

**КИЇВСЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ
ІМЕНІ ТАРАСА ШЕВЧЕНКА**

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

На правах рукопису

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

Дисертація на здобуття наукового ступеня кандидата біологічних наук

Науковий керівник:
Солдаткін Олексій Петрович
доктор біологічних наук, професор,
член-кореспондент НАН України

КИЇВ – 2017

ЗМІСТ

ЗМІСТ	2
ПЕРЕЛІК УМОВНИХ ПОЗНАЧЕНЬ.....	5
ВСТУП	6
РОЗДІЛ 1. ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ	12
1.1. Класифікація та сучасні напрямки розробки біосенсорів.....	12
1.2. Аденозинтрифосфат.....	16
1.3. Класичні методи визначення АТФ	18
1.4. Електрохімічні біосенсори для визначення концентрації АТФ	21
1.5. Креатинкіназа	26
1.6. Класичні методи визначення КК	27
1.7. Електрохімічні біосенсори для визначення КК	28
1.8. Підсумки.....	30
РОЗДІЛ 2. МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ	31
2.1. Матеріали	31
2.2. Конструкція амперометричних перетворювачів на основі дискових платинових електродів.....	31
2.3. Конструкція кондуктометричних перетворювачів на основі золотих гребінчастих електродів	33
2.4. Вимірювальна установка для амперометричних досліджень.....	34
2.5. Вимірювальна установка для кондуктометричних досліджень	38
2.6. Методика нанесення ПФД мембрани	40
2.7. Методика іммобілізації ферментів на поверхнях амперометричних перетворювачів	40
2.8. Методика іммобілізації ферментів на поверхнях кондуктометричних перетворювачів	41
РОЗДІЛ 3. РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕНЬ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ	42

3.1. Дослідження аналітичних характеристик амперометричних перетворювачів за допомогою потенціостату PalmSens та його вітчизняного аналогу.....	42
3.1.1. Визначення перекису водню амперометричними перетворювачами із використанням двох потенціостатів.....	43
3.1.2. Порівняння біосенсорів на основі ГОД для визначенні глюкози.	47
3.1.3. Висновки.	50
3.2. Розробка амперометричних монобіосенсорів та біосенсорної системи для визначення концентрації АТФ та глюкози.....	51
3.2.1. Принцип роботи біосенсора для визначення АТФ.....	51
3.2.2. Підбір концентрації ферментів у біоселективних елементах біосенсорів для визначення глюкози та АТФ.....	52
3.2.3. Вибір умов іммобілізації ферментів при створенні біоселективного елемента.....	54
3.2.4. Вибір робочого буферу.....	55
3.2.5. Підбір концентрації магнію.....	57
3.2.6. Дослідження впливу концентрації глюкози на біосенсорне визначення концентрації АТФ.....	58
3.2.7. Використання ПФД мембрани для покращення селективності амперометричного перетворювача.....	60
3.2.8. Аналітичні характеристики біосенсора для визначення АТФ.....	63
3.2.9. Біосенсор для визначення глюкози.....	64
3.2.10. Методика одночасного визначення глюкози та АТФ біосенсорною системою.....	66
3.2.11. Відтворюваність відгуків біосенсорної системи на АТФ та глюкозу.....	68
3.2.12. Відтворюваність приготування біосенсорів.....	69
3.2.13. Стабільність біосенсорів при зберіганні.....	71
3.2.14. Вимірювання реальних зразків.....	73
3.2.15. Висновки.....	74

3.3. Розробка амперометричного біосенсора для визначення активності креатинкінази у сироватці крові	75
3.3.1. Принцип роботи біосенсора для визначення активності креатинкінази...	75
3.3.2. Процедура аналізу активності КК у сироватці крові	77
3.3.3. Вибір оптимального розведення зразків сироватки крові	77
3.3.4. Підбір оптимальної концентрації АДФ та креатинфосфату.....	79
3.3.5. Калібрувальні криві для визначення активності КК при різних концентраціях глюкози.....	81
3.3.6. Відтворюваність вимірювання активності КК.....	83
3.3.7. Вимірювання активності КК в зразках сироватки крові.....	84
3.3.8. Висновки.	86
3.4. Розробка кондуктометричного біосенсора для визначення концентрації АТФ.....	86
3.4.1. Принцип роботи кондуктометричного біосенсора для визначення активності АТФ	87
3.4.2. Вибір умов іммобілізації ГЕК.....	88
3.4.3. Вплив складу робочого буфера на роботу біосенсора	89
3.4.4. Вплив концентрації АТФ та глюкози на роботу біосенсора.	92
3.4.5. Відтворюваність відгуків біосенсора	94
3.4.6. Операційна стабільність біосенсорів	94
3.4.7. Довгострокове зберігання біосенсорів.....	96
3.4.8. Вимірювання реальних зразків	96
3.4.9. Висновки	97
РОЗДІЛ 4. АНАЛІЗ ТА УЗАГАЛЬНЕННЯ РЕЗУЛЬТАТІВ ДОСЛІДЖЕНЬ ...	100
ВИСНОВКИ.....	110
ПЕРЕЛІК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ.....	111

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ ПОЗНАЧЕНЬ

АДФ – аденозин-5'-дифосфат

АТФ – аденозин-5'-трифосфат

БСА – бичачий сироватковий альбумін

ГА – глутаровий альдегід

ГЕК – гексокіназа

ГК – гліцеролкіназа

ГОД – глюкозооксидаза

ГФО – гліцерофосфатоксидаза

КК – креатинкіназа

ПФД – поліфенілендіамін

ЦВА – циклічна вольтамперограма

HEPES – 4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid

ВСТУП

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 [1, 2].

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 [3, 4]. Перспективним є визначення концентрації АТФ у крові людини для діагностики різноманітних хвороб [5]. Також визначення кількості 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 [6] та рідинна хроматографія [7], 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 [8, 9]. Біолюмінесцентні 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 [10]. Радіоізотопні методи аналізу АТФ є більш високоточними, але потенційно небезпечними для оператора [11]. 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 [12], амперометричні скловуглецеві електроди [13], амперометричні платинові мікроелектроди [14] 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). Тому наявність в зразку невідомої (або змінюваної у часі) концентрації цих речовин значно ускладнює визначення АТФ.

Тому актуальним завданням є створення біосенсорної 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. Також здобувач вдячний французьким колегам Флоранс Лагард (Florence Lagarde) та Ніколь Жаффрезік-Рено (Nicole Jaffrezic-Renault) з Інституту аналітичних наук м. Ліон, 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 щирю 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» (Віллербан, 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 наукових журналах та тезах 3 доповідей на наукових конференціях, отримано 1 патент на винахід України.

Структура та обсяг дисертації. Дисертація складається із вступу, огляду літератури, матеріалів та методів, результатів досліджень та їх обговорення, аналізу та 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.

РОЗДІЛ 1

ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ

1.1. Класифікація та сучасні напрямки розробки біосенсорів

Аналітична хімія є галуззю хімії, яка спрямована на виявлення та кількісне визначення речовин в зразках. В наші дні аналітична хімія швидко розвивається, оскільки вона потрібна для хімічних, фізичних і біологічних досліджень. Практичне застосування аналітичної хімії, наприклад визначення токсинів та контроль якості фармацевтичних препаратів та харчових продуктів, також є дуже важливими [15].

Основою сучасних аналітичних досліджень є високотехнологічне обладнання, таке як високоефективні рідинні хроматографи, спектрометри або мас-спектрометри. Можливості цих методів дуже великі. Проте, їх недоліками є висока ціна і складність. Тому розвиваються альтернативні методи аналізу, які є менш потужними, але набагато дешевшими і простішими у використанні. Сенсори, в тому числі біосенсори, належать до цих альтернативних методів аналізу.

Перший прототип біосенсора був створений більше 50 років тому, в 1962 році [16]. Цей біосенсор базується на рН-чутливому електроді з іммобілізованою глюкозооксидазою (ГОД) і призначений для вимірювання концентрації глюкози в людській крові. Після цієї піонерської роботи швидкий розвиток глюкозних біосенсорів відбувався в багатьох лабораторіях, що призвело до створення ряду комерційних приладів, глюкометрів, доступних в даний час. Інтенсивні дослідження різних типів біосенсорів почалися в 1980-х роках в Європі, Сполучених Штатах Америки та Японії. З тих пір розвиток

біосенсорів триває, поширюючись по всьому світу. Це може бути пов'язано з тим, що біосенсори поєднують низку переваг в порівнянні з класичними методами аналізу, а саме: низьку ціну, експресність і простоту експлуатації з високою специфічністю і чутливістю біоматеріалу.

Згідно з класичним визначенням Міжнародного об'єднання дослідників фундаментальної та прикладної хімії, «біосенсор – це інтегрований пристрій на основі рецептору й перетворювача, який здатний забезпечувати кількісний чи напівкількісний аналіз використовуючи біологічний розпізнавальний елемент» [17].

Як показано на рис. 1.1, декілька подій відбуваються протягом аналізу зразку біосенсором:

- 1) біоматеріал контактує з зразком (рідким чи газоподібним). Цільова молекула реагує з біоматеріалом;
- 2) процеси в біоматеріалі змінюють фізичні та/або хімічні властивості на поверхні перетворювача (наприклад, змінюється рН);
- 3) ці зміни є пропорційними концентрації цільового аналіту та вимірюються перетворювачем, який передає інформацію на вимірювальний пристрій, а останній зазвичай передає інформацію у комп'ютер.

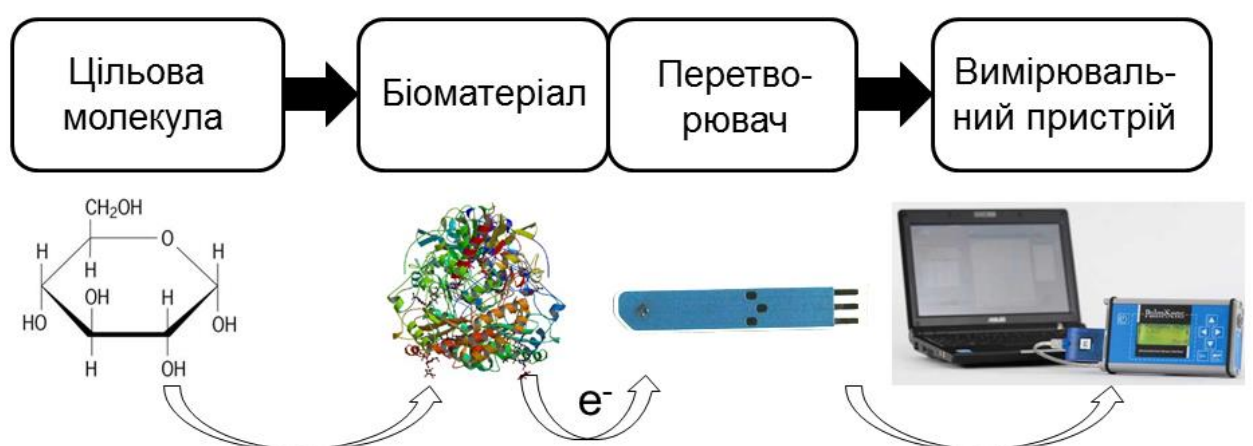


Рис. 1.1. Загальна схема роботи біосенсора на прикладі роботи глюкозного біосенсора

Існує дві основні класифікації біосенсорів. Біосенсори класифікують за типом біоматеріалу та типом перетворювача (рис. 1.2) [18, 19]. Біорозпізнавальний матеріал може мати каталітичну активність або виступати просто рецептором. Очищені ферменти найчастіше виступають в якості біокаталізаторів і ферментні біосенсори є найбільшою групою біосенсорів, завдяки широкому діапазону хімічних реакцій, що каталізують ферменти, та відносно високій стабільності ферментів. Приклади ферментів, що використовуються для розробки біосенсорів, включають глікозид гідролази [20], протеази [21], амідогідролази [22], органофосфорні гідролази [23], естерази [24], кінази [25], фосфатази [26], оксидази [27–30], дегідрогенази [31–33], та ін. Більше того, можуть бути використані мультиферментні системи, що каталізують каскади біохімічних реакцій [34–36]. Це значно розширює діапазон речовин, що можуть визначатися ферментними біосенсорами.

Імобілізовані тканини, клітини (включаючи бактерії) або навіть окремі органели можуть також виступати чутливими елементами каталітичних біосенсорів [37, 38]. Такий біоматеріал є значно дешевшим за ферменти, але, в цілому, має значно гіршу селективність та чутливість. Альтернативно, для створення біосенсорів можуть бути використані некаталітичні рецепторні молекули, такі як антитіла, клітинні рецептори, нуклеїнові кислоти, біоміметики, тощо [39, 40].

Також, біосенсори можуть бути класифіковані за типом перетворювача, який може бути оптичним, п'єзоелектричним, термічним та електрохімічним. Електрохімічні перетворювачі є однією з найбільших груп перетворювачів в біосенсорах і поділяються на амперометричні, потенціометричні, кондуктометричні, та імпедиметричні [19, 41–46].

Популярність електрохімічних біосенсорів пояснюється їх невеликою вартістю, відносно швидкою та простою процедурою аналізу, невеликим розміром вимірювальної установки. Також їх успіх пов'язаний з розробкою планарних електродів, виготовлених шляхом трафаретного друку; ці електроди

стали дуже поширеними завдяки дешевизні, чутливості та здатності до мініатюризації [47–49].

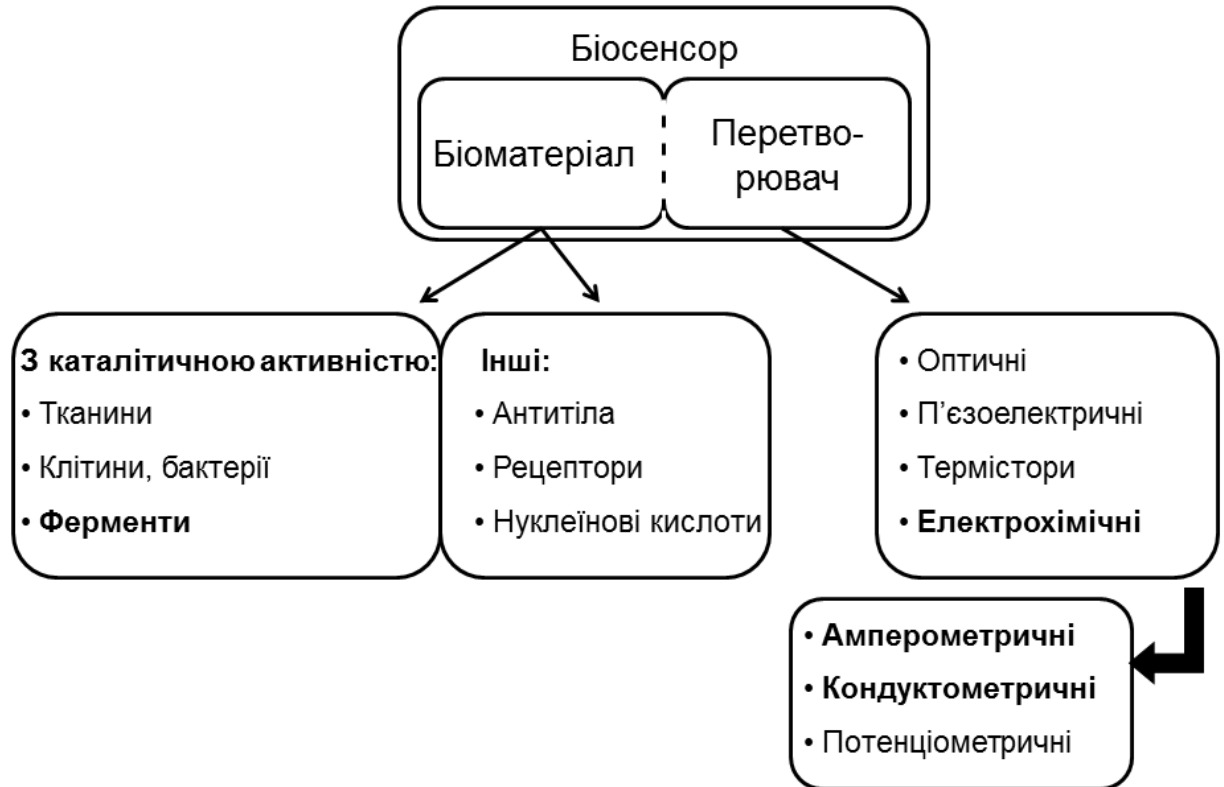


Рис. 1.2. Схема класифікації біосенсорів. Жирним шрифтом виділено типи біосенсорів, що використовувались в даній роботі

До сучасних напрямків розробки біосенсорів належать:

- 1) Інтеграція наночастинок до складу біосенсора. Очікується, що наноматеріали покращать чутливість, лінійний діапазон, стабільність та інші аналітичні характеристики біосенсорів [50–54].
- 2) Розробка масивів біосенсорів та мультибіосенсорів, що здатні визначати концентрації декількох важливих речовин одночасно [55–60].
- 3) Застосування мікропроточних технологій, які дають змогу інтегрувати біосенсор в невелику систему (lab on chip), що крім біосенсора містить

пристрої для попередньої обробки зразку, наприклад його пре концентрування або розділення на фракції одночасно [61, 62].

- 4) Розробка приладів для аналізу «на місці» (*in situ*). Дані прилади повинні бути портативними, легкими у використанні та достатньо потужними, щоб проводити аналіз не в лабораторії, а безпосередньо в місці, де виникає така потреба – клінічна палата, квартира, ринок, забруднена ділянка місцевості, тощо [61, 63].
- 5) Розробка біосенсорів, інтегрованих в одяг. Такі біосенсори планується використовувати для детекції токсинів та вибухівки, наприклад у випадку одяжі військових. Інший схожий напрям – інтеграція біосенсорів безпосередньо в шкіру (як тату), що дає широкі можливості по моніторингу фізіологічних параметрів в реальному часі. Перші прототипи таких біосенсорів вже розроблені [64–67].
- 6) Розробка біосенсорів, що складаються повністю з надрукованих компонентів. Сучасні можливості друку дозволяють створювати майже будь-які компоненти біосенсорів і це значно зменшить вартість біосенсорів та полегшить їх масове виробництво [68].

1.2. Аденозинтрифосфат

Аденозин-5'-трифосфат (АТФ) є органічною молекулою, яка складається з трьох структурних частин: аденіну (нітрогенвмісна циклічна сполука), рибози (цукор), і трьох залишків фосфорної кислоти (рис. 1.3).

При нейтральному рН фосфатні групи АТФ є негативно зарядженими, і цей заряд компенсується двома іонами натрію або одним іоном магнію. У дослідженнях АТФ, як правило, використовується у формі динатрієвої солі. У біологічних тканинах заряд АТФ компенсується іонами Mg^{2+} .

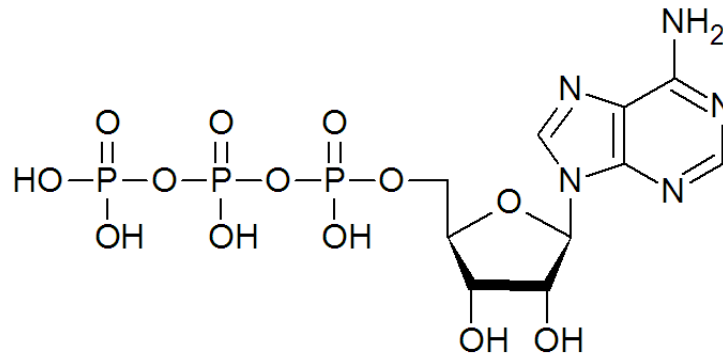


Рис. 1.3. Хімічна формула АТФ

АТФ є основною високоенергетичною сполукою в клітинах будь-якого організму. Вона синтезується фосфорилуванням аденозин-5'-дифосфату в основних біохімічних шляхах клітини - гліколізу і циклу Кребса з окисним фосфорилуванням. Крім того, АТФ утворюється як продукт у багатьох інших ферментативних реакціях. Отримані молекули АТФ використовуються для синтезу низки необхідних клітинних сполук, таких як білки, нуклеотиди, нуклеїнові кислоти, жирні кислоти, тощо. Насправді, АТФ бере участь (прямо чи опосередковано) майже у всіх клітинних реакціях і в багатьох фізіологічних реакціях [69, 70]. Так, АТФ бере участь у передачі нервових імпульсів в центральній нервовій системі. АТФ є нейромедіатором і котрансміттером, і він вивільняється в синапсах [71]. Крім того, АТФ бере участь в регулюванні тромбоутворення, де виступає в якості сигнальної молекули в каскаді, який керує згортанням крові; АТФ регулює діяльність імунної системи під час нападів астми [72, 73]. АТФ, як вважають, має велике значення для моторики шлунково-кишкового тракту, оскільки він регулює рівень вивільнення серотоніну (5-гідрокситриптаміну) [74, 75].

Незважаючи на широке використання АТФ в організмі людини, концентрація АТФ в плазмі крові дуже низька. Типові значення, наведені в літературі, знаходяться в діапазоні від 120 до 1250 нМ; цей широкий розкид результатів ймовірно викликаний різною обробкою зразків [76]. При травмах

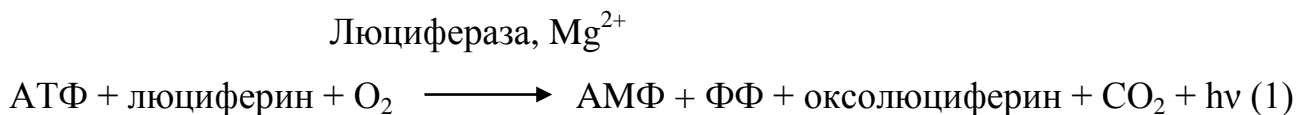
клітини пошкоджуються і вивільняють велику кількість АТФ в кров. Проте вивільнений АТФ швидко деградує протягом декількох хвилин [77].

Невеликі концентрації АТФ також присутні в сечі (2-6 нМ у здорових людей і 7-11 нМ у пацієнтів з синдромом гіперактивного сечового міхура) [78].

Таким чином, очевидно, що моніторинг концентрації АТФ, особливо в біохімічних, молекулярно-біологічних і біотехнологічних зразках, а також *in vivo* в тканинах і клітинах є дуже важливим. Визначення концентрації АТФ використовується для дослідження життєздатності клітин і їх проліферації, цитотоксичності, апоптозу і передачі енергії. Також, визначення концентрації АТФ може бути ефективним при розробці ліків, в тому числі тих, що засновані на інгібіторах кіназ [79–81]. Крім того, в харчовій промисловості визначення АТФ може бути використане для оцінки бактеріальної контамінації харчових продуктів і напоїв [82].

1.3. Класичні методи визначення АТФ

Біолюмінесцентний метод на основі люциферази є найстарішим і найбільш часто використовуваним сьогодні методом визначення АТФ. Люцифераза – це фермент, що міститься в деяких організмах, зокрема в комах, і відповідає за випромінювання світла організмами. Люцифераза виробляє світло у відповідності з наступною реакцією:



Як видно з реакції, люцифераза розщеплює АТФ до аденозинмонофосфату (АМФ) і пірофосфату (ФФ), одночасно відбувається окиснення люциферину і випромінювання світла. Спектр випромінювання розташований в області 470-700 нм з максимумом при 562 нм. Люциферази є

дуже селективними відносно АТФ і інтенсивність виробленого світла прямо пропорційна концентрації АТФ. Ця реакція була відкрита в 1884 р [83] і вперше застосована для визначення АТФ в 1947 році [84]. У наші дні ця реакція застосовується в сучасній люмінометрії та в десятках інших подібних методах, які є швидкими, селективними, чутливими, і, отже, широко поширеними. Найбільш чутливі методи мають межу виявлення АТФ в діапазоні фемтомоль [10]. Недоліком методів, оснований на люциферазній реакції, є те, що вони є практично непридатними для визначення АТФ в режимі реального часу та *in vivo* з кількох причин. По-перше, необхідно використовувати чутливі камери, що ускладнює мініатюризацію вимірювального приладу. По-друге, люциферин і люцифераза повинні бути додані до зразка, наприклад, впорскуванням в тканини. Інша проблема полягає в тому, що активність люциферази залежить від складу робочого розчину. Люцифераза чутлива до концентрації різних катіонів (наприклад, Cu^{2+} , Zn^{2+} , Ca^{2+}) і аніонів (наприклад, CO_3^{2-} , PO_4^{3-} , SO_4^{2-}), тому для визначення АТФ в складних зразках необхідна їх попередня обробка. Крім того, люциферазі потрібні іони Mg^{2+} в якості кофактору [85].

Іншими методами визначення АТФ є різновиди спектрофотометрії. Молекула АТФ здатна поглинати світло в ультрафіолетовій області спектра і є флуорофором. Поглинання ультрафіолетового світла може бути використаним для визначення концентрації АТФ за допомогою УФ-спектрофотометрії при 260 нм [10]. Цей метод є досить простим і не вимагає додавання реагентів, але він є неселективним. Інші аденін-вмісні молекули мають подібний пік поглинання. Щоб обійти цю проблему, проводять розділення речовин за допомогою високоефективної рідинної хроматографії (ВЕРХ) перед детектуванням.

АТФ також можна визначати з використанням методів на основі флуоресценції. Дані методи засновані або на гасінні флуоресценції рідкоземельних металів у комплексі з АТФ, або на посиленні флуоресценції, наприклад, збільшенні флуоресценції рідкоземельних елементів (Eu або Tb) в

присутності АТФ та доксицикліну, окситетрацикліну чи фенантроліну [10]. Нещодавно інші стратегії посилення флуоресценції за участю комплексів АТФ із аптамерами [86] або агрегації катіонного похідного політіофену в присутності АТФ, були запропоновані [87].

Різновиди рідинної хроматографії часто використовуються для високоточного визначення концентрації АТФ. Поза всяким сумнівом, хроматографія (і особливо ВЕРХ) є дуже потужним, чутливим, селективним і досить швидким методом аналізу. Іншою перевагою цього методу є можливість виявлення різних речовин одночасно. Для поліпшення можливостей ВЕРХ, ультраефективна рідинна хроматографія була нещодавно запропонована для визначення АТФ [88]. Детекція АТФ після розділення фракції класично здійснюється за допомогою вимірювання УФ-поглинання або флуоресцентної спектрометрії. Незважаючи на свої переваги, хроматографічні методи вимагають кваліфікованого персоналу і складного дорогого устаткування. Іноді зразок має бути попередньо оброблений перед аналізом. Крім того, хроматографія не може бути використана для визначення концентрації АТФ в режимі реального часу та *in vivo*, а це є особливо важливим для біологічних досліджень [10, 89].

Мікродіаліз є способом отримання рідких проб з живого організму, без значного пошкодження самого організму. Мікродіаліз використовується як додаток до хроматографії або спектрометрії, щоб мати можливість вимірювання концентрації АТФ або інших молекул в живих тканинах, наприклад, таких як нервова тканина. Цей метод заснований на невеликому зонді (трубка або катетер), який імплантується в тканини. Низькомолекулярні сполуки і вода з тканини дифундують всередину зонда і формують діалізат. Потім діалізат тече через трубку і збирається з зовнішнього боку зонда з послідовним аналізом за допомогою відповідного аналітичного методу. Перевагою мікродіалізу є можливість визначення декількох речовин в кожному зразку діалізату із застосуванням різних методів. Проте, часове розділення

мікродіалізу є не дуже добрим (зазвичай декілька хвилин), тому що утворення діалізату є досить повільним процесом [90–92].

1.4. Електрохімічні біосенсори для визначення концентрації АТФ

Підсумовуючи огляд традиційних методів визначення АТФ можна зробити висновок, що їх головними недоліками є складність та висока вартість обладнання, необхідність висококваліфікованого персоналу, а також висока складність для вимірювань в режимі реального часу та неможливість аналізу *in vivo*.

Альтернативою класичним методам аналізу може бути використання нових біоаналітичних приладів – біосенсорів, які позбавлені перелічених недоліків.

Біосенсори є перспективними приладами для визначення АТФ. У порівнянні з традиційними методами, АТФ-чутливі біосенсори мають наступні переваги:

- 1) вартість вимірювальної установки є досить низькою (від 1 до 5 тис. євро);
- 2) вимірювальна установка може бути розібрана і легко перевозиться з метою проведення вимірювань у потрібному місці;
- 3) використання біосенсорів є більш простим у порівнянні з рідинною хроматографією або іншими високотехнологічними методами;
- 4) ферментні біосенсори можуть бути використані для вимірювання концентрації АТФ в реальному часі. Наприклад, біосенсори можуть визначати поступове збільшення або зменшення концентрації АТФ. Це корисно в біохімічних дослідженнях для вивчення кінетики різних реакцій;
- 5) мікробіосенсори можуть бути імплантовані в тканини для вимірювання концентрації АТФ *in vivo*.

Тим не менш, біосенсори мають також деякі недоліки:

1) багато біосенсорів, особливо неферментативних, чутливі не тільки до АТФ, а й до структурно подібних молекул, таких як аденозиндифосфат (АДФ), гуанозинтрифосфат, уридинтрифосфат або цитидинтрифосфат;

2) більшість ферментних біосенсорів вимагають сталої концентрації гліцерину або глюкози, так як ці біосенсиори засновані на ферментативних системах, що містять ГОД чи гліцеролкіназу (ГК). Таким чином, зміни концентрації гліцерину або глюкози знижують точність вимірювань;

3) різноманітні іони, такі як Mg^{2+} , можуть впливати на активність ферментів. Тому важко точно вимірювати концентрацію АТФ в зразках складних за вмістом, так само як і у випадку біоломінесцентних методів на основі люциферази;

4) електрохімічні біосенсиори можуть мати інтерференцію від електроактивних речовин, таких як аскорбінова кислота, сечова кислота, дофамін та ін. Електрохімічні реакції на електродах, в яких беруть участь дані речовини, можуть викликати неспецифічні сигнали біосенсорів і заважати вимірюванням. Незважаючи на розроблені ефективні методи запобігання інтерференції (наприклад, використання напівпроникних мембран або зниження робочого потенціалу), контрольний сенсор без ферменту часто використовують паралельно під час вимірювань для контролю неспецифічних реакцій.

На сьогодні, існує декілька лабораторних прототипів афінних (найчастіше на основі аптамерів, які утворюють комплекс з АТФ) та електрохімічних біосенсорів для визначення АТФ, які основані на аптамерах [93–95], флуоресцентних зондах [96], різноманітних ферментативних реакціях, тощо. Нижче ми опишемо лише електрохімічні ферментні біосенсиори, оскільки вони близькі до запропонованих в даній роботі. Декілька потенціометричних та амперометричних ферментних біосенсорів було описано раніше, проте до останнього часу не було описано жодного кондуктометричного біосенсора, чутливого до АТФ.

Потенціометричні біосенсори

Лише декілька біосенсорів для визначення АТФ було розроблено, використовуючи іон-селективні польові транзистори (ІСПТ) та іммобілізовані ферменти. В одній роботі, H^+ -АТФаза (протонна помпа) була іммобілізована на рН-чутливий польовий транзистор за допомогою смоли на основі полівінілбутирату [12]. Лінійний діапазон визначення АТФ становив від 0,2 мМ до 1,0 мМ, та біосенсор втрачав 90 % активності після 18 днів. Час відгуку був близько хвилини. В більш недавній роботі, апіраза (АТФ-дифосфогідролаза) була іммобілізована на чутливу поверхню іон-селективного польового транзистора [97]. Коли ферментний шар селективно каталізував дефосфорилування АТФ, утворені протони акумулювалися в чутливій зоні перетворювача. Лінійний діапазон визначення АТФ був аналогічний попередньому біосенсору (0,2 – 1,0 мМ), та час відгуку був 5 хв. Головним недоліком даних потенціометричних біосенсорів є їхня низька чутливість до АТФ та залежність відгуків від буферної ємності середовища. Крім того, дані біосенсори не використовувались для визначення АТФ у реальних зразках.

Використовуючи інший підхід, було розроблено потенціометричний біосенсор на основі електроду з холін-чутливою мембраною та іммобілізованою холінкіназою [98]. Холін-чутливий електрод базувався на полімерній мембрані з іонним обмінником. Біосенсор генерував сигнал, пропорційний концентрації холіну. В присутності АТФ, холінкіназа фосфорилувала холін, зменшуючи його концентрацію, таким чином, сигнал біосенсора зменшувався. Межа визначення АТФ складала 10 мкМ. Цей біосенсор був успішно використаний для визначення вмісту АТФ в еритроцитах людини.

