

НАЦІОНАЛЬНА АКАДЕМІЯ НАУК УКРАЇНИ  
ІНСТИТУТ МОЛЕКУЛЯРНОЇ БІОЛОГІЇ І ГЕНЕТИКИ

Кваліфікаційна наукова  
праця на правах рукопису

**ТОПОЛЬНІКОВА ЯРОСЛАВА ВІТАЛІЇВНА**

УДК 543.553+577.15+543.06

**ДИСЕРТАЦІЯ**

РОЗРОБКА БІОСЕНСОРНОЇ СИСТЕМИ ДЛЯ ОДНОЧАСНОГО  
ВИЗНАЧЕННЯ КОНЦЕНТРАЦІЙ ЛАКТАТУ ТА ПРУВАТУ В  
БІОЛОГІЧНИХ РІДИНАХ ДЛЯ КЛІНІЧНОЇ ДІАГНОСТИКИ

03.00.20 – біотехнологія

09 – біологічні науки

Подається на здобуття наукового ступеня кандидата біологічних наук

Дисертація містить результати власних досліджень. Використання  
ідей, результатів і текстів інших авторів мають посилання на відповідне

джерело \_\_\_\_\_

(підпис, ініціали та прізвище здобувача)

Науковий керівник (консультант) Солдаткін Олександр Олексійович  
к.б.н., с.н.с.

Київ –2019

## АНОТАЦІЯ

**Топольнікова Я.В. Розробка біосенсорної системи для одночасного визначення концентрацій лактату та пірувату в біологічних рідинах для клінічної діагностики.** – Кваліфікаційна наукова праця на правах рукопису.

*Дисертація на здобуття наукового ступеня кандидата біологічних наук (доктора філософії) за спеціальністю 03.00.20 – «Біотехнологія» (09 – біологічні науки) – Інститут молекулярної біології і генетики НАН України, Київ, 2019.*

Дисертація присвячена розробці біосенсорної системи для визначення лактату та пірувату в сироватці крові та інших біологічних рідинах з метою застосування в клінічній діагностиці. Показники лактату та відношення лактату до пірувату у венозній крові людей з політравмою є діагностичним критерієм для оцінки важкості стану пацієнта та подальшого прогнозу. Також дані показники є значимими при оцінці стану новонароджених, зокрема оцінки рівня гіпоксії, діагностики септичних станів та дисфункції піруватдегідрогеназного комплексу.

Тому перша частина даної роботи була присвячена розробці монобіосенсорів для визначення лактату та пірувату, які у другій частині планували інтегрувати в єдину систему для одночасного детектування обох компонентів. Як біоселективні елементи монобіосенсорів виступали ензими лактатоксидаза або піруватоксидаза, іммобілізовані на поверхні амперометричних перетворювачів. Як перетворювачі використовували платинові дискові електроди.

Для забезпечення селективності біосенсорів відносно електроактивних речовин, що можуть бути присутніми у сироватці крові, застосовано нанесення додаткової мембрани на основі поліфенілендіаміну на поверхню перетворювача. Показано, що використання цієї мембрани

значно покращує селективність амперометричних біосенсорів відносно можливих електроактивних інтерферентів.

Було підібрано оптимальні умови виготовлення біосенсорів, а саме проаналізовано і обрано оптимальні методи та умови іммобілізації ензимів. Проведено порівняльний аналіз трьох методик іммобілізації лактатоксидази та піруватоксидази, а саме: іммобілізація шляхом поперечного зшивання глутаровим альдегідом, фотополімеризація у шарі полімеру PVA-SbQ, а також адсорбція на частинках силікаліту. Оптимальним методом для іммобілізації лактатоксидази виявилось поперечне зшивання глутаровим альдегідом на поверхні перетворювача. В той же час, оптимальним методом для іммобілізації піруватоксидази виявилась фотополімеризація у шарі PVA-SbQ. Оскільки чутливість піруват-чутливого монобіосенсора була нижчою, ніж лактат-чутливого монобіосенсора, для виготовлення біосенсорної системи в єдиному циклі обрано метод фотополімеризації.

