

**НАЦІОНАЛЬНА АКАДЕМІЯ НАУК УКРАЇНИ
ІНСТИТУТ МОЛЕКУЛЯРНОЇ БІОЛОГІЇ І ГЕНЕТИКИ**

КУЧЕРЕНКО Іван Сергійович



УДК 543.553.8+577.151.4+577.113.3+577.152.273

**РОЗРОБКА ЕЛЕКТРОХІМІЧНИХ ФЕРМЕНТНИХ БІОСЕНСОРІВ ДЛЯ ВИЗНАЧЕННЯ
КОНЦЕНТРАЦІЙ АТФ ТА АКТИВНОСТІ КРЕАТИНКІНАЗИ**

03.00.20 – біотехнологія

АВТОРЕФЕРАТ

дисертації на здобуття наукового ступеня

кандидата біологічних наук

Київ – 2017

Дисертацією є рукопис.

Роботу виконано в лабораторії біомолекулярної електроніки відділу механізмів трансляції генетичної інформації Інституту молекулярної біології і генетики НАН України та на кафедрі біохімії ННЦ «Інститут біології» Київського національного університету імені Тараса Шевченка (м. Київ).

Науковий керівник: доктор біологічних наук, професор, член-кореспондент НАН України
Солдаткін Олексій Петрович,
Інститут молекулярної біології і генетики НАН України,
завідувач лабораторії біомолекулярної електроніки.

Офіційні опоненти: доктор біологічних наук, професор
Курдиш Іван Кирилович,
Інститут мікробіології і вірусології ім. Д.К. Заболотного НАНУ,
завідувач відділу мікробіологічних процесів на твердих поверхнях;

доктор біологічних наук, доцент
Галкін Олександр Юрійович,
Національний технічний університет України «Київський політехнічний інститут імені Ігоря Сікорського»,
професор кафедри промислової біотехнології.

Захист відбудеться «25» квітня 2017 р. о 10³⁰ на засіданні спеціалізованої вченої ради Д 26.237.01 в Інституті молекулярної біології і генетики НАН України за адресою: 03143, Київ-143, вул. Академіка Заболотного, 150.

З дисертацією можна ознайомитися у бібліотеці Інституту молекулярної біології і генетики НАН України (03143, Київ-143, вул. Академіка Заболотного, 150).

Автореферат розіслано «___» березня 2017 року.

Вчений секретар
спеціалізованої вченої ради
кандидат біологічних наук, с.н.с.



І.В. Крупська

ЗАГАЛЬНА ХАРАКТЕРИСТИКА РОБОТИ

Актуальність теми. Аденозин-5'-трифосфат (АТФ) є основним джерелом енергії та її переносником в усіх живих клітинах, тому він є поширеною речовиною в будь-якому організмі. В клітинах відбувається одночасне утворення нових молекул АТФ (під час розпаду органічних речовин) та використання АТФ (під час біосинтетичних процесів). Також АТФ є одним з джерел енергії для функціонування ферментів та білків клітинної мембрани, попередником важливого вторинного посередника – циклічного аденозинмонофосфату, алостеричним регулятором низки білків тощо (Alberts et al., 2002; Weaver, 2012).

Визначення концентрацій АТФ дозволяє оцінити енергетичний стан клітин та тканин. Також, визначення АТФ може бути корисним в медицині для вивчення біохімічних процесів, в яких він бере участь, а саме: регулювання скорочення м'язів і агрегація тромбоцитів, підтримка судинного тонуусу, нейротрансмісія та регуляція діяльності нервової системи (Burnstock, 2006; Gourine et al., 2005). Перспективним є визначення концентрації АТФ у крові людини для діагностики різноманітних хвороб (Chida et al., 2013). Також визначення концентрації АТФ, що змінюється під час роботи різноманітних кіназ, можна використати для визначення активності цих кіназ, зокрема для скринінгу інгібіторів протеїнкіназ або визначення активності кіназ, які є біомаркерами захворювань. Креатинкіназа (КК) є прикладом такого біомаркерного ферменту. Вона є важливим внутрішньоклітинним ферментом, який присутній у м'язах та нейронах, проте практично відсутній в крові за нормальних умов. При пошкодженні м'язів, зокрема у випадку інфаркту міокарду, активність КК в сироватці крові значно зростає, що і дозволяє діагностувати відповідні захворювання.

Сучасні стандартні методи визначення АТФ, такі як спектрофотометрія (Kataoka et al., 1999) та рідинна хроматографія (Teerlink et al., 1993), є досить точними, але потребують наявності кваліфікованого персоналу та складного і дорогого обладнання. Ще одним недоліком наведених вище методів є необхідність складної попередньої підготовки проб для аналізу (Bergmeyer, 1984; Kawamoto et al., 1998). Біоломінесцентні методи на основі люциферази є дуже селективними та чутливими, проте вони є практично непридатними для визначення АТФ в режимі реального часу та *in vivo* через особливості їх застосування (Khlyntseva et al., 2009). Радіоізотопні методи аналізу АТФ є більш високоточними, але потенційно небезпечними для оператора (May et al., 2005). Тому сьогодні дуже актуальним є питання створення більш зручного, точного, швидкого, селективного та дешевого методу визначення вмісту АТФ в фармацевтичних препаратах та біологічних зразках.

Альтернативою можуть бути біосенсорні методи визначення АТФ. На сьогодні існує ряд лабораторних прототипів біосенсорів для визначення АТФ. Вони створені на основі рН-чутливих польових транзисторів (Gotoh et al., 1986), амперометричні скловуглецеві електроди (Wen et al., 2014), амперометричні платинові мікроелектроди (Patel et al., 2011) з нанесеними на них ферментами. Спільним недоліком даних біосенсорів є доволі складні за будовою електроди, що

збільшує їх вартість та обмежує можливості масового виробництва. Крім того, переважна більшість сучасних біосенсорів для визначення АТФ є монобіосенсорами, що базуються на каскадах ферментативних реакцій і тому чутливі, крім АТФ, до глюкози або гліцеролу (залежно від використаної ферментативної системи). Відповідно, наявність в зразку невідомої (або змінюваної у часі) концентрації цих речовин значно ускладнює визначення АТФ.

Тому актуальним завданням є створення сенсорної системи на основі двох біосенсорів, здатної селективно і точно визначати концентрацію АТФ, а також кондуктометричного біосенсора на основі планарних електродів та одного ферменту гексокінази, який був би простішим за будовою та використанням у порівнянні з існуючими біосенсорами. Також важливим було використання розробленої біосенсорної системи для аналізу активності КК в сироватці крові з метою визначення даного біомаркерного ферменту.

Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами. Дисертаційна робота виконувалась на кафедрі біохімії ННЦ «Інституту біології» Київського національного університету імені Тараса Шевченка (м. Київ) та в лабораторії біомолекулярної електроніки Інституту молекулярної біології і генетики НАН України в рамках проектів «Розробка електрохімічних моно- та мультисенсорів для визначення основних метаболітів крові: метрологічне забезпечення та дослідна експлуатація» комплексної науково-технічної програми НАН України «Сенсорні прилади для медико-екологічних та промислово-технологічних потреб: метрологічне забезпечення та дослідна експлуатація» (№ держ. реєстрації 0113U002509, 2013-2017 рр.) та «Розроблення і створення методів іммобілізації ферментів на поверхню мультиперетворювачів» Державної цільової науково-технічної програми розроблення і створення сенсорних наукоємних продуктів (№ держ. реєстрації 0114U000680, 2014-2017 рр.). Частина роботи була також виконана в рамках міжнародного проекту «Integrated nanodevices» 7-ої рамочної програми ЄС (PIRSES-GA-2012-318524, 2013-2015 рр.).

Мета і задачі дослідження. Мета дисертаційної роботи полягала у розробці ферментних електрохімічних біосенсорів та біосенсорної системи для визначення концентрації АТФ та активності КК, а також дослідження їх ефективності при аналізі широкого спектру зразків.

Для досягнення поставленої мети необхідно було вирішити наступні задачі:

1. Дослідити аналітичні характеристики амперометричних перетворювачів за допомогою потенціостату PalmSens та його вітчизняного аналогу.

2. Розробити амперометричний біосенсор для визначення АТФ на основі глюкозооксидази та гексокінази.

3. Перевірити можливість уніфікації умов роботи розробленого АТФ-чутливого біосенсора з біосенсором для визначення глюкози та створити на їх основі біосенсорну систему для одночасного визначення АТФ та глюкози в тому самому зразку.

4. Дослідити можливість біосенсорного визначення активності КК за швидкістю продукування нею АТФ та провести аналіз її активності в сироватці крові.

5. Розробити кондуктометричний біосенсор для визначення АТФ на основі одного ферменту гексокінази.

Об'єкт дослідження: ферментативний гідроліз АТФ та окиснення глюкози в модельних та фармацевтичних зразках, що супроводжується утворенням пероксиду водню і зміною провідності; визначення активності креатинкінази в біологічних зразках.

Предмет дослідження: амперометричні і кондуктометричні ферментні біосенсори для аналізу АТФ та глюкози в фармацевтичних препаратах та біологічних зразках.

Методи дослідження: електрохімічні та біохімічні методи дослідження ферментативних реакцій, амперометричний та кондуктометричний методи, методи ковалентної іммобілізації ферментів, статистичний аналіз.

Наукова новизна одержаних результатів. Вперше розроблено кондуктометричний ферментний біосенсор на основі гексокінази для визначення глюкози та АТФ (патент України №112141, 2016) і досліджено його основні аналітичні характеристики. Розроблено амперометричний двоферментний біосенсор на основі глюкозооксидази та гексокінази та досліджено його аналітичні характеристики. Вперше запропоновано біосенсорну систему на основі двох біосенсорів для точного та одночасного визначення АТФ та глюкози. Вперше проведено одночасне визначення невідомих концентрацій АТФ та глюкози в комерційних фармацевтичних препаратах з використанням розробленої біосенсорної системи і показано високу кореляцію отриманих результатів із номінальними, заявленими виробником, концентраціями даних речовин. Розроблено процедуру визначення активності КК за допомогою запропонованого амперометричного біосенсора і проведено визначення активності КК в сироватці крові.

Практичне значення одержаних результатів. Створено лабораторні зразки монобіосенсорів та біосенсорної системи на основі амперометричних перетворювачів та іммобілізованих ферментів, призначені для кількісного аналізу вмісту АТФ і глюкози та активності КК в біологічних зразках.