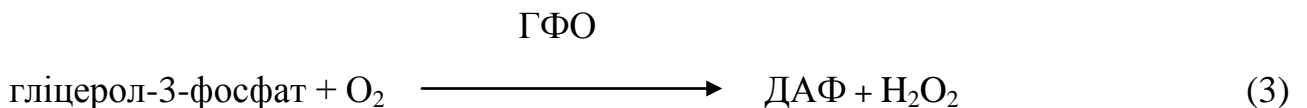
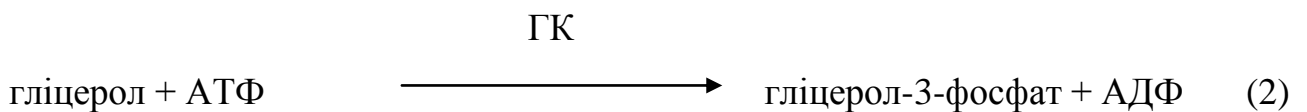
Найбільш чутливий потенціометричний біосенсор із запропонованих в літературі базується на пласкій мембрані з бішару ліпідів з вбудованою Na^+, K^+ -АТФазою (Na^+ -помпою) [99]. При наявності АТФ мембранний потенціал пропорційно зростає, що і реєструвалося вимірювальною установкою. Межа

визначення АТФ була 6,3 мкМ. Робочий діапазон складав 6,3 мкМ – 1 мМ. Біосенсор був чутливий також до уридинтрифосфату та гуанозинтрифосфату, проте не до цитидинтрифосфату та АДФ через селективність використаного ферменту. Для роботи біосенсора необхідно додавання іонів натрію та калію в аналізований зразок, оскільки вони транспортуються Na^+, K^+ -АТФазою. Дизайн та характеристики біосенсора є досить цікавими, проте його створення є трудомістким та стабільність при зберіганні ймовірно є дуже низькою.

Амперометричні біосенсори

Переважна більшість описаних в літературі біосенсорів для визначення АТФ оснований на амперометричних перетворювачах, які можуть бути мініатюризовані і використані для *in vivo* вимірювань. Також робота даних біосенсорів не дуже залежить від іонної сили та буферної ємності розчину у порівнянні з кондуктометричними та потенціометричними біосенсорами. Це робить вимірювання реальних зразків значно легшим. Нажаль, немає ферменту типу «АТФ оксидаза», який міг би бути використаний для прямого окиснення АТФ. Тому двоферментні системи на основі ГК/гліцерофосфатоксидази (ГФО) або ГОД/гексокінази (ГЕК) зазвичай використовуються.

Визначення АТФ при використанні першої ферментної системи базується на таких реакціях:



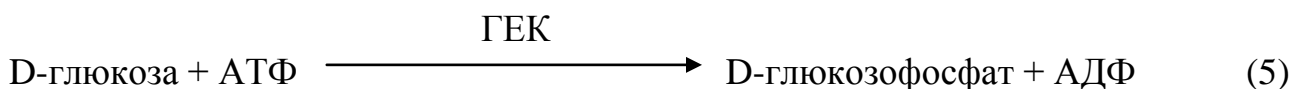
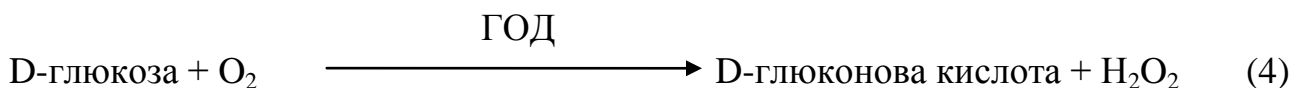
На першому етапі, ГК фосфорилує гліцерол, використовуючи АТФ, і на другому етапі гліцерол-3-фосфат окислюється ГФО до дигідроксиацетон фосфату (ДАФ) та пероксиду водню. Детекція основана на окисненні пероксиду водню на поверхні електроду, і відгук біосенсора прямо пропорційний концентрації АТФ. Втім, відгук біосенсора також залежить від

концентрації гліцеролу та гліцерол-3-фосфату. Для точного визначення концентрації АТФ, гліцерол-3-фосфат має бути відсутнім у зразку, та гліцерол має бути в такій концентрації, яка насичує ГК (>0,5 мМ). В такому випадку, реакція стає залежною лише від кількості АТФ в зразку. Мікробіосенсиори на основі цього каскаду реакцій були успішно використані для детекції АТФ у живих тканинах [92, 100]. Лінійний діапазон визначення АТФ складав 200 нМ – 50 мкМ, та час відгуку був 10 с. Цікаво, що автори використали диференційний режим вимірювань (з контрольним сенсором) для видалення сигналу від інтерферуючих речовин.

Ця двоферментна система також була використана при створенні комерційно доступних мікробіосенсорів для визначення АТФ фірмою Sarissa Biomedical Ltd. Ці мікробіосенсиори базуються на Pt/Ir дроті діаметром 25 та 50 мкм та вуглецевому волокні діаметром 7 мкм.

Нещодавно платинові мікроелектроди, модифіковані графеном з іммобілізованою ГК та ГФО були використані для вимірювання концентрації АТФ в режимі реального часу у тканинах рослин [101].

Альтернативною двоферментною системою для визначення АТФ є ГОД/ГЕК. В цьому випадку, каталізовані реакції є наступними:



Відгук біосенсора відбувається завдяки окисненню пероксиду водню, що утворюється внаслідок окиснення глюкози ГОД. Якщо АТФ присутній у вимірюваному зразку, то ГЕК фосфорилує глюкозу і концентрація глюкози зменшується. Тоді відгук біосенсора знижується пропорційно концентрації АТФ. Головною проблемою є залежність відгуків біосенсора від концентрації глюкози, яка має бути стабільною протягом вимірювань.

Описані біосенсори, що використовують дану систему, використовують як перетворювачі платинові електроди [102, 103], скловуглецеві електроди [104] та платинові мікроелектроди [14, 105]. Найбільша чутливість до АТФ була досягнута у випадку біосенсора на основі скловуглецевих електродів. Їхній діапазон визначення АТФ складав 0,5-20 мкМ, а при зберіганні у 0,1 М фосфатному буфері, рН 7,4, при 4 °С біосенсор втратив 35 % активності після 22 діб. Біосенсори на основі платинових електродів мали ширший діапазон визначення АТФ (50-500 мкМ [102] та 10-200 мкМ [103]), проте характеризувались гіршою стабільністю при зберіганні (втрата активності – 60 % після 2 тижнів). Для запобігання окисненню електроактивних речовин, поверхню електродів покривали мембраною на основі поліфенілендіаміну (ПФД), яка дозволяла дифузії до електроду та окиснення пероксиду водню, проте не пропускала відносно більші молекули. Концентрація АТФ у реальних зразках (гемолізат еритроцитів людини [102] та шлунково-кишкові тканини [14]) була оцінена, що показує, що система ГОД/ГЕК є достатньо ефективною.

1.5. Креатинкіназа

Креатинкіназа (КК) є важливим внутрішньоклітинним ферментом, який присутній у тваринних тканинах. КК зустрічається переважно в м'язах (в першу чергу скелетних м'язах та міокарді) та у мозку, проте КК також присутня у інших тканинах, які потребують великої кількості енергії.

КК забезпечує додаткове постачання енергії для функціонування клітини та підтримує стабільне співвідношення АТФ/АДФ. Таким чином, КК регулює клітинний гомеостаз. Як було описано раніше, головним переносником енергії в клітині є АТФ. Під час активної м'язової роботи відбувається вичерпання запасів АТФ у м'язових клітинах, і тоді КК утворює нові молекули АТФ шляхом переносу фосфатної групи від креатинфосфату до АДФ. Таким чином, КК забезпечує м'язам додаткову енергію, яка зберігається у вигляді

креатинфосфату. Протягом періоду спокою КК каталізує зворотну реакцію і поповнює запаси креатинфосфату.

В нормі КК в сироватці крові практично відсутня. Активність КК в сироватці крові здорових чоловіків становить 0,038-0,174 од.акт./мл, жінок – 0,026-0,14 од.акт./мл, дітей в кілька разів більше ніж у дорослих. Внаслідок тривалої фізичної роботи, а також при пошкодженні м'язової тканини (наприклад, внаслідок різних запалень, інфаркту міокарду і м'язової дистрофії) КК потрапляє в кров і її активність в сироватці зростає в декілька разів, максимум до 2,0 од.акт./мл або 39-185 нг/мл [106–108]. Також активність КК в сироватці зростає при гіпотиреозі. Зазвичай КК є біомаркером інфаркту міокарду і в сучасній лабораторній діагностиці активність (або концентрацію) КК часто визначають для підтвердження інших симптомів цього захворювання. Рівень КК у крові починає зростати одразу після інфаркту і перевищує норму через 4-6 годин, а максимальна концентрація КК спостерігається через 18-24 години після інфаркту [108]. За рівнем зростання КК проводиться оцінка важкості інфаркту для вибору лікування [109]. Також вимірювання концентрації КК в сироватці крові є корисним при оцінці фізичних якостей атлетів [106].

1.6. Класичні методи визначення КК

Імунологічні методи є найбільш точними та селективними методами досліджень біомаркерів, зокрема і КК [108, 110]. Вони базуються на зв'язуванні КК з селективним до неї антитілом і подальшій детекції цієї взаємодії за допомогою хемілюмінесценції або імуноферментного аналізу; описано також метод електрохімічної детекції зв'язування КК з антитілами [111]. Результатом є визначення вагової концентрації КК (в нанограмах). Перевагою імунологічних методів є можливість розрізнити різні ізоформи КК за умови підбору високоселективних антитіл, що є важливим для визначення

тканини, з якої КК потрапила в кров; також визначення КК не залежить від її активності, тому можуть використовуватись зразки, які зберігали в неналежних умовах або тривалий час. Недоліками імунологічних методів є висока вартість, необхідність використання тварин для продукування антитіл, необхідність особливих умов для проведення реакції, та відсутність можливості багатократного використання.

В клінічних лабораторіях зазвичай використовуються значно простіші спектрофотометричні методи визначення КК, які базуються на визначенні активності КК (в од.акт./мл) за швидкістю утворення продуктів реакції [112]. Поширена ферментна система КК-ГЕК-глюкозо-6-фосфатдегідрогеназа. КК синтезує АТФ, який використовується ГЕК для синтезу глюкозо-6-фосфату; останній окиснюється глюкозо-6-фосфатдегідрогеназою, яка утворює НАДН. НАДН реєструється спектрофотометрично при 340 нм і його кількість прямо пропорційна активності КК. Дані методи не можуть розрізнити ізоформи КК (визначається загальна активність всіх ізоформ КК у зразку), проте в більшості випадків тотальної активності КК є цілком достатньо для діагностичних цілей.

1.7. Електрохімічні біосенсори для визначення КК

Електрохімічні біосенсори є перспективною альтернативою імунологічним та спектрофотометричним методам визначення КК. Дані біосенсори потенційно є дешевими, простими у виробництві і використанні, та мають невеликі розміри. Біосенсори можуть бути використані для багаторазових вимірювань і бути поєднаними у мультибіосенсорні системи з метою одночасного визначення декількох аналітів у зразку, що корисно для всебічної діагностики пацієнта. Проте на сьогодні кількість описаних біосенсорів для визначення КК є невеликою.

Перша робота, в якій було запропоновано біосенсор для визначення КК, була опублікована в 1986 році [107]. В ній був використаний амперометричний

біосенсор на основі двоферментної системи ГОД-ГЕК. В даній роботі було вперше продемонстровано принципову можливість біосенсорного визначення активності КК шляхом визначення кількості АТФ, що продукується в ході реакції. Проте слід відзначити, що метою роботи було доведення роботи каскаду ферментативних реакцій КК-ГЕК-ГОД, і автори не визначали аналітичні характеристики біосенсора і не пропонували методик, за якою можна було б виміряти концентрацію КК в реальних зразках. Запропонований в роботі принцип визначення КК був взятий за основу при розробці біосенсора, описаного в нашій роботі.

Також були створені біосенсори на основі ферментної системи ГК-ГФО [106, 113]. Зокрема, в роботі [106] було використано дешеві одноразові перетворювачі, які отримували шляхом вакуумного напилення золотих електродів на полікарбонатну підкладку; при цьому з однієї полікарбонатної пластини отримували 200 перетворювачів з трьома електродами на кожному. Цей біосенсор був одноразового використання, проте продемонстрував гарну відтворюваність результатів вимірювань. Автори дослідили аналітичні характеристики біосенсора та провели вимірювання активності КК в одному зразку сироватки крові.

Принципово інший підхід до створення біосенсорів для визначення КК було запропоновано в роботі [108]. В ній описано афінний електрохімічний біосенсор. Креатинфосфат (один з субстратів КК) іммобілізували на поверхню амперометричного перетворювача, після чого додавали зразок з КК, яка зв'язувалась із іммобілізованим креатинфосфатом та від'єднувала від нього фосфатну групу. Це призводило до зміни електрохімічних характеристик поверхні електроду, що реєстрували за допомогою вольтаметрії та спектроскопії електрохімічного імпедансу. Біосенсор мав високу чутливість та селективність і був апробований для вимірювання зразків синтетичної крові. Недоліками даного біосенсора є одноразове використання, складні процедури приготування біосенсора і схеми проведення вимірювання.

1.8. Підсумки

Таким чином, на сьогодні вже розроблено низку ферментних електрохімічних біосенсорів для визначення АТФ і КК. Для створення біосенсорів застосовувались різні типи фізичних перетворювачів та різні ферментні системи. З огляду літератури можна зробити висновок, що при розробці біосенсора для визначення АТФ більшість дослідників стикається з проблемою впливу концентрації гліцеролу чи глюкози на чутливість біосенсора до АТФ, що вносить суттєву похибку в аналіз. Іншою важливою проблемою є визначення концентрації АТФ в режимі реального часу та *in vivo*, а це є особливо важливим для біологічних досліджень

Щодо біосенсорів для визначення КК, то тут має місце проблема багаторазового використання біосенсора. В більшості випадків можливо використовувати один біосенсор для вимірювання лише одного зразку, що збільшує собівартість такого вимірювання. Традиційні ж методи визначення КК потребують складного і дорогого обладнання та є не портативними.

З огляду на зазначене, найбільш перспективним, на наш погляд, є створення біосенсорної системи на основі дискових платинових електродів як фізичних перетворювачів та біоселективних елементів на основі іммобілізованих ГОД та ГЕК. Така система зможе вимірювати одночасно концентрацію глюкози біосенсором на основі ГОД та концентрацію АТФ біосенсором на основі ГОД та ГЕК. Використання такої системи дозволить проводити просте, надійне, селективне та одночасне визначення АТФ та глюкози в одну стадію у біологічних зразках. Варто зазначити, що аналогів подібної біосенсорної системи в світі ще не існує. Для розробки біосенсора для визначення активності КК пропонується використати АТФ-чутливий біосенсор і розробити процедуру багаторазового його використання. Принцип методу полягає у детекції АТФ, що продукується КК в робочій комірці під час каталізу КК біохімічної реакції.

РОЗДІЛ 2

МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ

2.1. Матеріали

В роботі використовували такі реактиви: ГОД із *Aspergillus niger* (КФ 1.1.3.4) з активністю 272 од.акт./мг фірми «Genzyme» (Великобританія); ГЕК із *Saccharomyces cerevisiae* (КФ 2.7.1.1) з активністю 30,6 од.акт./мг фірми «Sigma-Aldrich» (США); креатинкіназа із м'язів кроля (КК, 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 креатинкінази були люб'язно надані Київським міським науково-практичним центром нефрології та гемодіалізу.

2.2. Конструкція амперометричних перетворювачів на основі дискових платинових електродів

В роботі як амперометричні перетворювачі використовували платинові дискові електроди власного виготовлення (рис. 2.1) та, лише в першій частині роботи, планарні нікелеві електроди.

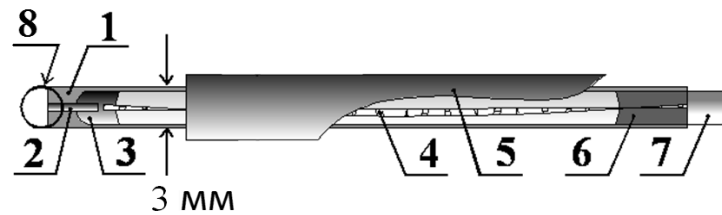


Рис. 2.1. Схематичне зображення амперометричного перетворювача на основі платинового дискового електроду: 1) скляна трубка; 2) платиновий дріт; 3) сплав Вуда; 4) мідний дріт; 5) захисне покриття; 6) епоксидна смола; 7) контактна площадка; 8) чутлива область

При створенні платинових дискових електродів, спочатку платиновий дріт діаметром 0,4 мм і довжиною 3 мм запаювали в кінцевій частині скляного капіляра із зовнішнім діаметром 3,5 мм. Відкритий торець дроту виступав робочою поверхнею перетворювача. Потім платиновий дріт за допомогою легкоплавкого сплаву Вуда з'єднували з провідником, розміщеним всередині капіляра. На другому кінці провідника приєднували контактну площадку для підключення до вимірювальної установки. Робочу поверхню електродів отримували шліфуванням із використанням порошку оксиду алюмінію (розмір частинок 0,1 мкм та 0,05 мкм) та протирали чистим спиртом перед іммобілізацією біоселективного елементу. Періодично електродну поверхню поновлювали за допомогою такого ж шліфування. Таким чином, один перетворювач використовували багаторазово для створення кількох різних біосенсорів.

Для створення планарних нікелевих перетворювачів, на єдину підкладку наносили чотири робочі електроди, електрод порівняння та допоміжний електрод. Металізація пластин електродів проводилась методом магнетронного розпилення на установці вакуумного напилення «Катод-1М». В якості провідної системи використовувались плівки Ti-Ni. Для формування адгезійного підшару Ti використовувалась мішень марки BT1-00. Поверхневий опір плівки підшару складав 150-200 Ом/см. В якості основного провідного шару використовувались плівки Ni марки НВК, поверхневий опір плівки Ni

складав $R_s \leq 0,15$ Ом/см. Струмopрoвідні шини за виключенням активної області та зони контактів покривались захисним шаром, в якості якого використовувався фоторезист ФП383 з товщиною 1,5-2 мкм, задублений при температурі 150 °С протягом 30 хв. Поверхневий опір струмopрoвідних шин складав 0,13-0,15 Ом/см, що забезпечує опір доріжки від контактної області до активної зони не більше 30 Ом. В якості підкладки використовувався ситал односторонньої поліровки марки СТ-50-І-0,6 з класом поліровки робочої поверхні – 13-14.

2.3. Конструкція кондуктометричних перетворювачів на основі золотих гребінчастих електродів

В роботі використовували кондуктометричні перетворювачі, виготовлені згідно наших рекомендацій в Інституті фізики напівпровідників імені В.Є. Лашкарьова НАН України (м. Київ, Україна). Вони мають розмір 5 мм × 30 мм та складаються з двох ідентичних пар золотих гребінчастих електродів, нанесених на керамічну підкладку (рис. 2.2).

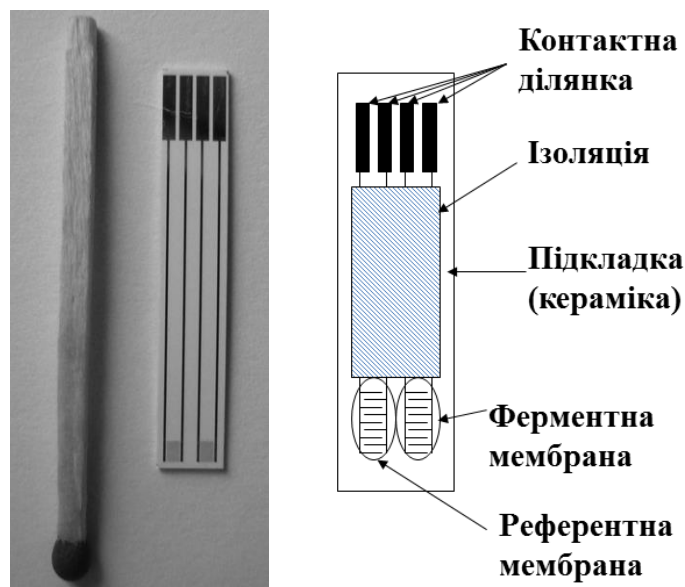


Рис. 2.2. Зовнішній вигляд та схема кондуктометричного перетворювача на основі золотих гребінчастих електродів

Кожна пара гребінчастих електродів містить 20 комплементарних растрових пальців, що мають ширину та зазор між ними 20 мкм із загальною площею чутливої поверхні біля 2 мм². Використання одночасно двох пар електродів обумовлено необхідністю проводити вимірювання у диференційному режимі, коли на одну з пар електродів наносять фермент, а на іншу пару – БСА. Остання пара виступає як референтна та дозволяє значно покращувати точність біосенсорних вимірювань і зменшувати вплив неінформативних заряджених частинок на відгук біосенсора.

Мікрофотографії даних електродів наведені в роботі [20].

2.4. Вимірювальна установка для амперометричних досліджень

В роботі використовувалась трьохелектродна схема амперометричного аналізу. Робочі амперометричні електроди, допоміжний платиновий електрод 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, проте зазвичай до нього були підключені 2-3 робочі електроди. Відстань між допоміжним платиновим електродом та усіма робочими біосенсорами в процесі вимірювання була однаковою і складала приблизно 5 мм. Загальний вигляд вимірювальної установки, під'єднаної до комп'ютера, показано на рис. 2.3.

Також, на першому етапі роботи, використовувався потенціостат українського виробництва, який був розрахований на роботу з 4-ма робочими електродами і був складовою амперометричного комплексу. До його складу входять: електрохімічна вимірювальна комірка (Е/Х комірка) з чотирма робочими електродами (РЕ), допоміжним електродом (ДЕ) та електродом порівняння (ЕП), електронний вимірювальний блок (ВБ) і персональний комп'ютер (ПК). ВБ складається з уніфікованого базового модуля (УБМ) та

адаптера сенсорів - блока потенціостату. За допомогою останнього підтримуються необхідні потенціали електродів комірки, а також знімається і перетворюється її вихідний струмовий сигнал. Електроживлення вимірювальної системи здійснюється блоком живлення (БЖ) від акумулятора або через мережевий адаптер від мережі змінного струму.



Рис. 2.3. Зовнішній вигляд вимірювальної установки для амперометричних вимірювань

Базовий модуль виконує основні функції, властиві широкому класу вимірювальної апаратури: формує напругу живлення електронних вузлів усього вимірювального блоку, вимірює і перетворює в цифрову форму вхідні інформативні сигнали (U_x), виробляє аналогові ($U_{уп}$) і логічні сигнали керування (СУ) вимірювальними перетворювачами. У цьому випадку таким вимірювальним перетворювачем, що формує сигнал U_x , є потенціостат (П).

До складу УБМ входить мікропроцесорний контролер (МПК) із відповідним програмним забезпеченням нижнього рівня, що забезпечує виконання вимірювальних операцій, необхідну обробку сигналів та обмін даними із ПК через інтерфейс (ІФ). Для сполучення вимірювального перетворювача (потенціостату) із МПК УБМ містить аналого-цифровий перетворювач (АЦП) та цифро-аналоговий перетворювач (ЦАП) з джерелом опорної напруги (ДОН) і блок регістрів (БР) для формування логічних сигналів СУ.

Основним елементом потенціостату є операційний підсилювач (ОП), у колі зворотного зв'язку якого включена вимірювальна комірка. За допомогою ОП комірки визначається електричний потенціал в досліджуваному розчині поблизу РЕ. Для коректності цього визначення необхідно, щоб в колі ОП струм був практично відсутнім. З цією метою в схему потенціостату введений повторювач напруги із вхідними струмами, меншими 1 пА. Вихідний струм потенціостату I_x протікає в колі РЕ і при цьому потенціал РЕ повинен бути близьким до 0. Для зняття цього струму з дотриманням зазначеного режиму застосовується перетворювач струм - напруга (ПСН) на основі прецизійного операційного підсилювача з великим коефіцієнтом підсилення. Такий перетворювач підключено до кожного з робочих електродів. У колі зворотного зв'язку ПСН включений регульований резистор R_1 , що визначає його коефіцієнт перетворення i , отже, діапазон вимірюваних струмів. За допомогою комутатора К (перемикача каналів) до виходу потенціостату підключається вихід одного з ПСН. Для перемикання діапазонів вимірювання використовуються сигнали СУ. Величина вихідного сигналу U_x визначається співвідношенням:

$$U_x = I_x \cdot R_1$$

де: I_x – струм між допоміжним і робочим електродами.

Значення U_x перетворюється в цифровий код за допомогою аналогово-цифрового перетворювача (АЦП) і передається МПК у персональний комп'ютер комплексу для подальшої обробки і реєстрації. Величина струму I_x у комірці з електродом порівняння повністю визначається електрохімічними процесами на РЕ, які, у свою чергу, залежать від потенціалу розчину (потенціал ДЕ відносно потенціалу РЕ). Точність завдання цих потенціалів залежить від напруг зсуву операційних підсилювачів потенціостату, що також необхідно враховувати при виборі елементної бази і при розробці детальних принципових схем цього пристрою. Потенціал ЕП у даній схемі жорстко пов'язаний з керуючою напругою $U_{уп}$ (вони рівні, якщо $R_2 = R_3$). Величина $U_{уп}$ формується цифро-аналоговим перетворювачем блоку УБМ. Керування значенням $U_{уп}$ здійснюється за допомогою ПК програмою верхнього рівня через МПК блоку УБМ. Схема даного амперометричного комплексу наведена на рис. 2.4.

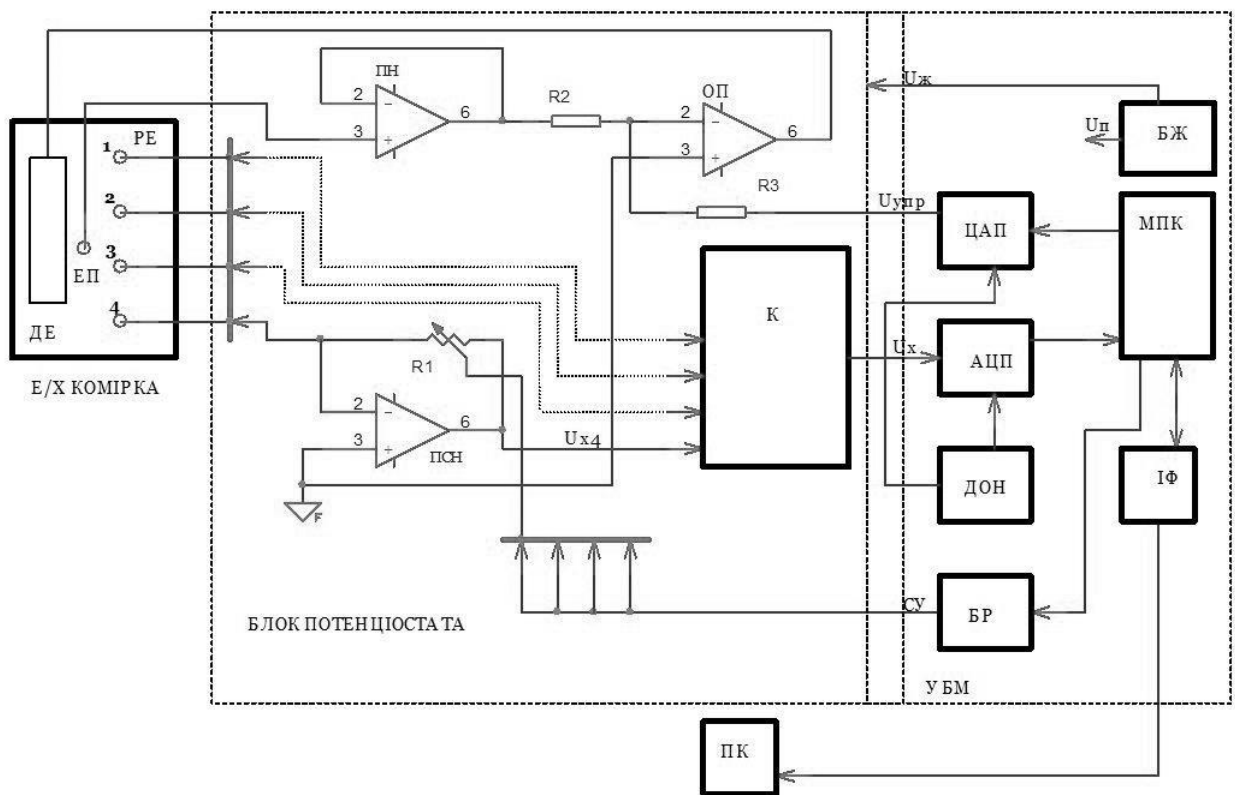


Рис. 2.4. Структурна схема апаратури амперометричного комплексу

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. Робочим буфером виступав 25 мМ HEPES з рН 7,4, з 2 мМ Mg^{2+} ; також в частині експериментів використовувався фосфатний та тріс-буфер, про що вказано у відповідних розділах роботи. Концентрації субстратів в робочій комірці задавали додаванням аліквот концентрованих розчинів субстратів (50 мМ і 500 мМ глюкози та 50 мМ АТФ). Усі дослідження проводились у трьох повторностях. Дані, наведені в таблицях та на рисунках, є середнім значенням трьох експериментів \pm середньоквадратичне відхилення, яке було пораховано за допомогою програми OriginLab OriginPro 8.5.

2.5. Вимірювальна установка для кондуктометричних досліджень

Кондуктометричні 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 фарадеевські процеси, зарядження подвійного шару та поляризація мікроелектродів. Технічні подробиці роботи приладу наведені в роботі [114]. Загальний вигляд робочої комірки та приладу, під'єданого до комп'ютера, наведений на рис. 2.5.

Виміри проводились у 5 мМ HEPES з рН 7,4, з 2 мМ Mg^{2+} ; за кімнатної температури, у відкритій комірці об'ємом 2 мл при постійному перемішуванні (рис. 2.6). Робочий буфер мав меншу концентрацію ніж у випадку амперометричних вимірювань через значну залежність кондуктометричних вимірювань від іонної сили та буферної ємності розчину. Концентрації субстратів в робочій комірці задавали внесенням до комірки концентрованих розчинів цих речовин. Усі дослідження проводились у двох-трьох серіях.

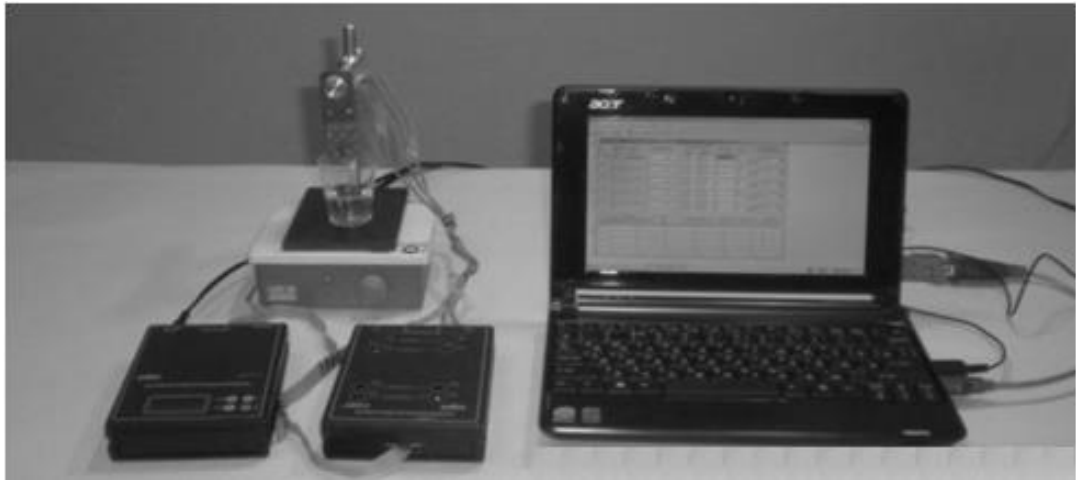


Рис. 2.5. Зовнішній вигляд вимірювальної установки для кондуктометричних вимірювань, що містить кондуктометр, робочу комірку з перетворювачем, та комп'ютер

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. Статистична обробка даних проводилась так само, як і при амперометрії.