Оскільки робота піруватоксидази залежить від наявності кофакторів, було визначено оптимальні концентрації тіамінпірофосфату та іонів магнію, які необхідно додавати в робочий буфер при аналізі. Також досліджено оптимальну концентрацію фосфат-іонів, які виступають як косубстрат. Оптимальна концентрація фосфат-іонів склала 20 мМ, тіамінпірофосфату – 500 мкМ,  $Mg^{2+}$  – 120 мкМ.

Наступним етапом роботи було дослідження впливу характеристик робочого буферного розчину на функціонування монобіосенсорів. Досліджено залежність відгуків монобіосенсорів від таких параметрів як рН, буферна ємність та іонна сила. Розроблені біосенсори показували відсутність суттєвих коливань відгуків при зміні іонної сили та буферної ємності. Оптимальний діапазон рН для роботи лактат-чутливого біосенсора склав 7,3-7,7, для піруват-чутливого біосенсора – від 7,1 до 7,5. Оскільки коливання рН сироватки крові людини при будь-яких патологічних станах не виходить за межі 7,35 – 7,45, запропонована

біосенсорна система придатна для роботи з сироваткою крові за будь-яких станів пацієнта.

Встановлено, що розроблені монобіосенсиори для визначення лактату та пірувату проявляли гарну відтворюваність відгуків впродовж кількох годин безперервної роботи. Стандартна похибка визначення не перевищувала 3,7 % для піруват-чутливого біосенсора та 1,4 %, для лактат-чутливого біосенсора. Також було показано, що розроблені монобіосенсиори проявляли високу операційну стабільність сигналів впродовж щонайменше одного тижня.

Подальшим етапом роботи стало поєднання монобіосенсорів у біосенсорну систему для одночасного визначення лактату і пірувату. Для одночасного функціонування двох монобіосенсорів в єдиному циклі було застосовано додатковий модуль, який під'єднували до потенціостату – восьмиканальний мультиплексор.

Для поєднання біосенсорів у систему необхідно було провести дослідження перехресного впливу субстратів монобіосенсорів при одночасному вимірюванні. Відгук лактат-чутливого монобіосенсора на піруват, як і відгук піруват-чутливого монобіосенсора на лактат не спостерігали, що свідчить про відсутність перехресного впливу. Окрім того, було проведено дослідження впливу кофакторів та косубстрату піруватоксидази на роботу монобіосенсора для визначення лактату. Жодного впливу не було зафіксовано, що свідчить про можливість безперешкодної одночасної роботи розроблених монобіосенсорів в системі.

Після поєднання монобіосенсорів у систему, було проаналізовано її аналітичні характеристики. Лінійний діапазон лактат-чутливого монобіосенсора становить від 5 мкМ до 1 мМ, з мінімальною межею визначення лактату – 5 мкМ, та чутливістю до лактату 204 нА/мМ. Лінійний діапазон піруват-чутливого монобіосенсора – від 10 мкМ до 5

мМ, мінімальна межа визначення пірувату – 5 мкМ, чутливість до пірувату складає 31 нА/мМ.

Також було апробовано роботу розробленої біосенсорної системи для визначення лактату та пірувату у складі більш складного мультибіосенсорного масиву для одночасного визначення лактату, пірувату, глюкози, глутамату, холіну та ацетилхоліну. Одночасний аналіз даних субстратів у крові та лікворі є цінним у клінічній практиці для більш повного розуміння стану нервової системи пацієнта і всебічної оцінки енергетичного стану організму. Продемонстровано відсутність перехресного впливу розробленої біосенсорної системи з іншими біосенсорами, що входять до складу масиву, а також гарні аналітичні показники під час одночасної роботи. Також показано високу селективність біосенсорного масиву відносно електроактивних інтерферентів, зокрема дофаміну, цистеїну, аскорбінової та сечової кислот та парацетамолу за рахунок застосування захисної мембрани з полі-мета-фенілендіаміну на поверхні робочих електродів.

