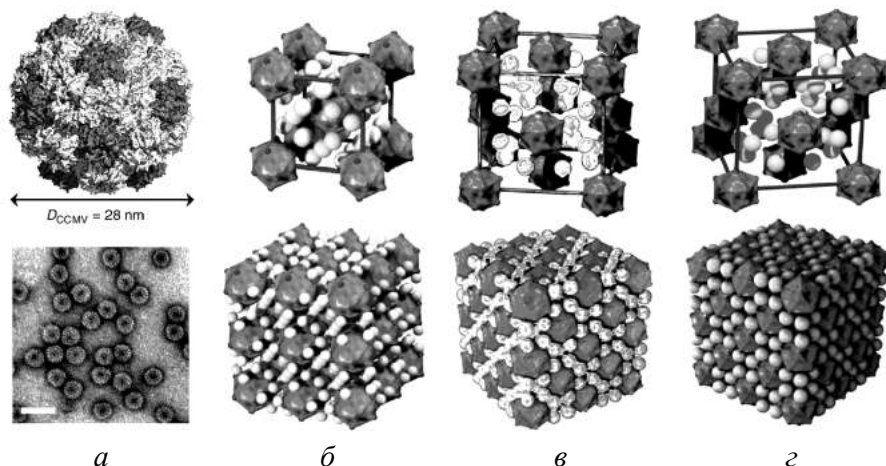


Рисунок 4.15 – Самоасемблирование белковых кристаллов кубической симметрии [73, 74]: *a* – схема икосаэдрического вируса ССМV; *б* – в верхней части – элементарная ячейка объёмноцентрированной кубической решётки ($a = 35$ нм) упаковки капсидов вируса ССМV с помощью авидинов (светлые шарики); внизу – схема упаковки кристалла; *в* – в верхней части – элементарная ячейка гранецентрированной кубической решётки ($a = 40,5$ нм) упаковки ССМV с помощью ПАМAM-G6; внизу – схема упаковки; *г* – в верхней части – элементарная ячейка гранецентрированной кубической решётки ($a = 40,4$ нм) упаковки ССМV с помощью наночастиц золота; внизу – схема упаковки

Наночастицы золота (AuNP) также являются катионами, и их удалось применить для самосборки капсидов вируса ССМV в кристалл [74]. На рисунке 4.15(г) вверху представлена элементарная ячейка гранецентрированной кубической решётки кубического кристалла, в который упаковываются капсиды вируса ССМV с помощью золотых наночастиц диаметром 2,6 нм (постоянная решётки $a = 40,4$ нм). На рисунке 4.15(г) внизу показана схема упаковки такого ССМV–AuNP кристалла.

Сам по себе единичный капсид вируса ССМV был успешно использован для исследования протекания ферментативных процессов в одно-молекулярном режиме [75]. Ферментативный катализ традиционно исследуется в объёме реактора на ансамблевом уровне, и такая характеристика силы связывания фермент-субстратного комплекса, как константа Михаэлиса, представляет собой константу равновесия в реакции диссоциации фермент-субстратного комплекса [76]. Для исследования ферментативного катализа на уровне единственной молекулы, фермент пероксидаза хрена (horseradish peroxidase, HRP) был помещён внутрь капсида вируса ССМV (рисунок 4.16). В эксперименте была использована способность капсида ССМV диссоциировать на белковые димеры при $pH = 7,5$ (рисунок 4.16(1)), а потом самопроизвольно реассемблировать при повышении кислотности до $pH = 5$ (рисунок 4.16(2)). Если при реассемблировании в систему поместить фермент *E*, он окажется внутри капсида (рисунок 4.16(2)). Таким методом в капсид ССМV был помещён фермент HRP. Субстрат дигидроадамин 6G проходил сквозь поры в капсиде и в ходе ферментативной реакции превращался в люминесцирующий продукт родамин 6G, изменение концентрации которого регистрировалось по нарастанию люминесцентного сигнала [75].

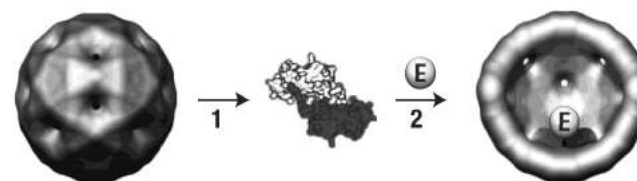


Рисунок 4.16 – Схема асемблирования фермента HRP (*E*) внутрь капсида вируса ССМV [75]: 1 – дисасемблирование капсида на белковые димеры при $pH = 7,5$; 2 – реасемблирование капсида с ферментом HRP внутри при $pH = 5$

Компартментализация ферментов в белковые нанокapsулы достаточно широко распространена в природе. Например, во многих цианобактериях и хемоавтотрофах в белковую ячейку карбоксисому с диаметром 80–140 нм помещены ферменты рибулозо-1,5-бисфосфат карбоксилаза (Рубиско) и карбоновая ангидраза, чтобы повысить эффективность про-

цесса связывания углерода в ходе фотосинтеза [77]. Ферменты люмазин синтазы в *Aquifex aeolicus* самоасSEMBЛИРУЮТСЯ в икосаэдрический белковый капсид, где катализируют предпоследний этап синтеза рибофлавина [78]. Белок ферритин представляет собой октаэдрическую белковую нанокapsулу и катализирует формирование внутри капсулы наночастиц ферригидрита ($\text{Fe}_2\text{O}_3 \cdot \text{H}_2\text{O}$) из Fe^{2+} и O_2 [79].

В работе [80] была предложена методика самоасSEMBЛИРОВАНИЯ нанокapsулы, содержащей ферменты гидрогеназы (EсHyd-1[NiFe]), катализирующие синтез молекулярного водорода (рисунок 4.17).

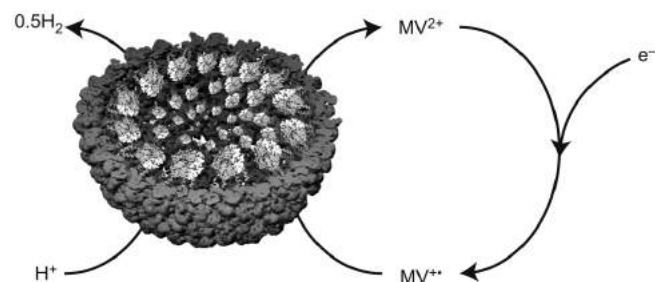


Рисунок 4.17 – Схема синтеза молекулярного водорода самоасSEMBЛИРОВАНЫМ нанокapsульным ферментативным комплексом P22-Hyd [80]

В качестве продуцента использовалась *Escherichia coli*, которую трансформировали двумя экспрессионными плазмидами. Первая плазмида содержала гены *hyaA* и *hyaB* большой и малой субъединиц гетеродимерной гидрогеназы EсHyd-1. Их синхронная экспрессия приводила к синтезу и асSEMBЛИРОВАНИЮ функциональной гидрогеназы в цитозоле клетки-продуцента. Вторая плазмида содержала ген субъединицы белкового капсида бактериофага P22. Экспрессия второй плазмиды после завершения самоасSEMBЛИРОВАНИЯ гидрогеназ EсHyd в цитозоле приводила к синтезу белков капсида P22, которые под действием специфических промоторов связывались с гидрогеназами EсHyd. Затем такие комплексы самоасSEMBЛИРОВАЛИСЬ в капсидный комплекс P22-Hyd, каталитическая активность которого в 100 раз превышала активность гидролаз EсHyd очищенных от капсидных белков P22. В качестве электронного переносчика использовался метил виологен MV^{2+} .

4.4. СамоасSEMBЛИРОВАНИЕ в нанофармации

Технологии самосборки и самоасSEMBЛИРОВАНИЯ [7, 81, 84, 85, 90, 91, 102] успешно применяются в нанофармации и наномедицине для синтеза наночастиц лекарственных препаратов [7, 21, 23, 82, 84, 85, 87, 100, 104], для задач медицинской визуализации [4–8, 14, 89, 101, 103], для медицинской диагностики [4, 6–8, 22, 81, 83, 86, 88, 89, 91] и, в частности, для биосенсорики [82].

Среди огромного числа применений наночастиц доминируют доставка лекарственных препаратов [4–8, 15, 22, 23, 81, 82, 85–88, 90, 91, 96, 100, 103, 104], инженерия тканей [4, 5, 10, 11, 22, 23, 88], в частности, модификация имплантов [4, 22], нанотерапия [12, 13, 21, 22, 81–84, 86, 89, 90, 94, 95–99, 100–104] и, в частности, иммунотерапия [4, 6, 21, 23, 88], нанотераностика [83, 89, 101, 103].

Из всех видов терапевтических применений самоасSEMBЛИРОВАНЫХ наночастиц отметим их применение в офтальмологии [21, 23, 103], в кардиологии и для лечения сердечно-сосудистых заболеваний [21, 23, 86, 88, 103], в стоматологии [4, 16, 22, 23, 82, 86] и в онкологии [82, 83, 86, 88, 90–93, 98, 100–102, 104].

Так, используя капсиды икосаэдрических вирусов бактериофагов MS2 в качестве прототипа, были разработаны способы функционализации нанокapsул MS2 [105]. Капсид бактериофага MS2 состоит из 180 субъединиц, между которыми расположены 32 поры диаметром 1,8 нм, что позволяет использовать его в качестве нанокapsулы для таргетной доставки лекарственных препаратов и других относительно больших органических молекул.

