

СПОСОБ НЕИНВАЗИВНОЙ ДИАГНОСТИКИ ПОРАЖЕНИЯ СОЕДИНЕНИЯМИ НЕРВНО-ПАРАЛИТИЧЕСКОГО ДЕЙСТВИЯ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ БИОСЕНСОРА В КЛИНИЧЕСКИХ И ПОЛЕВЫХ УСЛОВИЯХ

Э.Т. Гайнуллина¹,
С.Б. Рыжиков²,
В.Н. Фатеенков¹, М.А. Понсов¹,
Л.В. Петракова¹

¹ФГБУ «27 Научный центр»
министерства обороны Российской
Федерации», 105005, г. Москва,
Российская Федерация
²ФГБОУВО Московский
государственный университет
им. М.В. Ломоносова, физический
факультет, 119991, г. Москва,
Российская Федерация

Рассмотрены вопросы обоснования необходимости создания и перспективности разработки методики неинвазивной диагностики поражения соединениями нервно-паралитического действия в полевых условиях, отвечающей современным требованиям по чувствительности, специфичности и быстродействию. В результате проведенных исследований предложен способ ранней и достоверной неинвазивной диагностики поражения соединениями нервно-паралитического действия с применением биосенсора необратимых ингибиторов холинэстераз.

Ключевые слова: неинвазивная диагностика, соединения нервно-паралитического действия, биосенсор.

Цит: Э.Т. Гайнуллина, С.Б. Рыжиков, В.Н. Фатеенков, М.А. Понсов, Л.В. Петракова. Способ неинвазивной диагностики поражения соединениями нервно-паралитического действия с использованием биосенсора в клинических и полевых условиях. Токсикологический вестник. 2021; 1:38-42.

Введение. В настоящее время существует реальная опасность отравления нейротоксинами. Несмотря на существование Международной Конвенции о запрещении разработки, производства, накопления и применения химического оружия и о его уничтожении, наиболее опасные отравляющие вещества, содержащие нейротоксины, применялись террористами в Токийском метро и в Сирии. Подробные данные о применении химического оружия в мирное время приведены в публикации [1]. Таким образом, совершенствование диагностики отравления нейротоксинами является важным и актуальным.

Целью данного исследования является разработка способа ранней и достоверной диагностики поражения соединениями нервно-паралитического действия в клинических и полевых условиях, отвечающего современным требованиям по чувствительности, специфичности и времени формирования аналитического сигнала.

В наших исследованиях мы ориентировались на неинвазивную диагностику, поскольку она имеет определенные преимущества перед рядом традиционных методов: рентген, биопсия, забор крови и др.

Неинвазивная диагностика имеет следующие преимущества:

- исключает внесение во внутреннюю среду организма болезнетворных вирусов, бактерий и ксенобиотиков, как это может случиться при заборе крови;
- позволяет исключить лучевую нагрузку на организм в отличие от диагностики с применением рентгенологических и радиоизотопных методов исследования;
- освобождает пациента от комплекса болевых и неприятных ощущений;
- неинвазивные методы с использованием сенсорных и передающих сигналы устройств, позволяют решать медико-социальные задачи. На-

Гайнуллина Эра Тазетдиновна (Gainullina Era Tazetdinovna), доктор химических наук, старший научный сотрудник ФГБУ «27 Научный центр» Министерства обороны Российской Федерации»

Фатеенков Владимир Николаевич (Fateenkov Vladimir Nikolaevich), кандидат военных наук, доцент, начальник научно-исследовательского отдела ФГБУ «27 Научный центр» Министерства обороны Российской Федерации»

Рыжиков Сергей Борисович (Ryzhikov Sergey Borisovich), доктор педагогических наук, доцент ФГБОУВО МГУ им. М.В. Ломоносова, sbr@physics.msu.ru
Понсов Михаил Александрович (Ponsov Mikhail Aleksandrovich), кандидат химических наук, доцент, старший научный сотрудник ФГБУ «27 Научный центр» Министерства обороны Российской Федерации»

Петракова Лидия Васильевна (Petraikova Lidiya Vasilievna), научный сотрудник ФГБУ «27 Научный центр» Министерства обороны Российской Федерации»

пример, создание дистанционных аларм-систем может быть полезным для наблюдения из больницы или поликлиники за больными с опасностью внезапной смерти (гипертонической болезнью или др.) и оказания своевременной помощи при наступивших критических состояниях.