На наступному етапі роботи необхідно було перевірити можливість використання розробленої біосенсорної системи при визначенні концентрацій лактату та пірувату в реальних зразках сироватки крові. Було підібрано оптимальне розведення зразків з урахуванням лінійних діапазонів обох монобіосенсорів та діапазону концентрацій субстратів у крові в нормі та патології. В роботі було проаналізовано 7 зразків сироватки крові людини. Біосенсорне визначення концентрації лактату та пірувату у сироватці крові здійснювали за допомогою калібрувальних кривих. Було показано хорошу відтворюваність відгуків біосенсорної системи при вимірюванні реальних зразків сироватки крові впродовж кількох годин безперервної роботи, стандартне середньоквадратичне відхилення склало 5 %, для лактат-чутливого біосенсора, та 9,3% для піруват-чутливого біосенсора.

Як контрольний метод було застосовано спектрофотометричне визначення концентрацій лактату та пірувату.

За результатами досліджень було побудовано кореляційні графіки та показано кореляцію між даними, отриманими за допомогою біосенсорної системи та контрольного методу. Показано, що коефіцієнт кореляції ( $R^2$ ) результатів біосенсорного та спектрофотометричного визначення концентрацій лактату та пірувату становив 0,945 (визначення лактату) та 0,980 (визначення пірувату), що є досить високим показником і свідчить про співвідносність результатів біосенсорної системи та контрольного методу. Також були проведені розрахунки співвідношення лактату та пірувату. Цей параметр може бути використаний в клінічній практиці для диференційної діагностики різних метаболічних захворювань.

Отримані експериментальні результати свідчать про можливість використання розробленої біосенсорної системи для одночасного визначення концентрацій лактату та пірувату і обрахунку їх співвідношення в сироватці крові. Це може бути корисним у клінічній діагностиці для визначення рівня лактатацидозу у крові людини з політравмою та іншими патологічним станами. Співвідношення лактату та пірувату корисне для визначення типу лактатацидозу, зокрема розрізнення лактатацидозу А типу, пов'язаного з наслідками клітинної гіпоксії, та лактатацидозу В типу, пов'язаного з недостатнім кліренсом лактату при недостатності печінки або нирок. Також за допомогою розробленої біосенсорної системи можливо діагностувати дисфункції піруватдегідрогеназного комплексу у новонароджених. Крім того, використання даних показників дозволяє передбачити такі зміни у стані пацієнта, як ймовірність настання поліорганної недостатності, колапсу, коми та клінічної смерті.

Тому як результат нашого дослідження було запропоновано методику аналізу концентрацій лактату та пірувату та їх співвідношення у венозній крові людей за допомогою розробленої біосенсорної системи.

**Ключові слова:** біосенсорна система, лактат, піруват, амперометричний перетворювач, біосенсор, ензим, діагностика лактатацидозу, медична діагностика.

### Список публікацій здобувача:

1. Топольнікова Я.В., Кучеренко І.С., Шкотова Л.В., Хоменко І.І., Дзядевич С.В., Солдаткін О.О. Розробка амперометричного біосенсора на основі лактатоксидази для визначення лактату. *Sensor Electronics and Microsystem Technologies*. 2016. Т. 13, № 1, С. 87-97. (Особистий внесок здобувача: аналіз літературних джерел, проведення експериментальних досліджень, аналіз результатів, підготовка роботи до публікації).