Как показано на рисунке 4.18(а) для загрузки этих капсул используют 180 тирозинов Tyr85 на внутренней поверхности капсида, к которым присоединяют диазониевые соли [105]. Если разместить на внутренней поверхности 180 субъединиц капсида в позициях 87 цистеины Cys87, то их тиольные группы можно использовать для присоединения 180 имидов малеиновой кислоты (малеимидов) (рисунок 4.18(б)), которые, в свою очередь, можно использовать для загрузки нанокapsулы контрастными

агентами для МРТ Gd-bis(НОРО)ТАМ (рисунок 4.18(в)) [107], или молекулами таксола для антираковой терапии (рисунок 4.18(г)) [108], или порфиринами для фотодинамической терапии (рисунок 4.18(д)) [105].

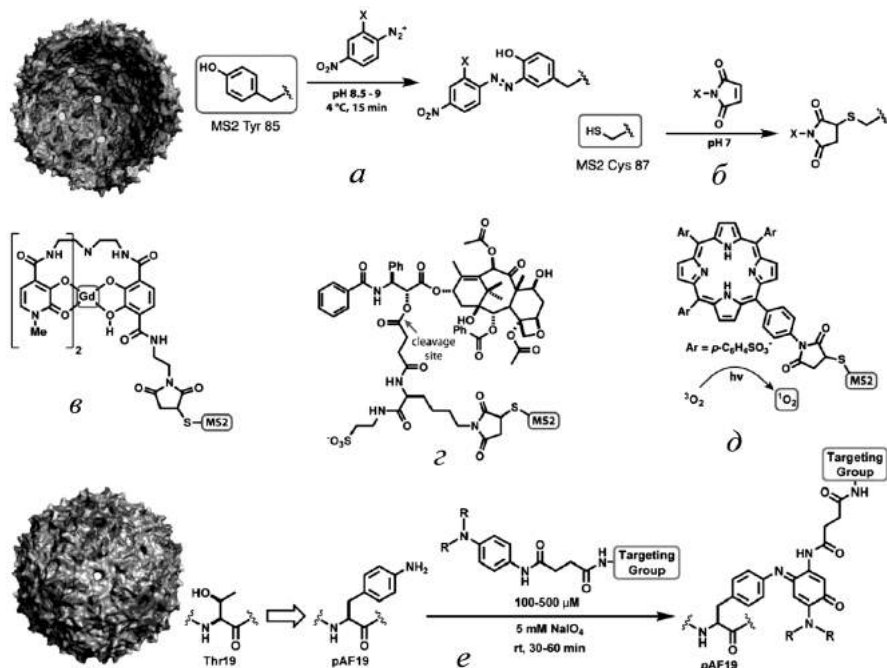


Рисунок 4.18 – Модификация капсида бактериофага MS2 для целевой доставки препаратов [105]: *a* – модификация 180 тирозинов Tyr85 диазониевыми солями на внутренней поверхности капсида; *б* – вставка 180 цистеинов в позиции 87 на внутренней поверхности субъединиц капсида для присоединения малеимидов; *в* – присоединение к Cys87 контрастных агентов для МРТ Gd-bis(НОРО)ТАМ; *г* – присоединение к Cys87 молекул таксола для противораковой терапии; *д* – присоединение к Cys87 порфиринов для фотодинамической терапии; *е* – замена треонинов Thr19 на *p*-аминофенилаланины pAF19 на наружной поверхности капсида для присоединения целевых пептидов

Для таргетной нанотерапии нацеливающие (таргетные) функциональные группы необходимо присоединить к поверхности капсида. Для

обеспечения селективности на поверхности субъединиц в позиции 19 вместо триптофанов Thr19 были помещены нестандартные аминокислоты *p*-аминофенилаланины pAF19, что обеспечило 180 сайтов связывания с таргетными пептидами [109], например, с таргетными пептидами к нейробластоме, к клеткам рака груди и к металлопротеиназам, и со специфическими для клеток печени таргетными пептидами [110] (рисунок 4.18(е)).

Разработано и используется в исследованиях большое число видов наночастиц для доставки лекарственных препаратов, большинство из которых образуются технологиями самосборки [23] (рисунок 4.19).

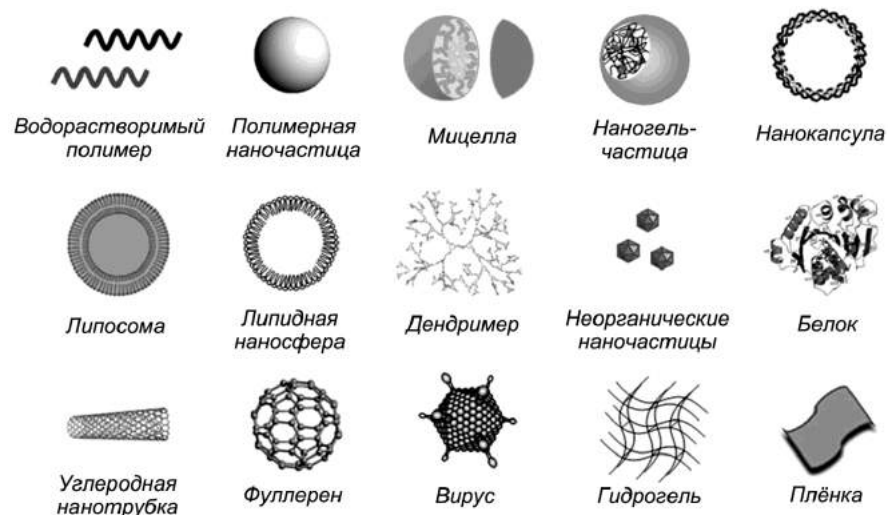


Рисунок 4.19 – Основные виды наночастиц для доставки лекарственных препаратов [23]

Особое место среди наночастиц лекарственных препаратов занимают липидные наночастицы, для которых процесс самосборки липидов в наночастицу вследствие гидрофобного эффекта [28] принципиально важен для формирования стабильной структуры [91].

Из липидных наночастиц, которые не представлены на рисунке 4.19, следует отметить липодиски, которые конструируются таким об-

разом, чтобы транспортировать неустойчивые и гемолитически активные метаболиты [111] (рисунок 4.20(а)).

На рисунке 4.20(б) представлена схема загрузки липодиска меллитином – цитолитическим линейным катионным амфифильным пептидом из яда пчёл, который, как считается, является перспективным мембранолитическим препаратом для разрушения раковых клеток [112]. Применение в онкологии чистого меллитина *in vivo* не эффективно, поскольку он не стабилен в плазме крови, обладает гемолитическим действием и не специфичен к раковым клеткам. Однако в составе липодиска, который функционализирован эпидермальным фактором роста (EGF), селективно связывающимся с EGF-рецептором на поверхности раковой клетки, меллитин защищён от протеолитической деградации и демонстрирует мембранолитическое антираковое действие [113].

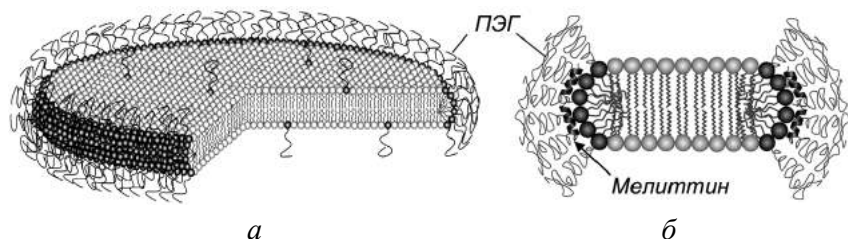


Рисунок 4.20 – Строение липодиска: а – стабилизация полиэтиленгликолем [111]; б – загрузка меллитином [112]

Моноламеллярные липосомы, состоящие из липидного бислоя, окружающего водный объём диаметром порядка 100 нм. Липосомы могут транспортировать как водорастворимые молекулы во внутреннем водном объёме, так и липофильные водонерастворимые молекулы в гидрофобной области липидного бислоя [91, 114–116] (рисунок 4.21(а)).

Если липосомы синтезированы из естественных липидов, то они не токсичны, не иммуногенны и биodeградебельны. Для защиты липосомы от неспецифической агрегации и, тем самым, увеличения нахождения липосом в кровотоке к липидам бислоя ковалентно присоединяют молекулы полиэтиленгликоля (ПЭГ) (рисунок 4.21(а)). Такие липосомы называют

стэкс-липосомами [117]. Для направленной доставки содержимого липосом к их поверхности ковалентно пришивают адресные молекулы, например, антитела к поверхностным белкам клеток-мишеней (рисунок 4.21(а)).

Липосомы связываются с поверхностью клетки либо в результате селективного связывания поверхностных лигандов липосомы с мембранными рецепторами клетки (рисунок 4.21(б), А), либо за счёт электростатического связывания (рисунок 4.21(б), В).

