

УДК 577.15.086.83

Н. А. Береговой, О. Г. Сафронова, **В. И. Хиченко**, М. Б. Штарк,  
Г. Г. Опарович, Г. В. Панасюк

(Новосибирск)

### БИОСЕНСОРНАЯ СИСТЕМА ДЛЯ ОПРЕДЕЛЕНИЯ КОНЦЕНТРАЦИИ ПЕРЕКИСИ ВОДОРОДА (КЛИНИЧЕСКОЕ ИСПЫТАНИЕ)

Описаны результаты клинического применения биосенсорной системы для определения концентрации перекиси водорода. Показано, что биосенсор на основе иммобилизованной ткани *Agmatocia Rusticana* с кислородным трансдуктором устойчиво работает в жидкой среде, представляющей собой разведенный в 250 раз желудочный сок, при этом практически не изменяются калибровочная кривая и время отклика сенсора. Исследованы пробы, взятые у 71 пациента с гастроэнтерологической патологией. Делается вывод о возможности использования биосенсорной системы для проведения анализа в течение 3—4 мин после получения желудочного сока во время гастроэндоскопии в диапазоне концентраций  $10^{-7}$ — $10^{-4}$  М.

В данной работе представлены результаты апробации в клинических условиях биосенсорной системы для определения концентрации перекиси водорода в биологических жидкостях [1]. Необходимость контроля концентрации перекиси водорода возникает при патологиях, связанных с изменением активности ферментов ее разрушения, — пероксидазы и каталазы. Есть основания полагать, что недостаточно быстро разрушаемая в таких случаях перекись водорода может способствовать, в частности, раздражению слизистой желудка, что в конечном итоге может привести к развитию язвенной болезни. Необходимо отметить, что в биологических пробах концентрация пероксида водорода не сохраняется постоянной, поэтому актуальна задача проведения измерений за минимальное время. Предлагаемая биосенсорная методика в отличие от традиционных методов, требующих для измерения концентрации перекиси водорода проведения специальных процедур и значительного времени, позволяет свести процедуру измерения к одному этапу длительностью в несколько минут.

Цель данной работы — измерение концентрации перекиси водорода с помощью биосенсорной системы в пробах желудочного сока, полученных во время процедуры гастроэндоскопии пациентов с гастроэнтерологической патологией.

**Методика.** Поскольку в ходе реакции разложения перекиси водорода, катализируемой пероксидазой и каталазой, количество образующегося в этой реакции кислорода пропорционально концентрации субстрата, то в качестве трансдуктора необходимо использовать физико-химическую систему, параметры которой зависят от концентрации кислорода. Был выбран кислородный датчик, работающий по принципу гальванического элемента, серебряный катод и цинковый анод которого находятся в растворе электролита, отделенного от исследуемой жидкости тефлоновой мембраной, проницаемой для кислорода. Растворенный в испытуемом образце кислород диффундирует через мембрану в слой электролита между мембраной и поверхностью серебряного катода, где он восстанавливается. Одновременно на аноде протекает реакция окисления цинка (рис. 1). В результате этих процессов сила тока, возникающего в элементе, прямо пропорциональна парциальному давлению кислорода,

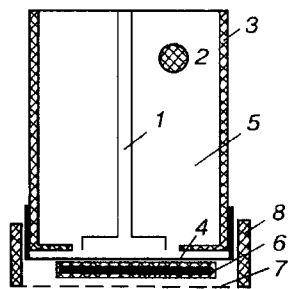


Рис. 1. Схема биосенсора на основе кислородного датчика: 1 — серебряный катод, 2 — цинковый анод, 3 — корпус, 4 — тефлоновая мембрана, 5 — раствор электролита, 6 — иммобилизованная растительная ткань, 7 — нейлоновая сетка, 8 — фиксирующее кольцо

растворенного в тестируемом образце. Кислородный датчик присоединяли к вольтметру.