2. Топольнікова Я.В., Книжникова Д.В., Кучеренко І.С., Дзядевич С.В., Солдаткін О.О. Розробка амперометричної біосенсорної системи для одночасного вимірювання пірувату і лактату. *Sensor Electronics and Microsystem Technologies*. 2017. Т.14, №4, С.13-26. (Особистий внесок здобувача: аналіз літературних джерел, проведення експериментальних досліджень, аналіз результатів, підготовка роботи до публікації).

3. Knyzhnykova D.V., Topolnikova Ya.V., Kucherenko I.S., Soldatkin O.O. Development of pyruvate oxidase-based biosensor for pyruvate determination. *Biopolymers and Cell*. 2018. Т.34, №1, С. 14-23. (Особистий внесок здобувача: аналіз літературних джерел, проведення частини експериментальних досліджень, аналіз результатів, підготовка роботи до публікації).

4. Кучеренко Д.Ю., Кучеренко І.С., Солдаткін О.О., Топольнікова Я.В., Книжникова Д.В., Дзядевич С.В., Солдаткін О.П. Масив ферментних біосенсорів для визначення концентрацій нейротрансмітерів та метаболітів. *Sensor Electronics and Microsystem Technologies*. 2018. Т. 15, № 2, С. 39-53. (Особистий внесок здобувача: аналіз частини літературних

джерел, проведення частини експериментальних досліджень з інтеграції біосенсорів для аналізу лактату та пірувату у мультибіосенсорний масив, аналіз результатів).

5. Кучеренко І.С., Топольнікова Я.В., Книжникова Д.В., Солдаткін О.О. Оптимізація процедури визначення лактату та пірувату у сироватці крові за допомогою біосенсорної системи. *Sensor Electronics and Microsystem Technologies*. 2018. Т. 15, № 3, С. 31-42. (Особистий внесок здобувача: аналіз літературних джерел, проведення частини експериментальних досліджень, аналіз результатів).

6. Kucherenko I.S., Topolnikova Ya.V., Soldatkin O.O. Advances in the biosensors for lactate and pyruvate detection for medical applications: A review. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*. 2019. Т. 110, С. 160-172. (Особистий внесок здобувача: аналіз літературних джерел, участь в написання статті).

7. Топольнікова Я.В., Кучеренко І.С., Солдаткін О.О., Солдаткін О.П. Розробка амперометричного біосенсора для визначення лактату. *Тези всеукраїнської науково-практичної конференції «Біотехнологія: звершення та надії»*, Київ, 21-22 травня 2015, С. 106-107. (Особистий внесок здобувача: проведення розробки амперометричного біосенсора для визначення лактату, аналіз результатів).

8. Топольнікова Я.В., Солдаткін О.О., Солдаткін О.П. Оптимізація роботи амперометричного біосенсора для визначення лактату. *Тези конференції-конкурсу молодих учених «Актуальні проблеми біохімії та біотехнології – 2016»*, Київ, 26-27 травня 2016, С. 52. (Особистий внесок здобувача: проведення експериментальних досліджень з оптимізації роботи лактат-чутливого біосенсора, аналіз результатів).

9. Топольнікова Я.В., Книжникова Д.В., Кучеренко І.С., Солдаткін О.О. Розробка амперометричної біосенсорної системи для визначення лактату та пірувату. *Тези науково-практичної конференції з міжнародною участю «YouthNanoBioTech-2017. Молодіжний форум*



новітніх технологій у медицині», Київ, 17-18 травня 2017, С.193-194. (Особистий внесок здобувача: проведення експериментальних досліджень з встановлення операційної стабільності і відтворюваності роботи біосенсорної системи, аналіз результатів).

10. Topolnikova Ya.V., Knyzhnykova D.V., Kucherenko I.S., Soldatkin O.O. Development of amperometric biosensors for the determination of lactate and pyruvate. *Abstracts of the Conference of Young Scientists Institute of Molecular Biology and Genetics NAS of Ukraine*, Kyiv, 2017, С. 235. (Особистий внесок здобувача: проведення експериментальних досліджень з оптимізації умов іммобілізації ензимів в складі біосенсорів і дослідження аналітичних характеристик отриманих біосенсорів, аналіз результатів).