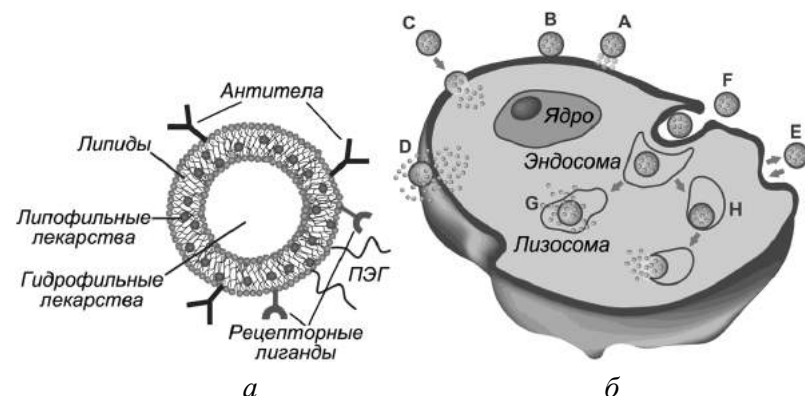


Рисунок 4.21 – Липосомы в наномедицине: а – функционализация липосом [114]; б – взаимодействие липосом с клеткой [116]

Липосомы доставляют лекарственное вещество в клетки либо путём слияния с их мембраной (рисунок 4.21(б), С), либо за счёт облегчённой диффузии из адсорбированной на плазматической мембране липосомы (рисунок 4.21(б), D). Может происходить также обмен метаболитами клетки с липосомой (рисунок 4.21(б), E). Если липосома поглощается клеткой в ходе эндоцитоза (рисунок 4.21(б), F), то она либо деградирует в лизосоме (рисунок 4.21(б), G), либо разгружается в цитозоль клетки после слияния с мембраной эндосомы (рисунок 4.21(б), H).

Пример разработки липосомы с pH-зависимой стабильностью липидного бислоя приведён на рисунке 4.22 [118]. Липосома для антираковой терапии с присоединёнными к поверхности антителами к Her-2-рецепторам на поверхности клеток рака груди была загружена

доксорубицином (DOX) и препаратом против мультилекарственной резистентности верапамилом.

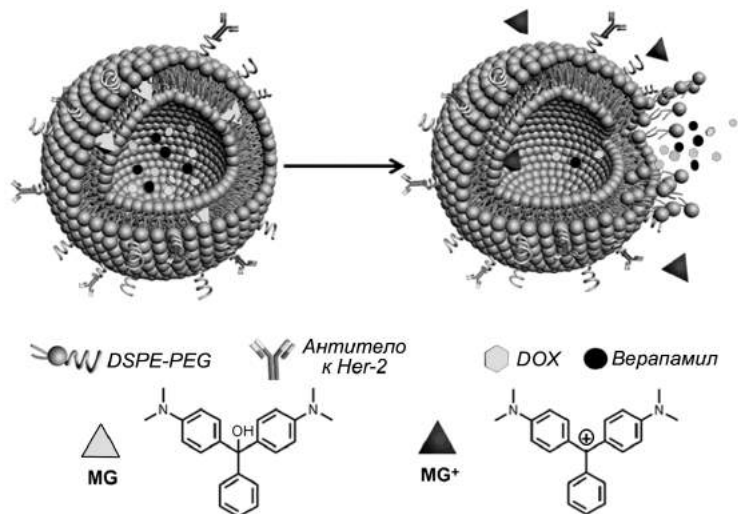


Рисунок 4.22 – pH-зависимая деградация липидной оболочки липосомы [118]

Защиту липосомы обеспечивали молекулы полиэтиленгликоля, присоединённые к липидам дистеарилглицерофосфоэтаноламинам (DSPE-PEG). В качестве pH-чувствительного агента был использован встроенный в липидный бислой краситель малахитовый зелёный (MG), который при снижении pH протонируется в карбокатион MG^+ и дезорганизует бислой, что приводит к высвобождению содержимого липосомы (рисунок 4.22) [118]. Если в состав оболочки липосомы включить эластиноподобные полипептиды, для которых характерен термостимулированный структурный фазовый переход, то при повышении температуры такая термочувствительная липосома в клетке будет разрушаться и высвобождать содержимое [119].

Кроме стандартных липосом в качестве нанотранспортёров используются также такие липосомоподобные наночастицы, как билосомы (от англ. *bile salts*), содержащие соли желчных кислот [120]; эмульсомы, имеющие плотное ядро из жирных кислот, покрытое липидной оболоч-

кой, а, иногда ещё и, слоем S-белков [121]; э-липосомы (eLiposomes), содержащие как эмульсионные наночастицы, так и молекулы лекарственных препаратов, такие, как, например, доксорубин [122]; ниосомы, образующиеся в процессе самоорганизации неионных поверхностно активных молекул в везикулы [123]; этосомы, состоящие из фосфолипидов, этанола и воды [124], и, наконец, экзосомы, содержащиеся в экзоцитозных везикулах некоторых клеток и используемые для направленной доставки лекарственных препаратов к целевым объектам (targeted drug delivery, TDD) [125].

Образующиеся в процессе самосборки амфифильных молекул мицеллярные наночастицы также широко используются в качестве нанофармацевтических препаратов в наномедицине для TDD (рисунок 4.23).

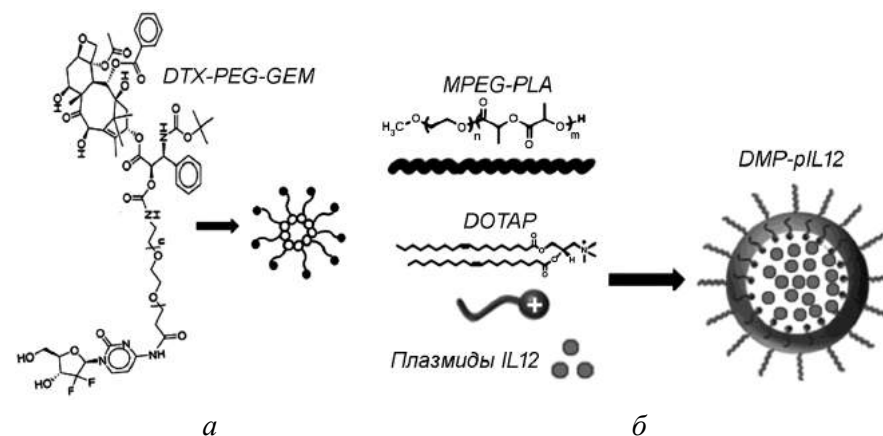


Рисунок 4.23 – Самосборка мицеллярных наночастиц: а – из амфифильных конъюгатов (DTX-PEG-GEM) доцетакселя (DTX) и гемцитабина (GEM), соединённых полиэтиленгликолевым линкером (PEG) [127]; б – самоассемблирование наночастиц DMP-pIL12 из молекул поли(этиленгликоля)-поли(лактида) (MPEG-PLA) и 1,2-диолеил-3-триметиламмоний-пропана (DOTAP), транспортирующих плазмиды pIL12, которые экспрессируют белок интерлейкин-12 [129]

В качестве примеров можно привести формирование мицеллярных наночастиц амфифильными молекулами алкилированного поли(α)глутамат амина (APA), транспортирующих короткие интерферирующие РНК

(siRNA) в антиопухолевой терапии [126]; самосборку мицелл амфифильными конъюгатами (DTX-PEG-GEM) доцетакселя (DTX) и гемцитабина (GEM), соединённых полиэтиленгликолем линкером (PEG), для терапии рака груди [127] (рисунок 4.23(а)); самосборку мицелл метоксилполи(этиленгликоль)-поли(D,L-лактат) (mPEG-PDLLA), содержащих пирензепин (pirenzepine, PRZ) и применяющихся в офтальмологии для лечения близорукости [128]; и, наконец, самоассемблирование наночастиц DMP-rIL12 из молекул поли(этиленгликоля)-поли(лактида) (MPEG-PLA) и 1,2-диолеил-3-триметиламмоний-пропана (DOTAP), транспортирующих плазмиды rIL12, которые экспрессируют белок интерлейкин-12 для терапии колоректального рака [129] (рисунок 4.23(б)).

Аналогично происходит самосборка композитных мицелл из молекул конъюгата P-DOX доксорубицина с триблок-сополимером P123 и молекул диблок-сополимеров (P-surate) [130, 131], состоящих из полиэтиленгликоль-блок-полидиизопропанол-аминоэтил-метакрилата, конъюгированного с ципатом [132], и самосборка мицелл (HA-ss-TOS-PTX) из молекул гиалуроновой кислоты (HA), к которым посредством дисульфидных мостиков были присоединены токоферол-сукцинаты (TOS), в состав которых включили молекулы таксола (paclitaxel, PTX) [133].

В некоторых системах процессы самоассемблирования приводят к образованию цилиндрических наночастиц. Например, конъюгация молекул антиракового препарата камптотецина с дилизинами приводит к самосборке цилиндрических наночастиц в виде спиральных нанолент или нанотрубок (рисунок 4.24), которые значительно увеличивают эффективность антираковой терапии, сравнимую с ингибитором топоизомеразы I иринотеканом [134].

Ещё одним примером самоассемблирующихся наночастиц являются системы, использующие молекулы дендримеров. Например, молекулярные конъюгаты полиамидаминного дендримера РАММ с урсоловой кислотой (пентациклическое тритерпеновое соединение, ингибирующее рост опухолей и метастаз) и с лактобионовой кислотой, в качестве нацеливающей молекулы к азиалогликопротеиновым рецепторам (asialoglycoprotein receptor, ASGPR) клеток гепато-

целлюлярной карциномы (hepatocellular carcinoma, HCC), спонтанно формируют наночастицы размером ~ 100 нм, которые являются перспективным нанофармацевтическим препаратом в HCC-терапии [135].