В биосенсорной системе использовали тканевый сенсор на основе порошка корней *Armoracia Rusticana*, богатого ферментами — каталазой и пероксидазой. Для изготовления биологического блока сенсора порошок из высушенной ткани растворяли в 0,2 М калий-фосфатном буфере. Для иммобилизации активных реагентов на вырезанные из специальной фоточувствительной мембраны [2] диски наносили полученную суспензию и экспонировали под ртутной лампой ДРШ 250-3 на расстоянии 25 см в течение 20 мин. Изготовленный таким образом биологический блок фиксировали на поверхности трансдуктора — кислородного электрода. Измерение концентрации перекиси водорода проводили, последовательно добавляя пробы в раствор 0,2 М калий-фосфатного буфера (рН 0,7) (1 : 250) при постоянном перемешивании на магнитной мешалке. Калибровочную кривую зависимости концентрации перекиси водорода от парциального давления кислорода (выраженного в удельных единицах) строили аналогичным образом, добавляя в буферный раствор стандартные пробы перекиси в диапазоне конечных концентраций  $0,88 \cdot 10^{-7}$ — $8,8 \cdot 10^{-7}$  М. Для исключения неспецифического влияния желудочного сока была построена также калибровочная кривая для стандартных проб перекиси водорода с добавлением желудочного сока (рис. 2).

Для определения концентрации перекиси водорода у пациентов использовали по 40 мкл желудочного сока, забранного во время процедуры гастроэндоскопии с одновременной оценкой состояния слизистой желудка.

**Результаты и обсуждение.** Сравнительный анализ построенных калибровочных кривых биосенсора в буферном растворе и в растворе желудочного сока (разведение в 250 раз) показал, что созданная биосенсорная система может быть успешно использована для измерения данного аналита в пробах желудочного сока (см. рис. 2), поскольку в описанных разведениях компоненты желудочного сока не оказывают неспецифического влияния на результаты измерения.

Полученные результаты показали, что использование биосенсорной системы позволяет провести измерение в течение 3—4 мин после забора желудочного сока (рис. 3) во время гастроэндоскопии с одновременной оценкой состояния слизистой оболочки желудка. Биосенсорная система дает возможность зарегистрировать наличие перекиси водорода в диапазоне концентрации  $10^{-7}$ — $10^{-4}$  М без использования дополнительных реактивов и предварительной обработки проб.

Был обследован 71 пациент: у 50 перекиси водорода в желудочном соке обнаружено не было, у 21 отмечена положительная реакция на перекись, из них у шести ее концентрация максимальна (достигает  $2,5 \cdot 10^{-5}$  М).

Полученные данные будут проанализированы для выявления возможной корреляции повышенной концентрации перекиси водорода в желудочном

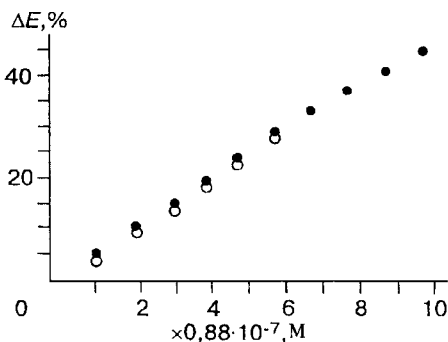


Рис. 2. Калибровка биосенсора в буферном растворе (•) и в растворе желудочного сока (◦)

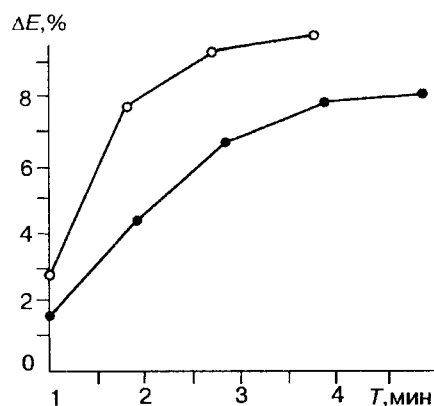


Рис. 3. Кривая отклика биосенсора при изменении концентрации перекиси водорода в буферном растворе (•) от 0 до  $1,6 \cdot 10^{-7}$  М и в растворе желудочного сока (○), когда она увеличивается от 0 до  $1,76 \cdot 10^{-7}$  М

соке с развитием язвенной болезни, что в перспективе может быть использовано для дифференцирования различных форм язвенной болезни желудка.

Все вышеизложенное позволяет сделать вывод о возможности использования предложенной биосенсорной системы для проведения анализа непосредственно после взятия проб в течение 3—4 мин во время гастроэндоскопии в диапазоне концентраций  $10^{-7}$ — $10^{-4}$  М.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Сафронова О. Г., Хиченко В. И. Биосенсоры для определения концентрации перекиси водорода в растворе на основе растительной ткани *Artemisia Rusticana* // Автометрия. 1993. № 2. С. 39.
2. Добриков М. И., Шишкин Г. В. *n*-Азидотетрафторбензальдегид — высокоэффективный гетеробифункциональный реагент для фотоиммобилизации ферментов // Изв. СО АН СССР. Сер. хим. наук. 1990. Вып. 6.

Поступила в редакцию 17 октября 1996 г.