11. Топольнікова Я.В., Книжникова Д.В., Кучеренко І.С., Солдаткін О.О. Розробка електрохімічного біосенсора для вимірювання концентрації піровиноградної кислоти. *Тези XVI Міжнародної наукової конференції «Шевченківська весна: досягнення біологічної науки / BioScience Advances»*, Київ, 24-27 квітня 2018, С. 63-64. (Особистий внесок здобувача: дослідження аналітичних характеристик електрохімічного біосенсора, аналіз результатів).

12. Кучеренко І.С., Кучеренко Д.Ю., Топольнікова Я.В., Книжникова Д.В., Солдаткін О.О., Дзядевич С.В., Солдаткін О.П. Масив біосенсорів для одночасного визначення глутамату, глюкози, холіну, ацетилхоліну, лактату та пірувату у водних зразках. *Тези 8-ї Міжнародної науково-технічної конференції «Сенсорна електроніка та мікросистемні технології» (СЕМСТ-8)*, Одеса, 28 травня – 01 червня 2018, С. 122. (Особистий внесок здобувача: проведення експериментів з розробки біосенсорної системи на основі лактат-чутливого та піруват-чутливого біосенсорів).

13. Topolnikova Ya., Knyzhnykova D., Kucherenko I., Soldatkin O. Development an electrochemical biosensor system for the determination of lactate and pyruvate concentration in human serum. *Materials of XII annual*

*Conference of Young Scientists Institute of Molecular Biology and Genetics NAS of Ukraine, Kyiv, 2018, С. 160. (Особистий внесок здобувача: проведення експериментів з розробки двох елементів біосенсорного масиву – біосенсорів для визначення концентрацій лактату та пірувату).*

## SUMMARY

**Topolnikova Ya.V. Development of biosensor system for simultaneous determination of lactate and pyruvate concentration in biological fluids for clinical diagnostics.** - Qualifying scientific work on the rights of the manuscript.

*Thesis for a candidate degree in biological sciences (doctor of philosophy) in specialty 03.00.20 – "Biotechnology" (09 – biological sciences) – Institute of Molecular Biology and Genetics, National Academy of Sciences of Ukraine, Kyiv, 2019.*

The thesis is devoted to the development of a biosensor system for the determination of lactate and pyruvate in serum and other biological fluids for use in clinical diagnosis. The lactate indicators and lactate to pyruvate ratio in the venous blood of people with polytrauma are the diagnostic criteria for assessing the severity of the patient's condition and subsequent prognosis. These criteria are also significant to estimate the state of newborns, in particular, the level of hypoxia, diagnosis of septic conditions and dysfunction of the pyruvate dehydrogenase complex.

Therefore, the first stage of this work was the development of monobiosensors for separate determination of lactate and pyruvate, which were supposed for further integration in a single system for simultaneous analysis of both components. The bioselective elements of monobiosensors, enzymes lactate oxidase and pyruvate oxidase, were immobilized on the surface of platinum disk electrodes, which served as amperometric transducers.

To ensure the biosensors selectivity in presence the electroactive interfering substances in the blood serum, an additional polyphenylenediamine-based membrane was deposited on the transducer surface; essential improvement of the selectivity of amperometric biosensors was shown.

The optimal conditions of biosensor preparation were selected; in particular, the methods and conditions of the enzymes immobilization were

analyzed and optimized. Three methods of immobilization of lactate oxidase and pyruvate oxidase were compared - immobilization by cross-linking with glutaraldehyde, photopolymerization in a layer of polymer PVA-SbQ, adsorption on the silicalite particles.