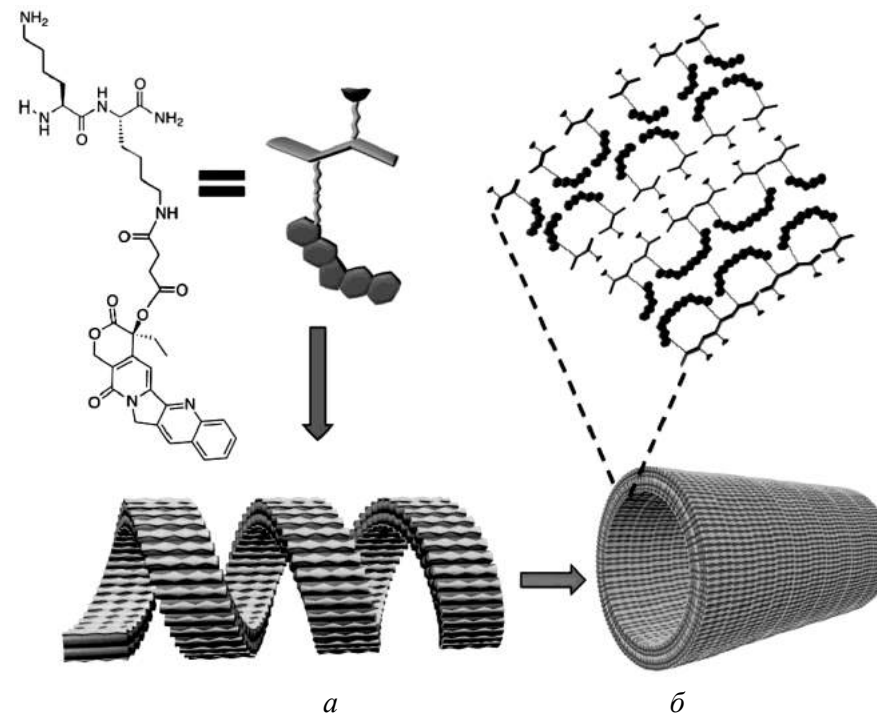


Рисунок 4.24 – Самосборка камптотециновых цилиндрических наночастиц [134]: *а* – формирование спиральной наноленты; *б* – образование нанотрубки

Электростатическое взаимодействие между молекулами также используют для самосборки транспортных наночастиц в наномедицине. Так, отрицательно заряженные плазмидные векторы (NF-κB shRNA) с короткими РНК, образующими шпильки (short hairpin RNA, shRNA), которые ингибируют экспрессию ядерного фактора NF-κB, стимулирующего развитие стволовых раковых клеток (cancer stem cells, CSCs), взаимодействуя с катионными карбамат-маннозо модифицированными молекулами полиэтиленimina (CMP), формируют наночастицы CMP/NF-κB shRNA

(CMPN), которые используют для доставки векторов NF-κB shRNA в CSC [136].

Явление гибридизации комплементарных фрагментов молекул ДНК используется для самоасSEMBлирования как компонентов нанофармацевтических носителей, так и целых нанокapsул, целиком асSEMBлированных из ДНК [137]. Гибридизация комплементарной нити ДНК (complementary sequence, CS, csDNA), конъюгированной с проапоптотическим пептидом KLA (катионный спиральный пептид, разрушающий внешнюю мембрану митохондрии и выпускающий цитохром c в цитозоль клетки), с одонитивым ДНК-аптамером (Chl-MUC1-apt) к MUC1-рецепторам раковой клетки, конъюгированным с холестерином (Chl), формирует амфифильный комплекс KLA-DNA-Chl-MUC1. Самосборка таких комплексов в мицеллы при наличии в системе молекул доксорубина (DOX) образует нацеленные мицеллярные наночастицы, транспортирующие DOX и KLA, и специфично связывающиеся с MUC1-рецепторами [138] (рисунок 4.25).

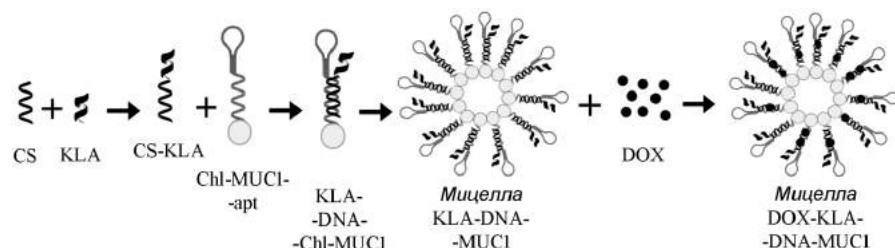


Рисунок 4.25 – Самосборка MUC1-аптамер таргетной ДНК-мицеллы для дуальной противоопухолевой Доксорубином и KLA-пептидом [138]: CS – комплементарная нить ДНК; KLA – проапоптотический пептид; Chl – холестерин; MUC1-apt – ДНК-аптамер к MUC1-рецепторам; DOX – доксорубин

Молекулы ДНК используются природой только для хранения генетической информации. Однако, используя выдающиеся свойства нуклеиновых кислот к самопроизвольной гибридизации комплементарных участков, можно использовать специальным образом сконструированные ДНК-наноблоки для самосборки различных пространственных конструк-

ций, что превращает ДНК в конструкционный биоматериал для бионанотехнологии [139] и нанофармации [140].

Простейшим элементарным блоком является трёхлучевая Y-ДНК, асSEMBлированная из химически синтезированных олигонуклеотидов так, чтобы у неё были липкие концы [141]. Такие Y-ДНК самопроизвольно формируют дендримерные структуры, а использование фермента ДНК-лигазы ковалентно соединяет сахарофосфатные остовы ДНК в единую прочную структуру. Следующим шагом была разработка крестообразного 4×4 ДНК-блока (мотива), из которого в водных растворах происходила самосборка плоских ДНК-сеток [142]. 4×4-блок состоял из девяти олигонуклеотидов и содержал четыре четырёхнитевых стыковочных ДНК-узла на четырёх концах креста. Далее были разработаны ДНК-наноблоки, управляемое асSEMBлирование которых позволяет осуществлять дизайн разнообразных периодических наноструктур [143].

В последние годы многие исследователи разрабатывают методы самосборки объёмных ДНК-наноструктур [144–147], первым из которых был ДНК-нанокуб [143]. Наиболее эффективными примерами самоасSEMBлирования ДНК-нанокapsул, которые могут быть использованы для транспортировки молекул лекарственных препаратов, являются гексагональный нанобочонок (hexagonal barrel) [148] (рисунок 4.26) и нанокороб [149] (рисунок 4.27). В обоих случаях использовалась технология наноригами [150]. Нанобочонок с размерами 35 нм × 35 нм × 45 нм состоит из двух ДНК-доменов, соединённых сзади двумя одонитивными ДНК-петлями. При закрывании капсулы-бочонка два ДНК-домена удерживаются четырьмя попарно комплементарными аптамерами. СамоасSEMBлирование нанобочонка происходит в ходе специфического связывания 196 олигонуклеотидов с 7308-нуклеотидной фаговой ДНК в процессе резкого нагрева с последующим медленным охлаждением системы [148]. На внутренней поверхности капсулы расположены 12 линкеров, к которым были присоединены два типа груза: 5 нм золотые наночастицы присоединялись к 5'-тиол-модифицированным линкерам; Fab-фрагменты молекул антител ковалентно связывались с 5'-амино-модифицированным линкерами, используя HyNic/4FB-коннекторы (рисунок 4.26).

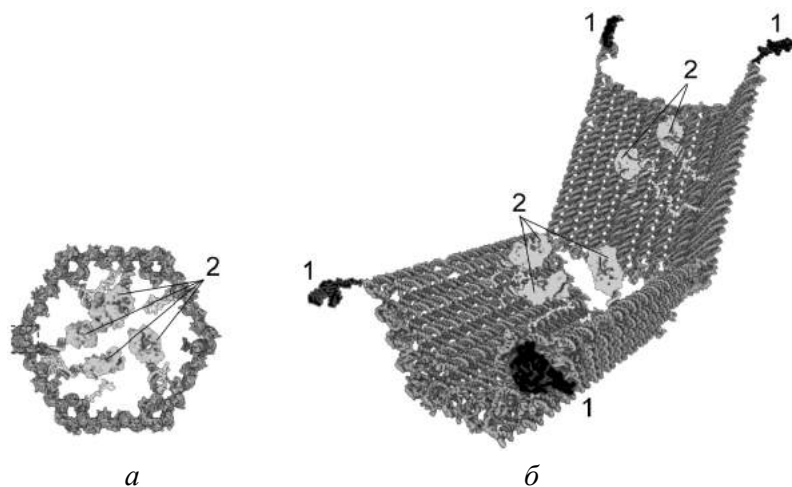


Рисунок 4.26 – Самоассемблированная ДНК-нанокапсула [148]: *a* – закрытая капсула, вид с торца; *б* – открытая капсула; 1 – запирающие аптамеры; 2 – транспортируемые молекулы