На сегодняшний день существуют различные способы использования неинвазивной диагностики. Примером неинвазивной диагностики является исследование химического состава выдыхаемого воздуха. Определение наличия в выдыхаемом воздухе следов этанола проводится очень давно и широко используется работниками ГИБДД для выявления случаев употребления спиртных напитков водителями транспортных средств. В настоящее время в выдыхаемом воздухе определяют более 100 химических соединений. Состав выдыхаемого воздуха и крови взаимосвязаны, что позволяет в определенных случаях отказываться от исследования крови и проводить определение содержания искомым веществ в выдыхаемом воздухе.

В 2018 г. был создан новый метод неинвазивной диагностики малярии, за который 25-летний Брайан Гитта из Уганды получил престижную премию «Africa for Engineering Innovation» от Королевской инженерной академии Великобритании [2]. Для диагностики малярии новым методом не нужен забор крови, достаточно провести красным лучом света по пальцу и обнаружить изменения в форме, цвете и концентрации эритроцитов, пораженных малярией. В течение минуты результаты отправляются на компьютер или мобильный телефон, подключенный к устройству. Разработанный тест не требует участия специалиста в его проведении. Значимость этого способа диагностики определяется тем, что малярия является главной причиной высокой смертности в Африке.

Неинвазивная диагностика поражения нейротоксинами предложена на основе светового зрачкового рефлекса (СЗР) [3]. СЗР определяет сужение и последующее расширение зрачка в ответ на свет в результате антагонистических действий сфинктера и расширителя мышцы радужки. Так как эти мышцы иннервируются парасимпатическим и симпатическим нервами, то различные параметры СЗР могут быть использованы в качестве индикаторов. Таким образом, СЗР обеспечивает важный показатель вегетативной нервной функции системы. В настоящее время СЗР является признанным инструментом для количественной неинвазивной диагностики поражения токсичным химическим веществом [3].

Существуют неинвазивные диагностики заболеваний с использованием пробы слюны, которые основаны на содержании в ней множества

биомаркеров, что делает возможным диагностирование значительного числа заболеваний [4]. Маркеры слюны могут точно отражать нормальное и болезненное состояния человека. Слюна является клинически информативной биологической жидкостью, которая позволяет успешно проводить диагностику в клинических условиях.

Развитие неинвазивных методов в диагностике в определенной степени связано с появлением нового направления – использования биосенсора (БС) – устройства, состоящего из активного компонента и преобразователя аналитического сигнала в регистрируемый сигнал (световой, звуковой и т.п.). Биосенсоры открывают новые пути неинвазивного определения ряда веществ в поте, слюне, слезе и моче, которые с одной стороны, являются доступными образцами, с другой стороны – накапливают высокую дозу отравляющих веществ в организме человека.

На основе успехов, достигнутых в области энзимологии, биотехнологии и сенсорных технологий, опубликовано значительное количество статей и патентов, посвященных разработке оптического биосенсора (ОБС) на основе холинэстеразы для определения нейротоксинов, в том числе фосфорорганических отравляющих веществ (ФОВ). Обзор биосенсоров такого назначения представлен в статье [5].

Повышенный интерес к разработке ОБС для определения ФОВ подчеркивает актуальность этих исследований, что, по-видимому, явилось основанием для проведения IV совещания Научного консультативного совета временной рабочей группы по проблемам химии и биологии с повесткой дня «Биосенсоры», проходившего в Гааге с 5 по 7 ноября 2013 г. В итогах совещания в Гааге было отмечено, что наиболее интенсивные исследования ведутся по двум направлениям [6]:

- 1) разработка БС на основе ферментов ацетилхолинэстеразы (АХЭ) или бутирилхолинэстеразы (БХЭ) для мониторинга объектов окружающей среды на содержание ФОВ;
- 2) разработка БС для диагностирования поражения ФОВ.

Диагностирование с использованием известных биосенсоров предусматривало проведение анализа проб крови после антидотной терапии пострадавшего.

В полевых условиях при поражении ФОВ более целесообразна неинвазивная диагностика с применением наиболее простых по устройству и удобных в эксплуатации биосенсоров.

Основное требование к биосенсорам нейротоксинов – обеспечение высокой чувствительности, специфичности и быстродействия. Актуальность обсуждаемой задачи стимулировала исследования, посвященные повышению чувствительности биосенсора нейротоксинов.

Предложены подходы к решению данной задачи на основе известных ранее литературных данных:

1. Оптические бессубстратные биосенсоры с флуоресцентной меткой (флуорогеном) на основе флуоресцентного метода регистрации аналитического сигнала можно отнести к числу наиболее чувствительных и быстродействующих.

2. Особый интерес представляют флуорогены – обратимые ингибиторы, являющиеся активаторами фосфорилирования холинэстераз.