The optimal method of immobilization for lactate oxidase was shown to be cross-linking with glutaraldehyde whereas for pyruvate oxidase - photopolymerization in the PVA-SbQ layer. Since the sensitivity of pyruvate monobiosensor was lower than that of lactate monobiosensor, the method of photopolymerization was utilized in the single-cycle fabrication of the biosensor system. .

Since the activity of pyruvate oxidase depends on the presence of cofactors, we determined the optimal concentrations of thiamine pyrophosphate and magnesium ions, which should be added to the working buffer during the analysis. The optimal concentration of phosphate ions, which act as a cosubstrate, was also detected. The optima of concentrations were: phosphate-ions - 20 mM, thiamine pyrophosphate - 500  $\mu\text{M}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$  - 120  $\mu\text{M}$ .

At the next stage, the effect of the characteristics of working buffer solution on the monobiosensor operation was under investigation. The dependence of responses on pH, buffer capacity and ionic strength was studied. No significant response fluctuations were observed when changing buffer capacity and ionic strength. The optimal pH ranged from 7.3 to 7.7 for lactate biosensors, from 7.1 to 7.5 – for pyruvate biosensors. Under any pathological conditions, the pH fluctuation in human blood serum does not go beyond the range of 7.35 - 7.45, so the proposed biosensor system is suitable for the blood serum assays at any state of the patient.

It was established that the monobiosensors developed for determination of lactate and pyruvate showed good responses reproducibility over several hours of continuous work. The standard deviation of the results of measurement did not exceed 3.7% for pyruvate and 1.4% for lactate. It was also shown that

developed monobiosensors exhibited high operational signal stability over at least one week.

At the next stage of the work, the monobiosensors developed were integrated in the biosensor system for simultaneous determination of lactate and pyruvate. For this purpose, an additional module, eight-channel multiplexer, was connected to the potentiostat.

For integration of two developed monobiosensors in a single biosensor system, it was necessary to study the cross-effect of substrates at simultaneous measurements. Neither the response of lactate monobiosensor to pyruvate nor the response of a pyruvate monobiosensor to lactate was observed, which indicates the absence of cross-effect. Additionally, an influence of cofactors and cosubstrate of pyruvate oxidase on the operation of lactate monobiosensor was studied. No effect was revealed, which indicates the possibility of simultaneous operation of the developed monobiosensors in the single system.

After integration of monobiosensors in a single system, the analytical characteristics of the latter were investigated. The linear range of lactate determination was 5  $\mu\text{M}$  - 1 mM, minimum detection limit 3  $\mu\text{M}$ , sensitivity to lactate 204 nA/mM. The linear range of pyruvate determination was 10  $\mu\text{M}$  - 5 mM, minimum detection limit 5  $\mu\text{M}$ , sensitivity to pyruvate - 31 nA / mM.

It was also studied the functioning of the developed biosensor system as a component of a more complex multibiosensor array for the simultaneous determination of lactate, pyruvate, glucose, glutamate, choline and acetylcholine. The data of the concentrations of these substrates in blood and liquor are vital in clinical practice for a better understanding of the state of the patient's nervous system and for a comprehensive assessment of the body energy status.

It was found that there is no cross-impact of the developed biosensor system and other biosensors in the array. Good analytical characteristics of the developed biosensor system during simultaneous operation were demonstrated as well as its high selectivity in presence of electroactive interferents (in

particular, dopamine, cysteine, ascorbic and uric acids, paracetamol), which was obtained due to the use of a protective poly-meta-phenylenediamine membrane on the working electrodes.

At the next stage of work, the developed biosensor system was evaluated regarding a possibility of simultaneous determination of the lactate and pyruvate concentrations in real samples of blood serum. The optimal dilution of samples was selected taking into account the linear ranges of detection for both monobiosensors and the substrates concentrations in the blood in normal and pathology. Seven samples of human blood serum were analyzed. The samples were diluted 5 times in the measuring cell. The lactate and pyruvate concentrations in blood serum were determined using calibration curves. A good responses reproducibility of the biosensor system was shown when analyzing real samples of blood serum during several hours of continuous operation; a standard mean square deviation was 5 % for lactate, and 9.3 % for pyruvate.