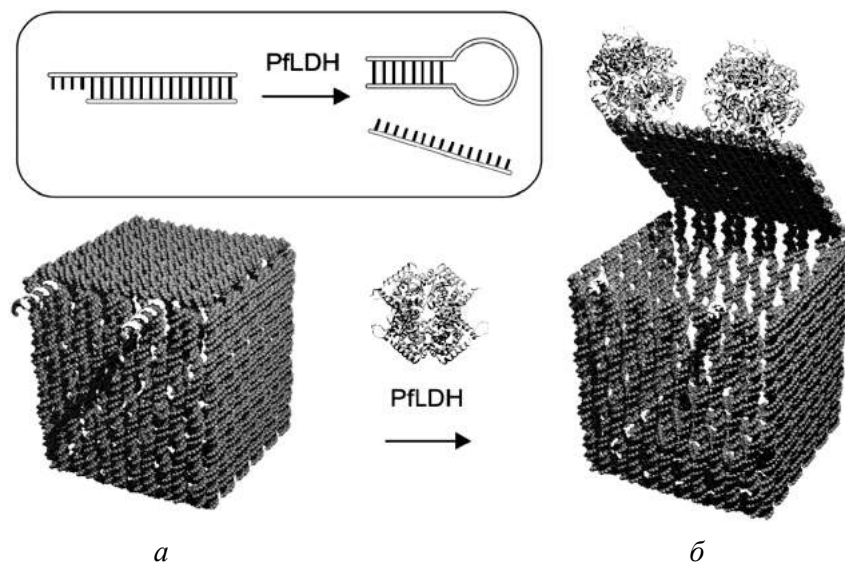


Рисунок 4.27 – Самоассемблированный ДНК-нанокороб [149]: *a* – закрытый короб; *б* – открытый с помощью PflDH-аптамера короб

ДНК-нанокороб (рисунок 4.27) с размерами 42 нм × 36 нм × 36 нм был самоассемблирован из однонитевой ДНК бактериофага M13, состоящей из 7249 нуклеотидов, с помощью олигонуклеотидных интерконнекторов [151]. Для открывания ДНК-замков был использован аптамер PflDH к малярийному биомаркерному белку *Plasmodium falciparum*-лактатдегидрогеназа [152]. Объем нанокороба позволяет транспортировать биомолекулярные объекты размером с рибосому или полиовирус [151].

Таким образом, в последнее время начато широкое использование нанобиофизических процессов самосборки и самоассемблирования для решения задач бионанотехнологии и нанофармации.

Список литературы

1. Nanobiophysics: Fundamentals and Applications / Ed. by V.A. Karachevtsev. – Boca Raton: CRC Press, 2016. – 428 p.
2. Bioactivity of Engineered Nanoparticles / Ed. by B. Yan, H. Zhou, J.L. Gardea-Torresdey. – Singapore : Springer, 2017. – 383 p.
3. Goodsell D.S. Bionanotechnology: Lessons from Nature / D.S. Goodsell. – New Jersey : Wiley, 2004. – 337 p.
4. Nanobiomaterials: Nanostructured Materials for Biomedical Applications / Ed. by R. Narayan. – Duxford : Woodhead Publishing, 2018. – 578 p.
5. Nanobiomaterials: Classification, Fabrication and Biomedical Applications / Ed. by X. Wang, M. Ramalingam, X. Kong, L. Zhao. – Weinheim : Wiley-VCH Verlag GmbH, 2018. – 494 p.
6. Огурцов А.Н. Бионанотехнология. Принципы и применение / А.Н. Огурцов. – Харьков : НТУ «ХПИ», 2012. – 480 с.
7. Fabrication and Self-Assembly of Nanobiomaterials. Applications of Nanobiomaterials / Ed. by A. Grumezescu. – Oxford : William Andrew, 2016. – 504 p.
8. In Vivo Self-Assembly Nanotechnology for Biomedical Applications / Ed. by H. Wang, L.-L. Li. – Singapore : Springer, 2018. – 208 p.
9. Crane H.R. Principles and Problems of Biological Growth / H.R. Crane // The Scientific Monthly. – 1950. – V. 70, № 6. – P. 376–389.
10. Nanobiomaterials in Hard Tissue Engineering / Ed. by A.M. Grumezescu. – Cambridge : William Andrew, 2016. – 490 p.

11. Nanobiomaterials in Soft Tissue Engineering / Ed. by A.M. Grumezescu. – Cambridge : William Andrew, 2016. – 511 p.
12. Nanobiomaterials in Antimicrobial Therapy / Ed. by A.M. Grumezescu. – Cambridge : William Andrew, 2016. – 558 p.
13. Nanobiomaterials in Cancer Therapy / Ed. by A.M. Grumezescu. – Oxford : William Andrew, 2016. – 569 p.
14. Nanobiomaterials in Medical Imaging / Ed. by A.M. Grumezescu. – Oxford : William Andrew, 2016. – 498 p.
15. Nanobiomaterials in Drug Delivery / Ed. by A.M. Grumezescu. – Cambridge : William Andrew, 2016. – 602 p.
16. Nanobiomaterials in Dentistry / Ed. by A.M. Grumezescu. – Cambridge : William Andrew, 2016. – 475 p.
17. Nanobiomaterials in Galenic Formulations and Cosmetics: Applications of Nanobiomaterials / Ed. by A.M. Grumezescu. – Cambridge : William Andrew, 2016. – 439 p.
18. Anal A.K. Bionanotechnology: Principles and Applications / A.K. Anal. – Boca Raton : CRC Press, 2018. – 205 p.
19. NanoBioMaterials / Ed. by B. Singh, R.J.Y. Ho, J.R. Kanwar. – London : CRC Press, 2018. – 308 p.
20. Nanobiomaterials: Applications in Drug Delivery / Ed. by A.K. Sharma, R.K. Keservani. – Waretown : Apple Academic Press, 2018. – 550 p.
21. Краснополяский Ю.М. Фармацевтическая биотехнология: Бионанотехнология в фармации и медицине / Ю.М. Краснополяский, А.С. Дудниченко, В.И. Швец. – Харьков : НТУ «ХПИ», 2011. – 228 с.
22. Therapeutic Nanomaterials / Ed. by M.O. Guler, A.B. Tekinay. – Hoboken : Wiley, 2016. – 313 p.
23. Nanomaterials in Pharmacology / Ed. by Z.-R. Lu, S. Sakuma. – New York: Humana Press, 2016. – 487 p.
24. Farzaneh H.H. A Practical Guide to Bio-inspired Design / H.H. Farzaneh, U. Lindemann. – Berlin : Springer-Verlag GmbH Germany, 2019. – 269 p.
25. Whitesides G.M. Molecular Self-Assembly and Nanochemistry: A Chemical Strategy for the Synthesis of Nanostructures / G.M. Whitesides, J.M. Mathias, C.T. Seto // Science, 1991. – V. 254. – P. 5036–1312.
26. Fulekar M.H. Nanotechnology: Importance and Applications / M.H. Fulekar. – New Dehli : I.K. International Publishing House, 2010. – 296 p.
27. Quantitative Models for Microscopic to Macroscopic Biological Macromolecules and Tissues / Ed. by L. Olivares-Quiroz, O. Resendis-Antonio. – Cham : Springer International Publishing AG, 2018. – 234 p.
28. Огурцов А.Н. Основы химической и молекулярной биофизики / А.Н. Огурцов, О.Н. Близнюк. – Харьков : НТУ «ХПИ», 2017. – 400 с.
29. Огурцов А.Н. Биологические мембраны / А.Н. Огурцов. – Харьков : НТУ «ХПИ», 2012. – 368 с.
30. Огурцов А.Н. Введение в биофизику макромолекул / А.Н. Огурцов. – Харьков : НТУ «ХПИ», 2014. – 384 с.
31. Mikhailov A.S. Chemical Complexity: Self-Organization Processes in Molecular Systems / A.S. Mikhailov, G. Ertl. – Cham : Springer International Publishing AG, 2017. – 209 p.
32. Огурцов А.Н. Основы биосинергетики / А.Н. Огурцов, О.Н. Близнюк. – Харьков : НТУ «ХПИ», 2018. – 368 с.
33. Bohidar H.B. Design of Nanostructures: Self-Assembly of Nanomaterials / H.B. Bohidar, K. Rawat. – Weinheim : Wiley-VCH, 2017. – 338 p.
34. Огурцов А.Н. Основы молекулярной биологии : в 2-х ч. / А.Н. Огурцов. – X. : НТУ «ХПИ», 2011. – Ч. 1. – 304 с. – Ч. 2. – 240 с.
35. Roeder R.G. The Complexities of Eukaryotic Transcription Initiation: Regulation of Preinitiation Complex Assembly / R.G. Roeder // Trends in Biochemical Sciences. – 1991. – V. 16. – P. 402–408.
36. Caffarri S. Functional Architecture of Higher Plant Photosystem II Supercomplexes / S. Caffarri, R. Kouřil, S. Kerešiče, E.J. Boekema, R. Croce // The EMBO Journal. – 2009. – V. 28, № 19. – P. 3052–3063.
37. Krupovic M. Multiple Origins of Viral Capsid Proteins from Cellular Ancestors / M. Krupovic, E.V. Koonin // Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. – 2017. – V. 114, № 12. – P. E2401–E2410.
38. Wickstead B. The Evolution of the Cytoskeleton / B. Wickstead, K. Gull // Journal of Cell Biology. – 2011. – V. 194, № 6. – P. 513–525.
39. Pum D. Reassembly of S-Layer Proteins / D. Pum, U.B. Sleytr. // Nanotechnology. – 2014. – V. 25. – P/ 312001–312015.
40. Murata S. Molecular Mechanisms of Proteasome Assembly // S. Murata, H. Yashiroda, K. Tanaka // Nature Reviews Molecular Cell Biology. – 2009. – V. 10. – P. 104–115.