Вперше розроблено кондуктометричний ферментний біосенсор для кількісного визначення АТФ у водних розчинах.

Запропоновано методологію використання біосенсорної системи для одночасного визначення концентрації глюкози та АТФ у сумішах і продемонстровано ефективність біосенсорної системи при роботі з фармацевтичними препаратами.

Розроблені монобіосенсори та біосенсорна система можуть бути ефективно використані при створенні комерційних біоаналітичних систем для контролю якості лікарських препаратів, а також для клінічної лабораторної діагностики.

Особистий внесок здобувача. Дисертантом спільно з науковим керівником обговорено та сформульовано програму проведення досліджень, відібрано методи розв'язання поставлених завдань та самостійно виконано викладені в роботі експерименти. У процесі написання дисертаційної роботи автором самостійно проаналізовано наукову літературу за темою дослідження та підготовлено огляд

літератури. Здобувач здійснював разом із співавторами підготовку до друку статей у профільних наукових журналах, патенту та тез доповідей.

Дисертантом самостійно розроблено лабораторні зразки амперометричних та кондуктометричних біосенсорів, досліджено та вдосконалено їхні основні аналітичні характеристики, оптимізовано методику визначення глюкози та АТФ у сумішах. Частина експериментальних досліджень із визначення оптимальних умов функціонування біоселективних елементів на основі іммобілізованих глюкозооксидази та гексокінази виконано в тісному співробітництві з к.б.н, с.н.с О.О. Солдаткіним та асп. Д.Ю. Кучеренко, яким здобувач щиро вдячний за співпрацю та надану допомогу. Також здобувач вдячний французьким колегам з Інституту аналітичних наук м. Ліон Флоранс Лагард (Florence Lagarde) та Ніколь Жаффрезік-Рено (Nicole Jaffrezic-Renault), які допомагали йому під час стажувань у їх лабораторії. Обговорення та аналіз результатів дослідження проведено з науковим керівником д.б.н., професором, членом-кореспондентом НАН України О.П. Солдаткіним та д.б.н., професором С.В. Дзядевичем, яким здобувач висловлює щиро подяку.

Апробація результатів дисертації. Результати досліджень були представлені на 6-тій Міжнародній науково-технічній конференції «Сенсорна електроніка та мікросистемні технології» (СЕМСТ-6) (Одеса, Україна, 2014); Міжнародній конференції «Journée de Printemps de la SCF en Rhône Alpes» (Вілльербан, Франція, 2015); V Всеукраїнській науково-практичній конференції студентів, аспірантів та молодих вчених «Біотехнологія: звершення та надії» (Київ, Україна, 2016).

Публікації. Матеріали дисертації опубліковано у 6 наукових статтях у фахових журналах та тезах 3 доповідей на наукових конференціях, захищено 1 патентом на винахід України.

Структура та обсяг дисертації. Дисертація складається із вступу, огляду літератури, матеріалів та методів, результатів досліджень та їх обговорення, аналізу і узагальнення результатів досліджень, висновків, переліку використаних джерел, який охоплює 123 найменувань. Роботу викладено на 124 сторінках машинописного тексту та проілюстровано 41 рисунком та 11 таблицями.

ОСНОВНИЙ ЗМІСТ РОБОТИ

Матеріали і методи дослідження. В роботі використовували такі реактиви: глюкозооксидаза із *Aspergillus niger* (ГОД, КФ 1.1.3.4) з активністю 272 од.акт./мг фірми «Genzyme» (Великобританія); гексокіназа із *Saccharomyces cerevisiae* (ГЕК, КФ 2.7.1.1) з активністю 30,6 од.акт./мг фірми «Sigma-Aldrich» (США); КК із м'язів кроля (КФ 2.7.3.2) з активністю 32 од.акт./мг виробництва фірми «Serva Feinbiochemica» (Німеччина); бичачий сироватковий альбумін (БСА, фракція V), АТФ, аденозиндифосфат (АДФ), креатинфосфат, гліцерол, аскорбінова кислота, м-фенілендіамін, та 25 %-й водний розчин глутарового альдегіду (ГА) фірми «Sigma-Aldrich» (США). Усі інші реактиви, що використовувались у роботі, були вітчизняного і закордонного виробництва та мали кваліфікацію "ос. ч." та "х. ч.".

Зразки сироватки крові людей для досліджень на вміст КК були люб'язно надані Київським міським науково-практичним центром нефрології та гемодіалізу.

В роботі як амперометричні перетворювачі використовували платинові дискові електроди власного виготовлення (рис. 1), планарні нікелеві електроди та кондуктометричні перетворювачі на основі золотих гребінчастих електродів (рис. 2), виготовлені згідно наших рекомендацій в Інституті фізики напівпровідників імені В.Є. Лашкарьова НАН України (м. Київ, Україна). На амперометричні перетворювачі перед іммобілізацією ферментів наносили полімерну мембрану на основі поліфенілендіаміну, яка практично усувала вплив інтерферуючих речовин на роботу біосенсора.

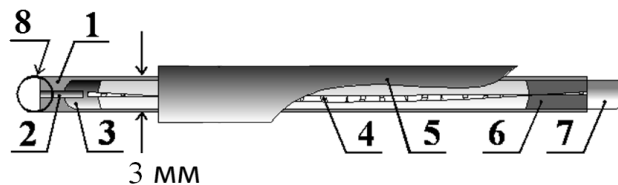


Рис. 1. Схематичне зображення амперометричного перетворювача на основі платинового дискового електроду: 1) скляна трубка; 2) платиновий дріт; 3) сплав Вуда; 4) мідний дріт; 5) захисне покриття; 6) епоксидна смола; 7) контактна площадка; 8) чутлива область

В роботі використовувалась триелектродна схема амперометричного аналізу. Робочі амперометричні електроди, допоміжний електрод (з платинового дроту) та електрод порівняння (Ag/AgCl) підключались до потенціостату PalmSens (Нідерланди). 8-ми канальний пристрій (CH-8 multiplexer, Palm Instruments BV, Нідерланди), що підключався до потенціостату, дозволяв отримувати сигнали одночасно з 8 робочих електродів. Також, на першому етапі роботи, використовувався потенціостат українського виробництва, який був розрахований на роботу з 4-ма робочими електродами. Виміри проводили за кімнатної температури у відкритій вимірювальній комірці об'ємом 3,5 мл при постійному перемішуванні та при постійному потенціалі +0,6 В відносно Ag/AgCl електрода порівняння.

У випадку кондуктометричного аналізу, перетворювачі були під'єднані до портативного приладу для кондуктометричних вимірювань розміром 9,5 см x 2,5 см x 13,5 см, що був виготовлений в Інституті електродинаміки НАН України. Цей прилад генерував синусоїдальний потенціал з частотою 36,5 кГц та амплітудою 14 мВ, що дозволяло уникати таких ефектів, як фарадеєвські процеси, зарядження подвійного шару та поляризація мікроелектродів. Завдяки використанню в роботі диференційного режиму вимірювань, всі неспецифічні зміни вихідного сигналу, пов'язані з коливаннями температури, рН середовища, електричними завадами, були практично зведені нанівець.

Біоселективні елементи біосенсорів формували шляхом іммобілізації ферментів на поверхні амперометричних або кондуктометричних перетворювачів методом поперечної зшивки ферментів з БСА глутаровим альдегідом (Soldatkin et al., 2009). Для цього розчини ферментів змішували з розчином глутарового

альдегіду та наносили на чутливі ділянки перетворювачів. Після цього перетворювачі на певний час залишали на повітрі за кімнатної температури, і глутаровий альдегід формував ковалентні зв'язки з аміногрупами в складі ферментів та БСА, що і призводило до іммобілізації ферментів.

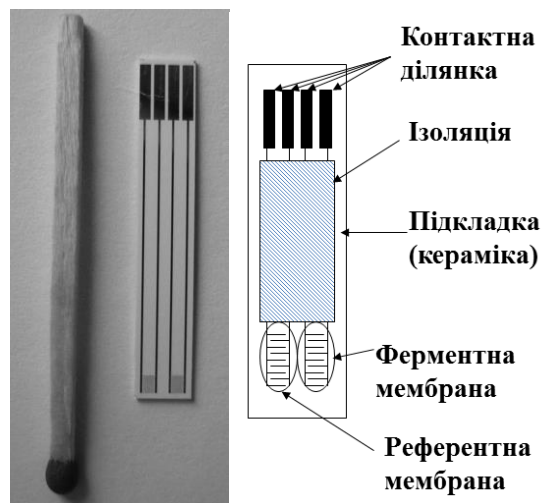


Рис. 2. Фотографія та схематичне зображення кондуктометричного перетворювача на основі золотих гребінчастих електродів

За допомогою розроблених біоселективних елементів проводили визначення концентрації АТФ та глюкози у фармацевтичних зразках, а також визначали активність КК в зразках сироватки крові.

Вимірювання концентрацій АТФ та глюкози у фармацевтичних зразках за допомогою амперометричних біосенсорів проводили у 25 мМ НЕРЕС буфері з рН 7,4, що містив 2 мМ Mg^{2+} , за кімнатної температури у відкритому об'ємі з інтенсивним перемішуванням. Визначення концентрацій речовин проводили за калібрувальною кривою, а також методом стандартних додавань. Вимірювання активності КК проводили в 10 мМ НЕРЕС буфері, рН 7,4, з 1 мМ АДФ, 10 мМ креатинфосфату та 10 мМ Mg^{2+} , за постійного потенціалу +0,6 В відносно $Ag/AgCl$ електроду порівняння. Визначення активності КК проводили за калібрувальною кривою.

Графічну та статистичну обробку результатів досліджень здійснювали за допомогою програм OriginLab Origin та Microsoft Excel.