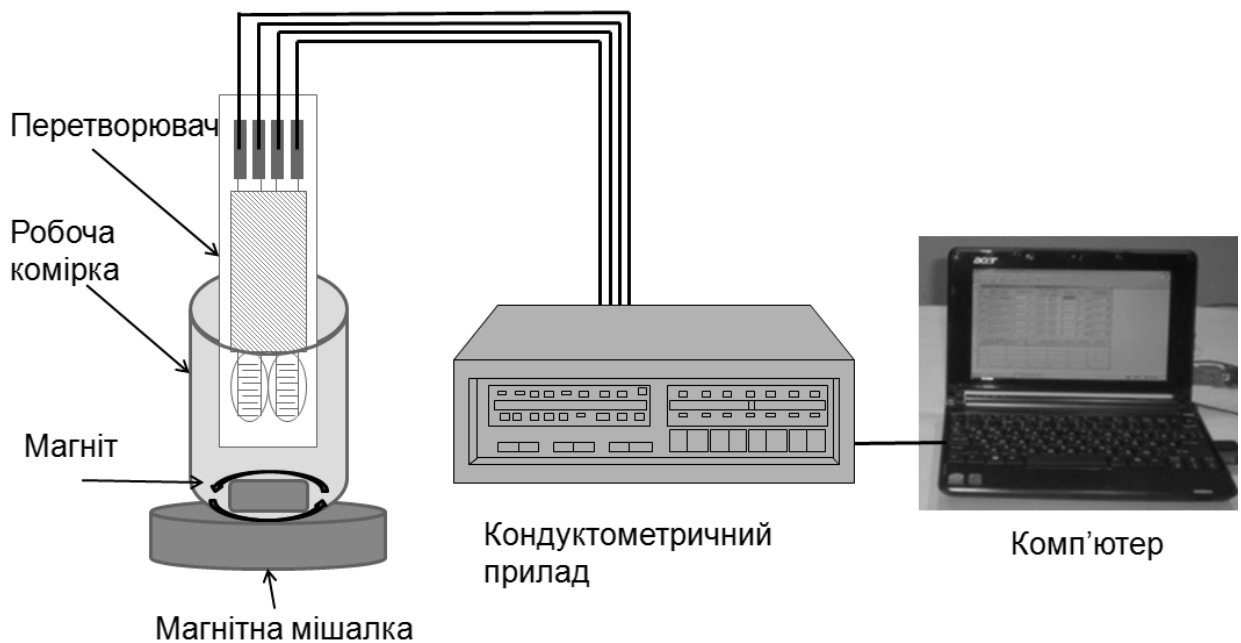


Рис. 2.6. Схема вимірювальної установки для кондуктометричних вимірювань

2.6. Методика нанесення ПФД мембрани

Для формування на чутливій поверхні амперометричних перетворювачів ПФД мембрани, триелектродну систему з чистим робочим електродом занурювали у 5 мМ розчин *m*-фенілендіаміну, після чого отримували 4-5 циклічних вольтамперограм (ЦВА). Фенілендіамін був розчинений у 10 мМ калій-фосфатному буфері, рН 7,4; даний розчин використовували свіжовиготовленим, оскільки фенілендіамін швидко окиснюється. Параметри ЦВА були наступними: початковий потенціал – 0 В, кінцевий потенціал становив +0,9 В, швидкість зміни потенціалу складала 20 мВ на секунду, крок зміни потенціалу – 5 мВ. Після цього поверх ПФД мембрани іммобілізували ферменти.

2.7. Методика іммобілізації ферментів на поверхнях амперометричних перетворювачів

Біоселективні елементи формували шляхом іммобілізації ферментів на поверхнях амперометричних перетворювачів. Вихідний розчин для виготовлення робочої мембрани біосенсора для визначення АТФ та глюкози містив 5 % (тут і далі – масова частка) ГОД, 5 % ГЕК, 3 % БСА у 20 мМ фосфатному буфері, рН 6,5, з 10 % гліцеролом. Вихідний розчин для виготовлення робочої мембрани біосенсора для визначення глюкози містив 4-5 % ГОД, 3 % БСА у 20 мМ фосфатному буфері, рН 6,5, з 10 % гліцеролом. Перед нанесенням на поверхні перетворювачів ці розчини змішували з 0,4 % водним розчином глутарового альдегіду (зшиваючого агенту) у пропорції 1:1. Одразу після цього суміші наносили на робочі поверхні перетворювачів та висушували протягом 40 хв. на повітрі за кімнатної температури. Потім електроди занурювали у робочий буфер на 10 хв. для вимивання незв'язаних компонентів біоселективних елементів та надлишку глутарового альдегіду.

2.8. Методика іммобілізації ферментів на поверхнях кондуктометричних перетворювачів

Як і у випадку амперометричних біосенсорів, у випадку кондуктометричних біосенсорів біоселективні елементи отримували шляхом ковалентної іммобілізації ферментів і допоміжних речовин на поверхнях перетворювачів. Вихідний розчин для виготовлення робочої мембрани біосенсора для визначення АТФ містив 10 % ГЕК, 5 % БСА у 20 мМ фосфатному буфері, рН 6,5, з 10 % гліцеролом. Вихідний розчин для виготовлення референтної мембрани біосенсора містив 15 % БСА у 20 мМ фосфатному буфері, рН 6,5, з 10 % гліцеролом. Перед нанесенням на поверхні перетворювачів ці розчини змішували з 0,8 % водним розчином глутарового альдегіду (зшиваючого агенту) у пропорції 1:1. Одразу після цього суміші наносили на робочі поверхні кондуктометричних перетворювачів (близько 100 нл на кожну поверхню) та висушували протягом 40 хв. на повітрі за кімнатної температури. Потім електроди занурювали у робочий буфер на 10 хв. для вимивання незв'язаних компонентів біоселективних елементів та надлишку глутарового альдегіду.

РОЗДІЛ 3

РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕНЬ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

3.1. Дослідження аналітичних характеристик амперометричних перетворювачів за допомогою потенціостату PalmSens та його вітчизняного аналогу

Ефективність роботи біосенсора залежить як від характеристик самого біосенсора, так і від вимірювального обладнання, до якого підключено біосенсор, наприклад потенціостату чи кондуктометра.

На сьогодні в Україні існує проблема підбору потенціостату при створенні лабораторних прототипів біосенсорів, оскільки зараз можна використовувати потенціостати лише закордонного походження – PalmSens, DropSens, та інші. Ці потенціостати коштують кілька тисяч доларів, що робить їх досить дорогими для придбання українськими лабораторіями. Крім того, їх складно купувати бюджетним установам, оскільки дистриб'юторів даних фірм в Україні немає, а замовляти напряму у виробника неможливо. Тому актуальною є розробка українського потенціостату, який би відповідав за характеристиками потенціостатам закордонного походження, але був би набагато вигіднішим в фінансовому плані, і вироблявся би в Україні.

В Інституті електродинаміки НАН України (відділ електричних і магнітних вимірювань) було розроблено експериментальний зразок (прототип) потенціостату та передано в Інститут молекулярної біології та генетики НАНУ (лабораторія біомолекулярної електроніки) для його тестування.

Відповідно першим етапом даної роботи було порівняти характеристики потенціостату українського виробництва із потенціостатом PalmSens

(Нідерланди) для того, щоб визначити, чи здатен потенціостат українського виробництва замінити PalmSens при розробці біосенсорів. Зокрема, робота була націлена на порівняння аналітичних характеристик сенсорів та біосенсорів при амперометричному визначенні перекису водню та глюкози. Крім того, одночасно було проведено дослідження планарних амперометричних нікелевих перетворювачів, створених шляхом недорогої технології вакуумного напилення металу на підкладку. Крім простої та дешевої технології виготовлення, їх перевагою було нанесення 4-х робочих електродів, а також допоміжного електроду та електроду порівняння, на один перетворювач. Дані перетворювачі є більш дешевими за звичайні амперометричні електроди на основі благородних металів, тож можуть бути більш перспективними для масового виробництва біосенсорів.

3.1.1. Визначення перекису водню амперометричними перетворювачами із використанням двох потенціостатів. Чутливість амперометричних перетворювачів до перекису водню є дуже важливим параметром при створенні та роботі біосенсорів, що базуються на вимірюванні концентрації перекису водню як продукту ферментативної реакції. Висока чутливість перетворювача стосовно перекису водню приведе до високої чутливості біосенсора, на основі даного перетворювача, до досліджуваної речовини. Тому першим етапом роботи було порівняння чутливості амперометричних перетворювачів до перекису водню із використанням двох потенціостатів (PalmSens, Нідерланди, та вітчизняного виробництва). Було проведено порівняння відгуків перетворювачів, під'єднаних до обох потенціостатів, в режимі амперометричних вимірювань, та отримано ЦВА за відсутності та за наявності перекису водню в вимірювальній комірці. Метод циклічної вольтамперометрії дозволяє аналізувати чутливість перетворювачів до певних субстратів при різному потенціалі. Тому, аналізуючи ЦВА, можна визначити оптимальний робочий потенціал для амперометричних вимірювань.

При проведенні експерименту, спочатку отримували 1-2 ЦВА у чистому робочому буфері, після чого до вимірювальної комірки додавали перекис водню (0,5 мМ) і отримували ще 3-4 вольтамперограми. Умови отримання ЦВА були однаковими для обох потенціостатів. Типові ЦВА обох потенціостатів до та після додавання перекису водню зображені на рис. 3.1 та 3.2.

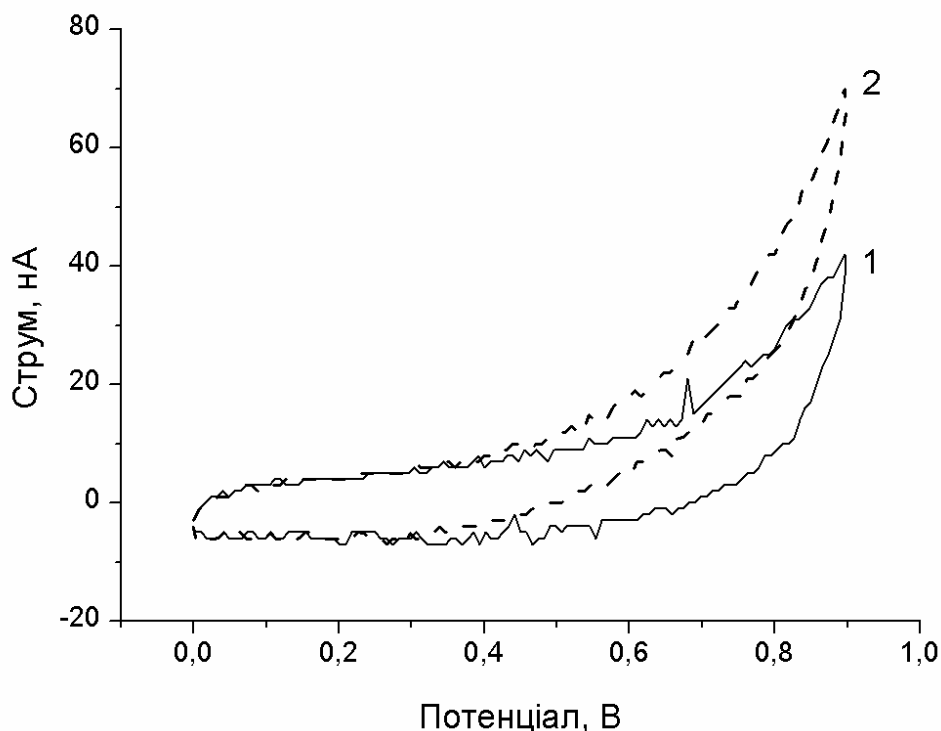


Рис. 3.1. ЦВА, отримані до (1) та після (2) додавання до комірки 0,5 мМ перекису водню із використанням потенціостату українського виробництва. Початковий потенціал становив 0 В, кінцевий – 0,9 В відносно внутрішнього електрода порівняння. Крок зміни потенціалу – 0,008 В, швидкість зміни потенціалу – 0,02 В/с. Вимірювання проводились у 5 мМ фосфатному буфері, рН 6,5

Потенціостат PalmSens демонструє менший рівень шуму, більш плавну вольтамперограму і має більшу чутливість до перекису водню, у порівнянні з потенціостатом українського виробництва. В обох випадках, суттєве збільшення сигналу при додаванні перекису водню спостерігається при

потенціалі, більшим за +0,6 В. Відповідно, незважаючи на меншу чутливість, вітчизняним потенціостатом можна правильно визначати оптимальний робочий потенціал для амперометричних вимірювань.

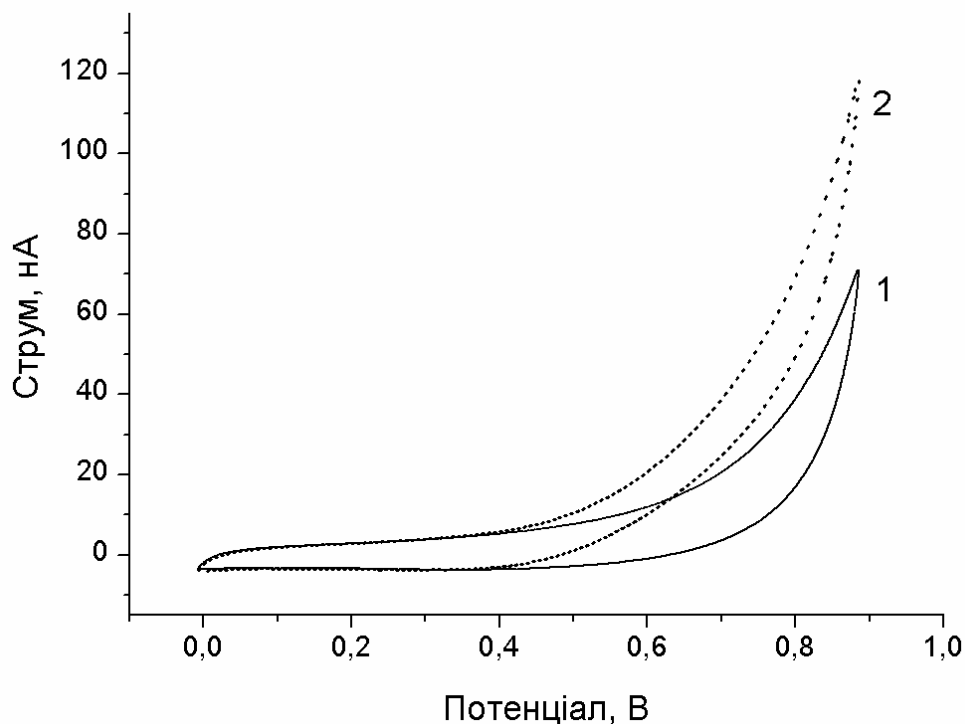


Рис. 3.2. ЦВА, отримані до (1) та після (2) додавання до комірки 0,5 мМ перекису водню із використанням потенціостату PalmSens. Умови отримання ЦВА такі самі, як і для рис. 3.1

Калібрувальні криві амперометричних перетворювачів для визначення перекису водню необхідні для оцінки чутливості перетворювачів до різних концентрацій перекису водню. Експеримент проводили в режимі амперометричних вимірювань у 5 мМ фосфатному буфері, при потенціалі 0,8 В відносно внутрішнього електроду порівняння шляхом додаванням до робочої вимірювальної комірки 0,2 мМ H_2O_2 кожні 30 секунд при потенціалі 0,8 В відносно внутрішнього електроду порівняння. Отримані калібрувальні криві наведені на рис. 3.3. З рисунка видно, що відгуки сенсорів були прямо пропорційні концентрації перекису водню на всьому діапазоні концентрацій,

причому чутливість PalmSens була дещо більшою; середня чутливість сенсорів складала 100 нА/мМ. Чутливості потенціостату українського виробництва було цілком достатньо для достовірного визначення концентрації перекису водню. З іншого боку, калібрувальна крива, отримана із використанням PalmSens, мала невелике відхилення від лінійності, в той час як потенціостат українського виробництва показав пряму залежність струму від концентрації перекису водню.

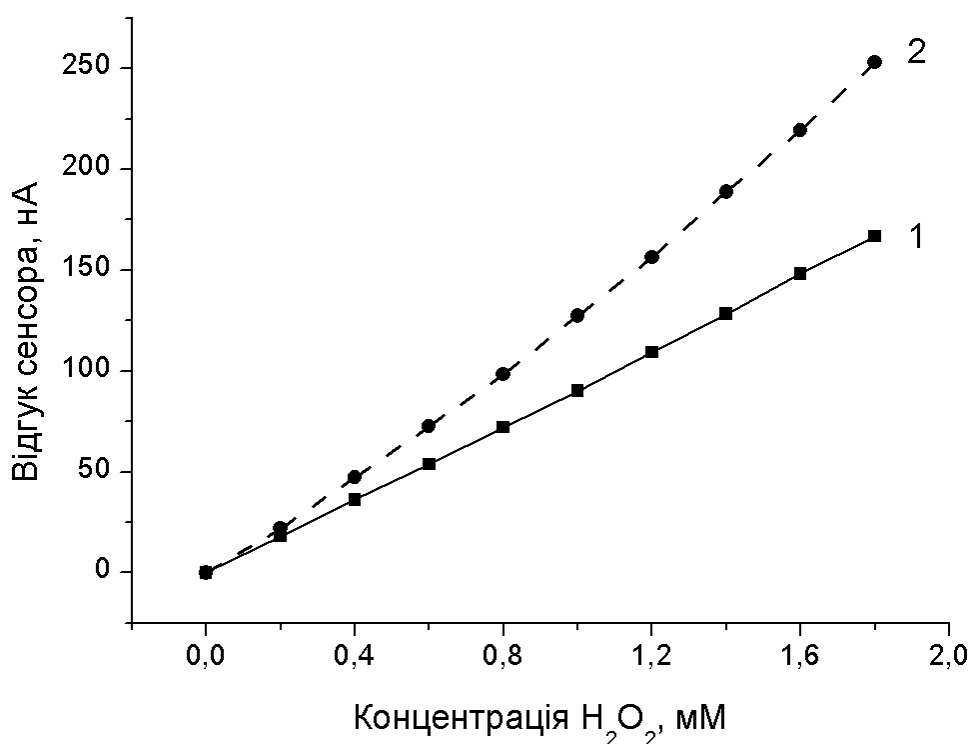


Рис. 3.3. Калібрувальні криві сенсорів для визначення перекису водню, отримані із використанням потенціостату українського виробництва (1) та PalmSens (2). Вимірювання проводились у 5 мМ фосфатному буфері рН 6,5 за потенціалу 0,8 В відносно внутрішнього електрода порівняння

Важливою характеристикою сенсорів є відтворюваність відгуків при додаванні однакових концентрацій досліджуваної речовини (це показує, як змінюється чутливість сенсора під час тривалої роботи). Цей параметр може залежати як від характеристик сенсора, так і від характеристик потенціостату.

Тому наступним етапом роботи було дослідження відтворюваності відгуків на перекис водню із використанням двох потенціостатів. Для цього, впродовж декількох годин безперервної роботи отримували відгуки на одну і ту саму концентрацію перекису водню (0,5 мМ). Час одного відгуку складав близько 40 секунд. Тривалість між відгуками складала приблизно 3 хв., протягом цього часу перетворювач і робочу комірку відмивали від перекису водню шляхом триразової заміни робочого буферу. Відтворюваність відгуків на перекис водню була майже однакова для обох потенціостатів (відносне стандартне відхилення відгуків становило 8 % для українського потенціостату та 7 % для PalmSens). В обох випадках спостерігалось збільшення відгуків сенсорів впродовж вимірювань на 15-20 %, що, ймовірно, пов'язано із використанням внутрішнього електроду порівняння, який приводив до дрейфу прикладеного потенціалу; потенціостат українського виробництва продемонстрував дещо менший дрейф сигналу протягом експерименту порівняно із закордонним аналогом. Першопричина дрейфу, скоріше за все, лежить в умовах вимірювань, аніж в потенціостатах.

Протягом місяця використання чутливість перетворювачів до перекису водню практично не змінювалась, що обумовлено стійкістю нікелю до хімічних модифікацій. Втім, через півтора-два місяця роботи відбувалось відшарування нікелю з поверхні перетворювачів, що практично унеможливило подальшу роботу з ними через втрату чутливості електродів. Причиною відшарування нікелю ймовірно було прикладання потенціалу до електродів, що призводило до погіршення зв'язків між нікелем та шарами підкладки. Тому слід завчасно замінювати нікелеві перетворювачі на нові, що не становить проблеми через низьку собівартість даних перетворювачів.

3.1.2. Порівняння біосенсорів на основі ГОД для визначенні глюкози.

Наступним етапом роботи була перевірка можливості створення біосенсорів для визначення глюкози шляхом іммобілізації ГОД на робочі електроди перетворювачів. Дані біосенсори були підключені до двох потенціостатів з

метою порівняння аналітичних характеристик біосенсорів, а саме калібрувальних кривих для визначення глюкози та відтворюваності відгуків на глюкозу.

Калібрувальні криві біосенсорів для визначення глюкози були отримані з використанням одного перетворювача, підключеного по черзі до обох потенціостатів. Лінійний діапазон вимірювання глюкози складав 0,1-2 мМ для біосенсора з використанням потенціостату українського виробництва та 0,05-2 мМ для PalmSens. Форма калібрувальних кривих була однаковою, що свідчило про відносну незалежність робочих характеристик біосенсора від підключеного потенціостату. Втім, через меншу чутливість і більший шум базової лінії у випадку українського потенціостату, при підключенні до нього біосенсорів останні демонстрували більшу мінімальну межу вимірювання глюкози (100 мкМ) у порівнянні з підключенням до PalmSens (50 мкМ).

Також було досліджено відтворюваність відгуків біосенсорів на глюкозу впродовж декількох годин безперервної роботи з використанням обох потенціостатів. Процедура експерименту була така сама як і при дослідженні відтворюваності відгуків голого амперометричного перетворювача на перекис водню, тільки у випадку ферментного біосенсора як субстрат використовували глюкозу. Помітного падіння відгуків за 15 вимірювань не відбувалось, що свідчить про гарну іммобілізацію ГОД в складі біоселективного елемента. Відтворюваність відгуків була різною для різних потенціостатів: відносне середньоквадратичне відхилення відгуків на глюкозу становило 4,4 % у випадку PalmSens і 7,9 % у випадку українського потенціостату.

За результатами усіх експериментів було складено порівняльну таблицю, в яку увійшли аналітичні характеристики перетворювачів та біосенсорів при вимірюванні концентрацій перекису водню та глюкози, відповідно, із використанням обох потенціостатів (табл. 3.1). Як видно з таблиці, в більшості випадків характеристики обох потенціостатів відрізнялися незначно. В цілому, потенціостат українського виробництва поступався PalmSens за деякими

параметрами, але характеристик обох потенціостатів було достатньо для роботи з біосенсорами.

Таблиця 3.1

Порівняння характеристик амперометричних перетворювачів та біосенсорів, отриманих з використанням потенціостатів українського виробництва та PalmSens

Параметри порівняння роботи перетворювачів та біосенсорів	PalmSens	Потенціостат українського виробництва
Величина відгуку на 0,5 мМ H ₂ O ₂ , нА	121,4	101,4
Шум базової лінії чистого сенсора, нА	0,5	1,3
Межа визначення H ₂ O ₂ , мкМ	6,2	19,2
Час відгуку на H ₂ O ₂ , хв.	< 1	< 1
Похибка вимірювання H ₂ O ₂ , %	8	6,8
Кількість одночасно вимірюваних каналів	1 (з мульти-плексором - 16)	4
Величина відгуку на 0,5 мМ глюкозу, нА	11,5	13,1
Шум базової лінії біосенсора, нА	0,4	1,1
Мінімальна межа визначення глюкози, мкМ	52	126
Час відгуку на глюкозу, хв.	< 1	< 1
Похибка вимірювання глюкози, %	4,4	7,9
Орієнтовна ціна потенціостату, грн.	100 000	3 000

3.1.3. Висновки. 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, мінімальна 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 потенціостату 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 показали кращу чутливість до перекису водню (приблизно в 10 разів), хоча і були дорожчими і складнішими у виготовленні.

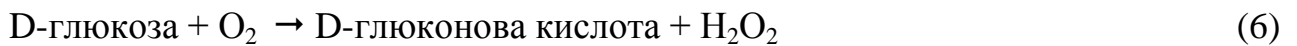
Результати досліджень, подані у цьому підрозділі, опубліковано в працях:

- 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.
- 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.

3.2. Розробка амперометричних монобіосенсорів та біосенсорної системи для визначення концентрації АТФ та глюкози

3.2.1. Принцип роботи біосенсора для визначення АТФ. В основі роботи амперометричного біосенсора для визначення АТФ лежать дві ферментативні реакції, що одночасно протікають в біоселективній мембрані, а також реакція розпаду перекису водню на електроді, яка протікає при прикладанні необхідного потенціалу і безпосередньо реєструється за допомогою амперометричного перетворювача:

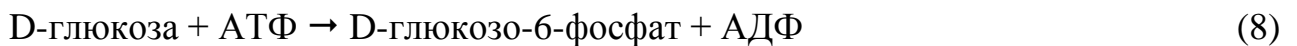
ГОД



+600 мВ



ГЕК



За наявності в розчині глюкози і відсутності АТФ в біоселективній мембрані біосенсора задіяна лише ГОД, тому відбуваються реакції (6) та (7). Відгук біосенсора в цьому випадку пропорційний концентрації глюкози. Після додавання до робочого розчину АТФ, в мембрані починається реакція (8) за участю ГЕК, яка зменшує локальну концентрацію глюкози і, як наслідок, відгук біосенсора на глюкозу зменшується пропорційно концентрації АТФ. Тому для визначення АТФ необхідно використовувати два біосенсори: на основі одного ферменту (ГОД) та на основі двох ферментів (ГОД та ГЕК). В цьому випадку, відгук другого біосенсора вираховується з відгуку першого біосенсора, різниця буде пропорційною концентрації АТФ в досліджуваному зразку.

3.2.2. Підбір концентрації ферментів у біоселективних елементах біосенсорів для визначення глюкози та глюкози і АТФ. Робота біосенсорів на основі ферментів значною мірою залежить від складу біоселективного елемента, а саме від концентрації та співвідношення ферментів (ГОД та ГЕК). Тому метою першого етапу роботи було знаходження оптимальної концентрації цих ферментів у біоселективних елементах обох біосенсорів.

Спочатку було визначено оптимальну концентрацію ГОД у біоселективній мембрані біосенсора для визначення глюкози (без додавання ГЕК). Для цього було приготовлено вихідні розчини з концентрацією ГОД від 1,2 % до 20 % (з додаванням 3 % БСА та 10 % гліцеролу як допоміжних речовин), ці розчини змішували із 0,4 % розчином ГА у пропорції 1:1 та проводили іммобілізацію протягом 30 хв. Внаслідок цього, масова частка ГОД у біоселективному елементі складала від 0,6 % до 10 % (на початку іммобілізації). Спочатку при збільшенні концентрації ферменту в біоселективній мембрані до 2-2,5 % величина відгуку біосенсора на глюкозу збільшувалась. При подальшому підвищенні концентрації ГОД в біомембрані від 2,5 % до 10 % величина відгуків біосенсора та форма калібрувальних кривих для визначення глюкози були вже практично однаковими (рис. 3.4, крива 1). Тому в подальших експериментах використовували ГОД у концентрації 2-2,5 %.

Далі було визначено оптимальну концентрацію ГЕК у біоселективному елементі біосенсора для визначення АТФ та глюкози (за аналогічною методикою). Було перевірено різні концентрації ГЕК у діапазоні від 1 % до 8 % за сталої концентрації ГОД (2 %). Було з'ясовано, що найвищі відгуки біосенсора на додавання АТФ спостерігаються за концентрації ГЕК 2-3 %, за вищих концентрацій ГЕК відбувалось зменшення відгуків (рис. 3.4, крива 2).

Зменшення відгуків на АТФ за високих концентрації ГЕК (4-8 %) можна пояснити тим, що в цьому випадку значна частина АТФ використовується ГЕК у поверхневих шарах біоселективного елемента, і до глибинних (найближчих

до електроду) шарів, які важливі для відгуку біосенсора, доходить відносно невелика кількість АТФ. В подальшій роботі використовували біоселективні елементи, в яких концентрація ГЕК становила 2,5 %.

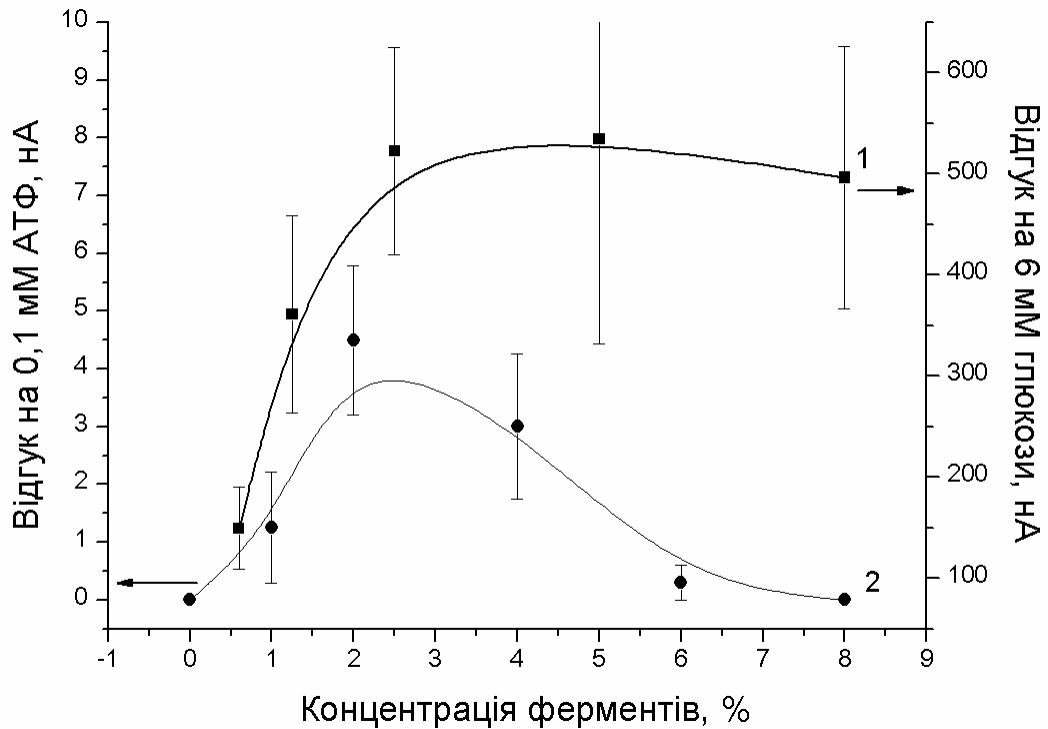


Рис. 3.4. Залежність величини відгуку біосенсора на глюкозу (1) та АТФ (2) від концентрації ГОД (1) та ГЕК (2) у складі біоселективного елементу. При підборі концентрації ГЕК, концентрація ГОД в біомембрані складала 2 %. Вимірювання проводились у 25 мМ фосфатному буфері з 2 мМ Mg^{2+} , рН 7,4, за постійного потенціалу +0,6 В відносно Ag/AgCl електрода порівняння

Також була перевірена можливість використання двошарових біоселективних елементів, в яких у першому шарі (найближчому до електроду) знаходилась ГОД, а в другому шарі – ГЕК. Для цього спочатку проводили іммобілізацію 2,5 % ГОД (за методикою виготовлення робочої мембрани біосенсора для визначення глюкози), після чого біосенсор відмивали, висушували та перевіряли чутливість до глюкози. Потім другим шаром іммобілізували ГЕК (2,5 %). Після іммобілізації другого шару на основі ГЕК

форма калібрувальних кривих для визначення глюкози не змінювалась, проте значно збільшувався шум базової лінії. Реєструвати відгуки на невеликі концентрації АТФ на фоні збільшеного шуму було неможливо, відповідно методика двошарової іммобілізації ферментів не використовувались в подальшій роботі.

3.2.3. Вибір умов іммобілізації ферментів при створенні біоселективного елементу. Дуже важливим фактором, що безпосередньо впливає на аналітичні характеристики біосенсора, є методика іммобілізації ферментів при створенні біоселективного елементу. В даній роботі в процесі іммобілізації ферментів на поверхню амперометричних перетворювачів проводили змішування розчину ферментів з розчином ГА, при цьому ГА утворював ковалентні зв'язки з ферментами та допоміжними речовинами; під час цього процесу активність ферментів зменшувалась залежно від концентрації ГА та часу іммобілізації. Тому наступним етапом роботи було покращення умов іммобілізації біоселективного елементу на основі ГОД та ГЕК, а саме підбір концентрації ГА та тривалості іммобілізації.