41. Ellis R.J. Molecular Chaperones: Assisting Assembly in Addition to Folding / R.J. Ellis // *Trends in Biochemical Sciences*. – 2006. – V. 31, № 7. – P. 395–401.
42. Pieters B.J.G.E. Natural Supramolecular Protein Assemblies / B.J.G.E. Pieters, M.B. van Eldijk, R.J.M. Nolte, J. Mecnović // *Chemical Society Reviews*. – 2016. – V. 45. – P. 24–39.
43. Sun H. Nanostructures Based on Protein Self-Assembly: From Hierarchical Construction to Bioinspired Materials / H. Sun, Q. Luo, C. Hou, J. Liu // *Nano Today*. – 2017. – V. 14. – P. 16–41.
44. Lai Y.-T. Structure of a 16-nm Cage Designed by Using Protein Oligomers / Y.-T. Lai, D. Cascio, T.O. Yeates // *Science*. – 2012. – V. 336, № 6085. – P. 1129.
45. Structure of a Designed Protein Cage that Self-Assembles Into a Highly Porous Cube / Y.-T. Lai, E. Reading, G.L. Hura [et al.] // *Nature Chemistry*. – 2014. – V. 6, № 12. – P. 1065–1071.
46. Computational Design of Self-Assembling Protein Nanomaterials with Atomic Level Accuracy / N.P. King, W. Sheffler, M.R. Sawaya [et al.] // *Science*. – 2012. – V.336, № 6085. – P.1171–1174.
47. Pauling L. The Structure of Feather Rachis Keratin / L. Pauling, R.B. Corey // *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. – 1951. – V. 37, № 5. – P. 256–261.
48. Matsunami H. Complete Structure of the Bacterial Flagellar Hook Reveals Extensive Set of Stabilizing Interactions / H. Matsunami, C.S. Barker, Y.-H. Yoon, M. Wolf, F.A. Samatey // *Nature Communications*. – 2016. – V. 7. – P. 13425.
49. A. Klug The Tobacco Mosaic Virus Particle: Structure and Assembly / A. Klug // *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*. – 1999. – V. 354, № 1383. – P. 531–535.
50. Luo Q. Protein-Based Supramolecular Polymers: Progress and Prospect / Q. Luo, Z. Dong, C. Hou, J. Liu // *Chemical Communications*. – 2014. – V. 50. – P. 9997–10007.
51. Oohora K. Chemically Programmed Supramolecular Assembly of Hemoprotein and Streptavidin with Alternating Alignment / K. Oohora, S. Buzarovic, A. Onoda, Y.M. Wilson, T.R. Ward, T. Hayashi // *Angewandte Chemie International Edition*. – 2012. – V. 51. – P. 3818–3821.
52. Onoda A. Fibrous Supramolecular Hemoprotein Assemblies Connected with Synthetic Heme Dimer and Apohemoprotein Dimer / A. Onoda, A. Takahashi, K. Oohora, Y. Onuma, T. Hayashi // *Chemistry & Biodiversity* – 2012. – V. 9. – P. 1684–1692.
53. Kitagishi H. Self-Assembly of One- and Two-Dimensional Hemoprotein Systems by Polymerization through Heme–Heme Pocket Interactions / H. Kitagishi, Y. Kakikura, H. Yamaguchi, K. Oohora, A. Harada, T. Hayashi // *Angewandte Chemie International Edition*. – 2009. – V. 48, № 7. – P. 1271–1274.
54. Self-Assembly of Cricoid Proteins Induced by «Soft Nanoparticles»: An Approach to Design Multienzyme-Cooperative Antioxidative Systems / H. Sun, L. Miao, J. Li, S. Fu [et al.] // *ACS Nano*. – 2015. – V. 9, № 5. – P. 5461–5469.
55. Огурцов А.Н. Молекулярная биофизика и ферментативный катализ / А.Н. Огурцов. – Харьков : НТУ «ХПИ», 2011. – 400 с.
56. Chemically Controlled Self-Assembly of Protein Nanorings / J.C.T. Carlson, S.S. Jena, M. Flenniken [et al.] // *Journal of American Chemical Society*. – 2006. – V. 128, № 23. – P. 7630–7638.
57. Chemically Self-Assembled Antibody Nanorings (CSANs): Design and Characterization of an Anti-CD3 IgM Biomimetic / Q. Li, C.R. So, A. Fegan [et al.] // *Journal of American Chemical Society*. – 2010. – V. 132, № 48. – P. 17247–17257.
58. Highly Ordered Protein Nanorings Designed by Accurate Control of Glutathione S-Transferase Self-Assembly / Y. Bai, Q. Luo, W. Zhang [et al.] // *Journal of American Chemical Society*. – 2013. – V. 135, № 30. – P. 10966–10969.
59. In vitro Self-Assembly of Tailorable Nanotubes from a Simple Protein Building Block / E.R. Ballister, A.H. Lai, R.N. Zuckermann, Y. Cheng [et al.] // *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. – 2008. – V. 105, № 10. – P. 3733–3738.
60. Miranda F.F. A Self-Assembled Protein Nanotube with High Aspect Ratio / F.F. Miranda, K. Iwasaki, S. Akashi, et al. // *Small*. – 2009. – V. 5, № 18. – P. 2077–2084.
61. Sendai T. Photoreconfigurable Supramolecular Nanotube / T. Sendai, S. Biswas, T. Aida // *Journal of American Chemical Society*. – 2013. –

- V. 135, № 31. – P. 11509–11512.
62. Precise and Reversible Protein-Microtubule-Like Structure with Helicity Driven by Dual Supramolecular Interactions / G. Yang, X. Zhang, Z. Kochovski [et al.] // *Journal of American Chemical Society*. – 2016. – V. 138, № 6. – P. 1932–1937.
 63. Metal-Directed, Chemically Tunable Assembly of One-, Two- and Three-Dimensional Crystalline Protein Arrays / J.D. Brodin, X.I. Ambroggio, C. Tang [et al.] // *Nature Chemistry*. – 2012. – V. 4. – P. 375–382.
 64. Liu Y. Rosetta Design Server for Protein Design / Y. Liu, B. Kuhlman // *Nucleic Acids Research*. – 2006. – V. 34, Suppl. № 2. – P. W235–W238.
 65. Schuster B. Nanotechnology with S-Layer Proteins / B. Schuster, E. Györvary, D. Pum, U.B. Sleytr // In: *Methods in Molecular Biology V. 300: Protein Nanotechnology, Protocols, Instrumentation, and Applications* / Ed. by T. Vo-Dinh. – Humana Press, 2005. – P. 101–123.
 66. Schuster B. Nanotechnology with S-Layer Proteins / B. Schuster, U.B. Sleytr // In: *Methods in Molecular Biology V. 996: Protein Nanotechnology: Protocols, Instrumentation, and Applications* / Ed. by J.A. Gerrard. – Humana Press, 2013. – P. 153–175.
 67. Sleytr U.B. Characterization and Use of Crystalline Bacterial Cell Surface Layers / U.B. Sleytr, M. Sára, D.Pum, B. Schuster // *Progress in Surface Science*. – 2001. – V. 68, № 7–8. – P. 231–278.
 68. Pum D. The Application of Bacterial S-layers in Molecular Nanotechnology / D. Pum, U.B. Sleytr // *Trends in Biotechnology (TIBTECH)*. – 1999. – V. 17. – P. 8–12.
 69. Pum D. S-layer Proteins as Basic Building Blocks in a Biomolecular Construction kit / D. Pum, A. Neubauer, E. Györvary, U.B. Sleytr // *Nanotechnology*. – 2000. – V. 11. – P. 100–107.
 70. Pum D. Reassembly of S-layer proteins / D. Pum, U.B. Sleytr // *Nanotechnology*. – 2014. – V. 25. – P. 312001–312015.
 71. Pum D. S-Layer Protein Self-Assembly / D. Pum, J.L. Toca-Herrera, U.B. Sleytr // *International Journal of Molecular Sciences*. – 2013. – V. 14. – P. 2484–2501.
 72. Self-Assembly of Coherently Dynamic, Auxetic, Two-Dimensional Protein Crystals / Y. Suzuki1, G. Cardone, D. Restrepo [et al.] // *Nature*. – 2016. – V. 533, № 7603. – P. 369–373.
 73. Liljestr V. Self-Assembly and Modular Functionalization of Three-Dimensional Crystals from Oppositely Charged Proteins / V. Liljestro, J. Mikkila, M.A. Kostiainen // *Nature Communication*. – 2014. – V. 5. – P. 4445–4453.
 74. Electrostatic Assembly of Binary Nanoparticle Superlattices Using Protein Cages / M.A. Kostiainen, P. Hiekkataipale, A. Laiho [et al.] // *Nature Nanotechnology*. – 2013. – V. 8. – P. 52–56.
 75. A Virus-Based Single-Enzyme Nanoreactor / M. Comellas-Aragones, H. Engelkamp, V.I. Claessen [et al.] // *Nature Nanotechnology*. – 2007. – V. 2. – P. 635–639.
 76. Огурцов А.Н. Ферментативный катализ / А.Н. Огурцов. – Харьков : НТУ «ХПИ», 2010. – 304 с.
 77. Badger M.R. CO₂ Concentrating Mechanisms in Cyanobacteria: Molecular Components, their Diversity and Evolution / M.R. Badger, G.D. Price // *Journal of Experimental Botany*. – 2003. – V. 54. – P. 609–622.
 78. Multiple Assembly States of Lumazine Synthase: A Model Relating Catalytic Function and Molecular Assembly / X. Zhang, P.V. Konarev, M.V. Petoukhov [et al.] // *J. of Molecular Biology*. – 2006. – V. 362. – P. 753–770.
 79. Theil E.C. Solving Biology’s Iron Chemistry Problem with Ferritin Protein Nanocages / E.C. Theil, T. Tosha, R.K. Behera // *Accounts of Chemical Research*. – 2016. – V. 49, № 5. – P. 784–791.
 80. Self-Assembling Biomolecular Catalysts for Hydrogen Production / P.C. Jordan, D.P. Patterson, K.N. Saboda [et al.] // *Nature Chemistry*. – 2016. – V. 8. – P. 179–185.
 81. Protein and Peptide Nanoparticles for Drug Delivery / Ed. by R. Donev. – Waltham : Academic Press, 2015. – 369 p.
 82. Biological and Pharmaceutical Applications of Nanomaterials / Ed. by P. Prokopovich. – Boca Raton : CRC Press, 2015. – 445 p.
 83. Cancer Nanotheranostics / P. Gopinath, S.U. Kumar, I. Matai [et al.]. – Singapore : Springer, 2015. – 133 p.
 84. Controlled Drug Delivery: The Role of Self-Assembling Multi-Task Excipients / Ed. by M.A. Mateescu, P. Ispas-Szabo, E. Assaad. – Woodhead Publishing, 2015. – 260 p.
 85. Nanotechnology and Drug Delivery. Volume 1: Nanoplatfoms in Drug Delivery / Ed. by J.L. Arias. – Boca Raton : CRC Press, 2015. – 378 p.