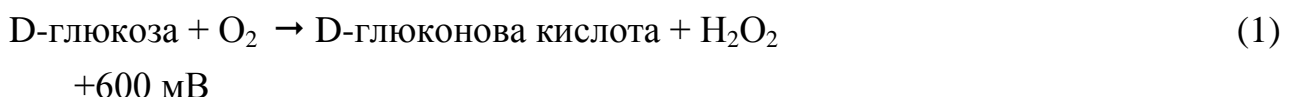
Результати та їх обговорення. Дослідження аналітичних характеристик амперометричних перетворювачів за допомогою потенціостату PalmSens та його вітчизняного аналогу. В роботі було проведено дослідження характеристик нікелевих перетворювачів при вимірюванні перекису водню та глюкози із використанням двох потенціостатів. Аналітичні характеристики визначення цих речовин обома потенціостатами в більшості випадків були майже однаковими. Потенціостат українського виробництва поступався потенціостату PalmSens лише за деякими параметрами: шум сигналу, межа визначення речовин, похибка вимірювання глюкози. В цілому, в роботі було продемонстровано, що потенціостат українського виробництва є більш дешевою альтернативою потенціостату PalmSens для використання його у біосенсоріці. Характеристик вітчизняної розробки цілком

достатньо для виконання більшості задач по розробці біосенсорів. Властивості нікелевих амперометричних перетворювачів теж були цілком прийнятні для створення на їх основі біосенсорів. Втім, зважаючи на кращі характеристики потенціостату PalmSens, зокрема чутливість, було вирішено використати саме його для розробки біосенсорів на наступних етапах роботи, оскільки необхідно було досягти мінімальної межі визначення досліджуваних речовин. Також, в подальшій роботі було використано дискові платинові електроди замість планарних нікелевих електродів, оскільки платинові електроди мали кращу чутливість до перекису водню (приблизно в 10 разів), хоча і були дорожчими і складнішими у виготовленні. При комерційному ж виготовленні біосенсорів цілком можливо використовувати нікелеві мультиелектроди, поступаючись деякими характеристиками біосенсорів на їх основі.

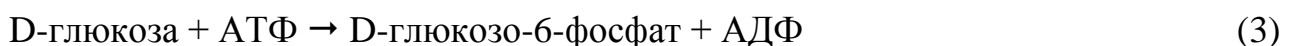
Розробка ферментного амперометричного монобіосенсора для визначення АТФ та створення біосенсорної системи для одночасного визначення АТФ та глюкози в тому самому зразку. Електрохімічні ферментні біосенсори для визначення АТФ, зокрема амперометричні, мають низку переваг перед традиційними методами визначення АТФ: біосенсори можуть бути використані для детекції змін концентрації АТФ в режимі реального часу або імплантовані у живі тканини у вигляді мікробіосенсорів. Крім того, біосенсори прості у використанні, експресні, високочутливі і, за масового виробництва, мають низьку вартість. Проте недоліками АТФ-чутливих біосенсорів є чутливість не тільки до АТФ, а і до інших речовин – глюкози або гліцеролу, залежно від використаної ферментної системи. Це викликано обмеженим вибором ферментів, що можна включати до складу біосенсорів. Перспективним напрямком для усунення даного недоліку є створення біосенсорних систем та мультибіосенсорів, в яких один з біосенсорів є чутливим до АТФ та глюкози (або АТФ та гліцеролу), а другий біосенсор є чутливим лише до одної речовини – глюкози або гліцеролу. Тому розробка біосенсорної системи для одночасного визначення АТФ та глюкози була однією з задач дисертаційної роботи. Відповідно, на першому етапі роботи була проведена розробка монобіосенсорів, які в подальшому були об'єднані в біосенсорну систему.

В основі роботи амперометричних біосенсорів для визначення АТФ та глюкози лежать ферментативні реакції, що одночасно протікають в біоселективній мембрані, а також реакція розкладу перекису водню на електроді, яка протікає при прикладанні необхідного потенціалу і безпосередньо реєструється вимірювальною установкою за допомогою амперометричного перетворювача:

ГОД



ГЕК



Біосенсор для визначення глюкози містить в складі свого біоселективного елементу лише один фермент – глюкозооксидазу (ГОД) і при наявності в розчині глюкози відбувається її окиснення (реакція 1) і утворення перекису водню. Останній розкладається на поверхні робочого електроду при прикладанні потенціалу (реакція 2) на два іони гідрогену, кисень та два електрони, які і генерують відгук біосенсора.

Біосенсор для визначення АТФ містить в своєму біоселективному елементі два ферменти – ГОД та гексокіназу (ГЕК). За наявності в розчині глюкози і відсутності АТФ, в біоселективній мембрані біосенсора задіяна лише ГОД, тому відбуваються реакції (1) та (2). Відгук біосенсора в цьому випадку пропорційний концентрації глюкози. Після додавання до робочого розчину АТФ, в мембрані починається реакція (3) за участю гексокінази (ГЕК), яка зменшує локальну концентрацію глюкози і, як наслідок, відгук біосенсора на глюкозу зменшується пропорційно концентрації АТФ. Було підібрано оптимальні умови іммобілізації ферментів в складі біоселективних елементів біосенсорів. Оптимальна концентрація ГОД та ГЕК в біоселективних елементах при іммобілізації становила 2-2,5 %, БСА – 3 %, глутарового альдегіду (зшиваючого агенту) – 0,2 %. Оптимальний час іммобілізації ферментів становив 40 хв.

В роботі досліджено основні аналітичні характеристики обох розроблених біосенсорів – такі, як чутливість, селективність, відтворюваність сигналу біосенсорів та їх стабільність при зберіганні за різних умов, залежність величин сигналів біосенсорів від складу робочого буферу. Інтерференція від електроактивних речовин була практично відсутня завдяки використанню напівпроникної мембрани на основі поліфенілендіаміну. Було підібрано оптимальну концентрацію в робочому буфері іонів магнію (необхідних для роботи ГЕК), яка становила 2 мМ. Типові калібрувальні криві біосенсора на основі ГОД та ГЕК для визначення глюкози та АТФ наведені на рис. 3.

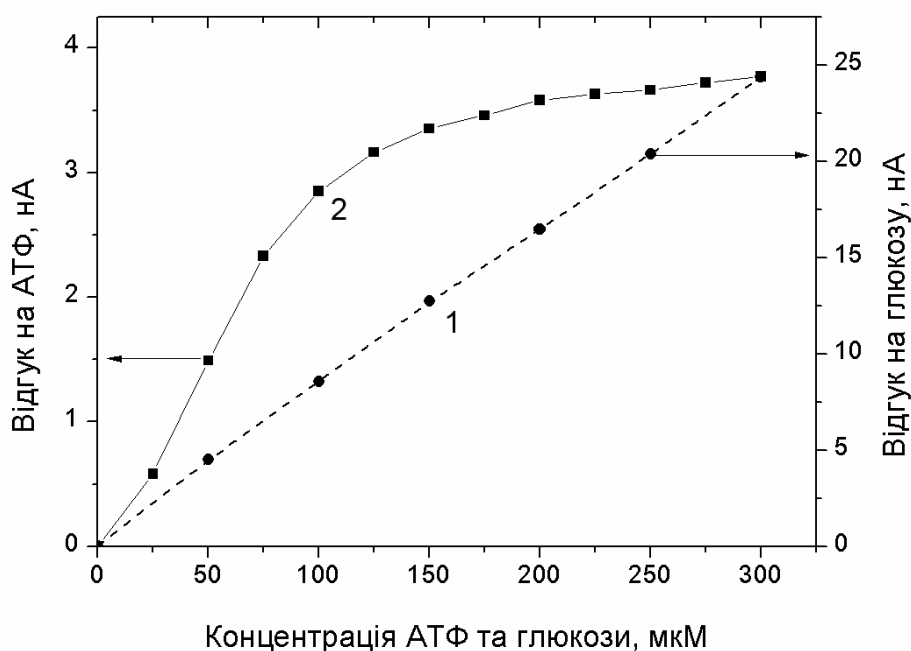


Рис. 3. Калібрувальні криві біосенсора на основі ГОД та ГЕК для визначення глюкози (1) та АТФ (2). Концентрація глюкози, за якої будували калібрувальну криву для визначення АТФ – 50 мкМ

За оптимальних умов (25 мМ НЕРЕС, рН 7,4, 2 мМ Mg^{2+}), аналітичні характеристики біосенсора на основі ГОД та ГЕК були наступні: мінімальна межа вимірювання АТФ становила 5 мкМ, лінійний діапазон визначення АТФ складав від 15 мкМ до 100 мкМ, чутливість до АТФ становила 25 – 35 нА/мМ. За таких же умов, мінімальна межа вимірювання глюкози становила 1 мкМ, лінійний діапазон роботи біосенсорів – від 10 мкМ до 2-2,3 мМ, чутливість становила 100–140 нА/мМ. Характеристики біосенсора для визначення глюкози на основі ГОД практично не відрізнялися від характеристик біосенсора на основі ГОД та ГЕК, що свідчить про відсутність суттєвого впливу ГЕК на роботу ГОД.

Також вивчено відтворюваність відгуків біосенсорів на глюкозу і АТФ впродовж дня (відносно середньоквадратичне відхилення відгуків на глюкозу становило 3-6 %, а відгуків на АТФ – 8-12 %).

Отримані характеристики монобіосенсорів були цілком задовільними для поєднання монобіосенсорів у біосенсорну систему.

На наступному етапі роботи було включено розроблені монобіосенсори у єдину біосенсорну систему, схема якої наведена на рис. 4. Обидва біосенсори були занурені в одну робочу комірку разом з електродом порівняння та допоміжним електродом і підключені до потенціостату через мультиплексор, який дозволяв одночасно працювати з кількома біосенсорами.



Рис. 4. Схема біосенсорної системи на основі двох біосенсорів для одночасного визначення концентрації глюкози та АТФ

В результаті проведених досліджень вперше розроблена високочутлива селективна біосенсорна система з використанням іммобілізованих ГОД і ГЕК, а також дискових платинових електродів як перетворювачів біохімічного сигналу в електричний для одночасного аналізу АТФ і глюкози в водних зразках. Отримані біоселективні елементи біосенсорної системи показали високу чутливість до своїх субстратів, час проведення аналізу 2 – 3 хв, а час відгуків – менше 30 с. На рис. 5 приведено приклад роботи біосенсорної системи при додаванні спочатку 50 мкМ

глюкози, а потім 100 мкМ АТФ. З рисунку видно висока швидкість відгуків біосенсорної системи, а також відсутність реакції біосенсора на основі ГОД на додавання до робочої комірки АТФ.