Для підбору оптимальної концентрації ГА виготовляли біоселективні елементи з масовою часткою ГА 1 %, 0,2 % та 0,1 %. Відгуки усіх отриманих біосенсорів на додавання глюкози були відтворюваними, а відгуки на АТФ були дуже маленькими за концентрації ГА – 1 % (в біомембрані) і достатніми для роботи за концентрацій ГА – 0,2 % та 0,1 %. Це пояснюється тим, що ГЕК є значно менш стабільним ферментом, ніж ГОД, тому активність ГЕК при іммобілізації втрачалась швидше. Втім, за найменшої концентрації ГА (0,1 %) спостерігалось поступове зменшення відгуків біосенсора під час багаторазового використання, обумовлене поступовим вимиванням ферментів з біоселективного елементу. Тому для подальшої роботи було вирішено використовувати концентрацію ГА 0,2 % при іммобілізації біоселективних елементів обох біосенсорів, за якої швидке зменшення відгуків не спостерігалось.

Також було перевірено роботу біосенсорів залежно від тривалості процесу іммобілізації біоселективного елемента (від 20 до 50 хвилин). При іммобілізації протягом 20 хв. спостерігалось поступове зменшення відгуків біосенсора впродовж роботи, обумовлене недостатнім закріпленням ферментів (витікання незв'язаних молекул ферментів), а при 50 хв. відгуки на АТФ були менші, ніж в решті випадків, ймовірно через зменшення активності ГЕК. Тому було вибрано 30-40 хв як оптимальний час іммобілізації.

3.2.4. Вибір робочого буферу. Склад робочого буферу певною мірою може впливати на роботу біосенсора, оскільки активність ферментів залежить від складу розчину, в якому вони знаходяться. Тому в даному дослідженні було порівняно роботу біосенсора на основі ГОД та ГЕК в різних буферних системах: фосфатному, трісовому та HEPES. Всі буфери були приготовлені з однаковою молярністю та рН (25 мМ, рН 7,4); при доведенні рН використовували HCl та NaOH. В усі буферні розчини було додано $Mg(NO_3)_2$ до концентрації 2 мМ, потрібної для ефективної роботи ГЕК. В якості основних характеристик, за якими проводили порівняння роботи біосенсора в різних буферних розчинах, обрали величини відгуків біосенсора на глюкозу (50 мкМ) та АТФ (50 мкМ), дрейф базової лінії, рівень шуму (середньоквадратичне відхилення) базової лінії та межу визначення АТФ. Відгуки біосенсора в трьох буферних розчинах наведені на рис. 3.5, а узагальнені результати наведені в табл. 3.2. Як видно з таблиці, найбільші відгуки біосенсора на глюкозу спостерігали у фосфатному буфері, а найменші – в тріс-HCl. При додаванні АТФ спостерігалась інша ситуація – найбільші відгуки біосенсора були отримані в буфері HEPES, а найменші – у фосфатному. Можливою причиною отриманого ефекту може бути різке зменшення концентрації магнію у фосфатному буфері за рахунок утворення малорозчинного фосфату магнію. Найменша мінімальна межа визначення АТФ (тут і далі оцінювалась як концентрація речовини, що призводила до відгуку біосенсора, втричі більшого за шум базової лінії) теж була у буфері HEPES. Оскільки мета даного

дослідження – це визначення в першу чергу АТФ, а не глюкози, для подальшої роботи як буферний розчин було обрано саме HEPES буфер.

Також було перевірено вплив буферної ємності на роботу біосенсора шляхом зміни концентрації робочого буфера від 5 до 100 мМ.

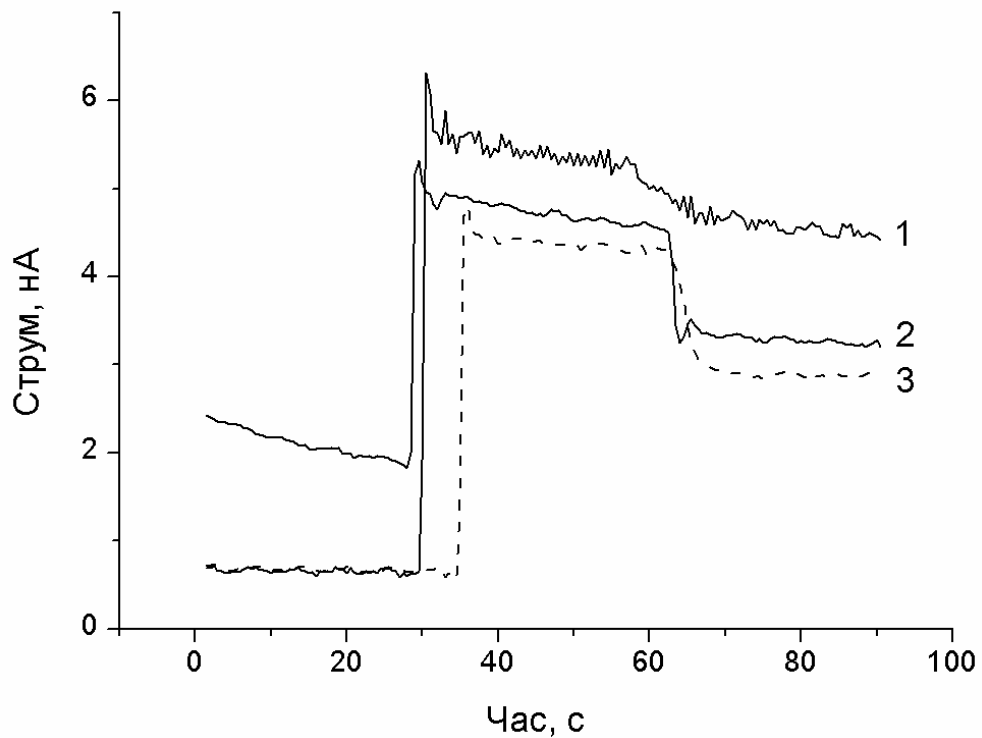


Рис. 3.5. Порівняння відгуків біосенсора в різних буферних розчинах: фосфатному (1), тріс-НСІ (2) та HEPES (3)

При збільшенні буферної ємності збільшується також іонна сила розчину та його фонові провідність. Значних змін відгуків біосенсора при цьому не спостерігалось. Такі результати є типовими для амперометричних ферментних біосенсорів, робота яких майже не залежить від буферної ємності та іонної сили розчину. Це свідчить про можливість використання розробленого нами біосенсора в біологічних розчинах, що характеризуються різними буферними ємностями та іонною силою.

Таблиця 3.2

Порівняння характеристик біосенсора при роботі в різних буферних розчинах

№	Характеристики біосенсора	Робочий буфер		
		HEPES	трис-НСl	фосфатний
1	Відгук на 50 мкМ глюкози, нА	2,9 ± 0,6	2,3 ± 0,6	4,4 ± 0,6
2	Відгук на 50 мкМ АТФ, нА	1,5 ± 0,2	1,2 ± 0,2	0,9 ± 0,2
3	Відносна величина відгуку на 50 мкМ АТФ, у відсотках від відгуку на глюкозу	52	52	21
4	Шум відгуку на глюкозу, нА	0,05	0,04	0,08
5	Дрейф базової лінії за 20 с., нА	0,16	0,26	0,24
6	Межа визначення АТФ, мкМ	4,6	6,6	13

3.2.5. Підбір концентрації магнію. Для роботи ГЕК, що входить до складу біоселективного елементу біосенсора для визначення АТФ, потрібна наявність іонів Mg^{2+} у робочому буфері (магній стабілізує молекулу АТФ і виступає активатором ГЕК). Для підбору оптимальної концентрації Mg^{2+} у робочому буфері була перевірена робота біосенсора при концентраціях Mg^{2+} від 0,5 мМ до 3 мМ, концентрація глюкози при цьому складала 100 мкМ, а АТФ – 100 мкМ (рис. 3.6).

Відгуки біосенсора на додавання глюкози практично не залежали від концентрації магнію, бо ГОД не потребує магнію для каталізу. Відгуки біосенсора на АТФ, як і очікувалось, збільшувались при збільшенні концентрації магнію. За концентрації магнію від 0,5 мМ до 2 мМ спостерігалась прямо пропорційне збільшення відгуків біосенсора на АТФ, а додавання більше 2 мМ магнію вже не призводило до суттєвого збільшення відгуків. Тому в

подальшій роботі робочий буфер містив в своєму складі саме 2 мМ Mg^{2+} (у вигляді нітрату магнію).

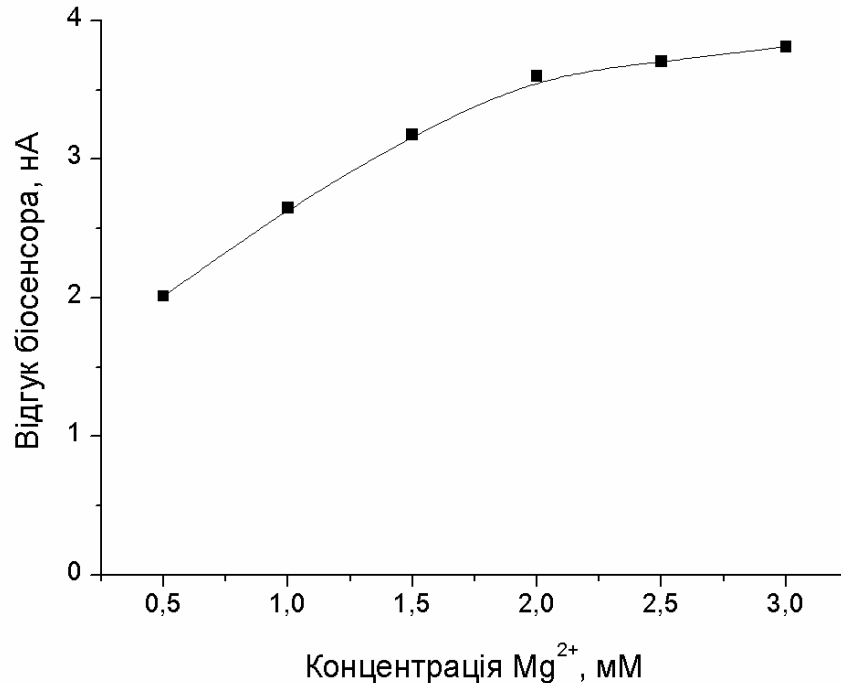


Рис. 3.6. Залежність відгуків біосенсора на АТФ від концентрації іонів магнію у робочому буфері.

3.2.6. Дослідження впливу концентрації глюкози на біосенсорне визначення концентрації АТФ. Як було описано раніше, вимірювання концентрації АТФ пропонованим двоферментним біосенсором базується на конкуренції між ГОД і ГЕК за глюкозу. Принципово, можна вимірювати АТФ за будь-яких концентрацій глюкози, однак чим більше глюкози в розчині, тим меншим буде відносне падіння відгуку біосенсора при додаванні АТФ (на фоні значного відгуку біосенсора на глюкозу); шум сигналу теж збільшується пропорційно кількості глюкози. З цих причин, чим менша концентрація глюкози, тим краще буде видно реакцію біосенсора на внесення АТФ. І навпаки, зменшення концентрації глюкози приводить до зменшення рівня шуму, а відповідно до зменшення межі вимірювання АТФ; крім того, зростає швидкість відгуку на глюкозу та АТФ. Тому більш детальні подальші

дослідження проводились за концентрації глюкози в розчині від 10 мкМ до 250 мкМ (рис. 3.7).

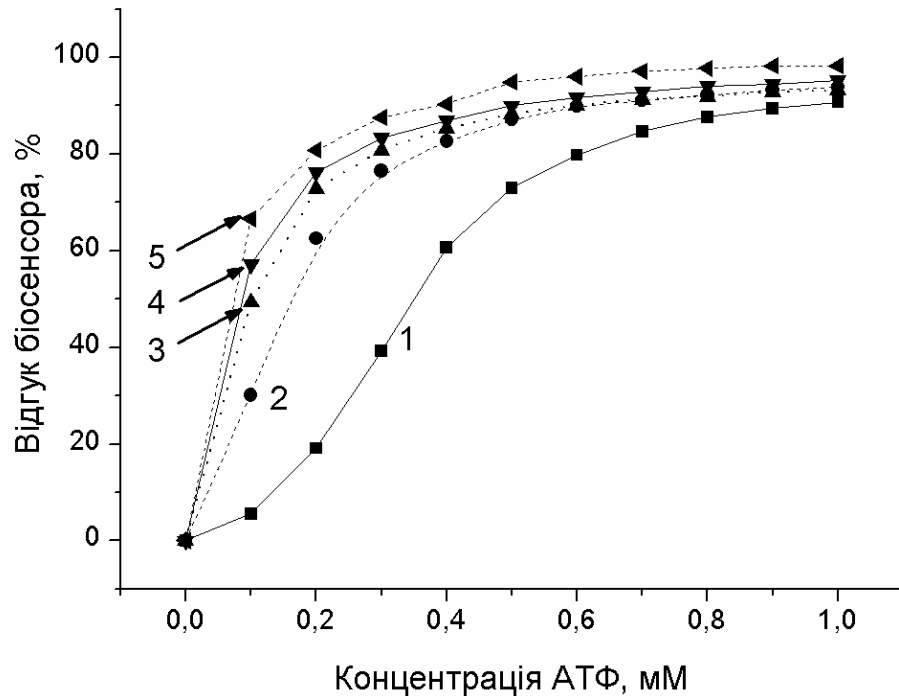


Рис. 3.7. Калібрувальні криві біосенсора для визначення АТФ, отримані за концентрацій глюкози: 250 мкМ (1), 100 мкМ (2), 50 мкМ (3), 25 мкМ (4), 10 мкМ (5). Вимірювання проводились у 25 мМ НЕРЕС буфері, рН 7,4, 2 мМ Mg^{2+} , за постійного потенціалу +0,6 В відносно Ag/AgCl електрода порівняння

Також було проведено більш детальний аналіз відгуків біосенсора на АТФ при концентраціях глюкози в робочій комірці від 10 мкМ до 250 мкМ (табл. 3.3). Найбільша абсолютна величина відгуку біосенсора (3,6 нА) при додаванні 100 мкМ АТФ (кінцева концентрація) спостерігалась при концентрації глюкози в робочій комірці 100 мкМ, Проте співвідношення величини відгуку біосенсора на АТФ та величини відгуку на глюкозу зростало зі зменшенням концентрації глюкози. Найменша межа визначення АТФ спостерігалась при концентрації глюкози в комірці 25 мкМ. З цих результатів видно, що, змінюючи концентрацію глюкози в робочому розчині, можна значно

змінювати характеристики визначення АТФ біосенсором. З іншого боку, це призводить до того, що неможливо точно визначати вміст АТФ, якщо в розчині присутня невідома концентрація глюкози. Тому під час вимірів необхідно використовувати одночасно і другий біосенсор, що чутливий лише до глюкози. Визначивши вміст глюкози біосенсором, чутливим до глюкози, можна з'ясувати, як буде реагувати на АТФ біосенсор, що чутливий до глюкози та АТФ. Це зробить можливим визначення концентрації АТФ та глюкози у сумішах.

Таблиця 3.3

Порівняння характеристик відгуків біосенсора на АТФ за різних концентрацій глюкози в розчині

Характеристики біосенсора	Концентрація глюкози				
	10 мкМ	25 мкМ	50 мкМ	100 мкМ	250 мкМ
Відгук на 100 мкМ АТФ, нА	0,9 ± 0,3	1,9 ± 0,7	3 ± 1,1	3,6 ± 1,4	3,3 ± 1,8
Відносний відгук на 100 мкМ АТФ, у відсотках від відгуку на глюкозу	55 ± 15	48 ± 11	38 ± 11	22 ± 8	7,4 ± 3,5
Шум, нА	0,02	0,02	0,11	0,17	0,33
Межа вимірювань АТФ, мкМ	7,2 ± 1,8	3,7 ± 2,2	10 ± 3	16 ± 7	28 ± 8

3.2.7. Використання ПФД мембрани для покращення селективності амперометричного перетворювача. Селективність біосенсора є важливим фактором при роботі з реальними біологічними рідинами, тому дослідження селективності біосенсора до можливих інтерферентів є обов'язковим етапом

при розробці біосенсорів. В нашій роботі був використаний безмедіаторний біосенсор з відносно високим робочим потенціалом (+0,6 В відносно Ag/AgCl електрода порівняння), через що на поверхні електроду можливе окиснення ряду електроактивних сполук. Існує два основних напрямки для запобігання окиснення інтерферуючих речовин на електродній поверхні – зменшення робочого потенціалу за рахунок введення в склад біоселективної мембрани додаткових речовин, або нанесення додаткових напівпроникних мембран, які селективно пропускають до електрода цільову речовину (в нашому випадку – перекис водню) [115]. Ми вирішили нанести на чутливу частину амперометричного перетворювача ПФД мембрану за методикою, описаною в роботі [116]. Ця мембрана утворює пори, розмір яких є достатнім для проходження низькомолекулярних сполук, зокрема перекису водню, до поверхні електрода, та є недостатнім для проходження більших за розміром речовин. Для формування ПФД мембрани триелектродну систему з голим робочим електродом занурювали у 5 мМ розчин *m*-фенілендіаміну, після чого отримували 4-5 ЦВА (рис. 3.8).

Четверта та п'ята вольтамперограми майже не відрізнялися одна від одної, що свідчило про закінчення формування шару ПФД на поверхні робочого електроду. Форма ЦВА, отриманих на використаних в нашій роботі електродах, цілком співпадала з вольтамперограмами, наведеними в першоджерелі [116]. Після цього перетворювачі висушували на повітрі за кімнатної температури та поверх ПФД мембрани іммобілізували біоселективні мембрани на основі ферментів ГОД та ГЕК.

Для підтвердження покращення селективності модифікованого перетворювача було перевірено чутливість електродів до інтерферуючих речовин до та після нанесення ПФД мембрани. Інтерферентами виступали дофамін, цистеїн, аскорбінова кислота, сечова кислота та парацетамол (ацетил-*n*-амінофенол). Ці речовини є досить поширеними в біологічних зразках і здатні окиснюватись при прикладанні потенціалу +0,6 В до амперометричного

перетворювача. До нанесення ПФД мембрани перетворювач достатньо сильно реагував на ці речовини, що могло призвести до проблем при вимірюванні реальних зразків. Втім, після нанесення ПФД мембрани відгуки біосенсора на інтерференти зникли зовсім або зменшились до незначних розмірів, при цьому чутливість перетворювача до перекису водню зменшилась на 20 % (таблиця 3.4). Це служить доказом ефективності додаткової ПФД мембрани та її коректного формування на поверхні перетворювача. Також було виявлено, що відтворюваність відгуків біосенсора на глюкозу та АТФ значно покращується при нанесенні ПФД мембрани.

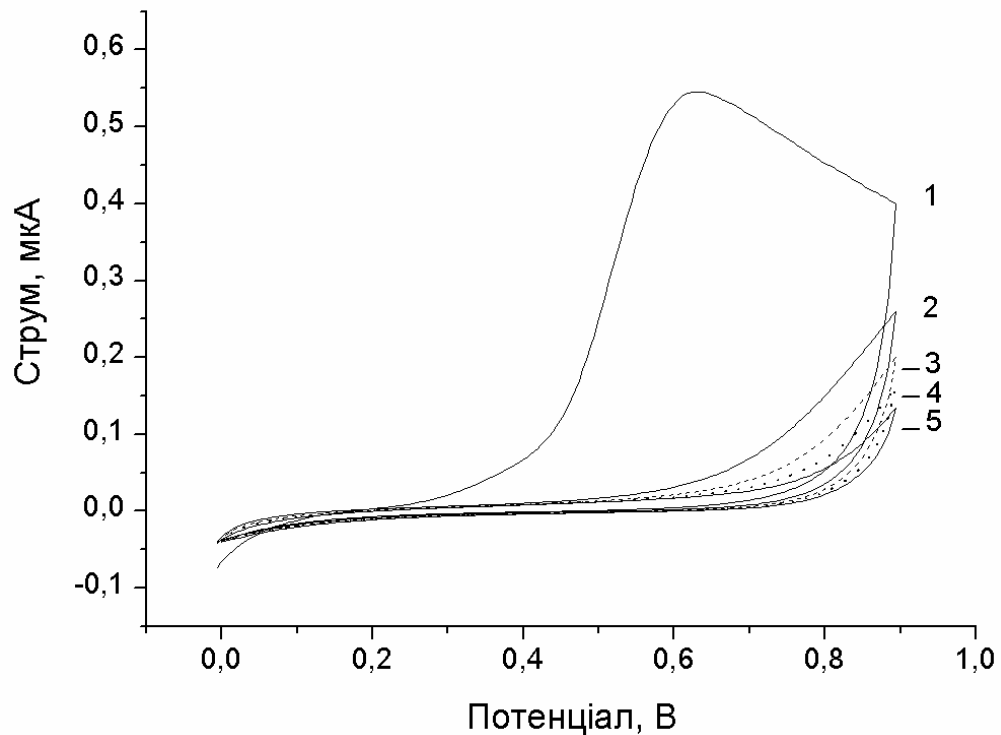


Рис. 3.8. ЦВА, отримані в 5 мМ *m*-фенілендіаміні з використанням платинових дискових електродів. Фенілендіамін був розчинений у 10 мМ калій-фосфатному буфері, рН 7,4. Початковий потенціал – 0 В, кінцевий потенціал становив +0,9 В, швидкість зміни потенціалу складала 20 мВ на секунду, крок зміни потенціалу – 5 мВ

Оскільки екрануючий ефект ПФД мембрани може зменшуватись з часом внаслідок поступового руйнування мембрани, було порівняно відгуки на аскорбінову кислоту до та після зберігання біосенсорів в сухому вигляді при -18 °С (одночасно з дослідженням стабільності біоселективних елементів при зберіганні). Через 50 діб, відгуки біосенсорів на аскорбінову кислоту зросли лише на 10 %, що свідчило про гарне зберігання ПФД мембрани і можливість використання біосенсорів навіть після тривалого зберігання для вимірювання біологічних зразків.

Таблиця 3.4

Селективність амперометричного перетворювача до та після нанесення додаткової ПФД мембрани

Електроактивні речовини	Відгук амперометричного перетворювача, нА	
	Електрод без ПФД мембрани	Електрод з ПФД мембраною
Перекис водню, 50 мкМ	34,7 ± 2,6	27,6 ± 0,8
Дофамін, 20 мкМ	14,8 ± 1,3	1,2 ± 0,3
Цистеїн, 100 мкМ	2,8 ± 0,4	0,02 ± 0,02
Парацетамол, 100 мкМ	7,3 ± 1,2	0
Сечова кислота, 100 мкМ	10,6 ± 1,8	0
Аскорбінова кислота, 500 мкМ	33,2 ± 1,7	0,9 ± 0,5

3.2.8. Аналітичні характеристики біосенсора для визначення АТФ.

При використанні 25 мМ НЕРЕС, рН 7,4, 2 мМ Mg²⁺ та 50 мкМ глюкози мінімальна межа вимірювання АТФ (мінімальна концентрація, що викликала відгук біосенсора, втричі більший за шум) становила 4-6 мкМ, лінійний

діапазон роботи був від 15 мкМ до 100 мкМ, чутливість до АТФ становила 25 – 35 нА/мМ. Типові калібрувальні криві біосенсора наведені на рис. 3.9.

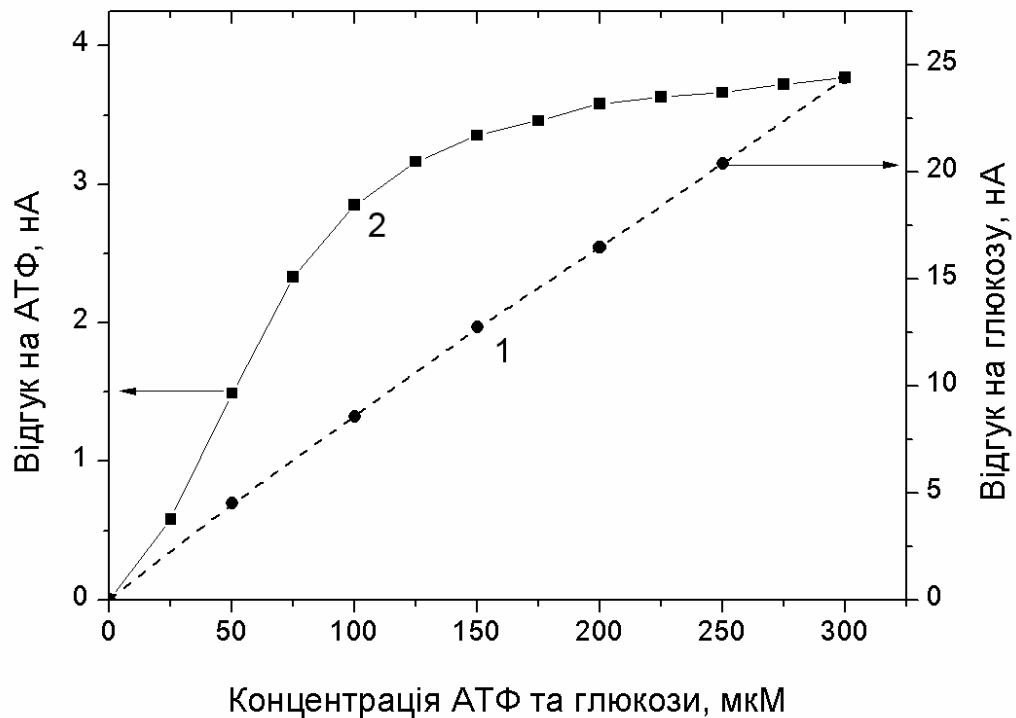


Рис. 3.9. Калібрувальні криві біосенсора на основі ГОД та ГЕК для визначення глюкози (1) та АТФ (2). Концентрація глюкози, за якої будували калібрувальну криву для визначення АТФ, становила 50 мкМ

Лінійні ділянки даних калібрувальних кривих описуються рівняннями $I=32 \cdot C$ (для визначення АТФ; $R^2=0,988$) та $I=80 \cdot C$ (для визначення глюкози; $R^2=0,99$), де I – сила струму після виходу відгуку на плато (steady-state response) (нА), C – концентрація АТФ чи глюкози (мМ).

Слід зазначити, що визначення АТФ біосенсором значною мірою залежало від складу робочого розчину, зокрема від вмісту глюкози та концентрації іонів Mg^{2+} . Змінюючи ці параметри, можна досягати різноманітних аналітичних характеристик біосенсора залежно від задач, що покладаються на біосенсор при визначенні АТФ.

3.2.9. Біосенсор для визначення глюкози. Розроблений в попередній частині роботи біосенсор для визначення АТФ, як і інші біосенсори, вказані у

вступі, чутливі одночасно до двох субстратів – глюкози та АТФ. Тому за наявності в досліджуваній пробі обох речовин (що є дуже вірогідним), визначити їх окремі концентрації буде складно. Для усунення цього недоліку ми вирішили використати додатковий біосенсор, що був чутливим лише до глюкози. Біоселективний елемент цього біосенсора містив ту саму ГОД, що входила до складу біоселективного елементу біосенсора для визначення АТФ та глюкози. Оскільки кінцевою метою дослідження була розробка масиву біосенсорів для визначення АТФ в присутності глюкози, в якому більш важливим, складним та примхливим був біосенсор на основі двох ферментів, то підібрані в попередніх розділах умови роботи біосенсора на основі ГОД та ГЕК були прийняті і для біосенсора на основі лише ГОД. За таких умов була отримана калібрувальна крива біосенсора на основі ГОД для визначення глюкози (рис. 3.10).

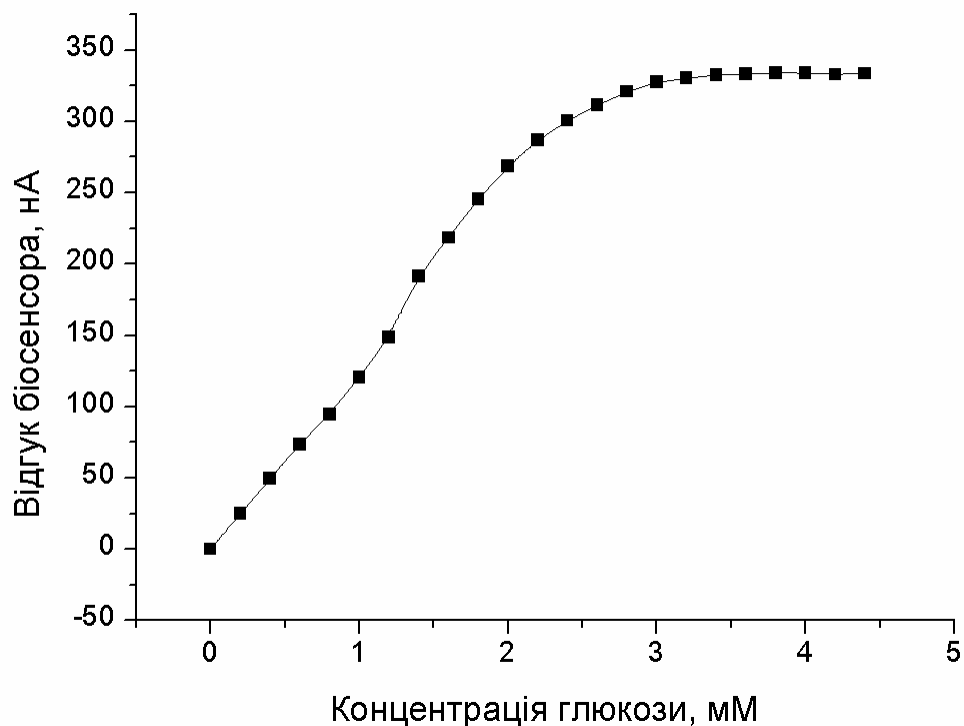


Рис. 3.10. Калібрувальна крива біосенсора на основі ГОД для визначення ГЛЮКОЗИ

Межа вимірювання глюкози становила 1 мкМ, лінійний діапазон роботи біосенсорів – від 10 мкМ до 2-2,3 мМ, чутливість становила 100–140 нА/мМ. Лінійна ділянка даної кривої описується рівнянням $I=138 \cdot C$, де I – сила струму після виходу відгуку на плато (steady-state) (нА), C – концентрація глюкози (мМ), $R^2=0,994$.

3.2.10. Методика одночасного визначення глюкози та АТФ біосенсорною системою. Для одночасного вимірювання концентрацій глюкози та АТФ використовували два біосенсори: перший на основі ГОД, другий - на основі ГОД та ГЕК, занурені в одну вимірювальну комірку та під'єднані до однієї вимірювальної установки (рис. 3.11).

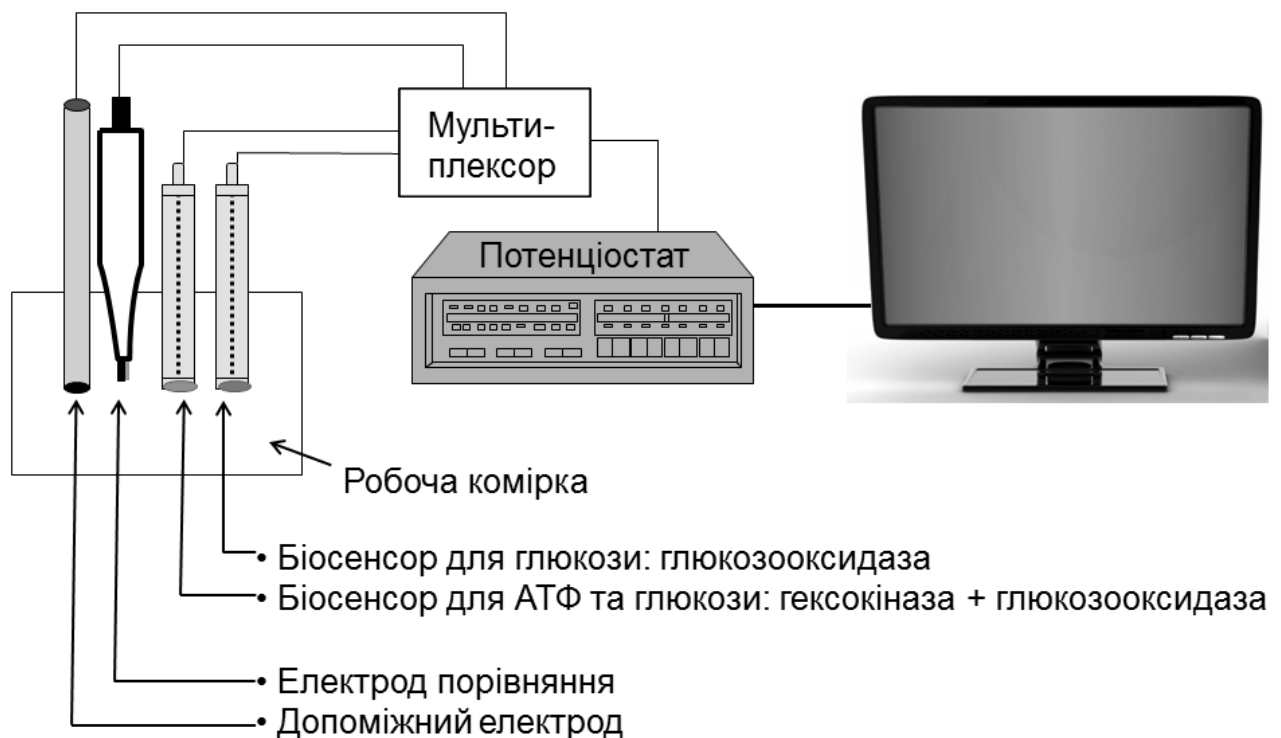


Рис. 3.11. Схема біосенсорної системи на основі двох біосенсорів для одночасного визначення концентрацій глюкози та АТФ

До комірки додавали робочий буфер, отримували базові лінії біосенсорів протягом кількох хвилин, а потім до робочого розчину додавали пробу та спостерігали відгуки обох біосенсорів. Відгук першого біосенсора, який містив

лише ГОД, збільшувався пропорційно вмісту глюкози, і за калібрувальною кривою (рис. 3.10) визначали цю концентрацію глюкози. Відгук другого біосенсора, залежав як від концентрації глюкози, так і від концентрації АТФ у досліджуваному розчині через конкуренцію між двома ферментами за глюкозу. Знаючи концентрацію глюкози у розчині із даних першого біосенсора, по калібрувальній кривій на глюкозу другого біосенсора (рис. 3.9) вираховували, яким мав би бути відгук другого біосенсора на цю ж концентрацію глюкози за відсутності АТФ. Із різниці між розрахованим та реальним відгуками другого біосенсора отримували відгук на АТФ. Використовуючи попередньо побудовану калібрувальну криву для визначення АТФ другим біосенсором (рис. 3.9), вираховували концентрацію АТФ. На рис. 3.12 приведено приклад роботи біосенсорної системи при додаванні спочатку 50 мкМ глюкози, а потім 100 мкМ АТФ.