Spectrophotometric measurement was used as a control method.

The correlation graphs were plotted, which showed the correlation between the data obtained by the biosensor system (using calibration curve) and control method (spectrophotometry). It was shown that the correlation ( $R^2$ ) was 0.945 for the lactate and 0.980 for the pyruvate determination, which is rather high indicators testifying to the correspondence of results. Additionally, the lactate to pyruvate ratio was calculated. This parameter can be used in clinical practice for the differential diagnosis of various metabolic diseases.

The experimental results obtained testify to suitability of the developed biosensor system for simultaneous determination of concentrations of lactate and pyruvate and their ratio in blood serum. This may be useful in clinical diagnosis to determine the level of lactic acidosis in the blood of humans with polytrauma and other pathological conditions. The lactate to pyruvate ratio is useful for determining the type of lactic acidosis, in particular to distinguish between the type A associated with cell hypoxia and the type B associated with poor lactate clearance at liver or kidney insufficiency. Using the developed

biosensor system, it is possible to diagnose dysfunction of the pyruvate dehydrogenase complex in newborns. Additionally, these indicators allow for predictions of the changes in the patient's condition, such as the probability of multiple organ failure, collapse, coma and clinical death.

Therefore, as a result of the study we proposed a method for determination of the lactate and pyruvate concentrations and their ratio in human venous blood using the developed biosensor system.

**Key words:** biosensor system, lactate, pyruvate, amperometric transducer, biosensor, enzyme, diagnosis of lactic acidosis, clinical diagnosis.

**List of scientific publications published on the topic of the dissertation:**

1. Topolnikova Ya.V., Kucherenko I.S., Shkotova L.V., Khomenko I.I., Dzyadevych S.V., Soldatkin O.O. Development of amperometric lactate oxidase-based biosensor for determination of lactate. *Sensor Electronics and Microsystem Technologies*. 2016. V. 13, № 1, P. 87-97.
2. Topolnikova Ya.V., Knyzhnykova D.V., Kucherenko I.S., Dzyadevych S.V., Soldatkin O.O. Development of amperometric biosensor system for simultaneous measurement of pyruvate and lactate. *Sensor Electronics and Microsystem Technologies*. 2017. V.14, №4, P.13-26.
3. Knyzhnykova D.V., Topolnikova Ya.V., Kucherenko I.S., Soldatkin O.O. Development of pyruvate oxidase-based biosensor for pyruvate determination. *Biopolymers and Cell*. 2018. T.34, №1, C. 14-23.
4. Kucherenko D.Yu., Kucherenko I.S., Soldatkin O.O., Topolnikova Ya.V., Knyzhnykova D.V., Dzyadevych S.V., Soldatkin A.P. An array of enzyme biosensors for determining the concentrations of neurotransmitters and metabolites. *Sensor Electronics and Microsystem Technologies*. 2018. V. 15, № 2, P. 39-53.

5. Kucherenko I.S., Topolnikova Ya.V., Knyzhnykova D.V., Soldatkin O.O. Optimization of the procedure for the determination of lactate and pyruvate in serum using a biosensor system. *Sensor Electronics and Microsystem Technologies*. 2018. V. 15, № 3, P. 31-42.

6. Kucherenko I.S., Topolnikova Ya.V., Soldatkin O.O. Advances in the biosensors for lactate and pyruvate detection for medical applications: A review. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*. 2019. V. 110, P. 160-172.

7. Topolnikova Ya.V., Kucherenko I.S., Soldatkin O.O., Soldatkin A.P. Development of an amperometric biosensor for lactate determination. *Abstracts of the Scientific and Practical Conference «Biotechnology: Excellence and Hope»*, Kyiv, May 21-22, 2015, P. 106-107.