Відпрацьовано уніфіковану методику визначення концентрацій АТФ і глюкози в сумішах. Дана методика полягала в наступному: попередньо до проведення аналізу отримували калібрувальні криві біосенсорів для визначення глюкози та АТФ. Після цього біосенсори відмивали, змінюючи кілька разів робочий буфер у комірці, та додавали до робочої комірки зразок з невідомими концентраціями АТФ та глюкози. Отримували відгуки біосенсорної системи після додавання зразку та за калібрувальною кривою біосенсора на основі ГОД визначали концентрацію глюкози, після чого за калібрувальною кривою біосенсора на основі ГОД та ГЕК вираховували, яким мав би бути відгук даного біосенсора на глюкозу за відсутності АТФ. Різниця між обрахованим і реальним відгуком біосенсора і була відгуком на АТФ, який порівнювали з калібрувальною кривою, яку було отримано попередньо за близької концентрації глюкози, і вираховували концентрацію АТФ у досліджуваному зразку.

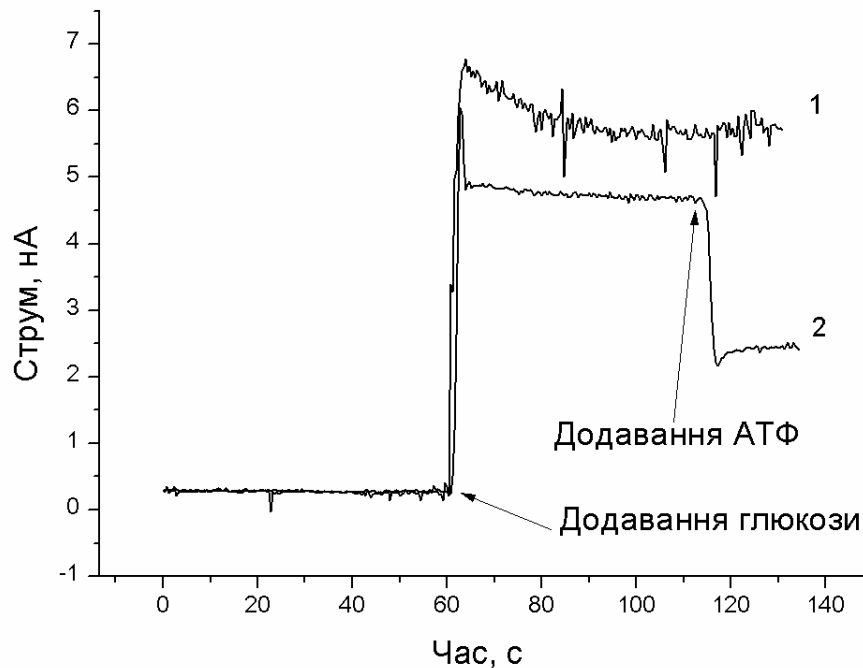


Рис. 5. Типові відгуки біосенсорної системи (1 – біосенсор для визначення глюкози, 2 – біосенсор для визначення глюкози та АТФ) при додаванні до робочої комірки глюкози (50 мкМ) та АТФ (100 мкМ). Вимірювання проводились у 25 мМ НЕРЕС буфері, рН 7,4, 2 мМ Mg^{2+} , за постійного потенціалу +0,6 В відносно $Ag/AgCl$ електрода порівняння

Ефективність методики продемонстровано при визначенні АТФ та глюкози в фармацевтичних препаратах. В табл. 1 наведені результати вимірювань вмісту АТФ та глюкози в розчинах для внутрішньом'язового введення, які були змішані в різних пропорціях, щоб отримати різні концентрації АТФ та глюкози. В таблиці подано середнє значення вимірів трьома біосенсорами, відхилення якого від номінальних концентрацій АТФ та глюкози не перевищувало 20 %.

Результати біосенсорного вимірювання концентрацій АТФ та глюкози у їхніх сумішах. Біосенсорні вимірювання були повторені 3 рази та подано середнє значення вимірювань \pm стандартне відхилення

	Суміш №1		Суміш №2		Суміш №3	
	Глюкоза, мМ	АТФ, мМ	Глюкоза, мМ	АТФ, мМ	Глюкоза, мМ	АТФ, мМ
Номінальна концентрація	2,5	5	10	10	1	2,5
Виміряна концентрація	$2,7 \pm 0,1$	$4,2 \pm 0,4$	$11,7 \pm 0,4$	$8,8 \pm 0,8$	$1,2 \pm 0,1$	$2,7 \pm 0,2$

Результати демонструють, що розроблена біосенсорна система є придатною для надійних вимірів зразків, що містять суміш АТФ та глюкози, що і було головною метою цієї частини роботи.

Дослідження можливості біосенсорного визначення активності КК за швидкістю продукування нею АТФ та проведення аналізу її активності в сироватці крові. Детектування утворення або споживання АТФ у водних розчинах за допомогою біосенсора є перспективною методикою для біохімічних досліджень, що вивчають процеси за участю АТФ. Крім того, на основі біосенсорних даних можливе визначення активності ферментів, що продукують чи споживають АТФ у робочій комірці. В першій частині дисертаційної роботи вже було розроблено АТФ-чутливий біосенсор на основі ГОД та ГЕК, тому в другій частині роботи було відпрацьовано методику біосенсорного визначення активності АТФ-продукуючого ферменту на прикладі КК. Даний фермент є поширеним у м'язовій тканині, проте є майже відсутнім у крові. Висока активність даного ферменту в сироватці крові є показником ушкодження м'язової тканини (в першу чергу міокарду), тому даний біосенсор можливо використовувати при діагностиці інфаркту міокарду.

Визначення активності КК базується на вимірюванні швидкості продукування АТФ у робочій комірці за допомогою біосенсора, чутливого до АТФ. Під час вимірювання в робочу комірку додається глюкоза та АТФ, внаслідок чого утворюється пероксид водню та генерується відгук біосенсора. Після додавання КК та її субстратів до робочої комірки відбувається реакція (4), що супроводжується утворенням (накопиченням) нових молекул АТФ через фосфорилування АДФ. Це приводить до зменшення відгуку біосенсора пропорційно швидкості утворення АТФ. Для обрахунків активності КК визначали зменшення відгуку біосенсора протягом 100 с після додавання обох субстратів КК (АДФ та креатинфосфату). Слід відзначити, що КК також каталізує зворотну реакцію (утворює АДФ та

креатинфосфат з АДФ та креатину), проте оптимальне значення рН для даної реакції складає 9,0. На біосенсорне визначення КК зворотня реакція не впливає.



КК має два субстрати – АДФ та креатинфосфат. Тому було важливо визначити оптимальні концентрації цих речовин для біосенсорного визначення активності КК (рис. 6 та рис. 7). Було показано, що оптимальна концентрація АДФ у розчині є 1 мМ, а креатинфосфату – 10 мМ. Залежність сигналу біосенсора на КК при різних концентраціях субстратів визначали для трьох концентрацій КК: 0,013 од.акт./мл, 0,038 од.акт./мл та 0,1 од.акт./мл; у випадку 20-кратного розведення зразку, ці концентрації відповідали рівню КК, збільшеному в 1,5, 4,5, та 12 разів, що відповідає всьому діапазону концентрацій КК при м'язових патологіях.

Встановлено оптимальний ступінь розведення зразків сироватки крові в електрохімічній комірці. Для цього, було використано умовний зразок, що містив 5,0 мМ глюкозу і 0,35 од.акт./мл КК, що є вдвічі більшим за нормальну концентрацію КК у сироватці крові чоловіків. Його додавали у комірку із розведенням від 6,7 разів до 50 разів і визначали швидкість зменшення відгуку біосенсора на глюкозу після додавання АДФ та креатинфосфату. Згідно з отриманими результатами, найкращим можна вважати розведення проби в 20 разів (1:20), коли зменшення сигналу внаслідок продукування АТФ є достатнім для реєстрації біосенсором, а вплив складових зразку на роботу біосенсора буде невеликим через значне розведення.

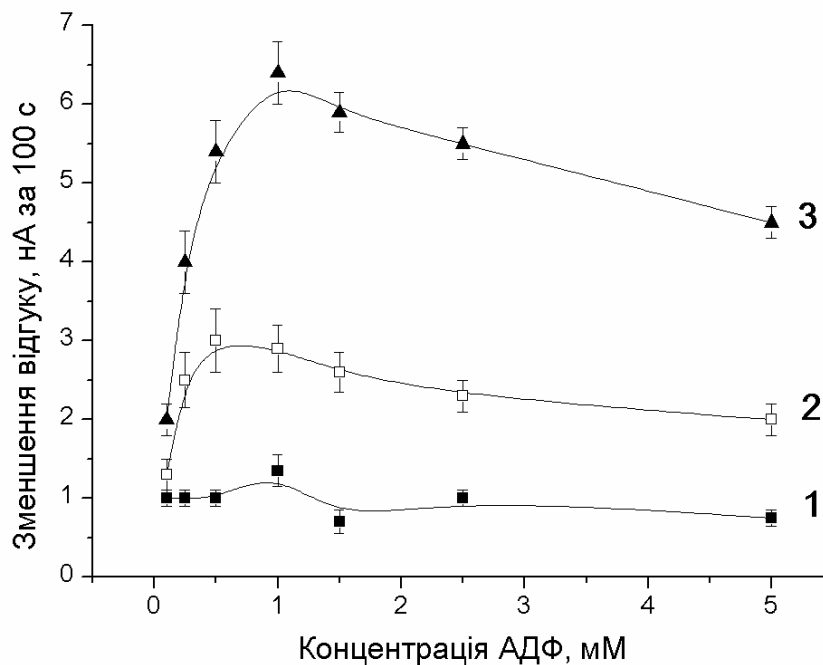


Рис. 6. Вплив концентрації АДФ на біосенсорне визначення активності КК (1 – 0,013 од.акт./мл, 2 – 0,038 од.акт./мл, 3 – 0,1 од.акт./мл). Вимірювання проводили в 10 мМ НЕРЕС буфері, рН 7,4, з 10 мМ креатинфосфатом та 10 мМ Mg^{2+} , за постійного потенціалу +0,6 В відносно Ag/AgCl електроду порівняння