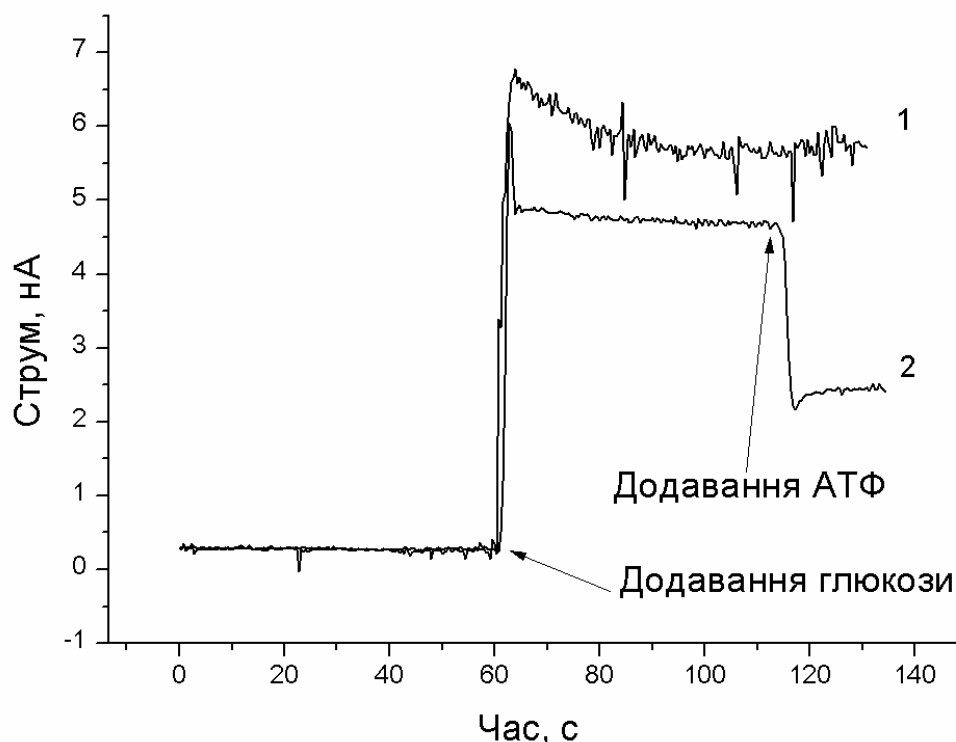


Рис. 3.12. Типові відгуки біосенсорної системи (1 – біосенсор для визначення глюкози, 2 – біосенсор для визначення глюкози та АТФ) при додаванні до робочої комірки глюкози та АТФ

3.2.11. Відтворюваність відгуків біосенсорної системи на АТФ та глюкозу. На наступному етапі роботи було досліджено відтворюваність відгуків біосенсорної системи впродовж декількох годин безперервної роботи (рис. 3.13). Одне вимірювання глюкози та АТФ займало 7-10 хв. (вимірювання лише глюкози займало 3-5 хв.), проміжок між вимірюваннями складав близько 10 хв.; за цей час біосенсори відмивали від субстратів, кілька разів змінюючи робочий буфер. Помітного падіння відгуків на обидві речовини за 10 вимірювань не відбувалось; відносне середньоквадратичне відхилення відгуків на глюкозу становило 3-6 %, а відгуків на АТФ – 8-12 % (в залежності від конкретного біосенсора). Більша розбіжність відгуків при вимірюванні АТФ у порівнянні з вимірюваннями глюкози пояснюється тим, що реакція на АТФ формується за рахунок конкуренції між двома ферментами, які використовують два субстрати, в той час як відгук на глюкозу формує лише один фермент на один субстрат.

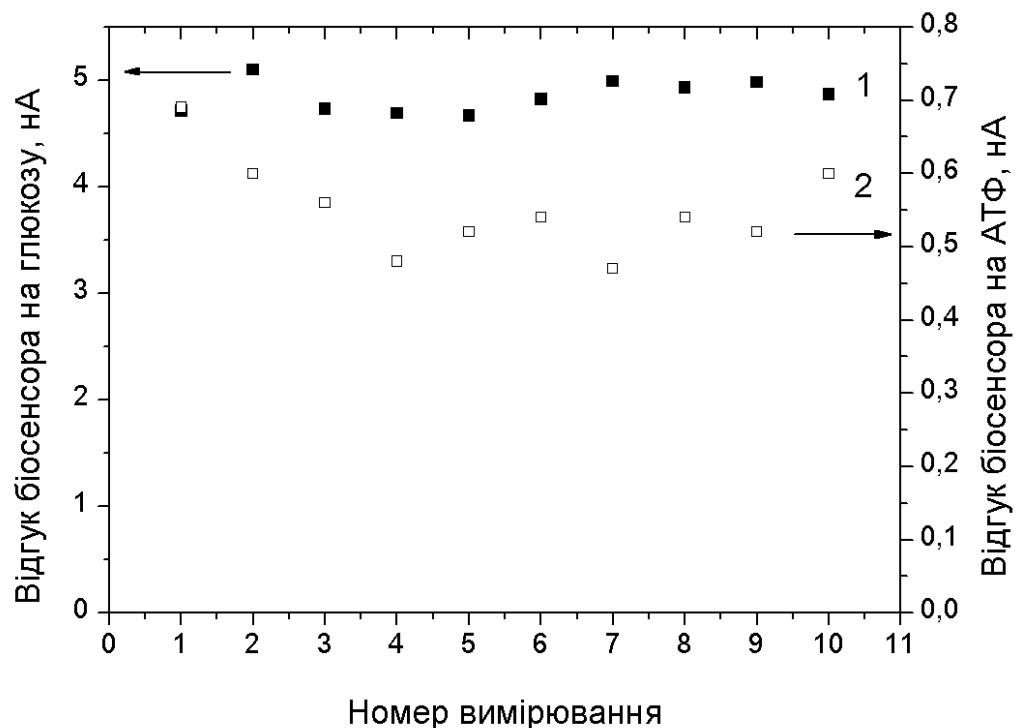


Рис. 3.13. Відтворюваність відгуків біосенсора на глюкозу (1) та АТФ (2). Концентрація глюкози – 50 мкМ, АТФ – 25 мкМ.

Також з отриманих даних було пораховано, наскільки змінюється межа визначення АТФ продовж роботи. Найменша мінімальна межа вимірювань спостерігалась на початку роботи біосенсора (одразу після іммобілізації ферментів) – 5 мкМ, а під час безперервної роботи мінімальна межа вимірювань зростала до 8-10 мкМ за рахунок деякого збільшення шуму базової лінії (рис. 3.14).

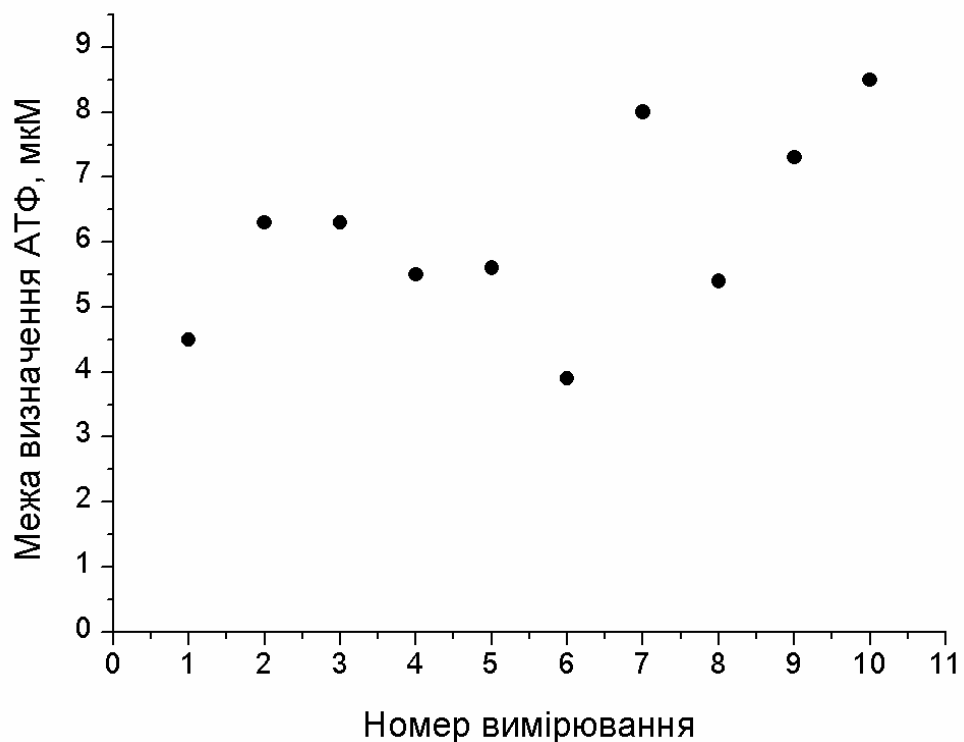


Рис. 3.14. Зміна мінімальної межі вимірювання АТФ впродовж кількох годин. Концентрація глюкози – 50 мкМ, АТФ – 25 мкМ. Вимірювання проводились у 25 мМ HEPES буфері, рН 7,4, 2 мМ Mg^{2+} , за постійного потенціалу +0,6 В відносно Ag/AgCl електрода порівняння

3.2.12. Відтворюваність приготування біосенсорів. Відтворюваність приготування біосенсорів є важливою при їх масовому виробництві. Цей параметр визначали шляхом проведення різних іммобілізацій біоселективних елементів на різні перетворювачі, після чого отримували відгуки біосенсорів на сталу концентрацію глюкози (100 мкМ), величини яких наведені на рис. 3.15.

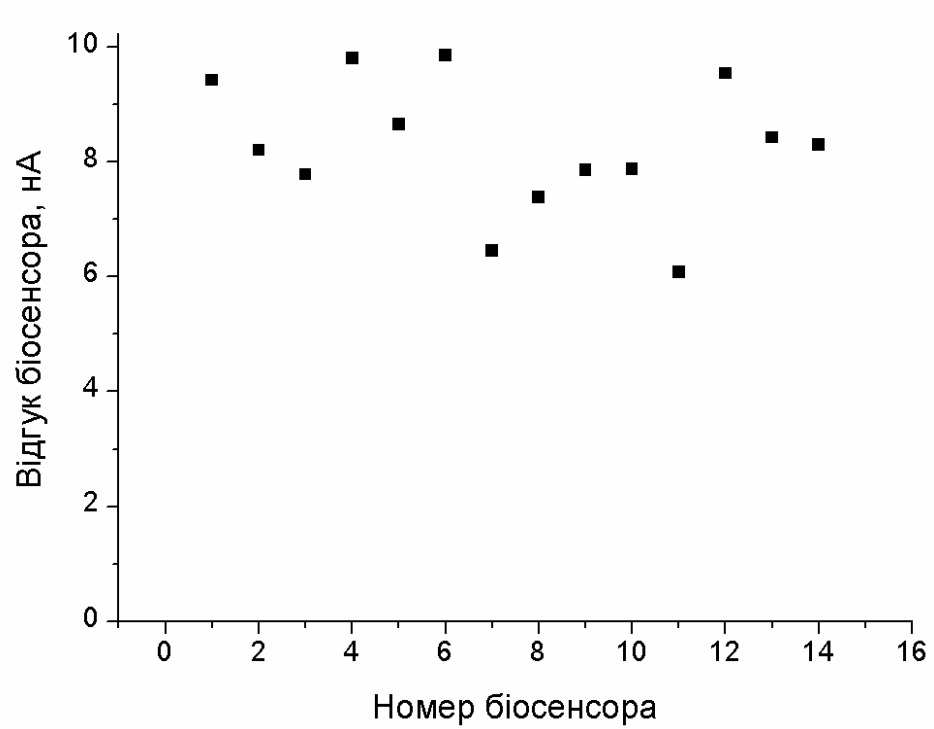


Рис. 3.15. Відгуки на глюкозу, отримані різними біосенсорами

Також отримували калібрувальні криві для визначення АТФ (рис. 3.16).

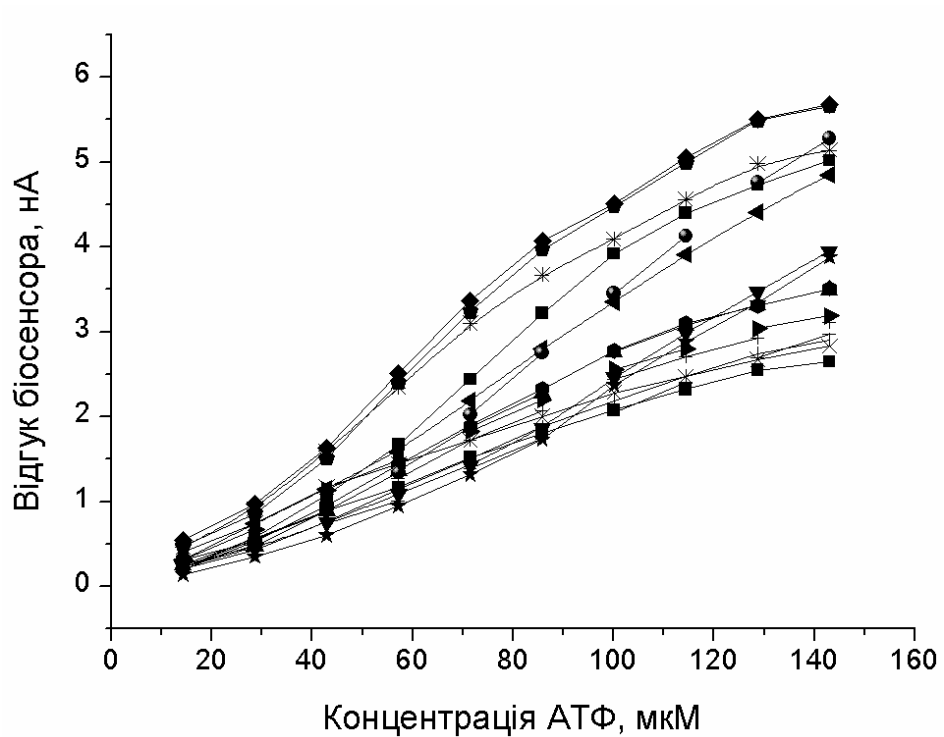


Рис. 3.16. Калібрувальні криві для визначення АТФ, отримані різними біосенсорами за концентрації глюкози в буфері 100 мкМ

Відносне стандартне відхилення відгуків різних біосенсорів на глюкозу становило 14 %, що є допустимим. Калібрувальні криві для визначення АТФ всіх біосенсорів мали подібну форму і однаковий діапазон вимірюваних концентрацій. Хоча величина відгуків на АТФ різних біосенсорів відрізнялася, це не становило проблеми, оскільки кожен біосенсор калібрували перед використанням.

3.2.13. Стабільність біосенсорів при зберіганні. Після оптимізації умов роботи біосенсорів, було досліджено стабільність біосенсора для визначення глюкози та АТФ при зберіганні. Передбачалось, що стабільність при зберіганні біосенсора для визначення глюкози буде аналогічною, оскільки в обох випадках відгук біосенсора формується ГОД, іммобілізованою в майже однакових умовах. Біосенсори зберігали в сухому вигляді за температури $+4\text{ }^{\circ}\text{C}$ та $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$ (рис. 3.17 та рис. 3.18).

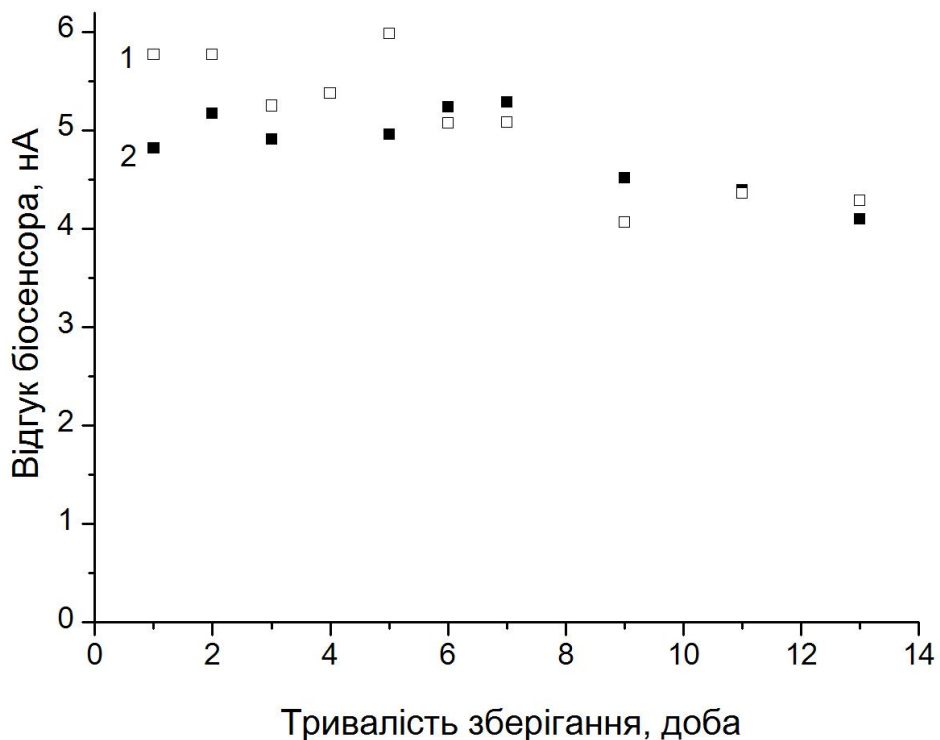


Рис. 3.17. Зберігання біосенсора для визначення глюкози та АТФ впродовж двох тижнів (відгуки на 50 мкМ глюкози). 1 – зберігання в сухому вигляді за температури $+4\text{ }^{\circ}\text{C}$, 2 – в сухому вигляді при $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$

В першому випадку відгуки на глюкозу за два тижні зменшились на 25 %, а в другому випадку – на 10-15 %. В той же час відгуки на АТФ зменшились на 65-75 % при зберіганні за температури +4 °С, та на 45-55 % при -18 °С. Це свідчить про те, що ГЕК є значно менш стабільним ферментом, ніж ГОД, і зберігання біосенсора для визначення АТФ лімітується саме стабільністю ГЕК. Це співпадає з даними, отриманими при дослідженні іммобілізації цих ферментів – активність ГЕК під час іммобілізації втрачалась швидше, ніж ГОД.

Оскільки зберігання біосенсорів при -18 °С впродовж двох тижнів показало кращі результати, за цих умов провели більш тривале зберігання біосенсорів. За 50 діб, відгуки на глюкозу не зменшились взагалі. Відгуки на АТФ за 34 доби зменшились на 20 %, а за 50 діб – на 43 %. Межа визначення АТФ під час зберігання не змінилась і складала 4-7 мкМ (в залежності від біосенсора).

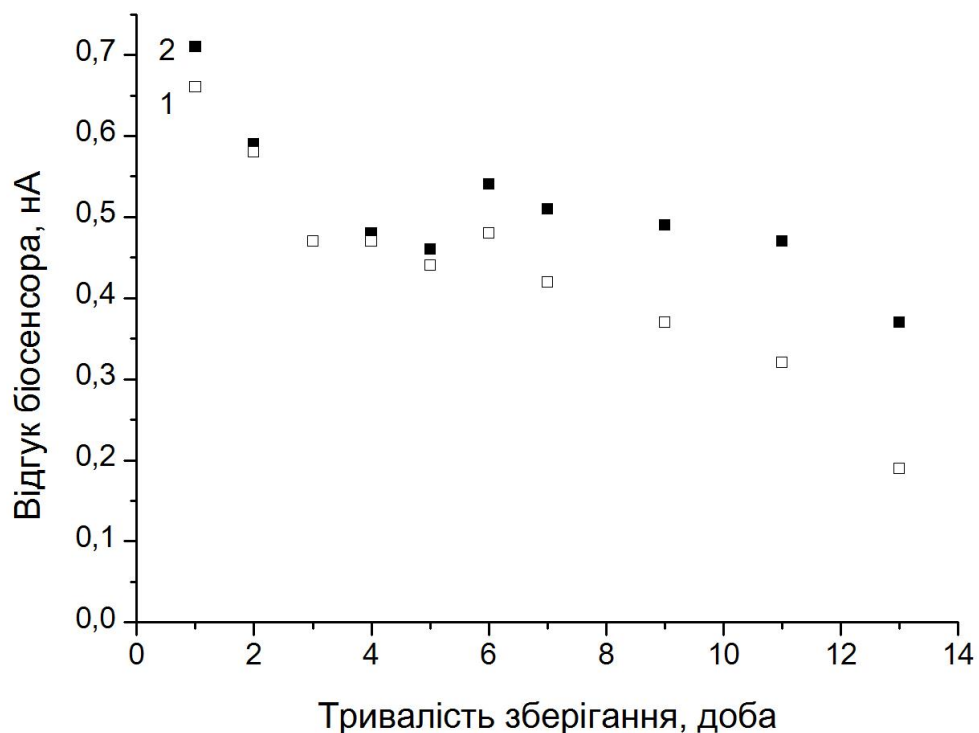


Рис. 3.18. Стабільність відгуків біосенсора на 25 мкМ АТФ впродовж двох тижнів. 1 – зберігання в сухому вигляді за температури +4 °С, 2 – в сухому вигляді при -18 °С

3.2.14. Вимірювання реальних зразків. Для перевірки роботи біосенсора для визначення АТФ в аптеці було куплено ампули фірми Дарниця для внутрішньовенного та внутрішньом'язового введення з вмістом АТФ 10 мг/мл (18 мМ). Визначення вмісту АТФ проводилось трьома «свіжовиготовленими» біосенсорами за двома методиками: за калібрувальною кривою та методом стандартних додавань. В першому випадку, будували калібрувальну криву для АТФ (при концентрації глюкози 100 мкМ), після чого отримували декілька відгуків на певний об'єм зразка (розведення зразка відбувалось в 233 рази). Перше додавання модельного розчину АТФ проводили тому що лінійний діапазон роботи біосенсора починався від 15-20 мкМ АТФ, і відгук на реальний зразок і наступні за ним два відгуки мали бути прямо пропорційні концентрації АТФ. В табл. 3.5 наведені результати вимірювань вмісту АТФ в ампулах (подано середнє значення вимірів трьома біосенсорами), які цілком співпадали (в межах похибки) з номінальною концентрацією АТФ.

Таблиця 3.5

Результати біосенсорного вимірювання вмісту АТФ в комерційних фармацевтичних препаратах (АТФ для ін'єкцій, номінальна, заявлена виробником концентрація АТФ в ампулі – 18 мМ)

Метод вимірювання	Результати біосенсорного вимірювання, мМ			
	Ампула №1	Ампула №2	Ампула №3	Ампула №4
Калібрувальна крива	16,8 ± 0,9	19,5 ± 0,7	17,9 ± 0,5	17,3 ± 0,6
Стандартні додавання	16,3 ± 1	19,8 ± 2,3	15,9 ± 0,2	17,7 ± 1,2

На наступному етапі роботи було виміряно концентрацію АТФ та глюкози у їх сумішах. Для цього було придбано розчин глюкози для ін'єкцій (номінальна концентрація 5 % або 277 мМ) фірми «Нікофарм» (м. Донецьк).

Біосенсорне визначення глюкози в цьому розчині повністю співпало з номінальною концентрацією глюкози (275 ± 5 мМ). Далі було змішано розчини АТФ та глюкози для отримання їх сумішей (1-10 мМ глюкози та 2,5-10 мМ АТФ). Аліквоти даних сумішей були додані до робочої комірки та отримані відгуки біосенсорної системи. Результати вимірювань показані в табл. 3.6; відхилення від номінальних концентрацій не перевищувало 20 %.

Похибка вимірювання була більшою, ніж у випадку окремих розчинів глюкози та АТФ, оскільки вимірювання сумішей є більш складною процедурою із використанням двох біосенсорів. Втім, результати демонструють, що запропонована біосенсорна система є придатною для надійних вимірів зразків, що містять суміш АТФ та глюкози, що і було головною метою цієї частини роботи.

Таблиця 3.6

Результати біосенсорного вимірювання концентрації 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	$2,7 \pm 0,1$	$4,2 \pm 0,4$	$11,7 \pm 0,4$	$8,8 \pm 0,8$	$1,2 \pm 0,1$	$2,7 \pm 0,2$

3.2.15. Висновки. Розроблено амперометричну біосенсорну систему для визначення АТФ та глюкози. Оптимальна концентрація ГОД та ГЕК в біоселективних елементах при іммобілізації становила 2-2,5 %, БСА – 3 %, глютарового альдегіду (зшиваючого агенту) – 0,2 %. Оптимальний час

іммобілізації ферментів становив 40 хв. Нанесення на перетворювачі ПФД мембрани практично нівелювало вплив електроактивних речовин на роботу біосенсора. Показано, що змінюючи склад аналізованого розчину, можна досягати різноманітних операційних характеристик біосенсорної системи в залежності від необхідних задач. В роботі успішно проведено вимірювання вмісту АТФ та глюкози у комерційних препаратах (ампулах) і їх сумішах.

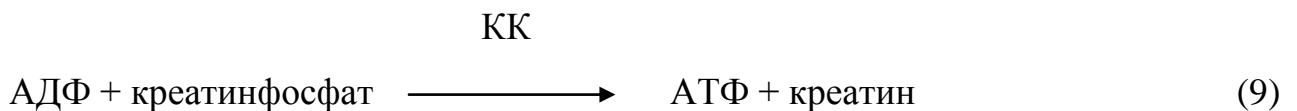
Результати цього підрозділу опубліковано в працях:

- 1) 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.
- 2) 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.
- 3) Розробка амперометричного біосенсора для визначення активності протеїнкінази / 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.

3.3. Розробка амперометричного біосенсора для визначення активності креатинкінази у сироватці крові

3.3.1. Принцип роботи біосенсора для визначення активності креатинкінази. Визначення активності КК базується на вимірюванні швидкості продукування АТФ у робочій комірці за допомогою попередньо розробленого АТФ-чутливого біосенсора. Під час вимірювання спершу додається глюкоза та АТФ, внаслідок чого утворюється H_2O_2 та генерується

відгук біосенсора. Після додавання КК та її субстратів до робочої комірки, відбувається реакція (9), та нові молекули АТФ утворюються шляхом 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 АТФ та креатину), проте оптимальне значення рН для даної реакції складає 9,0 [117], і практично всі методи для визначення активності КК використовують реакцію (9). На біосенсорне визначення КК зворотня реакція не впливає. Приклад типового відгуку біосенсора на послідовні додавання креатинфосфату, АДФ, глюкози, АТФ та КК показані на рис. 3.19.

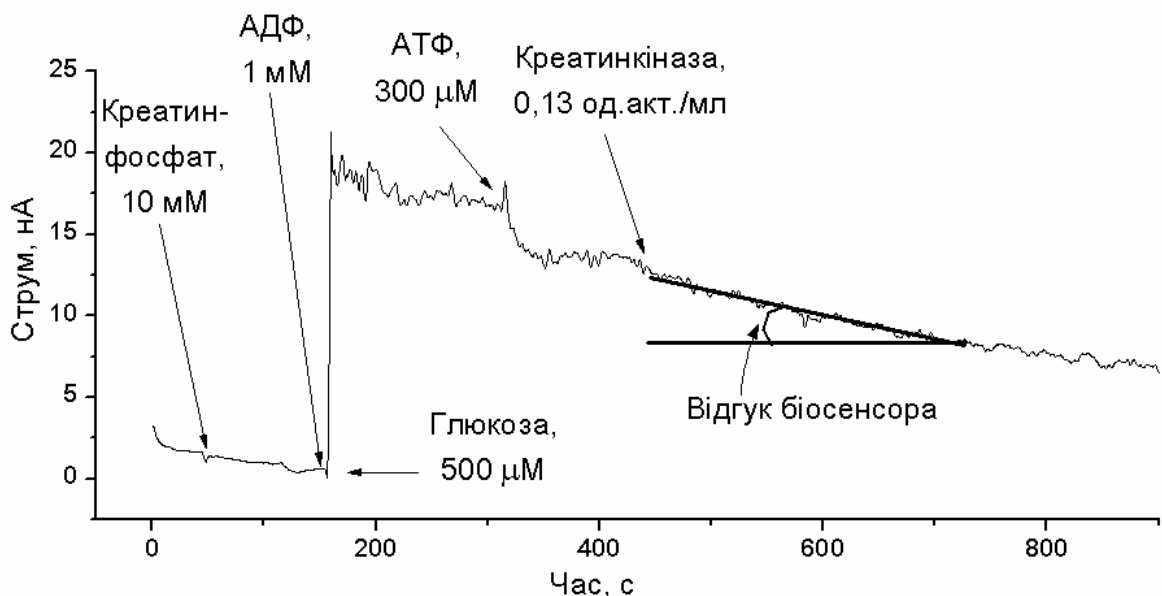


Рис. 3.19. Типові відгуки біосенсора на послідовні додавання субстратів та КК (концентрації речовин вказані на рисунку). Вимірювання проводили в 10 мМ НЕРЕС буфері, рН 7,4, з 10 мМ Mg^{2+} , за постійного потенціалу +0,6 В відносно Ag/AgCl електроду порівняння

Як видно, біосенсор не реагує на додавання креатинфосфату та АДФ, оскільки вони не є електроактивними молекулами. Внесення глюкози призводить до генерування амперометричного відгуку, який зменшується при внесенні АТФ. Після додавання КК відгук продовжує зменшуватись і максимальне падіння досягається через 20 хв. Подальше зменшення відгуку не відбувається, бо концентрація АТФ в комірці стає надто високою (більше 1 мМ) та біосенсорний відгук на АТФ досягає насичення.

3.3.2. Процедура аналізу активності КК у сироватці крові.

Пропонований біосенсор є чутливим до двох субстратів – глюкози та АТФ. Тому було отримано калібрувальні криві для визначення концентрацій цих речовин, які були аналогічні до отриманих раніше (рис. 3.9). В зразках сироватки крові, для вимірювання яких призначений біосенсор, обов'язково присутня глюкоза. Нормальна концентрація глюкози лежить в діапазоні від 4 до 7 мМ (5,5 мМ в середньому), а при патологіях може підвищуватись до 15-20 мМ. Таким чином, при розведенні зразку сироватки крові у 10-20 разів концентрація глюкози у вимірювальній комірці становитиме від 0,2 мМ до 2 мМ і може бути ефективно визначена біосенсором, оскільки відгук біосенсора на додавання сироватки буде залежати тільки від концентрації глюкози (вміст АТФ у крові лише 1 мкМ, що є нижче чутливості біосенсора). Після отримання відгуку на глюкозу, потрібно буде додати АДФ та креатинфосфат для початку роботи КК; концентрація АТФ у робочій комірці почне збільшуватись, а відгук біосенсора – зменшуватись. Визначивши швидкість зменшення відгуку, можна буде оцінити активність КК в зразку. Таким чином, внаслідок проведення одного вимірювання буде визначено концентрацію глюкози та КК.