3. Известен ряд флуорогенов-активаторов (активаторов) фосфорилирования холинэстераз.

4. Исследовано влияние БХЭ на флуоресценцию обратимых ингибиторов-флуорофоров [5].

Эти данные были использованы для разработки экспресс-метода определения ингибиторов БХЭ.

Действительно, введение не флуоресцирующего ингибитора $I_{нефл}$, характеризующегося более высоким сродством к ферменту (или при его существенно более высокой концентрации), приведет к смещению равновесия в системе и освобождению ингибитора-флуорофора в соответствии с рисунком 1:

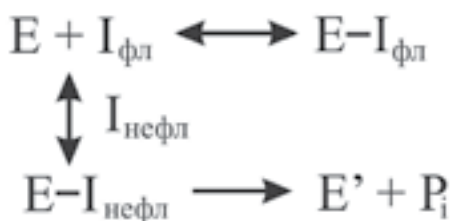


Рис. 1. E – БХЭ, $I_{фл}$ – обратимый флуорофор-ингибитор, $E-I_{фл}$ – комплекс БХЭ с обратимым ингибитором-флуорофором, $I_{нефл}$ – не флуоресцирующий ингибитор, $E-I_{нефл}$ – комплекс БХЭ с не флуоресцирующим ингибитором, E' – фосфорилированная БХЭ, P_i – продукт, выделившийся после фосфорилирования БХЭ.

В случае введения в систему не флуоресцирующего необратимого ингибитора ($I_{необ}$), например, фосфорорганического инсектицида, будет иметь место дальнейшее смещение равновесия в сторону образования фосфорилированной БХЭ. Флуоресценция системы при этом также будет снижаться более интенсивно.

Выбор флуорофора-ингибитора в данном исследовании проводился в соответствии со следующими требованиями: флуорофор должен быть относительно сильным ингибитором БХЭ, обладать высоким квантовым выходом, хорошо растворяться в водных средах в интервале физиологических значений рН.

Флуорофором-ингибитором, отвечающим данным требованиям, является комплекс бромид-да 3,8-диамино-5-этил-6-фенилфенантридиния (бромид этидия) с БХЭ.

Материалы и методы исследования. В качестве флуорофора-ингибитора использовали бромид этидия (*Ethidium bromide*) фирмы *Sigma-Aldrich*, в качестве фосфорорганического нейротоксина использовали параоксон (*Paraoxon-ethyl*) фирмы *Sigma-Aldrich*, в качестве фермента использовали ацетилхолинэстеразу из эритроцитов быка (*Acetylcholinesterase, type XII-S*) фирмы *Sigma-Aldrich*. Спектры флуоресценции регистрировали с помощью спектрофлуориметра MPF-4 фирмы *Hitachi*.

Результаты и обсуждение. Бромид этидия имеет ряд преимуществ по сравнению с известными флуорогенами, образующими флуоресцирующие комплексы с ХЭ:

1) его полоса флуоресценции находится в красной области спектра ($\lambda_{макс} = 610$ нм), удаленной от полос флуоресценции триптофана и других ароматических аминокислот, что вносит вклад в повышение специфичности анализа (рис. 2);

2) образует интенсивно флуоресцирующие комплексы не только с АХЭ эритроцитов человека, но и с АХЭ эритроцитов быка, БХЭ человека и лошади, а также пропионилхолинэстеразой зрительных ганглиев кальмара;

3) образует с холинэстеразами комплексы, положение полос поглощения и флуоресценции (рис. 2) которых отличается от соответствующих полос самого бромид этидия, что обеспечивает повышение специфичности определения аналита;

4) образование с холинэстеразами комплексов, положение полос поглощения и флуоресценции которых отличается от соответствующих полос самого бромид этидия (рис. 2), открывает перспективу использования для регистрации аналитического сигнала метода резонансного переноса энергии флуоресценции – одного из самых чувствительных методов измерения интенсивности флуоресценции.

Для проведения исследований по разработке целевого способа диагностики в данной работе был использован оптический биосенсор необратимых ингибиторов холинэстеразы в воздухе, активный компонент которого представляет собой интенсивно флуоресцирующий комплекс бромид этидия с БХЭ лошади, иммобилизованный на твердой подложке золь-гель методом [7].