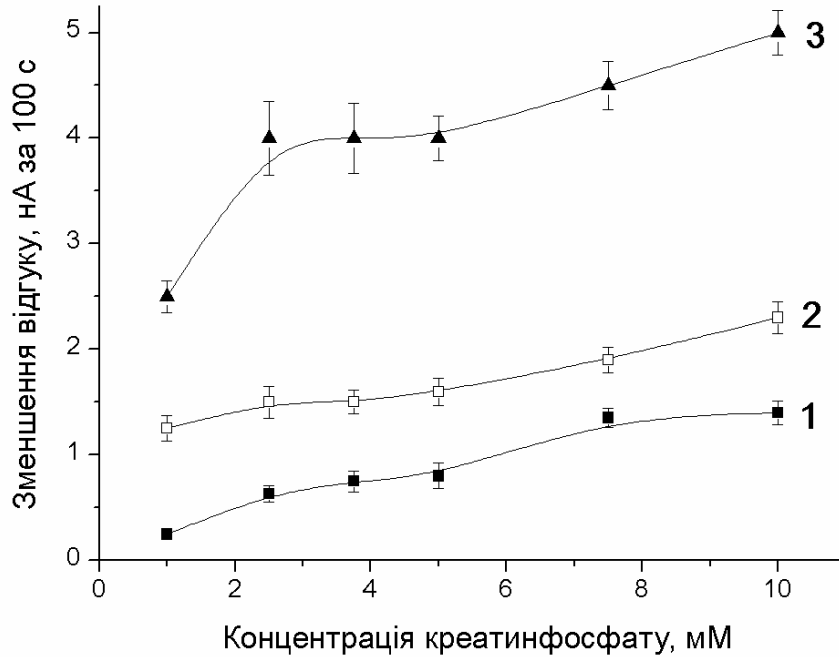


Рис. 7. Вплив концентрації креатинфосфату на біосенсорне визначення активності КК (1 – 0,013 од.акт./мл, 2 – 0,038 од.акт./мл, 3 – 0,1 од.акт./мл)

Оскільки біосенсор був чутливим до глюкози (через наявність ГОД в складі біоселективного елементу), необхідно було отримати калібрувальні криві для визначення активності КК за різних концентрацій глюкози, які можуть бути в реальних зразках після 20-кратного розведення (рис. 8).

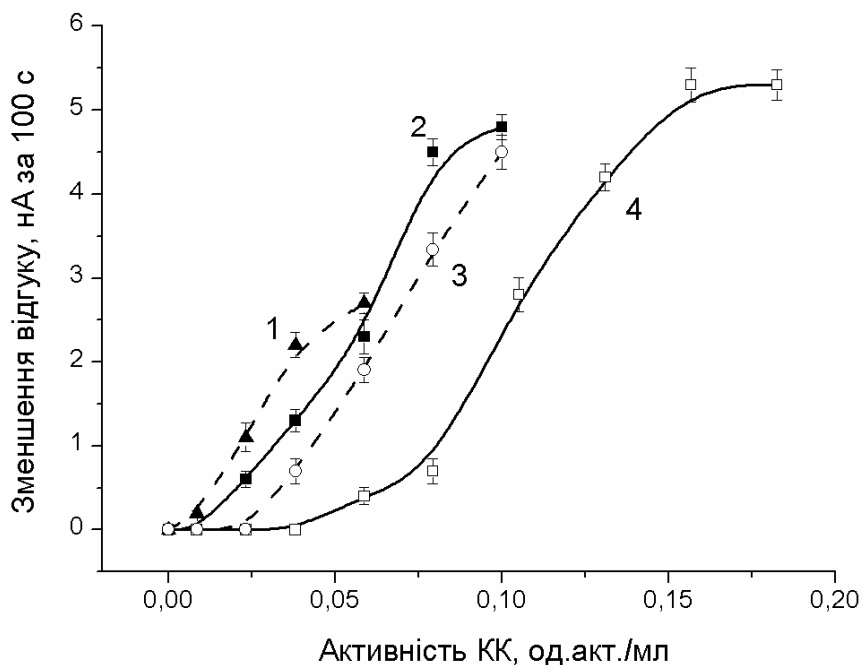


Рис. 8. Калібрувальні криві для визначення активності КК, отримані за різних концентрацій глюкози у вимірювальній комірці (1 – 0,1 мМ, 2 – 0,25 мМ, 3 – 0,5 мМ, 4 – 0,75 мМ) Вимірювання проводили в 10 мМ НЕРЕС буфері, рН 7,4, який містив 1 мМ АДФ, 10 мМ креатинфосфату та 10 мМ Mg^{2+} , за постійного потенціалу +0,6 В відносно Ag/AgCl електроду порівняння

Як видно з рисунку, чутливість біосенсора до КК зменшувалась із збільшенням концентрації глюкози, що пояснюється зміною чутливості біосенсора до АТФ. При концентраціях глюкози 0,1 мМ – 0,5 мМ можна було вимірювати активності КК від 0,01 од.акт./мл до 0,1 од.акт./мл. При концентрації глюкози 0,75 мМ чутливість біосенсора зменшувалась, і діапазон вимірювання КК зміщувався у бік більш високих концентрацій (0,06 од.акт./мл – 0,16 од.акт./мл). Таким чином, чутливості біосенсора було достатньо для того, щоб визначити, наскільки підвищений рівень КК у зразку при 20-кратному розведенні.

Для перевірки ефективності роботи біосенсора були приготовлені зразки сироватки крові з доданою КК (0,12 од.акт./мл, 0,26 од.акт./мл, 0,65 од.акт./мл, та 0,76 од.акт./мл). Результати вимірювання активності КК, отримані біосенсором, цілком співпали з доданими активностями даного ферменту з похибкою вимірювання 20-25 %. Приклад роботи біосенсора під час вимірювання активності КК наведено на рис. 9.

Крім того, біосенсор був протестований протягом тривалих вимірювань сироватки крові. Після двочасової інкубації біосенсора у 20-кратно розбавленій сироватці спостерігалось зменшення відгуків на глюкозу на 10 %. Це ймовірно викликалося взаємодією біоселективної мембрани біосенсора з компонентами сироватки (наприклад, протеолітичними ферментами). Біосенсор був придатний для 7-10 послідовних вимірювань без значних змін аналітичних характеристик, але після цього біосенсор має бути recalібровано.

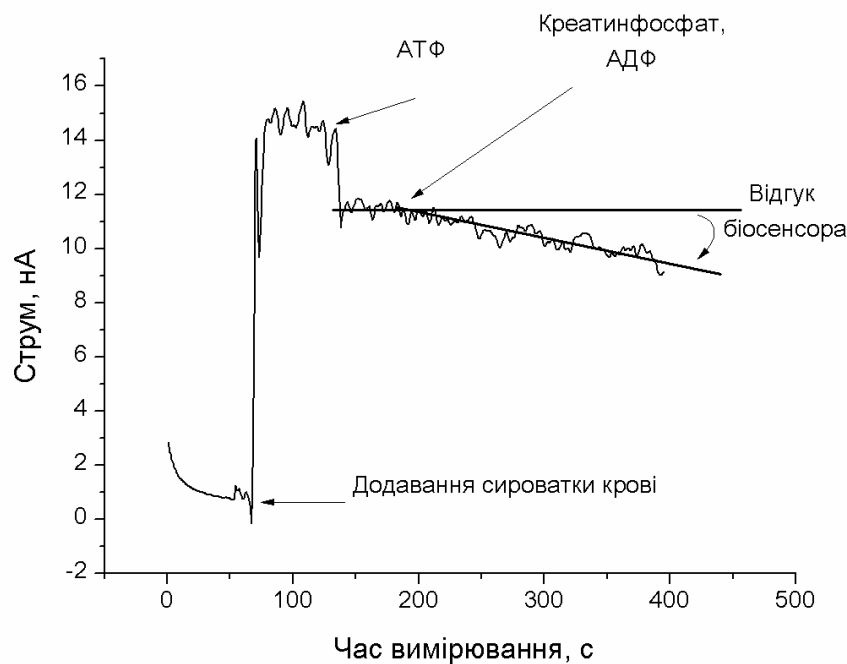


Рис. 9. Типовий відгук біосенсора, отриманий при аналізі активності КК в сироватці крові. Послідовність додавання речовин до робочої комірки вказано на рисунку. Концентрація АТФ у робочій комірці після додавання складала 300 μ М, креатинфосфату – 10 мМ, АДФ – 1 мМ

Активності КК, що були додані до сироватки крові, були в діапазоні концентрацій як для здорових людей, так і для хворих на інфаркт міокарду. Отже,

як свідчать результати наших досліджень, запропонована біосенсорна методика визначення активності КК за швидкістю продукування нею АТФ може бути ефективним інструментом для підтвердження діагнозу інфаркту міокарду. Описана методика визначення активності КК також може бути адаптована для визначення інших кіназ як у клінічних, так і у дослідних цілях.

Розробка кондуктометричного біосенсора для визначення АТФ. Описані в літературі, включно з розробленими в даній роботі, АТФ-чутливі біосенсори базуються на потенціометричному або амперометричному методах вимірювань. Кондуктометричний метод має деякі переваги перед ними, такі як простота будови та дешевизна перетворювачів, проте біосенсорів для визначення АТФ не було розроблено. Тому на завершальному етапі досліджень вперше була поставлена задача розробити кондуктометричний ферментний біосенсор для визначення АТФ та глюкози. В основі його роботи лежала ферментативна реакція, каталізована одним ферментом, гексокіназою (реакція 3), що був іммобілізованим на поверхні гребінчастого кондуктометричного перетворювача. Ця реакція призводить до появи двох нових заряджених речовин (АДФ та фосфорильованої глюкози), внаслідок чого змінюється провідність розчину та генерується відгук біосенсора. Загальна схема вимірювальної установки з біосенсором наведена на рис. 10.