3.3.3. Вибір оптимального розведення зразків сироватки крові.

Чутливість біосенсора до АТФ, а отже, і до КК залежить від концентрації глюкози: збільшення концентрації глюкози веде до зменшення чутливості до АТФ. Тому для того, щоб точно визначити концентрацію КК, необхідно побудувати калібрувальну криву для КК за певної концентрації глюкози

(наприклад, 250 мкМ) і провести два вимірювання зразку. Спершу, отримати відгук на зразок і визначити концентрацію глюкози, потім вирахувати таке розведення зразку, при якому концентрація глюкози в комірці становитиме 250 мкМ. Отримавши другий відгук на зразок при вирахованому розведенні, ми отримаємо ту концентрацію глюкози в комірці, за якої побудовано калібрувальну криву, та додавши АДФ і креатинфосфат можна буде точно визначити активність КК.

Втім, для клінічних досліджень не потрібно визначати точну концентрацію КК у крові. Важливо знати, чи підвищено її рівень, що дасть змогу інтерпретувати інші симптоми і поставити правильний діагноз. Тому наші дослідження були спрямовані на те, щоб розробити просту одностадійну методику, яка б показувала наявність підвищеного рівня КК в зразку. З цією метою потрібно було підібрати розведення зразку, яке б найефективніше дозволило визначати концентрацію КК за одне вимірювання. Для цього, було використано умовний зразок, що містив 5,0 мМ глюкози і 0,35 од.акт./мл КК, що є вдвічі більшим за нормальну концентрацію для 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. Результати наведено у таблиці 3.7. Для оцінки активності КК визначали зменшення відгуку біосенсора за 100 секунд після додавання субстратів КК; це зменшення наведено у нА та у відсотках від відгуку на глюкозу. Як видно, біосенсор реєстрував активність КК за всіх розведень, проте при розведенні в 50 разів, відгук біосенсора був доволі слабким. Тому найкращим можна вважати розведення проби в 20 разів, коли зменшення сигналу внаслідок продукування АТФ є достатнім для реєстрації біосенсором, а вплив складових зразку на роботу біосенсора буде невеликим через значне розведення. Крім того, якщо концентрація глюкози в зразку буде іншою (3 мМ або 15 мМ), то після розведення в комірці буде 0,2 мМ або 0,75 мМ глюкози, і

як видно з таблиці, біосенсор може визначати активність КК при таких концентраціях глюкози.

Таблиця 3.7

Вибір оптимального розведення зразків сироватки крові для біосенсорного аналізу активності КК

Розведення зразку	Концентрація глюкози в комірці, мкМ	Активність КК в комірці, од.акт./мл	Відгук біосенсора на глюкозу, нА	Зменшення відгуку, нА за 100 с	Зменшення відгуку, % за 100 с
x6,7	750	0,052	67 ± 17	3,6 ± 1,0	5,3 ± 0,9
x10	500	0,035	46 ± 14	2,9 ± 0,6	6,4 ± 0,6
x20	250	0,017	24 ± 5	1,7 ± 0,5	6,7 ± 0,4
x50	100	0,007	10 ± 2	0,5 ± 0,1	5,0 ± 0,4

3.3.4. Підбір оптимальної концентрації АДФ та креатинфосфату. КК має два субстрати – АДФ та креатинфосфат. Тому було важливо визначити оптимальні концентрації цих речовин для біосенсорного визначення активності КК. На початку роботи були використані такі концентрації АДФ та КФ (5 мМ та 10 мМ, відповідно), які були описані в першій роботі по визначенню активності КК за допомогою АТФ-чутливого біосенсора [107]. Втім, було вирішено перевірити, наскільки зміниться чутливість біосенсора до КК при зменшенні концентрації субстратів з метою зменшення собівартості аналізу. 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.

Спершу дослідили вплив концентрації АДФ за високої (10 мМ) концентрації креатинфосфату, оскільки вартість АДФ є значно більшою, ніж креатинфосфату (рис. 3.20). Виявилось, що найкращу чутливість до КК біосенсор мав при 1 мМ АДФ, а збільшення концентрації АДФ призводило до деякого зменшення чутливості до КК. Цей несподіваний ефект можна пояснити тим, що АДФ є інгібітором ГЕК [118]; у випадку використаної в роботі ГЕК з дріжджів інгібування є змішаного типу [119]. Тому за великих концентрацій АДФ, активність ГЕК зменшується, а разом з тим і зменшується чутливість біосенсора до АТФ, який продукується КК. В подальших дослідженнях активність КК визначали саме при 1 мМ АДФ.

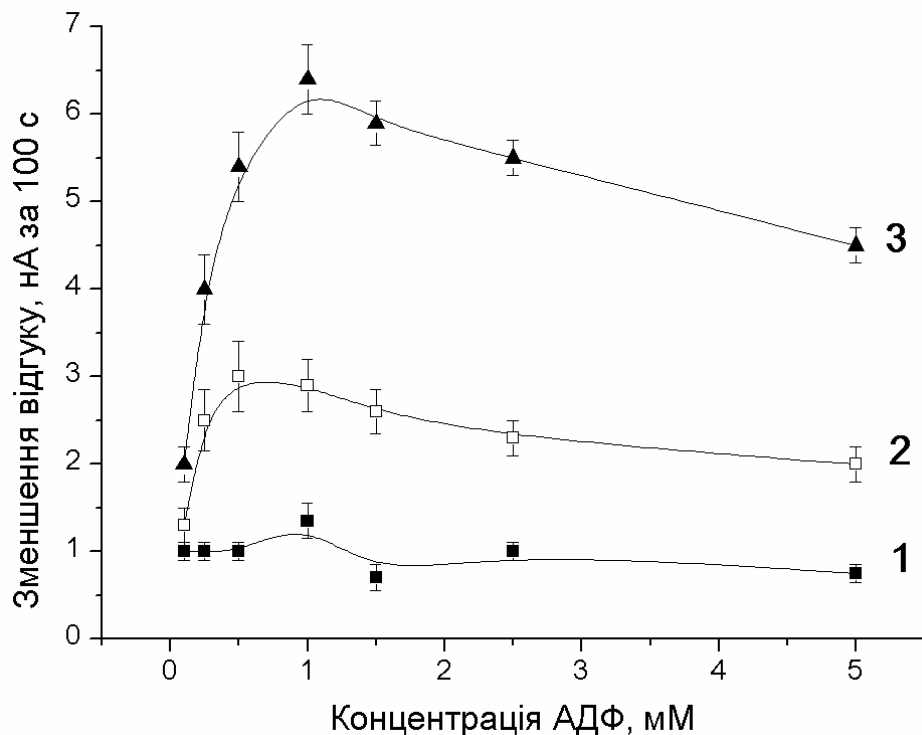


Рис. 3.20. Вплив концентрації АДФ на визначення активності КК (1 – 0,013 од.акт./мл, 2 – 0,038 од.акт./мл, 3 – 0,1 од.акт./мл). Вимірювання проводили в 10 мМ HEPES буфері, рН 7,4, з 10 мМ креатинфосфатом та 10 мМ Mg^{2+} , за постійного потенціалу +0,6 В відносно Ag/AgCl електроду порівняння

Зменшення концентрації креатинфосфату одразу викликало зменшення відгуку біосенсора на КК (рис. 3.21). Тому для того, щоб не зменшувати чутливість біосенсора, було вирішено і далі додавати до робочої комірки 10 мМ концентрацію креатинфосфату.

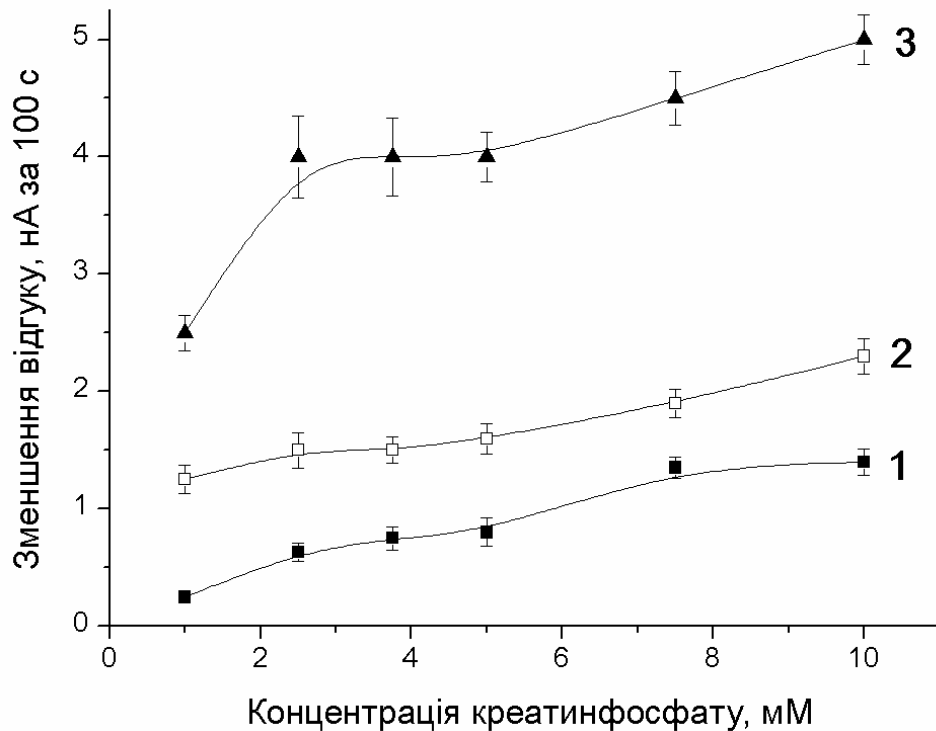


Рис. 3.21. Вплив концентрації креатинфосфату на відгук біосенсора (активність КК: 1 – 0,013 од.акт./мл, 2 – 0,038 од.акт./мл, 3 – 0,1 од.акт./мл). Вимірювання проводили в 10 мМ НЕРЕС буфері, рН 7,4, з 1 мМ АДФ та 10 мМ Mg^{2+} , за постійного потенціалу +0,6 В відносно Ag/AgCl електроду порівняння

3.3.5. Калібрувальні криві для визначення активності КК при різних концентраціях глюкози. Після дослідження умов роботи біосенсора були отримані калібрувальні криві для визначення КК. Як згадувалось раніше, біосенсор визначає активність КК за швидкістю продукування нею АТФ, а чутливість біосенсора до АТФ залежить від концентрації глюкози у розчині. Тому калібрувальні криві для визначення КК були отримані при різних

концентраціях глюкози у розчині, які могли бути при розведенні зразків сироватки крові у 20 разів (рис. 3.22).

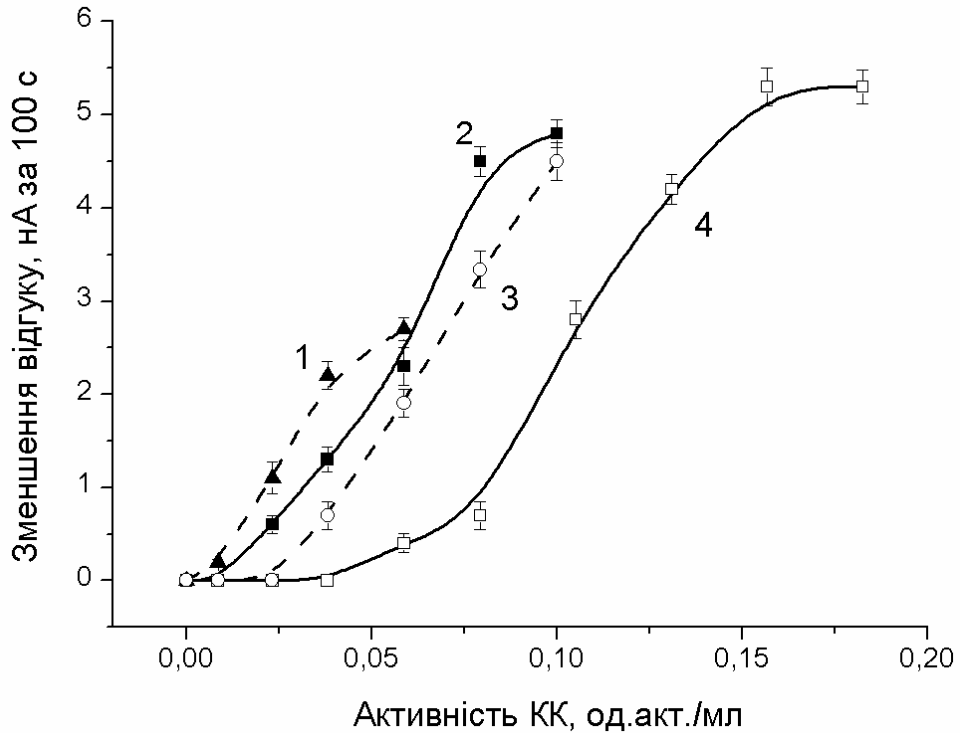


Рис. 3.22. Калібрувальні криві для визначення активності КК, отримані за різних концентрацій глюкози у вимірювальній комірці (1 – 0,1 мМ, 2 – 0,25 мМ, 3 – 0,5 мМ, 4 – 0,75 мМ). Вимірювання проводили в 10 мМ НЕРЕС буфері, рН 7,4, з 1 мМ АДФ та 10 мМ Mg^{2+} , за постійного потенціалу +0,6 В відносно Ag/AgCl електроду порівняння

Як видно з рисунку, чутливість біосенсора до КК зменшувалась із збільшенням концентрації глюкози. 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. Проте якщо пацієнт має

нормальний рівень КК, то чутливості біосенсора не вистачить для точної реєстрації активності КК, буде лише видно, що рівень КК не підвищений. Це є суттєвим недоліком пропонованого біосенсора, хоча це і не виключає можливості використання біосенсора для експрес-діагностики м'язових ушкоджень. Якщо буде необхідність виміряти активність КК у здорових пацієнтів, тоді доведеться проводити попередню обробку зразку, а саме зменшити концентрацію глюкози, оскільки саме глюкоза не дає змоги працювати з невеликими розведеннями зразку.

3.3.6. Відтворюваність вимірювання активності КК. Відтворюваність відгуків є важливою характеристикою біосенсора, яка вказує на точність визначення речовин. Тому було досліджено відтворюваність роботи біосенсорів при визначенні трьох концентрацій КК (рис. 3.23).

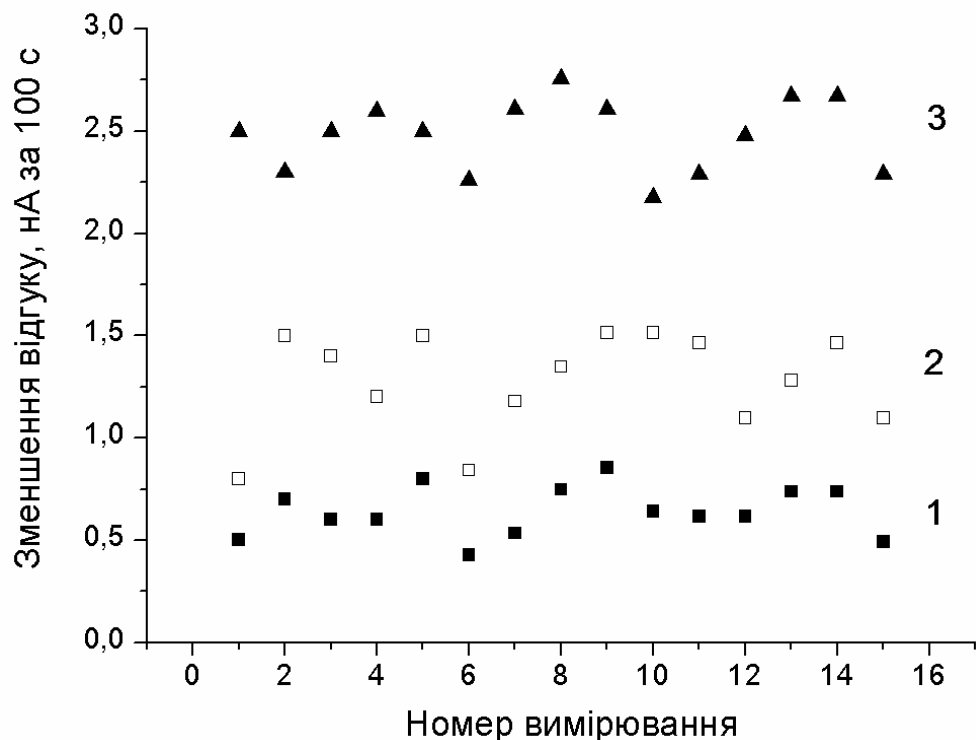


Рис. 3.23. Відтворюваність відгуків біосенсора на різні концентрації КК: 0,013 од.акт./мл (1), 0,038 од.акт./мл (2), 0,1 од.акт./мл (3). Концентрація глюкози – 0,25 мМ, АТФ – 0,1 мМ

Помітного падіння зменшення відгуків біосенсора впродовж робочого дня не відбувалось, що свідчило про високу стабільність іммобілізованих ферментів в складі біоселективного елементу. Відносне середньоквадратичне відхилення відгуків становило 21 % при визначенні 0,013 од.акт./мл КК, 19 % при визначенні 0,038 од.акт./мл КК, і 15 % при визначенні 0,1 од.акт./мл КК. Похибка визначення КК зменшувалась при збільшенні активності КК, оскільки реакція біосенсора на КК ставала більшою.

3.3.7. Вимірювання активності КК в зразках сироватки крові. Для того, щоб оцінити ефективність біосенсора, були проведені вимірювання активності КК в зразках сироватки крові. Зразки були отримано від Київського муніципального науково-практичного центру нефрології та гемодіалізу (Україна). Дані зразки були заморожені протягом тривалого часу та КК в них практично втратила свою активність. Після додавання зразків до робочої комірки, зменшення відгуку біосенсора через синтез АТФ не відбувалося. Цей факт також свідчить, що компоненти сироватки не інгібують біоселективного елементу біосенсора. Медичні лабораторії Майо (Mayo Medical Laboratories, США) рекомендують зберігання сироватки крові з КК не більше 1 тижня в охолодженому стані та не більше 28 діб у замороженому стані. Дійсно, навіть в модельних розчинах спостерігалось швидке зменшення активності КК (протягом 1-2 тижнів) та було необхідно готувати свіжі розчини КК із сухого ліофілізованого ферменту.

Тому було приготовлено зразки сироватки крові з доданою КК. Сироватку було отримано від п'яти різних людей. Для вимірювання активності КК було використано наступну процедуру. Спочатку, аліквоту сироватки крові додавали до робочої комірки (20-кратне розведення) та отримували відгук біосенсора на глюкозу, що була присутня в зразку. Потім оптимальні концентрації АДФ та креатинфосфату додавали до робочої комірки та спостерігали зменшення відгуку біосенсора через утворення АТФ. В кінці, швидкість зменшення відгуку порівнювали з калібрувальною кривою для

визначення КК, яка була отримана за концентрації глюкози, подібної до присутньої в зразку (концентрація глюкози була визначена за попередньо отриманою калібрувальною кривою біосенсора). Результати біосенсора співпали з доданими активностями КК з похибкою 20-25 % (таблиця 3.8).

Таблиця 3.8

**Біосенсорні вимірювання активності КК в різних зразках сироватки крові
(всі зразки були отримані від різних людей)**

№ зразку	Активність КК в сироватці, од.акт./мл	Результати біосенсора, од.акт./мл	Кореляція, %
1	0,12	0,10	83
2	0,26	0,23	89
3	0,65	0,52	80
4	0,76	0,57	75
5	1,30	1,07	82

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 компонентів сироватки з біоселективною мембраною біосенсора (забруднення біоселективної мембрани, її ферментативна деградація та ін.). Крім того, під час вимірювань зразків сироватки з відмивкою біосенсора між вимірюваннями, зменшення відгуків біосенсора було меншим. Біосенсор був придатний для 7-10 послідовних вимірювань без значних змін аналітичних характеристик, але після цього біосенсор має бути рекалібровано.

3.3.8. Висновки. Розроблений в попередній частині роботи амперометричний ферментний біосенсор було адаптовано для визначення активності КК у сироватці крові. Після оптимізації умов роботи біосенсора було проведено визначення різних концентрацій КК у 5 зразках сироватки крові. Біосенсор є придатним для експрес аналізу активності КК у пацієнтів з підозрою на інфаркт міокарду чи іншими пошкодженнями м'язів. Процедура приготування і використання біосенсора є досить простою для швидкого освоєння персоналом. Невеликі розміри портативної вимірювальної установки роблять можливим проведення вимірювань навіть біля ліжка пацієнта.

Результати цього підрозділу викладено у статті і доповідях конференцій:

- 1) 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.
- 2) 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.
- 3) 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.

3.4. Розробка кондуктометричного біосенсора для визначення концентрації АТФ

Як було показано в огляді літератури, раніше описані лабораторні прототипи АТФ-чутливих біосенсорів, включно з розробленими в даній роботі біосенсорами, базуються на потенціометричному або амперометричному

методах вимірювань. Кондуктометричний метод має деякі переваги перед ними, такі як простота будови та дешевизна перетворювачів, проте кондуктометричних 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.

3.4.1. Принцип роботи кондуктометричного біосенсора для визначення активності АТФ. В основі роботи кондуктометричного біосенсора для визначення АТФ лежить ферментативна реакція фосфорилування глюкози (8), каталізована ГЕК, яка іммобілізована в біоселективній мембрані біосенсора. В ході реакції змінюється провідність розчину, що і реєструється кондуктометричним перетворювачем.

Типова процедура вимірювання концентрації АТФ полягає в наступному (рис. 3.24, А). Спочатку до робочої комірки додають АТФ або зразок, що містить АТФ. Це призводить до неспецифічного сигналу біосенсора, оскільки АТФ є зарядженою речовиною. Даний сигнал компенсується диференційним режимом вимірювань, якщо робоча і референтна мембрани ідентичні за морфологією та товщиною. Після стабілізації сигналу до робочої комірки додають модельний розчин глюкози і в ферментній мембрані (біоселективному елементі) починається реакція. Ця реакція призводить до появи двох нових заряджених речовин (АДФ та фосфорильованої глюкози), внаслідок чого змінюється провідність розчину та генерується відгук біосенсора. Глюкоза є незарядженою речовиною, що виключає неспецифічну реакцію біосенсора на її додавання, і відгук біосенсора після додавання глюкози генерується виключно за рахунок ферментативної реакції. Таким чином, за допомогою двоетапної процедури додавання речовин можна обійти один з головних недоліків кондуктометричних біосенсорів – чутливість до заряджених речовин. При цьому, тривалість аналізу залишається цілком прийнятною – близько 5 хв.

В якості контролю був проведений зворотній експеримент (рис. 3.24, Б): спочатку до робочої комірки додавали глюкозу, а потім АТФ. Можна бачити, що відгук біосенсора на глюкозу відсутній, а відгук після додавання АТФ співпадає з тим відгуком, який був після додавання глюкози в попередньому експерименті.

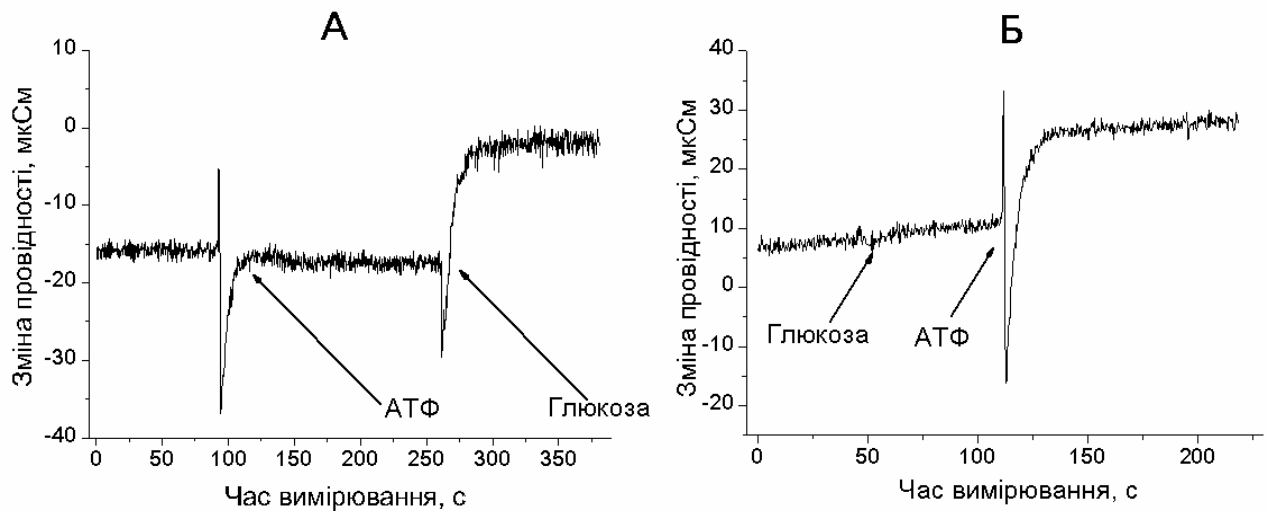


Рис. 3.24. Типові відгуки біосенсора на додавання 0,1 мМ АТФ та 0,2 мМ глюкози (пояснення в тексті). Робочий буфер – 5 мМ НЕРЕС, рН 7,4. Концентрація іонів магнію – 3 мМ

3.4.2. Вибір умов іммобілізації ГЕК. Іммобілізація біологічного матеріалу на поверхню перетворювача є важливим етапом створення біосенсора. Тому на початку роботи ми перевірили декілька варіантів іммобілізації ГЕК. Було вирішено ко-іммобілізувати ГЕК разом із БСА в присутності гліцеролу та ГА, при цьому ГА утворював ковалентні зв'язки між молекулами ГЕК та БСА, а гліцерол виступав допоміжною стабілізуючою фермент речовиною. Був використаний даний спосіб іммобілізації ГЕК, оскільки він приводив до гарних результатів при створенні амперометричного біосенсора на основі ГЕК та ГОД в попередній частині роботи.

Спочатку було перевірено різні співвідношення ГЕК та БСА у складі ферментної мембрани. Було використано вихідні розчини з концентрацією ГЕК

від 3 % до 15 % і БСА від 0 % до 5 %. Потім дані розчини змішували з 0,5 % або 0,8 % ГА, після чого витримували біосенсиори на повітрі протягом 15-30 хв. Найкращі відгуки біосенсорів спостерігались при початковій концентрації ГЕК 10 %, БСА 5 %, ГА 0,5 % і тривалості іммобілізації 30 хв.

Також перевірили роботу біосенсорів при різних концентраціях ГА – від 0,3 % до 0,9 % (до змішування). При використанні концентрації ГА 0,7 % та 0,9 % біосенсиори практично не давали відгуків на глюкозу та АТФ через значне зменшення активності ГЕК протягом іммобілізації. У випадку 0,3 % та 0,5 % ГА відгуки біосенсорів були майже однакові. Тому в подальшій роботі при іммобілізації використовували 0,5 % ГА.

3.4.3. Вплив складу робочого буфера на роботу біосенсора. Склад робочого буфера певною мірою може впливати на роботу біосенсора, оскільки активність ферментів залежить від складу розчину, в якому вони знаходяться. Тому наступним етапом нашої роботи було дослідження впливу параметрів розчину, таких як концентрація Mg^{2+} , буферна ємність та іонна сила на величину відгуків біосенсора.

Як зазначалося раніше, для роботи ГЕК потрібні іони Mg^{2+} у робочому буфері. Для підбору оптимальної концентрації Mg^{2+} була перевірена робота біосенсора при концентраціях Mg^{2+} від 1 мМ до 4 мМ. При проведенні експерименту до робочого буферу спочатку додавали аліквоти концентрованого розчину Mg^{2+} , потім додавали АТФ (100 мкМ), отримували базову лінію і через півхвилини додавали глюкозу (200 мкМ). Оцінювали величину відгуку біосенсора після додавання глюкози (відгук біосенсора на АТФ за відсутності глюкози не залежав від концентрації магнію). Відгуки біосенсора на глюкозу (в присутності АТФ), як і очікувалось, збільшувались при збільшенні кількості магнію (рис. 3.25). За концентрації магнію від 1 мМ до 3 мМ спостерігалась майже прямо пропорційне збільшення відгуків біосенсора на АТФ, а додавання більше 3 мМ магнію вже не призводило до суттєвого

збільшення відгуків. Тому в подальшій роботі до робочого буфера додавали Mg^{2+} до 3 мМ концентрації (у вигляді хлориду магнію).

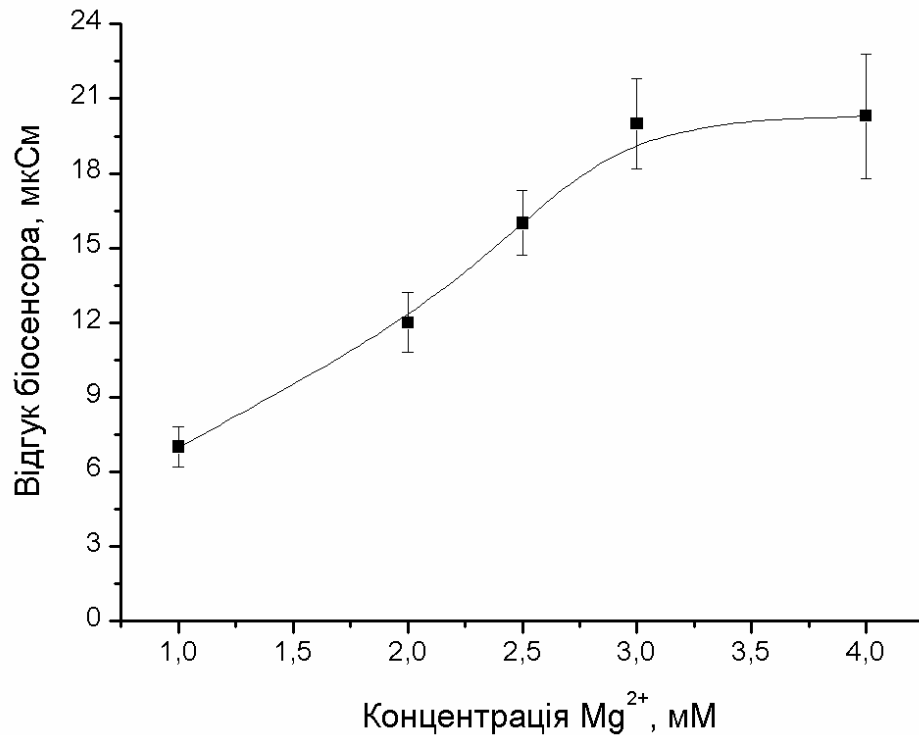


Рис. 3.25. Залежність відгуків біосенсора на додавання 200 мкМ глюкози (в присутності 100 мкМ АТФ) від концентрації іонів магнію у робочому буфері. Вимірювання проводили в 5 мМ буфері HEPES, рН 7,4

Буферна ємність робочого буферу сильно впливає на роботу кондуктометричних біосенсорів. Тому було перевірено роботу біосенсора при різних концентраціях буферного розчину (рис. 3.26). Як видно з рисунку, відгуки біосенсора були найвищі при мінімальній концентрації буферу (1 мМ), і експоненційно зменшувались при підвищенні концентрації. Це є типовою залежністю для кондуктометричних біосенсорів. Для подальшої роботи було вибрано 5 мМ HEPES, оскільки необхідно підтримувати стабільний рН робочого буферу після додавання зразків з іншими значеннями рН. З іншого боку, можна використовувати менш концентрований буфер і досягати значно більшої чутливості біосенсора до АТФ. Крім буферної ємності розчину на роботу біосенсора може впливати іонна сила.