Именно благодаря включению бромид этидия в состав аналитической рецептуры активного компонента совместно с БХЭ данный биосенсор характеризуется высокой специфичностью и чувствительностью к ФОВ. Существенным преимуществом биосенсора также является ли-

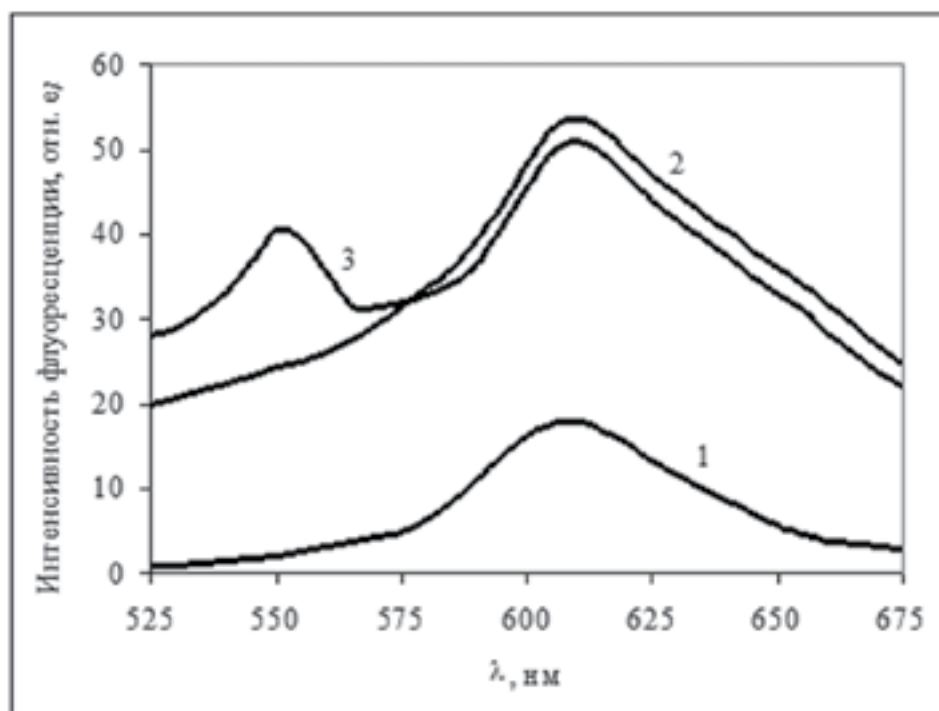


Рис. 2. Спектры флуоресценции: 1 – бромид этидий (0,6 мкмоль/л); 2 и 3 – комплекс бромида этидия с БХЭ лошади (0,36 Е/мл и 0,50 Е/мл соответственно); возбуждение: $\lambda = 470$ нм.

Таблица

Результаты определения параоксона биосенсором, $n = 10$

Эталонный раствор слюны	Определено биосенсором
Концентрация параоксона в эталонном растворе слюны, мкМ	Концентрация параоксона, мкМ
1,00	0,87±0,10
10,00	9,20±1,05

нейная зависимость снижения интенсивности флуоресценции $I_{\text{фл}}$ на длине волны $\lambda = 550$ нм от концентрации фосфорорганического инсектицида параоксона (x , мкМ), которая может быть представлена следующим уравнением:

$$I_{\text{фл}} (\text{отн. ед.}) = (72,6 \pm 1,4) - (5,5 \pm 0,1) x, \quad (1)$$

$$R = 0,95, n = 5.$$

Следовательно, уравнение (1) может служить дозиметром при определении нейротоксина данным биосенсором.

В данной работе биосенсор был дополнительно снабжен устройством, через которое анализируемая проба (например, слюна пораженного человека), содержащая нейротоксин, может входить в контакт с активным компонентом биосенсора.

При моделировании авторами данного исследования диагностики поражения нейроток-

сином в полевых условиях путем нанесения на активный компонент биосенсора слюны, содержащей фосфорорганический инсектицид параоксон, наблюдалось снижение интенсивности флуоресценции биосенсора на длине волны 550 нм. Аналитический отклик достигался за 15 – 30 секунд.

Приведенные в таблице данные, подтверждают правильное и точное определение наличия параоксона в анализируемой пробе слюны. Таким образом, можно сделать заключение о высокой чувствительности и малом времени формирования аналитического отклика при использовании для анализа данного биосенсора.

Заключение. В результате проведенных исследований авторами показано, что предложенный способ неинвазивной диагностики поражения со-

единениями нервно-паралитического действия в клинических и полевых условиях с применением ОБС необратимых ингибиторов холинэстеразы в воздухе, дополнительно снабженного устройством, через которое анализируемая проба, со-

держащая нейротоксин (например, слюну), может входить в контакт с активным компонентом биосенсора, отвечает современным требованиям по чувствительности и времени формирования аналитического сигнала.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Гаврилко-Алексеев А. Крупнейшие случаи применения химического оружия в истории. Available at: <https://www.rbc.ru/photoreport/07/04/2017/58e76c2a9a7947528d57950f>. Дата обращения: 1.07.2020.