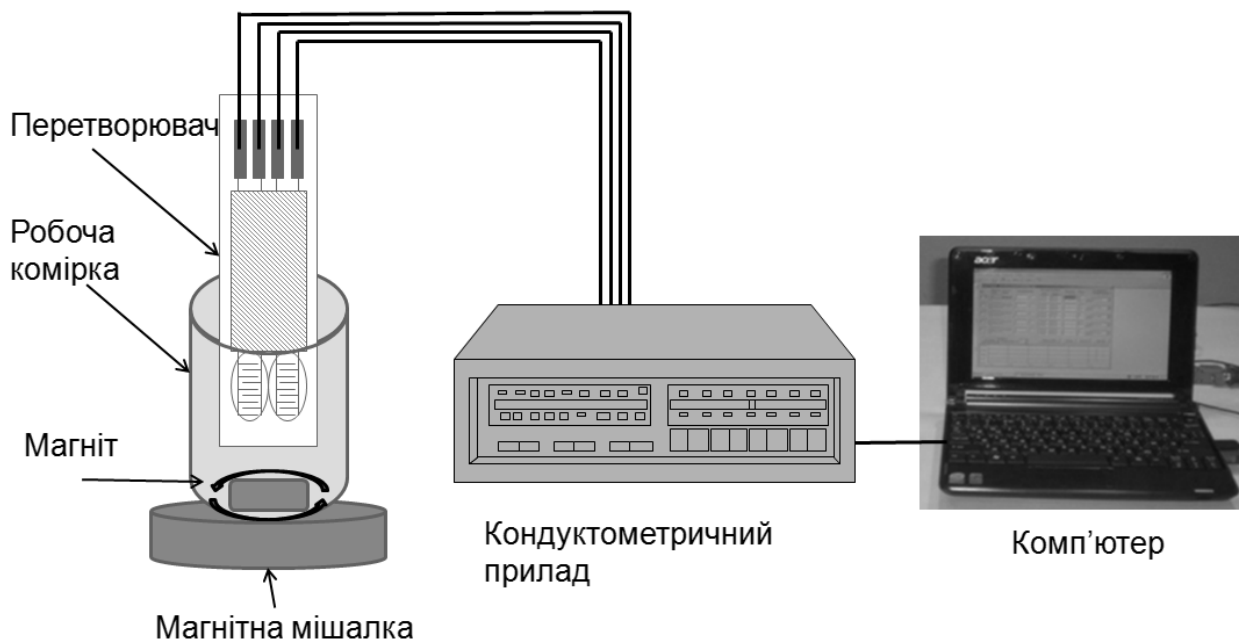


Рис. 10. Схема вимірювальної установки для кондуктометричних вимірювань

Було досліджено оптимальні умови іммобілізації ГЕК на поверхні перетворювача; найкращі результати було отримано при змішуванні розчину 10 % ГЕК, 5 % БСА і 10 % гліцеролу з 0,5 % глутаровим альдегідом і тривалості іммобілізації 30 хв. Оскільки АТФ є зарядженою речовиною, а реальні зразки можуть містити різноманітні іони, була розроблена двоетапна процедура аналізу (рис. 11). Вона полягала в послідовному додаванні зразку, що містив АТФ (заряджену молекулу), після чого мав місце неспецифічний відгук (швидка зміна провідності розчину), згодом базова лінія біосенсора стабілізувалася завдяки

диференційному режиму вимірювань; потім до робочої комірки додавали глюкозу (незаряджений субстрат), що призводило до початку реакції, каталізованої ГЕК, що і викликало відгук біосенсора. Даний відгук був пропорційним концентрації АТФ в робочій комірці.

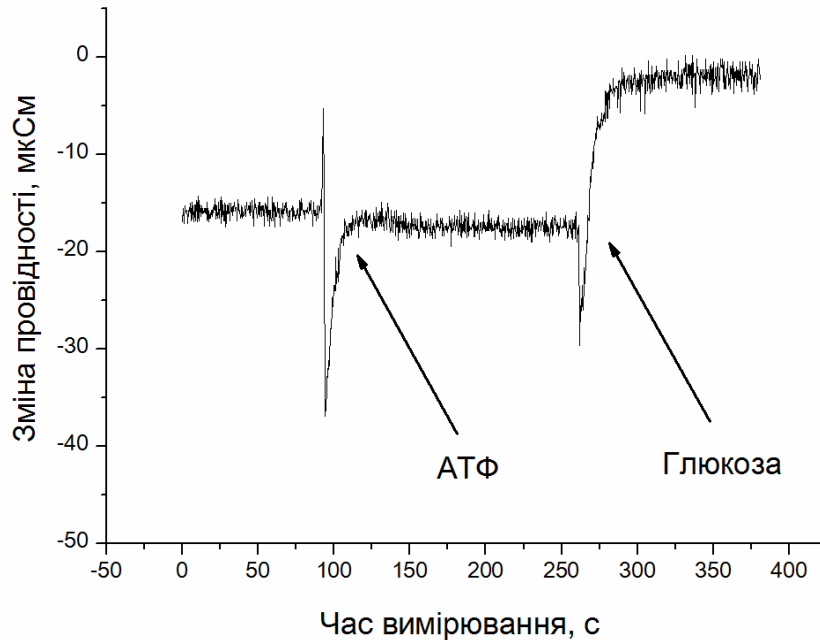


Рис. 11. Типові відгуки біосенсора при послідовному додаванні 0,1 мМ АТФ та 0,2 мМ глюкози. Робочий буфер – 5 мМ НЕРЕС, рН 7,4. Концентрація іонів магнію – 3 мМ

Таким чином було усунено вплив заряджених речовин на роботу біосенсора, який є суттєвою проблемою при розробці кондуктометричних біосенсорів. При цьому, тривалість аналізу залишається цілком прийнятною – близько 5 хв.

Як відомо, іони магнію є необхідними для роботи гексокінази, і дослідження залежності відгуків біосенсора при різних концентраціях іонів магнію виявило, що за 3 мМ концентрації іонів магнію відгуки є максимальними. Подальше підвищення концентрації магнію вже не призводило до збільшення відгуків, тому в подальших експериментах використовувався робочий буфер, що містив 3 мМ концентрацію іонів магнію.

Величина відгуку біосенсора сильно залежала від концентрації буферного розчину – підвищення молярності буферу призводило до стрімкого зменшення відгуків біосенсора (рис. 12).

Така ситуація є типовою для кондуктометричних біосенсорів через нейтралізацію зарядів буферним розчином, що зменшує провідність розчину і відповідно відгук біосенсора теж зменшується. Тому оптимальним буферним розчином для роботи біосенсора було обрано 5 мМ НЕРЕС, рН 7,4, з 3 мМ концентрацією іонів магнію. Проте слід зазначити, що у випадку вимірювання зразків з рН, близьким до рН робочого буферу (7,4), можливо використання робочого буферу більш низької концентрації (1 мМ), що значно збільшить чутливість біосенсора до АТФ.

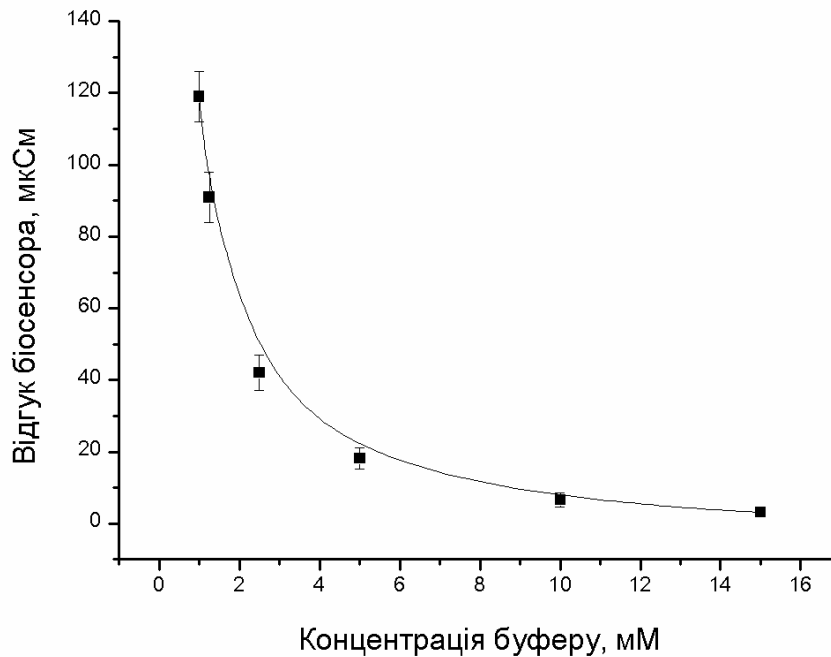


Рис. 12. Залежність відгуків біосенсора від концентрації робочого буферу (HEPES, рН 7,4). Концентрація АТФ у буфері – 100 мкМ, глюкози – 200 мкМ, іонів магнію – 3 мМ

Дослідження залежності між чутливістю біосенсора до АТФ і концентрацією глюкози показало, що оптимальна концентрація глюкози для визначення АТФ складає 0,2 мМ. В оптимальних умовах (при використанні 5 мМ HEPES, рН 7,4, з 3 мМ Mg^{2+} та 200 мкМ глюкози), мінімальна межа визначення АТФ становила 15 мкМ. Типова калібрувальна крива біосенсора для визначення АТФ наведена на рис. 13. Дана калібрувальна крива описується рівнянням $\sigma = 0,69 + 0,22 \cdot C$ ($R^2=0,99$), де σ – провідність розчину після виходу відгуку на плато (мкСм), C – концентрація АТФ (мкМ). Середньоквадратичне відхилення 10 послідовних відгуків біосенсорів на глюкозу та АТФ становило 10,3 %. Стабільність біосенсора при зберіганні була задовільною; при зберіганні біосенсора в сухому вигляді за температури $-18\text{ }^\circ\text{C}$ біосенсор можна було використовувати щонайменше протягом тижня. Для підтвердження ефективної роботи біосенсора, було проведено вимірювання концентрації АТФ у ампулах для внутрішньом'язового і внутрішньовенного введення. Показано високе співпадіння результатів, отриманих біосенсором, із номінальною концентрацією АТФ у ампулах.

Запропонований біосенсор можна використовувати для визначення концентрації АТФ у водних зразках, зокрема при контролі процесу виробництва ліків та контролі якості лікарських засобів, що містять АТФ. Також біосенсор може бути використаним для аналізу біологічних зразків з низькою буферною ємністю.

Було проведено порівняння амперометричного та кондуктометричного біосенсора для визначення АТФ, які були розроблені в даній роботі. Чутливість амперометричного біосенсора є вищою. Крім того, він є практично незалежним від концентрації іонів та заряджених речовин у зразках, що дає змогу вимірювати складні біологічні зразки. Висока стійкість біосенсора до інтерферуючих речовин

отримана за рахунок використання додаткової полімерної мембрани на основі поліфенілендіаміну, яка нанесена на голий робочий перетворювач. В роботі показано, що дана мембрана не пропускає до поверхні електроду електроактивні речовини відносно великої молекулярної маси (значно більші ніж пероксид водню, концентрація якого і є основою амперометричного відгуку), які здатні викликати похибку у вимірюваннях.