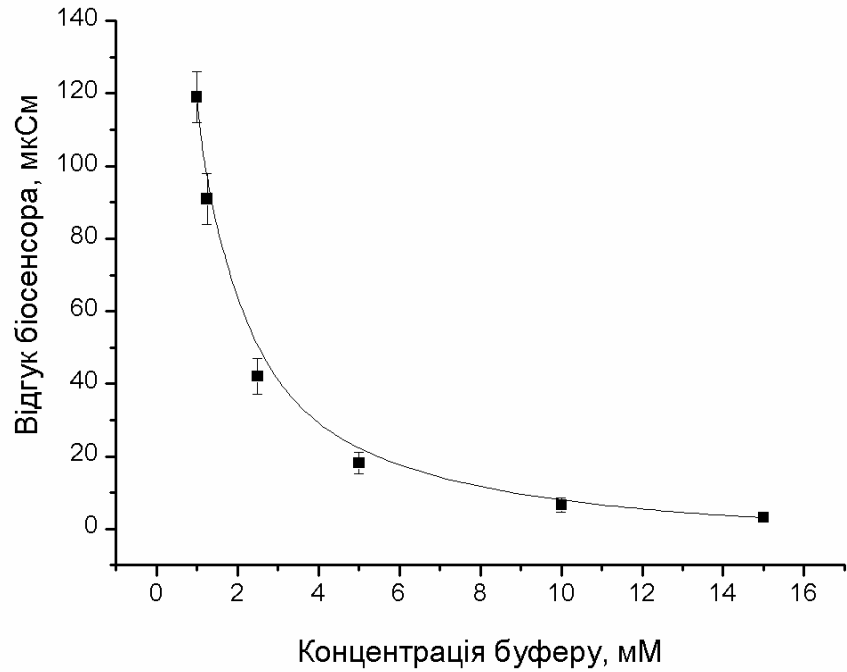


Рис. 3.26. Залежність відгуків біосенсора від концентрації робочого буферу. Концентрація АТФ – 100 мкМ, глюкози – 200 мкМ, Mg^{2+} – 3 мМ

Тому ми дослідили вплив КСІ на відгуки біосенсора (рис. 3.27).

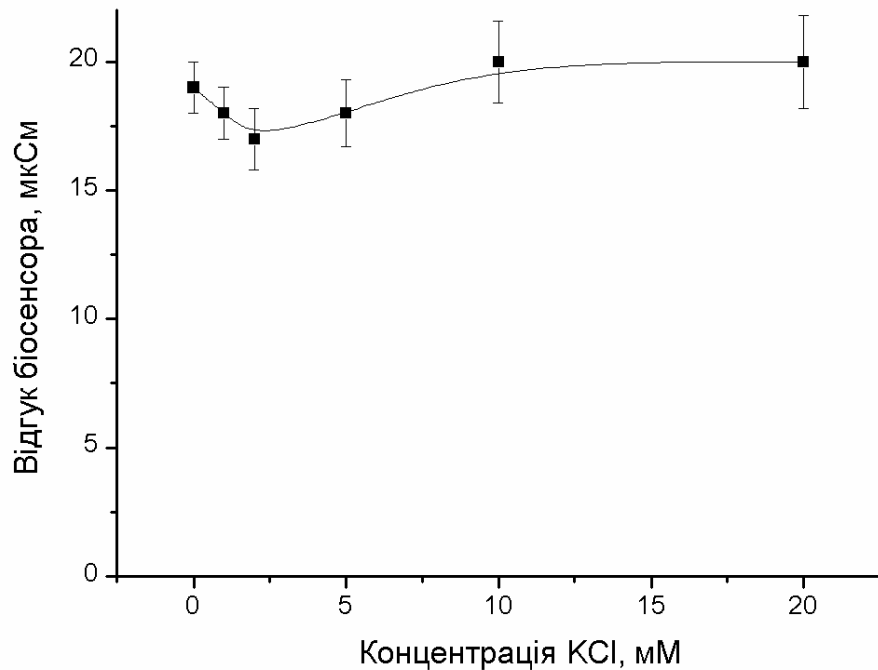


Рис. 3.27. Залежність відгуків біосенсора від концентрації КСІ. Робочий буфер – 5 мМ НЕРЕС, рН 7,4. Концентрація АТФ – 100 мкМ, глюкози – 200 мкМ, іонів магнію – 3 мМ

Як видно з рисунку, іонна сила суттєво не впливала на величину відгуків біосенсора, проте при більших концентраціях КСІ зростав шум сигналу, що збільшувало похибку вимірювання.

3.4.4. Вплив концентрації АТФ та глюкози на роботу біосенсора.

Відгуки біосенсора залежать як від концентрації АТФ, так і від концентрації глюкози. Тому було вирішено порівняти відгуки на глюкозу при різних концентраціях АТФ. Для цього, до розчину додавали АТФ, після чого послідовно збільшували концентрацію глюкози в розчині (від 0 до 0,6 мМ) і реєстрували відгуки. Відповідні криві наведені на рис. 3.28. Як видно, для всіх концентрацій АТФ майже максимальний відгук біосенсора (насичення за глюкозою) спостерігався при 200 мкМ глюкози, і подальше збільшення концентрації глюкози вже не приводило до суттєвого збільшення відгуку. Таким чином, концентрацію глюкози в 200 мкМ можна вважати оптимальною для визначення АТФ. Звісно, при подальшому (понад 300 мкМ) збільшенні концентрації АТФ глюкози вже не буде достатньо для максимального відгуку, проте на практиці такі концентрації АТФ в комірці досягти важко, враховуючи зазвичай невеликі концентрації АТФ у біологічних зразках (концентрації в сироватці крові за норми та патології варіюють від 120 до 1250 нМ) та необхідність у розведенні цих зразків. При використанні 5 мМ HEPES, рН 7,4, з 3 мМ Mg^{2+} та 200 мкМ глюкозою, мінімальна межа визначення АТФ становила 15 мкМ. Типова калібрувальна крива біосенсора для визначення АТФ наведена на рис. 3.29. 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). Слід зазначити, що визначення АТФ біосенсором значною мірою залежало від складу робочого розчину, зокрема від вмісту глюкози та концентрації іонів Mg^{2+} . Змінюючи ці параметри, можна досягати різноманітних аналітичних характеристик біосенсора в залежності від задач, що покладаються на біосенсор при визначенні АТФ.

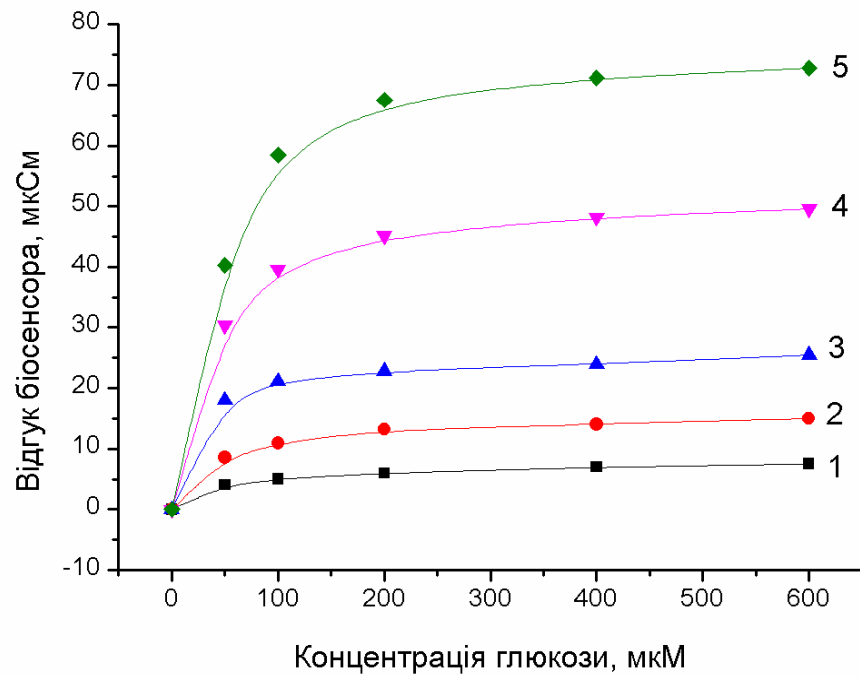


Рис. 3.28. Залежності відгуків біосенсора від концентрації глюкози, отримані при різних концентраціях АТФ у розчині (1 – 25 мкМ, 2 – 50 мкМ, 3 – 100 мкМ, 4 – 200 мкМ, 5 – 300 мкМ)

Наприклад, можливо зміщувати лінійний діапазон визначення АТФ.

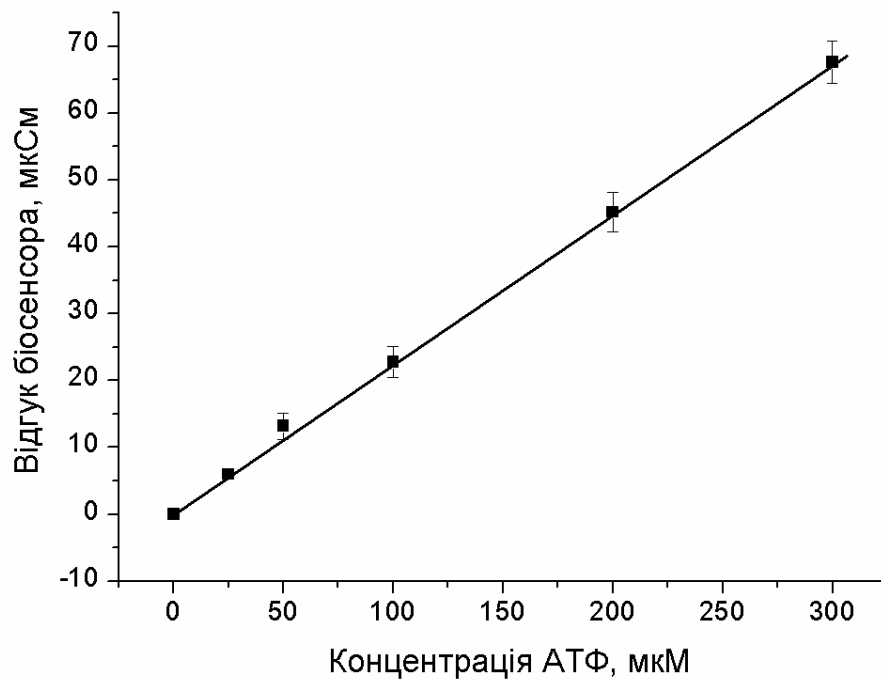


Рис. 3.29. Типова калібрувальна крива біосенсора на основі ГЕК для визначення концентрації АТФ. Концентрація глюкози – 200 мкМ

3.4.5. Відтворюваність відгуків біосенсора. На наступному етапі роботи було досліджено відтворюваність відгуків біосенсора впродовж декількох годин безперервної роботи. Одне вимірювання займало 7-10 хв., проміжок між вимірюваннями складав близько 10 хв.; за цей час біосенсор відмивали від субстратів, кілька разів змінюючи робочий буфер.

Результати дослідження представлено на рис. 3.30. Помітного падіння відгуків за 10 вимірювань не відбувалось; відносне середньоквадратичне відхилення відгуків становило 10,3 %.

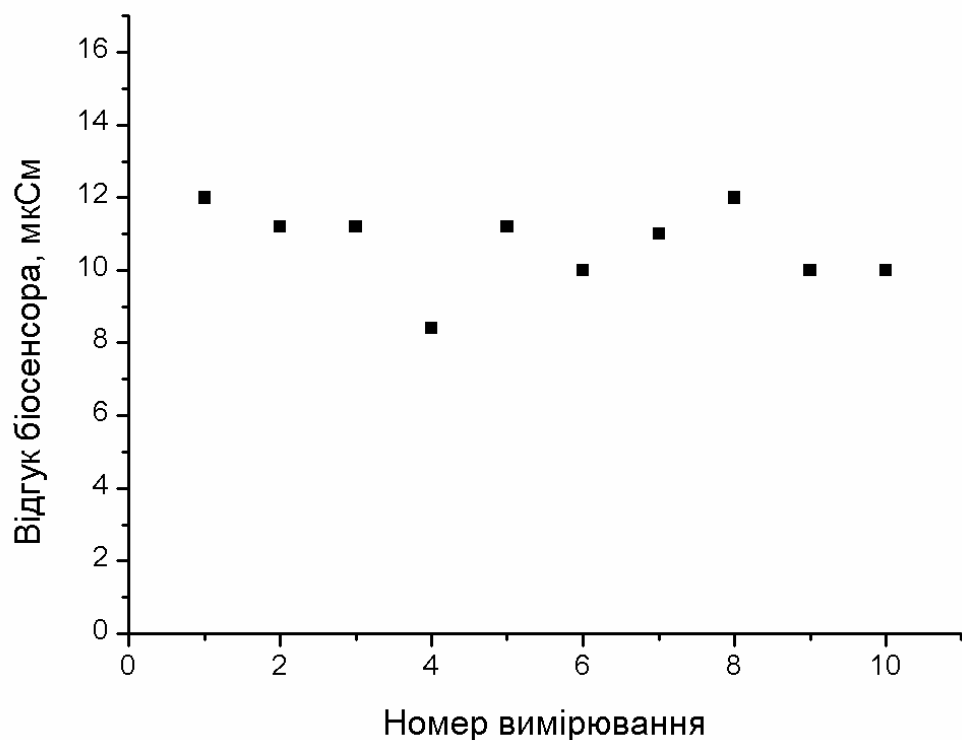


Рис. 3.30. Відтворюваність відгуків біосенсора впродовж кількох годин. Робочий буфер – 5 мМ HEPES, рН 7,4. Концентрація АТФ – 100 мкМ, глюкози – 200 мкМ, іонів магнію – 3 мМ

3.4.6. Операційна стабільність біосенсорів. Дуже важливою в роботі біосенсорів є можливість їх використання протягом тривалого часу для багатьох вимірювань. Але часто в процесі роботи відбувається часткове вимивання компонентів з біоселективної мембрани на поверхні перетворювача. Це може відбуватися внаслідок дифузії слабо зв'язаних компонентів мембрани

при інтенсивному перемішуванні буферного розчину в робочій комірці. Також може мати місце певне зменшення активності ферменту в мембрані при зберіганні. Все це може призводити до певного падіння відгуків біосенсорів в процесі роботи, а, відповідно, до зменшення чутливості біосенсора.

Тому метою наступного етапу роботи була перевірка операційної стабільності розробленого біосенсора (рис. 3.31). Для цього впродовж дня отримували 5-6 відгуків на глюкозу та АТФ (0,2 мМ та 0,1 мМ, відповідно), після чого біосенсор зберігали в робочому буфері за температури +4 °С до наступного використання. На наступний день знову протягом кількох годин отримували відгуки біосенсорів на ті самі концентрації глюкози та АТФ. Сумарний термін роботи та зберігання біосенсорів перевірявся щонайменше протягом 6 діб і демонстрував достатню стабільність.

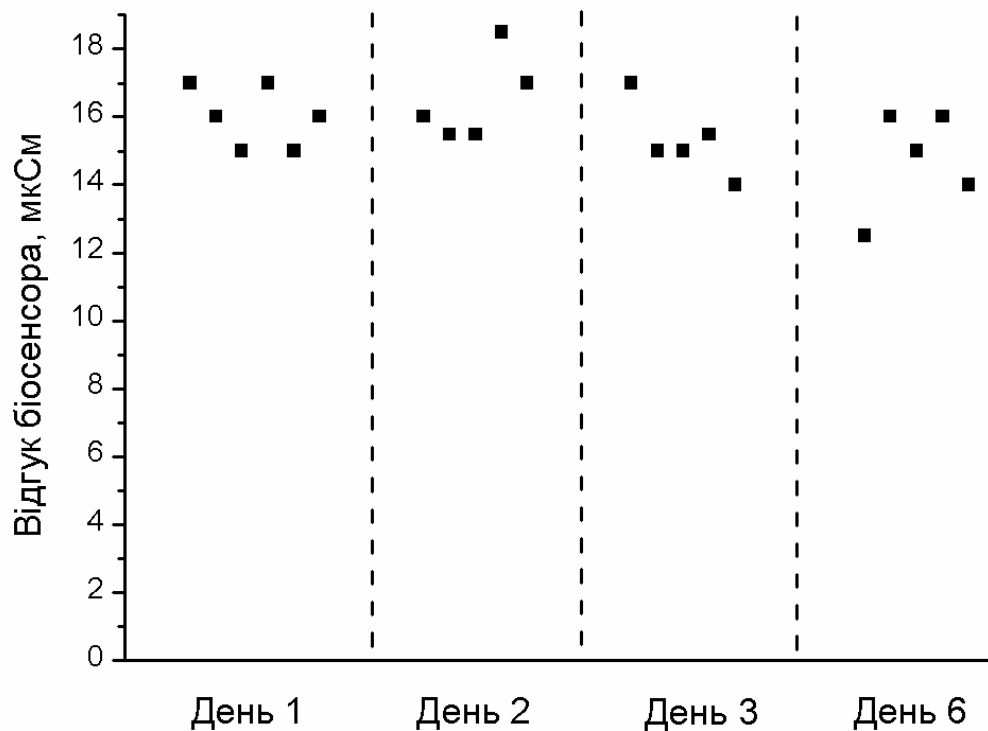


Рис. 3.31. Операційна стабільність біосенсора впродовж 6 днів. Робочий буфер – 5 мМ HEPES. Концентрація АТФ – 100 мкМ, глюкози – 200 мкМ, іонів магнію – 3 мМ

3.4.7. Довгострокове зберігання біосенсорів. На наступному етапі роботи було досліджено стабільність кондуктометричного біосенсора при довгостроковому зберіганні (11 діб) за різних умов зберігання. Для цього використовували «свіжовиготовлені» біосенсори, з використанням яких отримували відгуки на АТФ та глюкозу, після чого біосенсори відмивали від субстратів і продуктів реакції та зберігали деякий час, після чого знову отримували відгуки на ті самі концентрації субстратів.

Було перевірено 3 варіанти зберігання біосенсорів: в сухому стані за температури +4 °С, у робочому буфері при +4 °С (в буфер були занурені лише чутливі ділянки перетворювачів з нанесеним ферментом), а також в сухому стані за температури -18 °С. Зберігання в сухому стані при +4 °С виявилось найгіршим – після зберігання протягом 11 діб відгуки біосенсорів були практично відсутні. Після зберігання у буфері при +4 °С протягом 11 діб відгуки біосенсорів зменшились на 10-15 %. Найкращі результати було отримано при зберіганні біосенсорів в морозильній камері: відгуки зменшились на 7-12 %. Дані зменшення чутливості біосенсорів до АТФ пояснюються поступовим зменшенням активності ГЕК, яка є основою біоселективного елементу біосенсора, внаслідок зберігання, оскільки кондуктометричні перетворювачі самі по собі можуть зберігатися декілька років без зміни своїх характеристик.

Таким чином, біосенсор може використовуватись після тривалого зберігання, проте для точних вимірювань концентрацій АТФ є необхідним повторне калібрування біосенсорів після зберігання.

3.4.8. Вимірювання реальних зразків. Для підтвердження ефективної роботи біосенсора, було проведено вимірювання концентрації АТФ у ампулах для внутрішньом'язового і внутрішньовенного введення. Для цього було використано метод стандартних додавань, який було використано в попередній частині роботи при визначенні невідомих концентрацій речовин амперометричними біосенсорами.

Ніякої попередньої обробки зразків не проводили. Аліквоту зразку (декілька десятків мікролітрів) додавали до робочої комірки, отримували відгук біосенсора, після чого додавали 2-3 стандартні концентрації АТФ. Обробка отриманих результатів показала високе співпадіння результатів, отриманих біосенсором, із номінальною, заявленою виробником, концентрацією АТФ у ампулах (таблиця 3.9). Це демонструє можливість використання запропонованого біосенсора на фармацевтичному виробництві для контролю якості лікарських препаратів, що містять в своєму складі АТФ.

Таблиця 3.9

**Результати біосенсорних вимірювань концентрації АТФ у
фармацевтичних препаратах**

Номінальна концентрація АТФ в зразку, мМ	Концентрація АТФ, виміряна біосенсором, мМ	Співвідношення біосенсорних та номінальних даних, %	Ступінь розведення зразку у робочій комірці
18,15	22,1 ± 2,0	121	91
18,15	17,1 ± 1,9	94	91
18,15	19,4 ± 2,1	107	73
18,15	18,2 ± 2,0	100	73
23,15	21,3 ± 2,4	92	114

3.4.9. Висновки. Розроблено кондуктометричний одноферментний біосенсор для визначення АТФ та глюкози. Найкраща іммобілізація ГЕК спостерігалась при змішуванні розчину 10 % ГЕК, 5 % БСА і 10 % гліцеролу з 0,5 % глутаровим альдегідом і тривалості іммобілізації 30 хв. Характеристики біосенсора залежали від складу робочого буферу (аналізованого розчину), а

саме концентрації іонів магнію та концентрації буферу. Оптимальним буферним розчином є 5 мМ HEPES з 3 мМ іонів магнію. 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, мінімальна межа визначення АТФ становила 15 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 °С 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 і показано високе співпадіння результатів, отриманих біосенсором, із номінальною концентрацією АТФ у ампулах.

Пропонований біосенсор можна використовувати для визначення концентрації АТФ у водних зразках, зокрема 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 або ж при великому розведенні.

Результати досліджень, подані у цьому підрозділі, опубліковано в наступних працях:

- 1) 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.
- 2) 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.

РОЗДІЛ 4

АНАЛІЗ ТА УЗАГАЛЬНЕННЯ РЕЗУЛЬТАТІВ ДОСЛІДЖЕНЬ

Розробка дешевих, швидких та надійних методів визначення концентрації різноманітних речовин у розчинах має велике значення для біологічних досліджень, медичної діагностики та контролю якості фармацевтичних препаратів. Серед біологічних речовин важливе значення мають макроенергетичні молекули, в першу чергу АТФ, концентрація якого слугує показником енергетичного стану клітин. Традиційні методи визначення АТФ (рідинна хроматографія з спектрофотометрією, біолюмінесцентні методи) часто потребують складного та дорогого обладнання, великих затрат часу, і є майже непридатними для визначення концентрацій АТФ в режимі реального часу та *in vivo*, що суттєво обмежує їх використання в біологічних дослідженнях. Електрохімічні ферментні біосенсори для визначення АТФ, зокрема амперометричні, позбавлені даних недоліків: вони 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 та 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, в залежності від використаної ферментної системи (див. реакції 2, 3 та 4, 5). Це викликано обмеженим вибором ферментів, що можна включати до складу біосенсорів. Перспективним напрямком для усунення даного недоліку є створення біосенсорних систем та мультибіосенсорів, один з яких є чутливим до другої речовини – глюкози або гліцеролу. Тому розробка біосенсорної системи для одночасного визначення АТФ та глюкози була задачею другої частини дисертаційної роботи. Дана біосенсорна система передбачалась для

вимірювання глюкози і АТФ в біологічних та фармацевтичних зразках завдяки високій селективності, яка забезпечується високо селективними ферментами та використанням додаткової напівпроникної мембрани на основі фенілєндіаміну.

В результаті проведення експериментальних досліджень було розроблено амперометричну біосенсорну систему, що складалась з двох ферментних біосенсорів, один з яких був чутливим до АТФ та глюкози, а інший – лише до глюкози. Для створення біосенсора, чутливого до глюкози використовувався фермент ГОД, іммобілізований на поверхні робочого електроду поперечною зшивкою глутаровим альдегідом з молекулами БСА. Другий біосенсор містив в собі ферменти ГЕК та ГОД, також іммобілізовані за допомогою ГА. Однаковий тип іммобілізації потенційно дозволить виготовляти обидва біосенсори в рамках одного технологічного циклу.

В роботі досліджено основні аналітичні характеристики обох розроблених біосенсорів – такі, як чутливість, селективність, стабільність, залежність величин сигналів біосенсорів від складу робочого буферу.

На основі проведених досліджень вперше розроблена високочутлива селективна біосенсора система з використанням іммобілізованих ГОД і ГЕК, а також дискових платинових електродів в якості перетворювачів біохімічного сигналу в електричний для одночасного аналізу АТФ і глюкози в біологічних рідинах. Отримані біоселективні елементи біосенсорної системи показали високу чутливість до своїх субстратів, час проведення аналізу 2 – 3 хв. За оптимальних умов (при використанні 25 мМ НЕРЕС, рН 7,4, 2 мМ Mg^{2+}), межа вимірювання АТФ становила 4-6 мкМ, лінійний діапазон роботи був 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.

Відпрацьована уніфікована методика 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 та додавали до робочої комірки зразок з невідомими концентраціями АТФ та глюкози. 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 і вираховували концентрацію АТФ. Ефективність методики продемонстровано при визначенні АТФ та глюкози в комерційних фармацевтичних препаратах.

Детектування утворення або споживання АТФ у розчині за допомогою біосенсора є перспективною методикою для біохімічних досліджень, що досліджують процеси за участю АТФ. 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. Поява високої активності даного ферменту в сироватці крові є показником ушкодження м'язової тканини (в першу чергу міокарду), тому даний біосенсор можна використовувати як додатковий тест при діагностиці інфаркту міокарду.

В роботі було встановлено оптимальний склад робочого буферу для біосенсорного визначення активності КК і показано, що оптимальна концентрація субстратів КК у розчині є 1 мМ (АДФ) та 10 мМ (креатинфосфат). Встановлено оптимальний ступінь розведення зразків сироватки крові в електрохімічній комірниці, який складав 1:20. Оскільки біосенсор був чутливим до глюкози, було отримано калібрувальні криві для визначення активності КК за різних концентрацій глюкози, які можуть бути в реальних зразках. 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. 4.1.

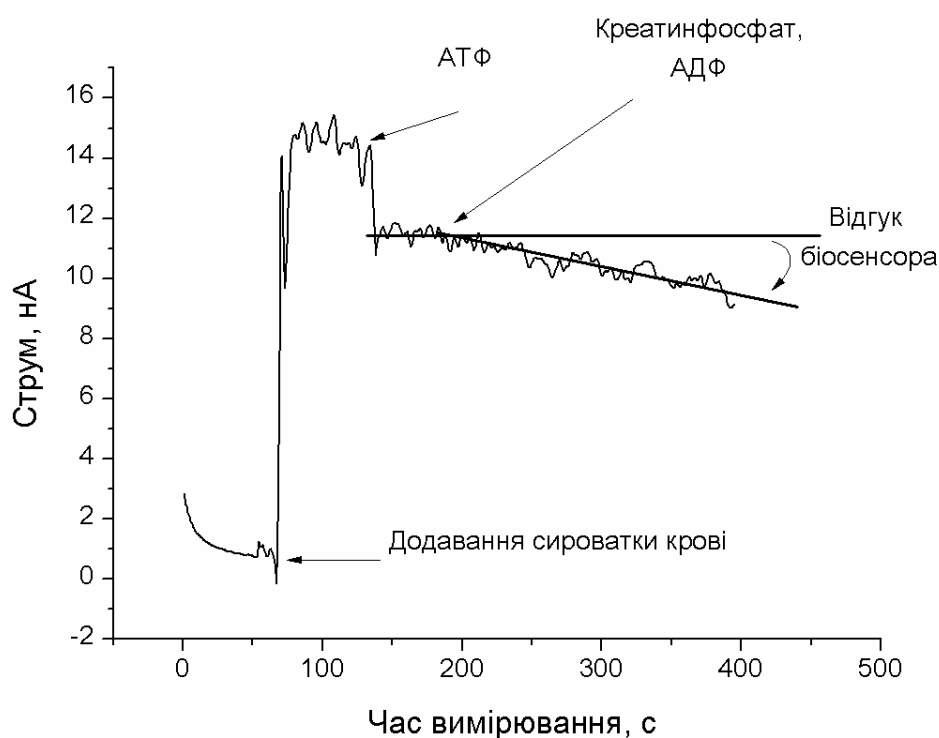


Рис. 4.1. Типовий відгук біосенсора, отриманий при аналізі активності КК в сироватці крові. Послідовність додавання речовин до робочої комірки вказано на рисунку. Концентрація АТФ у робочій комірці після додавання складала 300 мкМ, креатинфосфату – 10 мМ, АДФ – 1 мМ. Вимірювання проведені в 10 мМ НЕРЕС буфері, рН 7,4, з 10 мМ Mg^{2+} , при постійному потенціалі +0,6 В відносно Ag/AgCl електроду порівняння, за кімнатної температури. Кінцеве розведення сироватки в комірці 1:20

Активності КК, що були додані до сироватки крові, знаходились в діапазоні концентрацій як для здорових людей, так і для хворих на інфаркт міокарду, були ефективно виміряні біосенсорною системою. Отже, як свідчать результати наших досліджень, запропонована біосенсорна методика визначення

активності КК за швидкістю продукування нею АТФ є ефективним інструментом для підтвердження діагнозу інфаркту міокарду.

На завершальному етапі досліджень вперше було розроблено кондуктометричний ферментний біосенсор для визначення АТФ та глюкози. В основі його роботи лежала ферментативна реакція, каталізована єдиним ферментом ГЕК, що був іммобілізованим на поверхні гребінчастого кондуктометричного перетворювача. Під час проходження реакції відбувалась зміна провідності розчину, що і детектувалось перетворювачем. Було порівняно декілька варіантів іммобілізації ГЕК; 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. Вона полягала в послідовному додаванні зразку з АТФ, після чого базова лінія біосенсора стабілізувалася завдяки диференційному режиму вимірювань; потім до робочої комірки додавали глюкозу, що викликало відгук біосенсора, який був пропорційним концентрації АТФ. Таким чином було усунуто вплив заряджених речовин на роботу біосенсора, який є суттєвою проблемою при розробці кондуктометричних біосенсорів. Характеристики біосенсора залежали від складу робочого буферу, а саме концентрації іонів магнію та концентрації буферу. Іони магнію є необхідними для роботи ГЕК (вони стабілізують молекулу АТФ), і дослідження залежності відгуків біосенсора при різних концентраціях іонів магнію виявило, що за концентрації іонів магнію в 3 мМ відгуки є максимальними. Подальше підвищення концентрації магнію вже не призводило до збільшення відгуків. Величина відгуків біосенсора сильно залежала від концентрації буферного розчину – підвищення молярності буферу призводило до стрімкого зменшення відгуків біосенсора. Така ситуація є типовою для кондуктометричних біосенсорів через нейтралізацію зарядів (H^+ та OH^-) буферним розчином, що зменшує провідність розчину, а, відповідно, і відгук біосенсора. Тому

оптимальним буферним розчином для роботи біосенсора є 5 мМ HEPES, рН 7,4, з 3 мМ 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. Дослідження залежності між чутливістю біосенсора до АТФ і концентрацією глюкози показало, що оптимальна концентрація глюкози для визначення АТФ складає 0,2 мМ. 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 фармацевтичних препаратах (ампулах для внутрішньом'язового і внутрішньовенного введення). Показано високе співпадіння результатів, отриманих біосенсором, із номінальною, заявленою виробником, концентрацією АТФ у ампулах. Пропонований 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.

Порівняння амперометричного та кондуктометричного біосенсора для визначення АТФ, які були розроблені в даній роботі, наведено в таблиці 4.1. Як видно з таблиці, 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 ПФД, яка нанесена на голий робочий електрод. В роботі показано, що дана мембрана не пропускає до

поверхні електроду відносно великі електроактивні речовини (порівняно з H_2O_2), які здатні викликати похибку у вимірюваннях.

Таблиця 4.1

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
Час 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
Необхідність додаткових електродів	Так	Ні

З іншого боку, перевагами кондуктометричного біосенсора над амперометричним є значно нижча вартість 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 електродах. Все це робить кондуктометричний біосенсор для визначення АТФ значно дешевшим, ніж амперометричний. Проте головним недоліком кондуктометричного біосенсора є певна чутливість до заряджених речовин, яка залежить від якості перетворювача і якості приготування біосенсора (це типово не тільки для даного біосенсора, а і для кондуктометрії взагалі). Це обмежує коло зразків, що можуть бути виміряні даним біосенсором.

Порівняння аналітичних характеристик розроблених в даній роботі АТФ-чутливих біосенсорів із деякими біосенсорами, описаними в літературі, наведено в таблиці 4.2. Як видно з таблиці, лінійний діапазон визначення АТФ значно відрізняється в різних біосенсорів, що робить їх порівняння досить проблематичним. Біосенсори на основі аптамерів є на декілька порядків чутливішими у порівнянні з будь-яким біосенсором на основі ферментів (включаючи розроблені в даній роботі). Чутливості аптамерних біосенсорів є достатньо для визначення АТФ в крові, що неможливо будь-яким іншим біосенсором. З іншого боку, вимірювання за допомогою даних біосенсорів є дуже довготривалими через необхідність тривалої інкубації біосенсора з зразком для зв'язування АТФ з аптамером. Це робить неможливим використання аптамерних біосенсорів для вимірювань концентрації АТФ в режимі реального часу та *in vivo*.

Розроблені в даній роботі біосенсори є значно чутливішими, ніж біосенсори на основі H^+ -АТФази, $EF_0F_1-H^+$ -АТФази та апірази, та приблизно такими ж чутливими, як інші біосенсори на основі ферментних систем (ГК/ГФО та ГОД/ГЕК). Процедура аналізу із використанням розроблених монобіосенсорів 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.