2. Rodney Muhumuza. Non-invasive malaria test wins Africa engineering prize. Available at: <https://medicalxpress.com/news/2018-06-non-invasive-malaria->

Africa-prize.html. Дата обращения: 1.07.2020.

3. Hall C.A., Chilcott R.P. Eyeing up the Future of the Pupillary Light Reflex in Neurodiagnostics. *Diagnostics*. 2018, 8(1), 19; doi:10.3390/diagnostics8010019.

4. Kori R.K., Jain A.K., Yadav R.S. Biomarkers: An Essential Gizmo in Pesticide Toxicity. *Biomark J*. 2016, 2:1.

DOI: 10.21767/2472-1646.100009.

5. Gainullina E.T., Gulikova D.K., Korneev D.O., Oreshkin D.V., Ryzhikov S.B., Fateenkov V.N. Biosensors as tools of environmental monitoring for organophosphorus nerve agents. *Journal of Analytical Chemistry*. 2015; V. 70, No. 7. P. 771-780.

6. Fourth Meeting of the Scientific Advisory Board Temporary Working Group on the

Convergence of Chemistry and Biology. 5-7 November 2013. -Hague. - 2013.

7. Гайнуллина Э.Т., Корнеев Д.О., Фатеенков В.Н. Оптический биосенсор необратимых ингибиторов холинэстеразы в воздухе. Патент РФ № 2654294, Государственная регистрация РФ 17 мая 2018.

REFERENCES:

1. Gavrilko-Alekseev A. The largest cases of the use of chemical weapons in history. Available at: <https://www.rbc.ru/photoreport/07/04/2017/58e76c2a9a7947528d57950f>. (Accessed 1 July 2020) (in Russian)

2. Rodney Muhumuza. Non-invasive malaria test wins Africa engineering prize. Available at: <https://medicalxpress.com/>

news/2018-06-non-invasive-malaria-Africa-prize.html. (Accessed 1 July 2020).

3. Hall C.A., Chilcott R.P. Eyeing up the Future of the Pupillary Light Reflex in Neurodiagnostics. *Diagnostics*. 2018, 8(1): 19; doi: 10.3390/diagnostics8010019.

4. Kori R.K., Jain A.K., Yadav R.S. Biomarkers: An Essential Gizmo in

Pesticide Toxicity. *Biomark J*. 2016, 2:1. DOI: 10.21767/2472-1646.100009.

5. Gainullina E.T., Gulikova D.K., Korneev D.O., Oreshkin D.V., Ryzhikov S.B., Fateenkov V.N. Biosensors as tools of environmental monitoring for organophosphorus nerve agents. *Journal of Analytical Chemistry*. 2015; V. 70 (7): 771-780.

6. Fourth Meeting of the Scientific Advisory Board Temporary Working Group on the Convergence of Chemistry and Biology. 5-7 November 2013. -Hague. - 2013.

7. Gainullina E.T., Korneev D.O., Fateenkov V.N. Optical biosensor of irreversible cholinesterase inhibitors in the air. Patent RF, N 2654294; 2018 (in Russian).

E.T. Gainullina¹, S.B. Ryzhikov², V.N. Fateenkov¹, M.A. Ponsov¹, L.V. Petrakova¹

METHOD OF NON-INVASIVE DIAGNOSTICS OF POISONING BY SUBSTANCES OF NEUROPARALYTIC ACTION WITH THE USE OF A BIOSENSOR IN CLINICAL AND FIELD CONDITIONS

¹27th Scientific Center of the Ministry of Defence of the Russian Federation, 105005, Moscow, Russian Federation

²Lomonocov Moscow State University, Faculty of Physics, 119991, Moscow, Russian Federation

The questions of substantiation of the need to create and the prospects of developing a method for non-invasive diagnosis of lesions by compounds of neuroparalytic action in the field that meet modern requirements for sensitivity, specificity and speed are considered. As a result of the research, a method for early and reliable non-invasive diagnosis of lesions by neuroparalytic compounds in the field using an optical biosensor of irreversible cholinesterase inhibitors was proposed.

Keywords: *non-invasive diagnostics, substances of neuroparalytic action, biosensor.*

Quote: E.T. Gainullina, S.B. Ryzhikov, V.N. Fateenkov, M.A. Ponsov, L.V. Petrakova. Method of non-invasive diagnostics of poisoning by substances of neuroparalytic action with the use of a biosensor in clinical and field conditions. *Toxicological Review*. 2021; 1:38-42.

Переработанный материал поступил в редакцию 17.07.2020 г.