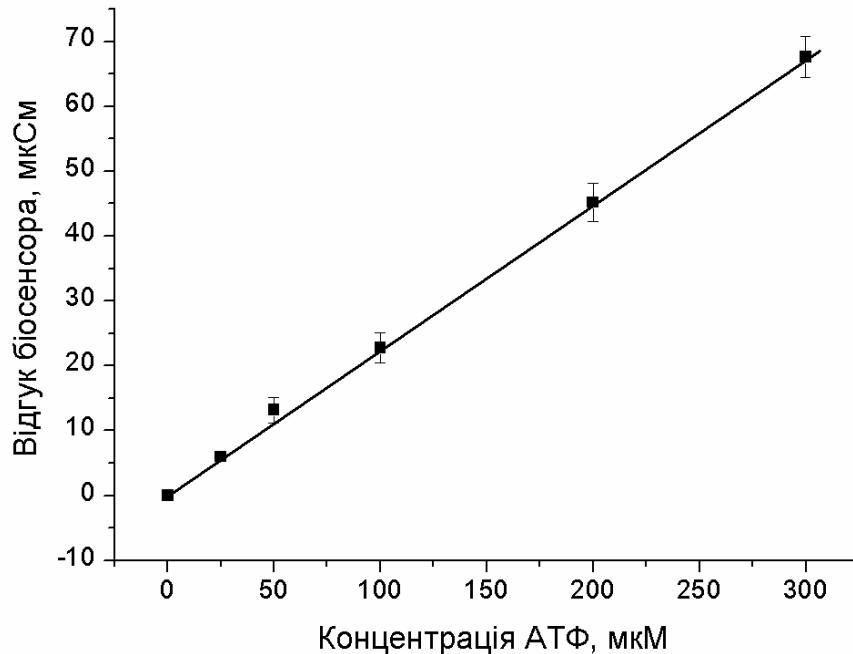


Рис. 13. Типова калібрувальна крива біосенсора на основі ГЕК для визначення концентрації АТФ. Концентрація глюкози – 200 мкМ. Робочий буфер – 5 мМ НЕРЕС, рН 7,5. Концентрація іонів магнію – 3 мМ

З іншого боку, перевагами кондуктометричного біосенсора над амперометричним є значно нижча собівартість як самого біосенсора, так і вимірювальної установки, що пояснюється значно простішою будовою кондуктометричних перетворювачів і простішою будовою установки для кондуктометричних вимірів. Крім того, для створення кондуктометричного біосенсора необхідно використання лише одного ферменту (ГЕК), а не двох ферментів (ГОД+ГЕК). Також для кондуктометричних вимірювань у порівнянні з амперометричними немає необхідності в досить складному електроді порівняння та будь-яких інших додаткових електродах. Все це робить кондуктометричний біосенсор для визначення АТФ значно дешевшим, ніж амперометричний. Проте головними недоліками кондуктометричного біосенсора є певна чутливість до заряджених речовин, яка залежить від якості перетворювача і якості приготування біосенсора, а також залежність аналітичних характеристик біосенсора від буферної ємності розчину (ці недоліки типові не тільки для даного біосенсора, а і для кондуктометрії взагалі). Це обмежує коло зразків, що можуть бути виміряні даним біосенсором. Узагальнене порівняння основних аналітичних характеристик розроблених амперометричного та кондуктометричного біосенсорів наведено в табл. 2.

Порівняння характеристик амперометричного та кондуктометричного біосенсорів для визначення АТФ, які було розроблено в даній роботі

Характеристика	Амперометричний біосенсор	Кондуктометричний біосенсор
Склад біоселективного елемента	ГОД + ГЕК	ГЕК
Тривалість одного аналізу	~5 хв	~5 хв
Межа визначення АТФ	5 мкМ	15 мкМ
Лінійний діапазон визначення АТФ	15 – 80 мкМ	15 – 300 мкМ
Селективність до інтерферентів	Хороша	Середня, залежить від якості перетворювача і виготовлення біосенсора
Необхідність додаткових електродів	Необхідні електрод порівняння та допоміжний електрод	Не потрібні

Процедура аналізу із використанням розроблених біосенсорів та біосенсорної системи є нескладною, нетривалою у часі, нетрудомісткою, менш витратною і не потребує попередньої підготовки проб у порівнянні з традиційними методами аналізу АТФ, глюкози та КК. Крім того, аналітичні системи на основі біосенсорів є мобільними завдяки невеликим розмірам вимірювальної установки, придатними до автоматизації і мініатюризації.

Особливо слід наголосити на економічній ефективності розроблених біосенсорів. Для створення одного біосенсора необхідно доли мікрограмів ферментів і цього достатньо для проведення десятків вимірювань протягом кількох тижнів. Це робить біосенсорний аналіз значно дешевшим у порівнянні з класичними аналітичними методами, такими як хроматографія та спектрофотометрія.

Простота, висока швидкість проведення аналізу за допомогою біосенсорів та інтерпретація отриманих результатів в режимі реального часу дає змогу досліджувати процеси, в яких відбувається швидке утворення або використання АТФ, що є цікавим для молекулярно-біологічних та біохімічних досліджень. Використання біосенсора для визначення активності КК робить можливим проведення процедури аналізу рівня даного біомаркерного ферменту безпосередньо біля ліжка хворого, що дозволяє швидко діагностувати хвороби та слідкувати за результатами їх лікування, а це створює передумови для переходу до персоналізованої медицини.

ВИСНОВКИ

Розроблено нові електрохімічні біосенсиори та біосенсорну систему на основі іммобілізованих глюкозооксидази та/або гексокінази для аналізу концентрацій АТФ і глюкози, а також для визначення активності КК.

1. Досліджено аналітичні характеристики амперометричних перетворювачів за допомогою потенціостату PalmSens та його вітчизняного аналогу. Показано, що вітчизняний потенціостат може використовуватись для виконання більшості задач по розробці біосенсиорів при значно меншій вартості приладу.

2. Розроблено амперометричний біосенсор для визначення АТФ на основі глюкозооксидази та гексокінази. Оптимальними умовами для роботи біосенсора був 25 мМ HEPES буфер, рН 7,4, який містив 2 мМ Mg^{2+} . Мінімальна межа вимірювання АТФ становила 5 мкМ, лінійний діапазон роботи – 15 - 100 мкМ.

3. Досліджено та уніфіковано умови роботи розробленого АТФ-чутливого біосенсора з біосенсором для визначення глюкози та вперше створено на їх основі біосенсорну систему для одночасного визначення АТФ та глюкози в тому самому зразку. Систему апробовано при аналізі складу фармацевтичних препаратів.

4. Досліджено можливість біосенсорного визначення активності КК за швидкістю продукування нею АТФ та проведено аналіз її активності в сироватці крові. Встановлено, що при концентраціях глюкози 0,1 мМ – 0,5 мМ можна було вимірювати активності КК в діапазоні від 0,01 од.акт./мл до 0,1 од.акт./мл.

5. Вперше розроблено кондуктометричний одноферментний біосенсор для визначення АТФ на основі гексокінази. Мінімальна межа визначення АТФ складала 15 мкМ, а лінійний діапазон роботи – від 15 до 300 мкМ. Даний біосенсор є простим за конструкцією і дешевим і може використовуватись для швидкого визначення АТФ у зразках з низькою буферною ємністю, зокрема, у фармацевтичних препаратах.

ПЕРЕЛІК НАУКОВИХ ПРАЦЬ, ОПУБЛІКОВНИХ ЗА ТЕМОЮ ДИСЕРТАЦІЇ

1. Методика тестування та оптимізації амперометричних перетворювачів / В.М. Пешкова, І.С. Кучеренко, О.О. Солдаткін, С.В. Дзядевич // *Sensor Electronics and Microsystem Technologies*. – 2013. – Т. 10. – С. 88 – 98. *(Особистий внесок здобувача: відпрацювання методики аналізу характеристик перетворювачів.)*

2. Дослідження аналітичних характеристик амперометричних нікелевих перетворювачів за допомогою потенціостату “PalmSens” та його вітчизняного аналогу / І.С. Кучеренко, О.С. Яковлева, О.О. Солдаткін, В.Г. Мельник, Л.М. Семеничева, О.П. Солдаткін, С.В. Дзядевич // *Sensor Electronics and Microsystem Technologies*. – 2014. – Т.11. – С. 42 – 52. *(Особистий внесок здобувача: визначення та аналіз характеристик нікелевих мультиперетворювачів із використанням двох потенціостатів.)*

3. Характеристики та оптимальні умови роботи амперометричного біосенсора для визначення аденозинтрифосфору / І.С. Кучеренко, О.О. Солдаткін,

Д.Ю. Дідух, О.П. Солдаткін // *Biotechnologia acta.* – 2014. – Т. 7. – С. 66 – 74. *(Особистий внесок здобувача: розробка біоселективного елемента біосенсора на основі глюкозооксидази та гексокінази, а також визначення його аналітичних характеристик.)*

4. Amperometric biosensor system for simultaneous determination of adenosine-5'-triphosphate and glucose / I.S. Kucherenko, D.Yu. Didukh, O.O. Soldatkin, A.P. Soldatkin // *Analytical Chemistry.* – 2014. – Vol. 86. – P. 5455 – 5462. *(Особистий внесок здобувача: оптимізація роботи двох біосенсорів в однакових умовах, відпрацювання методики одночасного аналізу концентрацій АТФ та глюкози у сумішах, визначення концентрації АТФ та глюкози у фармацевтичних препаратах.)*

5. Determination of total creatine kinase activity in blood serum using an amperometric biosensor based on glucose oxidase and hexokinase / I.S. Kucherenko, O.O. Soldatkin, F. Lagarde, N. Jaffrezic-Renault, S.V. Dzyadevych, A.P. Soldatkin // *Talanta.* – 2015. – Vol.144. – P. 604 – 611. *(Особистий внесок здобувача: адаптація роботи електрохімічного біосенсора на основі ГОД та ГЕК для аналізу активності КК в сироватці крові.)*

6. A novel conductometric biosensor based on hexokinase for determination of adenosine triphosphate / I.S. Kucherenko, D.Yu. Kucherenko, O.O. Soldatkin, F. Lagarde, S.V. Dzyadevych, A.P. Soldatkin // *Talanta.* – 2016. – Vol. 150. – P. 469 – 475. *(Особистий внесок здобувача: розробка та оптимізація роботи біоселективного елемента біосенсора на основі ГЕК та визначення його аналітичних характеристик.)*