Таблиця 4.2

Порівняння характеристик розроблених в даній роботі АТФ-чутливих біосенсорів з біосенсорами, описаними в літературі

Рецептор	Матеріал перетворювача	Час відгуку, хв.	Лінійний/робочий діапазон, мкМ	Межа визначення АТФ, мкМ	Реальні зразки	Джерело
Аптамер	Au	120	0,001-1	0,00025	Сироватка крові людини	[120]
		90	0,005-1	0,0014	Сироватка крові людини	[121]
	СВЕ	30	10 пМ - 100 нМ	10 пМ	Лізат клітин HeLa	[122]
H ⁺ -АТФаза	ІСПТ	1-1,5	200-1000	200	-	[12]
EF ₀ F ₁ -H ⁺ -АТФаза	Au	-	2500-6000	2500	-	[123]
Апіраза	ІСПТ	5	200-1000	200	-	[97]
Холінкіназа	-	1-2	10-75	4	Лізат еритроцитів людини	[98]
ГК + ГФО	Pt	0,3	1,3-12	0,0001	Зразки рослин <i>Ceratopteris sp.</i> та <i>Zea mays</i>	[101]
ГОД + ГЕК	СВЕ	0,3	0,5-20	0,2	-	[104]
	Pt	5	0,25-4	0,01	Тканини кишок	[14]
	Pt	2-3	50-500	10	Лізат еритроцитів людини	[102]
	Pt	0,3	15-90	5	Фармацевтичні препарати	Ця робота
ГЕК	Au	1	15-300	15	Фармацевтичні препарати	

Крім того, аналітичні системи на основі біосенсорів є мобільними завдяки невеликим розмірам, придатними до автоматизації і мініатюризації. Особливо слід наголосити на економічній ефективності розроблених біосенсорів. Для

створення одного біосенсора необхідно долі мікрограмів ферментів, і цього достатньо для проведення десятків вимірювань протягом кількох тижнів.

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 діагностики безпосередньо біля ліжка хворого та приймати рішення про наступне лікування, що створює передумови для переходу до персоніфікованої 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 біосенсорів 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 0,1-0,5 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 ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

1. Molecular biology of the cell / [B. Alberts, A. Johnson, J. Lewis et al.]. – [4-th ed.]. – New York : Garland Science, 2002. – 798 p.
2. Weaver R. F. Molecular biology / R. F. Weaver. – New York : McGraw-Hill Higher Education, 2012. – 590 p.
3. Release of ATP in the ventral medulla during hypoxia in rats: role in hypoxic ventilatory response / A. V Gourine, E. Llaudet, N. Dale [et al.] // The Journal of Neuroscience. – 2005. – Vol. 25. – № 5. – P. 1211–1218.
4. Burnstock G. Historical review: ATP as a neurotransmitter / G. Burnstock // Trends in Pharmacological Sciences. – 2006. – Vol. 27. – № 3. – P. 166–176.
5. Blood lactate/ATP ratio, as an alarm index and real-time biomarker in critical illness / J. Chida, R. Ono, K. Yamane [et al.] // PLOS ONE. – 2013. – Vol. 8. – № 4. – P. e60561.
6. Tissue based enzymatic determination of ATP in human erythrocyte hemolysate combined with spectrophotometric method / M. Kataoka, N. Teshima, M. Kurihara [et al.] // Chemistry Letters. – 1999. – Vol. 28. – № 6. – P. 491–492.
7. Simultaneous determination of creatine compounds and adenine nucleotides in myocardial tissue by high-performance liquid chromatography / T. Teerlink, M. Hennekes, J. Bussemaker [et al.] // Analytical Biochemistry. – 1993. – Vol. 214. – № 1. – P. 278–283.
8. Bergmeyer H. U. Methods of enzymatic analysis / H. U. Bergmeyer. – Deerfield Beach : VCH Publishers, 1984. – 218 p.
9. Determination of ATP and its metabolites released from rat caudal artery by isocratic ion-pair reversed-phase high-performance liquid chromatography / Y. Kawamoto, K. Shinozuka, M. Kunitomo [et al.] // Analytical Biochemistry. – 1998. – Vol. 262. – № 1. – P. 33–38.
10. Methods for the determination of adenosine triphosphate and other adenine

- nucleotides / S. V. Khlyntseva, Y. R. Bazel', A. B. Vishnikin [et al.] // *Journal of Analytical Chemistry*. – 2009. – Vol. 64. – № 7. – P. 657–673.
11. A technique for the measurement of renal ATP in a large animal model of septic shock / C. May, L. Wan, J. Williams [et al.] // *The International Journal of Artificial Organs*. – 2005. – Vol. 28. – № 1. – P. 16–21.
 12. A microsensor for adenosine-5'-triphosphate ph-sensitive field effect transistors / M. Gotoh, E. Tamiya, I. Karube [et al.] // *Analytica Chimica Acta*. – 1986. – Vol. 187. – P. 287–291.
 13. A novel amperometric adenosine triphosphate biosensor by immobilizing graphene/dual-labeled aptamers complex onto poly(o-phenylenediamine) modified electrode / W. Wen, T. Bao, J. Yang [et al.] // *Sensors and Actuators B: Chemical*. – 2014. – Vol. 191. – P. 695–702.
 14. ATP microelectrode biosensor for stable long-term in vitro monitoring from gastrointestinal tissue / B. A. Patel, M. Rogers, T. Wieder [et al.] // *Biosensors and Bioelectronics*. – 2011. – Vol. 26. – № 6. – P. 2890–2896.
 15. Karayannis M. I. Significant steps in the evolution of analytical chemistry—is the today's analytical chemistry only chemistry? / M. I. Karayannis, C. E. Efstathiou // *Talanta*. – 2012. – Vol. 102. – P. 7–15.
 16. Clark L. C. Electrode systems for continuous monitoring in cardiovascular surgery / L. C. Clark, C. Lyons // *Annals of the New York Academy of Sciences*. – 1962. – Vol. 102. – № 1. – P. 29–45.
 17. Electrochemical biosensors: recommended definitions and classification / D. R. Thévenot, K. Toth, R. A. Durst [et al.] // *Biosensors and Bioelectronics*. – 2001. – Vol. 16. – № 1–2. – P. 121–131.
 18. Perumal V. Advances in biosensors: principle, architecture and applications / V. Perumal, U. Hashim // *Journal of Applied Biomedicine*. – 2014. – Vol. 12. – № 1. – P. 1–15.
 19. Electrochemical biosensors - sensor principles and architectures / D. Grieshaber, R. MacKenzie, J. Vörös [et al.] // *Sensors*. – 2008. – Vol. 8. – № 3. – P. 1400–

- 1458.
20. Development of conductometric biosensor array for simultaneous determination of maltose, lactose, sucrose and glucose / O. O. Soldatkin, V. M. Peshkova, O. Y. Saiapina [et al.] // *Talanta*. – 2013. – Vol. 115. – P. 200–207.
 21. Enhanced response of a proteinase K-based conductometric biosensor using nanoparticles / W. Nourira, A. Maaref, H. Elaissari [et al.] // *Sensors*. – 2014. – Vol. 14. – № 7. – P. 13298–13307.
 22. A novel conductometric creatinine biosensor based on solid-state contact ammonium sensitive pvc–nh₂ membrane / I. Isildak, O. Cubuk, M. Altikatoglu [et al.] // *Biochemical Engineering Journal*. – 2012. – Vol. 62. – P. 34–38.
 23. Electrochemical biosensors for determination of organophosphorus compounds: review / A. Gahlaut, A. Gothwal, A. K. Chhillar [et al.] // *Open Journal of Applied Biosensor*. – 2012. – Vol. 1. – № 1. – P. 1–8.
 24. Feasibility of application of conductometric biosensor based on acetylcholinesterase for the inhibitory analysis of toxic compounds of different nature / K. V. Stepurska, O. O. Soldatkin, I. S. Kucherenko [et al.] // *Analytica Chimica Acta*. – 2015. – Vol. 854. – P. 161–168.
 25. A novel conductometric biosensor based on hexokinase for determination of adenosine triphosphate / I. S. Kucherenko, D. Y. Kucherenko, O. O. Soldatkin [et al.] // *Talanta*. – 2016. – Vol. 150. – P. 469–475.
 26. Upadhyay L. S. B. Alkaline phosphatase inhibition based conductometric biosensor for phosphate estimation in biological fluids / L. S. B. Upadhyay, N. Verma // *Biosensors and Bioelectronics*. – 2015. – Vol. 68. – P. 611–616.
 27. Highly sensitive conductometric biosensors for total lactate, D- and L-lactate determination in dairy products / T. T. Nguyen-Boisse, J. Saulnier, N. Jaffrezic-Renault [et al.] // *Sensors and Actuators B: Chemical*. – 2013. – Vol. 179. – P. 232–239.
 28. Laccase-based biosensors for detection of phenolic compounds / M. M. Rodríguez-Delgado, G. S. Alemán-Nava, J. M. Rodríguez-Delgado [et al.] //

- TrAC Trends in Analytical Chemistry. – 2015. – Vol. 74. – P. 21–45.
29. Quantification of L-lysine in cheese by a novel amperometric biosensor / R. Ciriello, T. R. I. Cataldi, F. Crispo [et al.] // Food Chemistry. – 2015. – Vol. 169. – P. 13–19.
 30. Badea M. Oxidase enzyme immobilisation through electropolymerised films to assemble biosensors for batch and flow injection analysis / M. Badea, A. Curulli, G. Palleschi // Biosensors & Bioelectronics. – 2003. – Vol. 18. – № 5–6. – P. 689–698.
 31. Thermally reduced graphene oxide: the study and use for reagentless amperometric D-fructose biosensors / I. Šakinytė, J. Barkauskas, J. Gaidukevič [et al.] // Talanta. – 2015. – Vol. 144. – P. 1096–1103.
 32. Development of a novel reagentless, screen-printed amperometric biosensor based on glutamate dehydrogenase and NAD^+ , integrated with multi-walled carbon nanotubes for the determination of glutamate in food and clinical applications / G. Hughes, R. M. Pemberton, P. R. Fielden [et al.] // Sensors and Actuators B: Chemical. – 2015. – Vol. 216. – P. 614–621.
 33. Amperometric biosensor for ethanol based on immobilization of alcohol dehydrogenase on a nickel hexacyanoferrate modified microband gold electrode / C. X. Cai, K. H. Xue, Y. M. Zhou [et al.] // Talanta. – 1997. – Vol. 44. – № 3. – P. 339–347.
 34. Biosensor technology: recent advances in threat agent detection and medicine / J. Kirsch, C. Siltanen, Q. Zhou [et al.] // Chemical Society Reviews. – 2013. – Vol. 42. – № 22. – P. 8733-8768.
 35. Cui Y. Amperometric ATP biosensors based on coimmobilizations of p-hydroxybenzoate hydroxylase, glucose-6-phosphate dehydrogenase, and hexokinase on clark-type and screen-printed electrodes / Y. Cui // IEEE Sensors Journal. – 2010. – Vol. 10. – № 5. – P. 979–983.
 36. Development of an amperometric biosensor based on a novel conducting copolymer for detection of anti-dementia drugs / J. Turan, M. Kesik, S. Soylemez

- [et al.] // *Journal of Electroanalytical Chemistry*. – 2014. – Vol. 735. – P. 43–50.
37. Ultra-sensitive conductometric detection of pesticides based on inhibition of esterase activity in *arthrospira platensis* / N. Tekaya, O. Saiapina, H. Ben Ouada [et al.] // *Environmental Pollution*. – 2013. – Vol. 178. – P. 182–188.
38. Love-wave bacteria-based sensor for the detection of heavy metal toxicity in liquid medium / I. Gammoudi, H. Tarbague, A. Othmane [et al.] // *Biosensors & bioelectronics*. – 2010. – Vol. 26. – № 4. – P. 1723–1726.
39. Recent developments in recognition elements for chemical sensors and biosensors / C. I. L. Justino, A. C. Freitas, R. Pereira [et al.] // *TrAC Trends in Analytical Chemistry*. – 2015. – Vol. 68. – P. 2–17.
40. Seok H. Integration of biomolecules and nanomaterials: towards highly selective and sensitive biosensors / H. Seok, T. H. Park // *Biotechnology Journal*. – 2011. – Vol. 6. – № 11. – P. 1310–1316.
41. Hayat A. Current trends in nanomaterial-based amperometric biosensors / A. Hayat, G. Catanante, J. Marty // *Sensors*. – 2014. – Vol. 14. – № 12. – P. 23439–23461.
42. Bratov A. Recent trends in potentiometric sensor arrays—a review / A. Bratov, N. Abramova, A. Ipatov // *Analytica Chimica Acta*. – 2010. – Vol. 678. – № 2. – P. 149–159.
43. Jaffrezic-Renault N. Conductometric microbiosensors for environmental monitoring / N. Jaffrezic-Renault, S. V. Dzyadevych // *Sensors*. – 2008. – Vol. 8. – № 4. – P. 2569–2588.
44. Randviir E. P. Electrochemical impedance spectroscopy: an overview of bioanalytical applications / E. P. Randviir, C. E. Banks // *Analytical Methods*. – 2013. – Vol. 5. – № 5. – P. 1098–1115.
45. Guo X. Surface plasmon resonance based biosensor technique: a review / X. Guo // *Journal of Biophotonics*. – 2012. – Vol. 5. – № 7. – P. 483–501.
46. Min J. Characterization and optimization of interdigitated ultramicroelectrode arrays as electrochemical biosensor transducers / J. Min, A. J. Baeumner //

- Electroanalysis. – 2004. – Vol. 16. – № 9. – P. 724–729.
47. Couto R. A. S. Recent developments, characteristics and potential applications of screen-printed electrodes in pharmaceutical and biological analysis / R. A. S. Couto, J. L. F. C. Lima, M. B. Quinaz // *Talanta*. – 2016. – Vol. 146. – P. 801–814.
 48. Tudorache M. Biosensors based on screen-printing technology, and their applications in environmental and food analysis / M. Tudorache, C. Bala // *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. – 2007. – Vol. 388. – № 3. – P. 565–578.
 49. Єльська Г. В. Біосенсорні технології: реалії та перспективи / Г. В. Єльська, Я. І. Корпан // *Вісн. НАН України*. – 2000. – Vol. 3. – P. 36–40.
 50. Recent advances on developing 3rd generation enzyme electrode for biosensor applications / P. Das, M. Das, S. R. Chinnadayala [et al.] // *Biosensors and Bioelectronics*. – 2016. – Vol. 79. – P. 386–397.
 51. Reverté L. New advances in electrochemical biosensors for the detection of toxins: nanomaterials, magnetic beads and microfluidics systems. a review / L. Reverté, B. Prieto-Simón, M. Campàs // *Analytica Chimica Acta*. – 2016. – Vol. 908. – P. 8–21.
 52. Enzyme immobilization on electrospun polymer nanofibers: an overview / Z.-G. Wang, L.-S. Wan, Z.-M. Liu [et al.] // *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*. – 2009. – Vol. 56. – № 4. – P. 189–195.
 53. Electrospun nonwoven nanofibrous membranes for sensors and biosensors / M. Scampicchio, A. Bulbarello, A. Arecchi [et al.] // *Electroanalysis*. – 2012. – Vol. 24. – № 4. – P. 719–725.
 54. One-step fabrication of electrospun photo-cross-linkable polymer nanofibers incorporating multiwall carbon nanotubes and enzyme for biosensing / E. Sapountzi, M. Braiek, C. Farre [et al.] // *Journal of The Electrochemical Society*. – 2015. – Vol. 162. – № 10. – P. B275–B281.
 55. Electrochemical sensors and biosensors / D. W. Kimmel, G. LeBlanc, M. E.

- Meschievitz [et al.] // *Analytical Chemistry*. – 2012. – Vol. 84. – № 2. – P. 685–707.
56. Kadara R. O. Screen printed recessed microelectrode arrays / R. O. Kadara, N. Jenkinson, C. E. Banks // *Sensors and Actuators B: Chemical*. – 2009. – Vol. 142. – № 1. – P. 342–346.
57. Conception of multibiosensor for determination of different toxic substances based on the enzyme inhibitor analysis / V. N. Arkhipova, S. V. Dzyadevich, O. N. Schuvailo [et al.] // *Biopolymers and Cell*. – 2001. – Vol. 17. – № 1. – P. 70–77.
58. Multienzyme electrochemical sensor array for determination of heavy metal ions / A. Kukla, N. Kanjuk, N. Starodub [et al.] // *Sensors and Actuators B: Chemical*. – 1999. – Vol. 57. – № 1–3. – P. 213–218.
59. Multi-sensor array used as an “electronic tongue” for mineral water analysis / L. Moreno, A. Merlos, N. Abramova [et al.] // *Sensors and Actuators B: Chemical*. – 2006. – Vol. 116. – № 1–2. – P. 130–134.
60. A multi-biosensor based on immobilized photosystem ii on screen-printed electrodes for the detection of herbicides in river water / E. Touloupakis, L. Giannoudi, S. A. Piletsky [et al.] // *Biosensors & Bioelectronics*. – 2005. – Vol. 20. – № 10. – P. 1984–1992.
61. Toward the development of smart and low cost point-of-care biosensors based on screen printed electrodes / M. U. Ahmed, M. M. Hossain, M. Safavieh [et al.] // *Critical Reviews in Biotechnology*. – 2016. – Vol. 36. – № 3. – P. 495–505.
62. Derkus B. Applying the miniaturization technologies for biosensor design / B. Derkus // *Biosensors and Bioelectronics*. – 2016. – Vol. 79. – P. 901–913.
63. Recent advances in biosensors based on enzyme inhibition / A. Amine, F. Arduini, D. Moscone [et al.] // *Biosensors and Bioelectronics*. – 2016. – Vol. 76. – P. 180–194.
64. Wearable electrochemical sensors for in situ analysis in marine environments / K. Malzahn, J. R. Windmiller, G. Valdés-Ramírez [et al.] // *The Analyst*. – 2011. –

- Vol. 136. – № 14. – P. 2912-2917.
65. Windmiller J. R. Wearable electrochemical sensors and biosensors: a review / J. R. Windmiller, J. Wang // *Electroanalysis*. – 2013. – Vol. 25. – № 1. – P. 29–46.
 66. Bandodkar A. J. Tattoo-based wearable electrochemical devices: a review / A. J. Bandodkar, W. Jia, J. Wang // *Electroanalysis*. – 2015. – Vol. 27. – № 3. – P. 562–572.
 67. Bandodkar A. J. Non-invasive wearable electrochemical sensors: a review / A. J. Bandodkar, J. Wang // *Trends in Biotechnology*. – 2014. – Vol. 32. – № 7. – P. 363–371.
 68. Turner A. P. F. Biosensors: sense and sensibility / A. P. F. Turner // *Chemical Society Reviews*. – 2013. – Vol. 42. – № 8. – P. 3184–3196.
 69. Berg J. M. *Biochemistry* / J. M. Berg, J. L. Tymoczko, L. Stryer. – New York : W.H. Freeman and Company, 2012. – 934 p.
 70. Nelson D. L. *Leninger principles of biochemistry* / D. L. Nelson, M. M. Cox. – New York : W.H. Freeman and Company, 2008. – 852 p.
 71. Kennedy C. ATP as a cotransmitter in the autonomic nervous system / C. Kennedy // *Autonomic Neuroscience : Basic & Clinical*. – 2015. – Vol. 191. – P. 2–15.
 72. Adenosine 5'-triphosphate and adenosine as endogenous signaling molecules in immunity and inflammation / M. J. L. Bours, E. L. R. Swennen, F. Di Virgilio [et al.] // *Pharmacology & Therapeutics*. – 2006. – Vol. 112. – № 2. – P. 358–404.
 73. Pelleg A. Adenosine 5'-triphosphate axis in obstructive airway diseases / A. Pelleg, E. S. Schulman // *American Journal of Therapeutics*. – Vol. 9. – № 5. – P. 454–464.
 74. Endogenous adenosine differentially modulates 5-hydroxytryptamine release from a human enterochromaffin cell model / F. L. Christofi, M. Kim, J. E. Wunderlich [et al.] // *Gastroenterology*. – 2004. – Vol. 127. – № 1. – P. 188–202.
 75. Burnstock G. The journey to establish purinergic signalling in the gut / G. Burnstock // *Neurogastroenterology and Motility*. – 2008. – Vol. 20 Suppl. 1. –

- P. 8–19.
76. Gorman M. W. Human plasma ATP concentration / M. W. Gorman, E. O. Feigl, C. W. Buffington // *Clinical Chemistry*. – 2007. – Vol. 53. – № 2. – P. 318–325.
 77. Kobayashi T. Human eosinophils recognize endogenous danger signal crystalline uric acid and produce proinflammatory cytokines mediated by autocrine ATP / T. Kobayashi, H. Kouzaki, H. Kita // *Journal of Immunology*. – 2010. – Vol. 184. – № 11. – P. 6350–6358.
 78. Urinary ATP may be a dynamic biomarker of detrusor overactivity in women with overactive bladder syndrome / M. Silva-Ramos, I. Silva, O. Oliveira [et al.] // *PLOS ONE*. – 2013. – Vol. 8. – № 5. – P. e64696.
 79. Lomakina G. Y. Bioluminescence assay for cell viability / G. Y. Lomakina, Y. A. Modestova, N. N. Ugarova // *Biochemistry (Moscow)*. – 2015. – Vol. 80. – № 6. – P. 701–713.
 80. Feng C. Optical aptasensors for quantitative detection of small biomolecules: a review / C. Feng, S. Dai, L. Wang // *Biosensors and Bioelectronics*. – 2014. – Vol. 59. – P. 64–74.
 81. Cao Y. Extracellular atp is a central signaling molecule in plant stress responses / Y. Cao, K. Tanaka, C. T. Nguyen, G. Stacey // *Current Opinion in Plant Biology*. – 2014. – Vol. 20. – P. 82–87.
 82. Bottari B. Determination of microbial load for different beverages and foodstuff by assessment of intracellular ATP / B. Bottari, M. Santarelli, E. Neviani // *Trends in Food Science & Technology*. – 2015. – Vol. 44. – № 1. – P. 36–48.
 83. Dubois R. Fonction photogenique des pyrophores / R. Dubois // *Compt. Rend. Soc. Biol.* – 1885. – Vol. 37. – P. 559–562.
 84. McElroy W. D. The energy source for bioluminescence in an isolated system / W. D. McElroy // *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*. – 1947. – Vol. 33. – P. 342–345.
 85. Rodionova N. S. Effect of different salts and detergents on luciferin-luciferase luminescence of the enchytraeid *fridericia heliota* / N. S. Rodionova, V. N. Petushkov // *Journal of Photochemistry and Photobiology B, Biology*. – 2006. –

- Vol. 83. – № 2. – P. 123–128.
86. Ultrasensitive and universal fluorescent aptasensor for the detection of biomolecules (ATP, adenosine and thrombin) based on DNA/Ag nanoclusters fluorescence light-up system. / Y. Zhu, X.-C. Hu, S. Shi [et al.] // *Biosensors & Bioelectronics*. – 2016. – Vol. 79. – P. 205–212.
 87. Fluorescence and colorimetric detection of ATP based on a strategy of self-promoting aggregation of a water-soluble polythiophene derivative / D. Cheng, Y. Li, J. Wang [et al.] // *Chem. Commun.* – 2015. – Vol. 51. – № 40. – P. 8544–8546.
 88. Fast determination of adenosine 5'-triphosphate (ATP) and its catabolites in royal jelly using ultraperformance liquid chromatography / L. Zhou, X. Xue, J. Zhou [et al.] // *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. – 2012. – Vol. 60. – № 36. – P. 8994–8999.
 89. Zou L.-L. Simultaneous determination of exogenous phosphocreatine and its metabolite creatine and related adenosine triphosphate in rat plasma and red blood cell by ion-pair high performance liquid chromatography-ultraviolet-visible assay / L.-L. Zou, Q.-S. Li, G.-Z. Han, L. Lu // *Chinese Journal of Analytical Chemistry*. – 2012. – Vol. 39. – № 1. – P. 45–50.
 90. Self-built microdialysis probes with improved recoveries of ATP and neuropeptides / J. Lietsche, J. Gorka, S. Hardt [et al.] // *Journal of Neuroscience Methods*. – 2014. – Vol. 237. – P. 1–8.
 91. Korf J. Ultraslow microdialysis and microfiltration for in-line, on-line and off-line monitoring / J. Korf, K. D. Huinink, G. A. Posthuma-Trumpie // *Trends in Biotechnology*. – 2010. – Vol. 28. – № 3. – P. 150–158.
 92. Dale N. Measurement of purine release with microelectrode biosensors / N. Dale, B. G. Frenguelli // *Purinergic Signalling*. – 2012. – Vol. 8. – P. 27–40.
 93. Pang J. Effect of structure variation of the aptamer-DNA duplex probe on the performance of displacement-based electrochemical aptamer sensors / J. Pang, Z. Zhang, H. Jin // *Biosensors & Bioelectronics*. – 2016. – Vol. 77. – P. 174–181.

94. In situ amplified electrochemical aptasensing for sensitive detection of adenosine triphosphate by coupling target-induced hybridization chain reaction with the assembly of silver nanotags / Q. Zhou, Y. Lin, Y. Lin [et al.] // *Talanta*. – 2016. – Vol. 146. – P. 23–28.
95. A graphene and aptamer based liquid gated fet-like electrochemical biosensor to detect adenosine triphosphate / S. Mukherjee, X. Meshik, M. Choi [et al.] // *IEEE Transactions on NanoBioscience*. – 2015. – Vol. 14. – № 8. – P. 967–972.
96. A sensitive electrochemical aptasensor for ATP detection based on exonuclease iii-assisted signal amplification strategy / T. Bao, H. Shu, W. Wen [et al.] // *Analytica Chimica Acta*. – 2015. – Vol. 862. – P. 64–69.
97. Enzyme-based field-effect transistor for adenosine triphosphate (ATP) sensing / S. Migita, K. Ozasa, T. Tanaka [et al.] // *Analytical sciences*. – 2007. – Vol. 23. – № 1. – P. 45–48.
98. Katsu T. Potentiometric method for the determination of adenosine-5'-triphosphate / T. Katsu, K. Yamanaka // *Analytica Chimica Acta*. – 1993. – Vol. 276. – № 2. – P. 373–376.
99. Na⁺,K⁺-ATPase-based bilayer lipid membrane sensor for adenosine 5'-triphosphate / Y. Adachi, M. Sugawara, K. Taniguchi [et al.] // *Analytica Chimica Acta*. – 1993. – Vol. 281. – № 3. – P. 577–584.
100. Microelectrode biosensor for real-time measurement of ATP in biological tissue / E. Llaudet, S. Hatz, M. Droniou [et al.] // *Analytical Chemistry*. – 2005. – Vol. 77. – № 10. – P. 3267–3273.
101. A self-referencing biosensor for real-time monitoring of physiological ATP transport in plant systems / D. C. Vanegas, G. Clark, A. E. Cannon [et al.] // *Biosensors and Bioelectronics*. – 2015. – Vol. 74. – P. 37–44.
102. Compagnone D. Glucose oxidase/hexokinase electrode for the determination of ATP / D. Compagnone, G. G. Guilbault // *Analytica Chimica Acta*. – 1997. – Vol. 340. – № 1–3. – P. 109–113.
103. Kueng A. Amperometric ATP biosensor based on polymer entrapped enzymes /

- A. Kueng, C. Kranz, B. Mizaikoff // *Biosensors & Bioelectronics*. – 2004. – Vol. 19. – № 10. – P. 1301–1307.
104. Liu S. Co-immobilization of glucose oxidase and hexokinase on silicate hybrid sol-gel membrane for glucose and ATP detections / S. Liu, Y. Sun // *Biosensors & Bioelectronics*. – 2007. – Vol. 22. – № 6. – P. 905–911.
105. Microbiosensor based on glucose oxidase and hexokinase co-immobilised on platinum microelectrode for selective ATP detection / O. O. Soldatkin, O. M. Schuvailo, S. Marinesco [et al.] // *Talanta*. – 2009. – Vol. 78. – № 3. – P. 1023–1028.
106. A novel disposable amperometric biosensor based on trienzyme electrode for the determination of total creatine kinase / C.-X. Liu, L.-Y. Jiang, H. Wang [et al.] // *Sensors and Actuators B: Chemical*. – 2007. – Vol. 122. – № 1. – P. 295–300.
107. Davis G. Detection of ATP and creatine kinase using an enzyme electrode / G. Davis, M. J. Green, H. A. O. Hill // *Enzyme and Microbial Technology*. – 1986. – Vol. 8. – № 6. – P. 349–352.
108. Novel sensory surface for creatine kinase electrochemical detection / F. T. C. Moreira, R. A. F. Dutra, J. P. Noronha [et al.] // *Biosensors & Bioelectronics*. – 2014. – Vol. 56. – P. 217–222.
109. Methods of creatine kinase-MB analysis to predict mortality in patients with myocardial infarction treated with reperfusion therapy / R. D. Lopes, Y. Lokhnygina, V. Hasselblad [et al.] // *Trials*. – 2013. – Vol. 14. – № 1. – P. 123.
110. Development and performance of an enzyme immunoassay to detect creatine kinase isoenzyme MB activity using anti-mitochondrial creatine kinase monoclonal antibodies / T. Hoshino, Y. Sakai, K. Yamashita [et al.] // *Scandinavian Journal of Clinical and Laboratory Investigation*. – 2009. – Vol. 69. – № 6. – P. 687–695.
111. Toyoda T. Measurement of creatine kinase isoenzyme MB in serum with immunoseparation and electrochemical detection / T. Toyoda, S. S. Kuan, G. G. Guilbault // *Analytical Chemistry*. – 1985. – Vol. 57. – № 12. – P. 2346–2349.

112. Walker H. K. Clinical methods: the history, physical, and laboratory examinations / H. K. Walker, W. D. Hall, J. W. Hurst. – Boston : Butterworths, 1990. – 1065 p.
113. Wet and dry chemistry kits for total creatine kinase activity using a microfabricated, planar, small-volume, amperometric cell / G. Nagy, C. X. Xu, R. P. Buck [et al.] // *Analytica Chimica Acta*. – 1998. – Vol. 377. – № 1. – P. 1–12.
114. Conductometric enzyme biosensors based on natural zeolite clinoptilolite for urea determination / O. Y. Saiapina, V. M. Pyeshkova, O. O. Soldatkin [et al.] // *Materials Science and Engineering: C*. – 2011. – Vol. 31. – № 7. – P. 1490–1497.
115. Cosnier S. Electrosynthesized polymers for biosensing / S. Cosnier, M. Holzinger // *Chemical Society Reviews*. – 2011. – Vol. 40. – № 5. – P. 2146–2156.
116. Killoran S. J. Characterization of permselective coatings electrosynthesized on pt-ir from the three phenylenediamine isomers for biosensor applications / S. J. Killoran, R. D. O'Neill // *Electrochimica Acta*. – 2008. – Vol. 53. – № 24. – P. 7303–7312.
117. Szasz G. Creatine kinase in serum: 1. determination of optimum reaction conditions. / G. Szasz, W. Gruber, E. Bernt // *Clinical Chemistry*. – 1976. – Vol. 22. – № 5. – P. 650–656.
118. Gao H. Multiplex inhibitor screening and kinetic constant determinations for yeast hexokinase using mass spectrometry based assays / H. Gao, J. A. Leary // *Journal of the American Society for Mass Spectrometry*. – 2003. – Vol. 14. – № 3. – P. 173–181.
119. Kosow D. P. Product inhibition of the hexokinases / D. P. Kosow, I. A. Rose // *The Journal of Biological Chemistry*. – 1970. – Vol. 245. – № 1. – P. 198–204.
120. Chen L. A multifunctional label-free electrochemical impedance biosensor for Hg²⁺, adenosine triphosphate and thrombin / L. Chen, Z.-N. Chen // *Talanta*. – 2015. – Vol. 132. – P. 664–668.

121. A simple electrochemical method for the detection of ATP using target-induced conformational change of dual-hairpin dna structure / J. Jia, J. Feng, H. G. Chen [et al.] // *Sensors and Actuators B: Chemical*. – 2016. – Vol. 222. – P. 1090–1095.
122. Zhu L. Label-free aptasensor based on electrodeposition of gold nanoparticles on graphene and its application in the quantification of adenosine triphosphate / L. Zhu, Y. Liu, P. Yang, B. Liu // *Electrochimica Acta*. – 2015. – Vol. 172. – P. 88–93.
123. Bucking W. An electrochemical biomimetic ATP-sensor / W. Bucking // *Sensors and Actuators B: Chemical*. – 2005. – Vol. 104. – № 1. – P. 111–116.