86. Nanotechnology and Drug Delivery. Volume 2: Nano-Engineering Strategies and Nanomedicines against Severe Diseases / Ed. by J.L. Arias. – Boca Raton : CRC Press, 2016. – 485 p.
87. Bhatia S. Nanotechnology in Drug Delivery: Fundamentals, Design, and Applications / S. Bhatia. – Oakville : Academic Press, 2016. – 379 p.
88. Biomedical nanomaterials / Ed. by Y. Zhao, Y. Shen. – Weinheim : Wiley-VCH Verlag, 2016. – 490 p.
89. Selvan S.T. Introduction to Nanotheranostics / S.T. Selvan, K. Narayanan. – Singapore : Springer, 2016. – 87 p.
90. Tasnim N. Frontiers in Nano-Therapeutics / N. Tasnim, B.G. Nair, K.S. Krishna. – Singapore : Springer, 2017. – 98 p.
91. Shah M.R. Lipid-Based Nanocarriers for Drug Delivery and Diagnosis / M.R. Shah, M. Imran, S. Ullah. – Oxford : William Andrew, 2017. – 355 p.
92. Kumar P. Nanomedicine for Cancer Therapy: From Chemotherapeutic to Hyperthermia-Based Therapy / P. Kumar, R. Srivastava. – Cham : Springer, 2017. – 77 p.
93. Nanomedicine in Cancer / Ed. by L.P. Balogh. – Singapore : Pan Stanford Publishing, 2017. – 841 p.
94. Nanomedicine for Inflammatory Diseases / Ed. by L.S. Milane, M.M. Amiji. – Boca Raton : CRC Press, 2017. – 370 p.
95. Nanostructures for Novel Therapy: Synthesis, Characterization and Applications / Ed. by D. Ficai, A.M. Grumezescu. – Elsevier, 2017. – 876 p.
96. Nanostructures for Drug Delivery / Ed. by E. Andronescu, A.M. Grumezescu. – Amsterdam : Elsevier, 2017. – 989 p.
97. Nanostructures for Antimicrobial Therapy / Ed. by D. Ficai, A.M. Grumezescu. – Amsterdam : Elsevier, 2017. – 693 p.
98. Nanostructures for Cancer Therapy / Ed. by D. Ficai, A.M. Grumezescu. – Amsterdam : Elsevier, 2017. – 887 p.
99. Nanostructures for Oral Medicine / Ed. by E. Andronescu, A.M. Grumezescu. – Amsterdam : Elsevier, 2017. – 998 p.
100. Nanotechnology Applied To Pharmaceutical Technology / Ed. by M. Rai, C.A. dos Santos. – Cham : Springer, 2017. – 387 p.
101. Nanobiotechnology: Human Health and the Environment / Ed. by A. Dhanwan, S. Singh, A. Kumar, R. Shanker. – CRC Press, 2018. – 513 p.
102. Biomedical Application of Nanoparticles / Ed. by B.H. Rihn. – Boca Raton : CRC Press, 2018. – 349 p.
103. Core-Shell Nanostructures for Drug Delivery and Theranostics: Challenges, Strategies and Prospects for Novel Carrier Systems / Ed. by M.L. Focarete, A. Tampieri. – Woodhead Publishing, 2018. – 467 p.
104. Singh B. Emerging Trends in NanoBioMedicine: NanoNutraceuticals / B. Singh, M. Hakkarainen, K.K. Singh. – Boca Raton : CRC Press, 2019. – 327 p.
105. Witus L.S. Using Synthetically Modified Proteins to Make New Materials / L.S. Witus, M.B. Francis // Accounts of Chemical Research. – 2011. – V. 44. – P. 774–783.
106. Hooker J.M. Interior Modification of Bacteriophage MS2 / J.M. Hooker, E.W. Kovacs, M.B. Francis // Journal of American Chemical Society. – 2004. – V. 126. – P. 3718–3719.
107. Hooker J.M. Magnetic Resonance Contrast Agents from Viral Capsid Shells: A Comparison of Exterior and Interior Cargo Strategies / J.M. Hooker, A. Datta, M. Botta, K.N. Raymond, M.B. Francis // Nano Letters. – 2007. – V. 7. – P. 2207–2210.
108. Wu W. Genome-Free Viral Capsids as Multivalent Carriers for Taxol Delivery / W. Wu, S.C. Hsiao, Z.M. Carrico, M.B. Francis // Angewandte Chemie International Edition. – 2009. – V. 48. – P. 9493–9497.
109. Carrico Z.M. Oxidative Coupling of Peptides to a Virus Capsid Containing Unnatural Amino Acids / Z.M. Carrico, D.W. Romanini, R.A. Mehl, M.B. Francis // Chemical Communications. – 2008. – V. 10. – P. 1205–1207.
110. Hooker J.M. Modification of Aniline-Containing Proteins Using a Chemoselective Oxidative Coupling Reaction / J.M. Hooker, A.P. Esser-Kahn, M.B. Francis // Journal of American Chemical Society. – 2006. – V. 128. – P. 15558–15559.
111. Zetterberg M.M. Optimization of Lipodisk Properties by Modification of the Extent and Density of the PEG corona / M.M. Zetterberg, S. Ahlgren, V.A. Hernández, N. Parveen, K. Edwards // Journal of Colloid and Interface Science. – 2016. – V. 484. – P. 86–96.
112. Ahlgren S. Targeting Lipodisks Enable Selective Delivery of Anticancer Peptides to Tumor Cells / S. Ahlgren, K. Reijmar, K. Edwards // Nano-

- medicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine. – 2017. – V. 13. – P. 2325–2328.
113. Ahlgren S. EGF-Targeting Lipodisks for Specific Delivery of Poorly Water-Soluble Anticancer Agents to Tumour Cells / S. Ahlgren, A. Fondell, L. Gedda, K. Edwards // *RSC Advances*. – 2017. – V. 7. – P. 22178–22186.
 114. Fahmy T.M. Targeted for Drug Delivery / T.M. Fahmy, P.M. Fong, A. Goyal, W.M. Saltzman // *Materials Today*. – 2005. – V. 8, № 8, Suppl. – P. 18–26.
 115. Sahoo S.K. *Nanotechnology in Health Care* / S.K. Sahoo. – Boca Raton : CRC Press, 2012. – 338 p.
 116. Bozzuto G. Liposomes as Nanomedical Devices / G. Bozzuto, A. Molinari // *International Journal of Nanomedicine*. – 2015. – V. 10. – P. 975–999.
 117. *Stealth Liposomes* / Ed. by D.D. Lasic, F.J. Martin. – Boca Raton : CRC Press, 1995. – 318 p.
 118. Dynamic Disordering of Liposomal Cocktails and the Spatio-Temporal Favorable Release of Cargoes to Circumvent Drug Resistance / Y. Liu, L.L. Li, G.-B. Qi [et al.] // *Biomaterials*. – 2014. – V. 35. – P. 3406–3415.
 119. Temperature-Triggered Tumor-Specific Delivery of Anticancer Agents by cRGD-Conjugated Thermosensitive Liposomes / M.S. Kim, D.-W. Lee, K. Park [et al.] // *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*. – 2014. – V. 116. – P. 17–25.
 120. Shukla A. Bilosomes in the Context of Oral Immunization: Development, Challenges and Opportunities / A. Shukla, V. Mishra, P. Kesharwani // *Drug Discovery Today*. – 2016. – V. 21, № 6. – P. 888–899.
 121. Ucisik M.H. Emulsomes Meet S-layer Proteins: An Emerging Targeted Drug Delivery System / M.H. Ucisik, U.B. Sleytr, B. Schuster // *Current Pharmaceutical Biotechnology*. – 2015. – V. 16. – P. 392–405.
 122. Lin C.-Y. Ultrasound Sensitive eLiposomes Containing Doxorubicin for Drug / C.-Y. Lin, M. Javadi, D.M. Belnap, J.R. Barrow, W.G. Pitt // *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine*. – 2014. – V. 10. – P. 67–76.
 123. Some Recent Advances on Liposomal and Niosomal Vesicular Carriers / C. Marianecchi, S. Petralito, F. Rinaldi [et al.] // *Journal of Drug Delivery Science and Technology*. – 2016. – V. 32. – P. 256–269.
 124. Bendas E.R. Enhanced Transdermal Delivery of Salbutamol Sulfate via Ethosomes / E.R. Bendas, M.I. Tadros // *AAPS PharmSciTech*. – 2007. – V. 8, № 3. – P. 213–220.
 125. Engineering Macrophage-Derived Exosomes for Targeted Paclitaxel Delivery to Pulmonary Metastases: in vitro and in vivo Evaluations / M.S. Kim, M.J. Haney, Y. Zhao [et al.] // *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine*. – 2018. – V. 14. – P. 195–204.
 126. Amphiphilic Poly(α)glutamate Polymeric Micelles for Systemic Administration of siRNA to Tumors / A. Krivitsky, D. Polyak, A. Scomparin [et al.] // *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine*. – 2018. – V. 14. – P. 303–315.
 127. Co-delivery of Docetaxel and Gemcitabine Using PEGylated Self-Assembled Stealth Nanoparticles for Improved Breast Cancer Therapy / V. Kushwah, S.S. Katiyar, A.K. Agrawal [et al.] // *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine*. – 2018. – V. 14. – P. 1629–1641.
 128. Ion-Paired Pirenzepine-Loaded Micelles as an Ophthalmic Delivery System for the Treatment of Myopia / Y. Li, Y. Zhang, P. Li [et al.] // *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine*. – 2017. – V. 13. – P. 2079–2089.
 129. Modified Nanoparticle Mediated IL-12 Immunogene Therapy for Colon Cancer / X. Liu, X. Gao, S. Zheng [et al.] // *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine*. – 2017. – V. 13. – P. 1993–2004.
 130. pH- and NIR Light-Responsive Micelles with Hyperthermia-Triggered Tumor Penetration and Cytoplasm Drug Release to Reverse Doxorubicin Resistance in Breast Cancer / H. Yu, Z. Cui, P. Yu [et al.] // *Advanced Functional Materials*. – 2015. – V. 25, № 17. – P. 2489–2500.
 131. Smart Nanoparticles Improve Therapy for Drug-Resistant Tumors by Overcoming Pathophysiological Barriers / J.-P. Liu, T.-T. Wang, D.-G. Wang [et al.] // *Acta Pharmacologica Sinica*. – 2017. – V. 38. – P. 1–8.
 132. Zhang Z. Design, Synthesis and Evaluation of Near-Infrared Fluorescent pH Indicators in a Physiologically Relevant Range / Z. Zhang, S. Achilefu // *Chemical Communications*. – 2005. – P. 5887–5889.
 133. Redox-responsive Micelles from Disulfide Bond-bridged Hyaluronic Acid-Tocopherol Succinate for the Treatment of Melanoma / J. Xia, Y. Du,

- L. Huang [et al.] // *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine*. – 2018. – V. 14. – P. 713–723.
134. The Self-Assembly of Anticancer Camptothecin–Dipeptide Nanotubes: A Minimalistic and High Drug Loading Approach to Increased Efficacy / S.H. Kim, J.A. Kaplan, Y. Sun [et al.] // *Chemistry – A European Journal*. – 2015. – V. 21, №1. – P. 101–105.
135. A Self-Assembly Nanodrug Delivery System Based on Amphiphilic Low Generations of PAMAM Dendrimers-Ursolic Acid Conjugate Modified by Lactobionic Acid for HCC Targeting Therapy / Z. Shen, B. Li, Y. Liu [et al.] // *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine*. – 2018. – V. 14. – P. 227–236.
136. Ke X. Delivery of NF- κ B shRNA using Carbamate-Mannose Modified PEI for Eliminating Cancer Stem Cells / X. Ke, C. Yang, W. Cheng, Y.Y. Yang // *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine*. – 2018. – V. 14. – P. 405–414.
137. Jiang D. DNA Nanomaterials for Preclinical Imaging and Drug Delivery / D. Jiang, C.G. England, W. Cai // *Journal of Controlled Release*. – 2016. – V. 239. – P. 27–38.
138. Charbgo F. MUC1 Aptamer-Targeted DNA Micelles for Dual Tumor Therapy Using Doxorubicin and KLA Peptide / F. Charbgo, M. Aliboland, S.M. Taghdisi // *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine*. – 2018. – V. 14. – P. 685–697.
139. Samanta A. Nanoparticles and DNA – a Powerful and Growing Functional Combination in Bionanotechnology / A. Samanta, I.L. Medintz // *Nanoscale*. – 2016. – V. 8. – P. 9037–9095.
140. Jiang D. DNA Nanomaterials for Preclinical Imaging and Drug Delivery / D. Jiang, C.G. England, W. Cai // *Journal of Controlled Release*. – 2016. – V. 239. – P. 27–38.
141. Luo D. The Road from Biology to Materials / D. Luo // *Materials Today*. – 2003. – V. 6. – P. 38–43.
142. Nanofabrication with Biomolecules / D.C. Chow, M.S. Johannes, W. Lee [et al.] // *Nano Today*. – 2005. – P. 30–39.
143. Aldaye F.A. Supramolecular DNA Nanotechnology / F.A. Aldaye, H.F. Sleiman // *Pure and Applied Chemistry*. – 2009. – V. 81. – P. 2157–2181.
144. DNA Nanotechnology. From Structure to Function / Ed. by C. Fan. – Berlin: Springer, 2013. – 360 p.
145. DNA in Supramolecular Chemistry and Nanotechnology / Ed. by E. Stulz, G.H. Clever. – Wiley, 2015. – 541 p.
146. Douglas K. DNA Nanoscience: From Prebiotic Origins to Emerging Nanotechnology / K. Douglas. – Boca Raton : CRC Press, 2017. – 457 p.
147. DNA Nanotechnology for Bioanalysis: From Hybrid DNA Nanostructures to Functional Devices / Ed. by G. Arrabito, L. Wang. – London : World Scientific, 2018. – 210 p.
148. Douglas S.M. A Logic-Gated Nanorobot for Targeted Transport of Molecular Payloads / S.M. Douglas, I. Bachelet, G.M. Church // *Science*. – 2012. – V. 335. – P. 831–834.
149. An Aptamer-Enabled DNA Nanobox for Protein Sensing / M.S.L. Tang, S.C.-C. Shiu, M. Godonoga [et al.] // *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine*. – 2018. – V. 14. – P. 1161–1168.
150. Rothemund P.W.K. Folding DNA to Create Nanoscale Shapes and Patterns / P.W.K. Rothemund // *Nature*. – 2006. – V. 440, № 7082. – P. 297–302.
151. Self-Assembly of a Nanoscale DNA Box with a Controllable Lid / E.S. Andersen, M. Dong, M.M. Nielsen [et al.] // *Nature*. – 2009. – V. 459, № 7243. – P. 73–76.
152. A DNA Aptamer Recognising a Malaria Protein Biomarker can Function as Part of a DNA Origami Assembly / M. Godonoga, T.-Y. Lin, A. Oshima [et al.] // *Scientific Reports*. – 2016. – V. 6. – P. 21266(1–12).

Наукове видання

БЄЛИХ Ірина Анатоліївна, БЛИЗНЮК Ольга Миколаївна,
ВАРАНКІНА Олександра Олександрівна, ЗВ'ЯГІНЦЕВА Оксана Вікторівна,
КЛЕЩЕВ Микола Федосович, КРАСНОПОЛЬСЬКИЙ Юрій Михайлович,
ЛАВРИК Дмитро Володимирович, МАСАЛІТІНА Наталія Юріївна,
ОГУРЦОВ Олександр Миколайович, ПИЛИПЕНКО Дар'я Михайлівна,
САМОЙЛЕНКО Сергій Іванович

АКТУАЛЬНІ ПРОБЛЕМИ БІОТЕХНОЛОГІЇ ТА БІОІНЖЕНЕРІЇ

Монографія

За редакцією ОГУРЦОВА Олександра Миколайовича

Російською мовою

Роботу до видання рекомендувала *М. Г. Зінченко*
В авторській редакції

План 2019 р., поз. 12.

Підп. до друку 31.01.2019 р. Формат 60×84 1/16. Папір офсетний.
Друк цифровий. Гарнітура Times New Roman. Ум. друк. арк. 13,95.
Наклад 300 пр. Зам. № 318. Ціна договірна

Видавець і виготовлювач ТОВ «ДРУКАРНЯ МАДРИД»
61024, м. Харків, вул. Максиміліанівська, 11
Тел.: (057) 756-53-25
Свідоцтво суб'єкта видавничої справи
Серія ДК № 4399 від 27.08.2012 р.
www.madrid.in.ua e-mail: info@madrid.in.ua

ISBN 978-617-7683-53-6