7. Патент України на винахід № 112141, Кондуктометричний біосенсор на основі гексокінази для визначення концентрації аденозин-5'-трифосфату у водних розчинах / І.С. Кучеренко, Д.Ю. Кучеренко, О.О. Солдаткін, С.В. Дзядевич, О.П. Солдаткін, Б. Озансой Касап, С.К. Кірдесілер, Б. Аката Курч // Заявл. 09.07.2015; Опубл. 25.07.2016, Бюл. №14. – 6 с. *(Особистий внесок здобувача: підбір умов іммобілізації гексокінази в складі біоселективного елемента біосенсора і визначення аналітичних характеристик біосенсора.)*

8. Amperometric biosensor for evaluation of creatine kinase activity in blood serum samples / I.S. Kucherenko, O.O. Soldatkin, N. Jaffrezic-Renault, F. Lagarde, S.V. Dzyadevych, A.P. Soldatkin // 6-та Міжнародна науково-технічна конференція «Сенсорна електроніка та мікросистемні технології» (СЕМСТ-6), 29 вересня – 3 жовтня 2014: тези доп. – Одеса, 2014, - С. 181. *(Особистий внесок здобувача: розробка процедури для проведення аналізу активності КК в сироватці крові за допомогою АТФ-чутливого біосенсора.)*

9. Amperometric enzyme biosensor for determination of creatine kinase activity / I.S. Kucherenko, O.O. Soldatkin, N. Jaffrezic-Renault, S.V. Dzyadevych, A.P. Soldatkin, F. Lagarde // International Conference «Journée de Printemps de la SCF en Rhône Alpes», June 2015: abstracts. – Villeurbanne, 2015, - P. 31. *(Особистий внесок здобувача: проведення експериментів з підбору оптимального розведення зразку сироватки крові в робочій комірці біосенсора та біосенсорний аналіз активностей КК в різних зразках сироватки крові.)*

10. Розробка амперометричного біосенсора для визначення активності протеїнкіназ / Д.В. Книжникова, Д.Ю. Кучеренко, М. Протопопов, І.С. Кучеренко, О.О. Солдаткін, О.П. Солдаткін // V Всеукраїнська науково-практична конференція студентів, аспірантів та молодих вчених «Біотехнологія: звершення та надії», 12-13 травня 2016 р.: тези доп. – Київ, 2016. – С. 123. *(Особистий внесок здобувача: оптимізація роботи біоселективного компонента АТФ-чутливого біосенсора у різних буферних розчинах з метою проведення протеїнкіназної реакції в робочій комірці біосенсора та визначення активності протеїнкіназ за швидкістю утворення ними АТФ.)*

АНОТАЦІЯ

Кучеренко І.С. Розробка електрохімічних ферментних біосенсорів для визначення концентрацій АТФ та активності креатинкінази. – Рукопис.

Дисертація на здобуття наукового ступеня кандидата біологічних наук за спеціальністю 03.00.20 – біотехнологія. – Інститут молекулярної біології і генетики НАН України, Київ, 2017.

Дисертацію присвячено розробці та оптимізації електрохімічних біосенсорів на основі іммобілізованих ферментів для визначення аденозинтрифосфату, глюкози та креатинкінази. Створено діючі лабораторні прототипи монобіосенсорів та біосенсорної системи для одночасного визначення АТФ та глюкози. Вперше розроблено кондуктометричний біосенсор для визначення АТФ та глюкози на основі одного ферменту гексокінази.

Досліджено та оптимізовано основні аналітичні характеристики біосенсорів. Вивчено вплив параметрів робочого буферу (концентрація іонів магнію, іонна сила, буферна ємність) та різних умов зберігання на функціонування біосенсорів. За допомогою монобіосенсорів, зокрема, та біосенсорної системи в цілому проведено аналіз вмісту АТФ, глюкози та креатинкінази в фармацевтичних зразках та в сироватці крові. Апробація біосенсорної системи показала задовільну кореляцію отриманих даних із номінальними, заявленими виробниками, значеннями вмісту даних речовин. Отриманий лабораторний прототип біосенсорної системи для визначення АТФ та глюкози може бути використаним для аналізу фармацевтичних та біологічних зразків.

Ключові слова: амперометричні перетворювачі, кондуктометричні перетворювачі, електрохімічні біосенсори, іммобілізовані ферменти, глюкозооксидаза, гексокіназа, глюкоза, аденозинтрифосфат, сироватка крові, креатинкіназа.

АННОТАЦИЯ

Кучеренко И.С. Разработка электрохимических ферментных биосенсоров для определения концентраций АТФ и активности креатинкиназы. – Рукопись.

Диссертация на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.00.20 – биотехнология. – Институт молекулярной биологии и генетики НАН Украины, Киев, 2017.

Мониторинг концентраций аденозинтрифосфата (АТФ), главной энергетической молекулы во всех живых организмах, является важной процедурой в биохимических, молекулярно-биологических и биотехнологических исследованиях. Концентрация этого вещества служит показателем энергетического состояния и жизнеспособности клеток и тканей.

Традиционно для количественного определения АТФ используют в основном биоллюминесцентные методы на основе фермента люциферазы, спектроскопические и хроматографические методы. Успешной альтернативой этим методам анализа могут стать ферментные биосенсоры, использование которых делает аналитическую процедуру более простой, быстрой, дешевой; кроме того, это дает возможность проводить одновременный анализ нескольких метаболитов и, что особенно важно

для биологических исследований, дает возможность проводить анализ концентраций АТФ в реальном режиме времени или внутри живых тканей путем имплантации в них микробиосенсоров. Недостатком биосенсорных методов является чувствительность не только к АТФ, но и к другим веществам – глюкозе или глицерину, в зависимости от используемой ферментной системы.

Основной целью работы было создание амперометрических и кондуктометрических биосенсоров и биосенсорной системы для одновременного количественного определения АТФ и глюкозы, а также оптимизация их рабочих характеристик для анализа фармацевтических и биологических образцов. Также была разработана методика определения активности креатинкиназы в сыворотке крови путем анализа скорости синтеза АТФ этой киназой.

Разработаны амперометрические биосенсоры на основе гексокиназы и глюкозооксидазы, чувствительные к глюкозе и АТФ. Всесторонне исследованы их аналитические характеристики. Линейный диапазон работы созданных биосенсоров составлял 15-100 мкМ для АТФ и 10 мкМ – 2 мМ для глюкозы. Время отклика биосенсоров около 30 с. Исследована воспроизводимость откликов биосенсоров на глюкозу и АТФ в течение дня (среднеквадратическое отклонение откликов на глюкозу составляло 3-6 %, а откликов на АТФ – 8-12 %). За 50 дней хранения биосенсоров при -18 °С отклики на глюкозу не изменились, а отклики на АТФ уменьшились на 43 % вследствие меньшей стабильности гексокиназы при хранении в сравнении с глюкозооксидазой.

На основе описанных биосенсоров разработана биосенсорная система для одновременного определения АТФ и глюкозы и создан ее лабораторный прототип, который был апробировано при анализе смесей фармацевтических препаратов, содержащих глюкозу и АТФ. Показано высокое совпадение биосенсорных результатов с номинальными, заявленными производителями, концентрациями исследуемых веществ.

Подобраны условия для анализа активности креатинкиназы по скорости синтеза АТФ киназой. Оптимизированы концентрации субстратов креатинкиназы; оптимум составил 1 мМ для АДФ и 10 мМ для креатинфосфата. Проведен анализ активности креатинкиназы в 5 образцах сыворотки крови. Показано, что биосенсор может быть использован для быстрого определения активности креатинкиназы у пациентов с подозрением на инфаркт миокарда или другими повреждениями мышечной ткани. Процедура приготовления и использования биосенсора является достаточно простой для быстрого освоения персоналом. Небольшие размеры портативной измерительной установки делают возможным проведение измерений даже возле кровати пациента. Главным недостатком предложенного биосенсора является зависимость его чувствительности от концентрации глюкозы, поэтому приходится выбирать между приблизительным определением активности креатинкиназы за одно измерение или более точное определение за 2 измерения (первое используется для определения концентрации глюкозы и подбора разведения образца). Описанная методика определения активности киназы может быть адаптирована для определения других киназ как в клинических, так и в исследовательских целях.

Также были проведены исследования по созданию кондуктометрического биосенсора на основе гексокиназы для определения концентраций АТФ и глюкозы. Изучена зависимость работы биосенсора от состава рабочего буфера, а именно концентрации ионов магния и концентрации буфера, и определены основные аналитические характеристики биосенсора. Оптимальным буфером для работы биосенсора являлся 5 мМ НЕРЕС, содержащий 3 мМ ионов магния. Среднеквадратическое отклонение 10 последовательных откликов биосенсора на АТФ и глюкозу составляло 10,3 %. Линейный диапазон работы биосенсора составлял от 15 до 300 мкМ АТФ. Предложенный биосенсор может быть использован для определения концентраций АТФ в водных образцах с низкой буферной емкостью.

Ключевые слова: амперометрические преобразователи, кондуктометрические преобразователи, электрохимические биосенсоры, иммобилизованные ферменты, глюкозооксидаза, гексокиназа, глюкоза, аденозинтрифосфат, сыворотка крови, креатинкиназа.

SUMMARY

Kucherenko I.S. **Development of electrochemical enzyme biosensors for the determination of ATP concentrations and creatine kinase activity.** – Manuscript.

Thesis for a Philosophy Doctor (PhD) degree in Biology, specialty 03.00.20 – biotechnology. – Institute of Molecular Biology and Genetics of National Academy of Sciences of Ukraine, Kyiv, 2017.

The thesis is dedicated to the development and optimization of the electrochemical biosensors based on immobilized enzymes for the determination of adenosine triphosphate (ATP), glucose, and creatine kinase. Working prototypes of monobiosensors and a biosensor system for the simultaneous determination of ATP and glucose were created. For the first time a conductometric biosensor based on hexokinase for determination of ATP and glucose was created.

Analytical characteristics of the biosensors were studied and optimized. Influence of the working buffer parameters (concentration of magnesium ions, ionic strength, and buffer capacity) and different conditions of the biosensor storage and functioning were evaluated. Using the monobiosensors and the biosensor system analysis of the ATP and glucose concentrations in pharmaceutical samples, and creatine kinase activity in blood serum was carried out. Tests of the biosensor system demonstrated good correlation of the obtained data with the nominal, given by producers, concentrations of these substances. Obtained laboratory prototype of the biosensor system for determination of ATP and glucose can be used for analysis of pharmaceutical and biological samples.

Keywords: amperometric transducers, conductometric transducers, electrochemical biosensors, immobilized enzymes, glucose oxidase, hexokinase, glucose, adenosine triphosphate, blood serum, creatine kinase.