

## **Подходы к определению компонентов для создания биосенсоров нового поколения**

**Передкова В.Е.** (СПХФУ, ИАП РАН)

**Научный руководитель - кандидат физико-математических наук, старший научный сотрудник, заведующий лабораторией медико-аналитических методов и приборов,  
Зайцева А.Ю.** (ИАП РАН)

**Введение.** Проведено исследование, посвященное очистке и выделению фермента холестеролоксидазы, а также разработке биосенсора на его основе. Фермент холестеролоксидаза играет важную роль в биологических процессах, связанных с метаболизмом холестерина, и его изучение имеет большое значение для медицинских и биотехнологических приложений. Результаты данного исследования могут быть полезными как для научных исследователей, так и для медицинских и биотехнологических компаний, занимающихся разработкой новых методов диагностики и лечения связанных с холестерином заболеваний.

**Ключевые слова:** холестеролоксидаза, биосенсор, холестерин.

**Основная часть.** Холестеролоксидаза – это ФАД–содержащий фермент, относящийся к семейству оксидоредуктаз. Катализирует реакцию окисления холестерина до холест-4-ен-3-он, с образованием перекиси водорода. Фермент широко применяется для определения холестерина в сыворотке крови, липопротеинах высокой плотности (ЛПВП), липопротеинах низкой плотности (ЛПНП). [1]

Одним из самых актуальных направлений получения фермента в России и мире является ее применение для анализа общего холестерина в сыворотке крови. Так холестеролоксидаза стала наиболее широко используемым ферментом в клинических лабораториях (только лишь за исключением глюкозооксидазы), так как анализы, включающие этот фермент, чрезвычайно просты и высокочувствительны. [3]

На данный момент в России не налажено собственное производство для получения холестеролоксидазы. Активность холестеролоксидазы, выпускаемой данным производителем, составляет 12-15 ЕД/мл. В связи с этим, становится актуальным вопрос о налаживании производства фермента в России, с активностью не ниже уровня зарубежного поставщика. [4]

Фермент обнаруживается во многих микроорганизмах: *Arthrobacter*, *Corynebacterium*, *Nocardia erythropolis* и *Rhodococcus erythropolis*, *Nocardia rhodochrous* и *Rhodococcus rhodochrous*, *Mycobacterium*, *Pseudomonas*, *Schizopyllum commune*, *Brevibacterium sterolicum*, *Streptovorticillium cholesterolicum*, *Streptomyces violascens*, *Rhodococcus* sp [5]. С целью получения фермента с высокой активностью, на кафедре биотехнологий СПХФУ проводилось изучение микробной культуры – продуцента холестеролоксидазы *Streptomyces lavendulae* [2] (штамм ВКМА-840Д). Осуществлен подбор питательных субстратов для выращивания посевного материала и ферментации, выбор оптимальных условий культивирования данного микроорганизма для эффективного биосинтеза целевого фермента [4].

Процессы, связанные с экстракцией и очисткой холестеролоксидазы аналогичны процессам, применяемым к ферментам в целом. Однако, как правило, имеются тончайшие различия в процессах экстракции и очистки, чтобы получить достаточный выход активного фермента от каждой из бактерий, продуцирующих холестеролоксидазу или достаточную степень осветления. [3]

Внедрение фермента холестеролоксидазы в биосенсор имеет высокую практическую значимость в контексте разработки эффективных методов определения концентрации холестерола. Применение биосенсоров на основе этого фермента обладает несколькими важными преимуществами: специфичность обнаружения, чувствительность, простота и быстрота анализа, применение в медицинской диагностике, возможности в научных исследованиях.

Принцип работы биосенсора основан на специфическом взаимодействии между ферментом и холестеролом, а измерение изменений сигнала предоставляет количественную информацию о концентрации холестерола в биологическом образце. Информация о принципе работы биосенсоров на основе фермента холестеролоксидазы основана на знании и общих принципах биосенсоров и ферментов. [6]

Процесс был разделен на несколько этапов:

1. Имобилизация фермента: Фермент холестеролоксидаза фиксируется на поверхности датчика или электрода биосенсора. Этот процесс называется имобилизацией и обеспечивает стабильное размещение фермента на поверхности, сохраняя его активность.
2. Реакция с холестеролом: Образец с анализируемым материалом (например, кровью или клеточными культурами) взаимодействует с биосенсором, содержащим холестеролоксидазу, происходит реакция между ферментом и холестеролом в образце.
3. Преобразование сигнала: Реакция между ферментом и холестеролом приводит к выделению продуктов, таких как пероксид водорода или другие вещества. Эти продукты могут быть детектированы с использованием метода - потенциометрии, что приводит к изменению электрического сигнала.
4. Измерение сигнала: Изменение сигнала, вызванное реакцией фермента с холестеролом, измеряется с помощью датчика биосенсора. Это изменение связано с концентрацией холестерола в образце.
5. Калибровка и интерпретация результатов: Результаты измерений могут быть калиброваны с использованием стандартных образцов с известной концентрацией холестерола. Полученные данные могут быть интерпретированы для определения точной концентрации холестерола в исследуемом образце.

**Выводы.** В данной статье был исследован процесс очистки и выделения фермента холестеролоксидазы, а также создания биосенсора на его основе. Очистка и выделение фермента позволяют получить более чистую и активную форму фермента, что важно для дальнейшего использования в биосенсорах. Биосенсоры, основанные на ферменте холестеролоксидазы, обладают высокой специфичностью и чувствительностью к холестеролу, что делает их полезными инструментами для диагностики и мониторинга уровня холестерола в биологических образцах. Эти биосенсоры имеют широкий спектр практических применений, включая медицинскую диагностику и научные исследования, и могут значительно улучшить наше понимание метаболизма холестерола и связанных с ним заболеваний.

### Список использованных источников:

1. Найденова, А.С. Регулируемая ферментация продуцента фермента холестеролоксидазы / А.С. Найденова, В.А. Колодязная // Сборник матлов VI Всерос. науч. конференции студ. и аспирантов с междунар. участием «Молодая фармация – потенциал будущего», 25-26 апреля 2016 г., Санкт-Петербург. – СПб.: Изд-во СПХФА, 2016; 262-265.
2. Найденова А. С. Колодязная В. А. Регулируемая ферментация продуцента фермента холестеролоксидазы // Сборник материалов IV Всероссийской научно-практической конференции с международным участием «Инновации в здоровье нации», Санкт-Петербург, 09–10 ноября 2016 года / Санкт-Петербургская государственная химико-фармацевтическая академия. Санкт-Петербург, 2016. С. 144-148.
3. Зайретдинова Д. Р. Холестеролоксидаза-фермент для диагностики уровня холестерина в сыворотке крови // Молодая фармация-потенциал будущего. – 2023. – С. 759-762.
4. Савельева П. Д., Колодязная В. А. Изучение условий культивирования нового продуцента фермента холестеролоксидазы // Инновации в здоровье нации. – 2019. – С. 368-371.
5. Осочук С. С. Влияние низкотемпературного хранения сыворотки крови крыс на содержание холестерина // Проблемы здоровья и экологии. – 2017. – №. 1 (51). – С. 62-66.
6. Шведене Н. В., Чернышёв Д. В., Плетнёв И. В. Ионные жидкости в электрохимических сенсорах // Российский химический журнал. – 2008. – Т. 52. – №. 2. – С. 80-91.