8. Topolnikova Ya.V., Soldatkin O.O., Soldatkin A.P. Optimization of the amperometric biosensor for lactate determination. *Abstracts of the conference-competition of young scientists «Actual problems of biochemistry and biotechnology – 2016»*, Kyiv, May 26-27, 2016, P. 52.

9. Topolnikova Ya.V., Knyzhnykova D.V., Kucherenko I.S., Soldatkin O.O. Development of an amperometric biosensor system for the determination of lactate and pyruvate. *Abstracts of a scientific-practical conference with international participation «YouthNanoBioTech-2017. The youth forum of the latest technologies in medicine»*, Kyiv, May 17-18, 2017, P. 193-194.

10. Topolnikova Ya.V., Knyzhnykova D.V., Kucherenko I.S., Soldatkin O.O. Development of amperometric biosensors for the determination of lactate and pyruvate. *Abstracts of the Conference of Young Scientists Institute of Molecular Biology and Genetics NAS of Ukraine*, Kyiv, 2017, P. 235.

11. Topolnikova Ya.V., Knyzhnykova D.V., Kucherenko I.S., Soldatkin O.O. Development of an electrochemical biosensor to measure the concentration of pyruvic acid. *Abstracts of the XVI International Scientific Conference «Shevchenko Spring: Achievement of Biological Science / BioScience Advances»*, Kyiv, April 24-27, 2018, P. 63-64.



12. Kucherenko I.S., Kucherenko D.Yu., Topolnikova Ya.V., Knyzhnykova D.V., Soldatkin O.O., Dzyadevych S.V., Soldatkin A.P. An array of biosensors for the simultaneous determination of glutamate, glucose, choline, acetylcholine, lactate and pyruvate in aqueous specimens. *Abstracts of the 8th International Scientific and Technical Conference «Sensor Electronics and Microsystem Technologies» (SEMST-8)*, Odessa, May 28 - June 01, 2018, P. 122.

13. Topolnikova Ya., Knyzhnykova D., Kucherenko I., Soldatkin O. Development an electrochemical biosensor system for the determination of lactate and pyruvate concentration in human serum. *Materials of XII annual Conference of Young Scientists Institute of Molecular Biology and Genetics NAS of Ukraine*, Kyiv, 2018, C. 160.

## ЗМІСТ

ЗМІСТ .....	18
ПЕРЕЛІК УМОВНИХ СКОРОЧЕНЬ .....	22
ВСТУП.....	23
РОЗДІЛ 1 .....	29
ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ .....	29
1.1. Медико-біологічне значення визначення концентрацій лактату і пірувату .....	29
1.2. Традиційні методи визначення лактату та пірувату .....	32
1.3. Біосенсорне визначення аналітів для клінічної діагностики .....	35
1.3.1. Загальні принципи роботи біосенсорів та вибір матеріалу електрода .....	35
1.3.2. Методи іммобілізації ензимів при розробці біосенсорів для визначення лактату і пірувату .....	37
1.3.3. Поширені проблеми при біосенсорному визначенні реальних зразків. ....	41
1.3.4. Розробка мультибіосенсорних систем для одночасного визначенні кількох аналітів: додаткові виклики. ....	42
1.4. Існуючі біосенсори та біосенсорні системи для визначення концентрацій лактату та пірувату .....	44
1.4.1. Біосенсори для визначення лактату.....	44
1.4.2. Біосенсори для визначення пірувату .....	45
1.4.3. Біосенсорні системи та мультибіосенсори для одночасного визначення пірувату та лактату .....	47
1.4.4. Комерційні системи для визначення концентрацій лактату .....	48
1.5. Підсумки до розділу 1 .....	49
РОЗДІЛ 2.....	50
МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ .....	50
2.1. Матеріали .....	50

2.2. Конструкція амперометричних перетворювачів	52
2.3. Схема експериментальної установки для амперометричних вимірювань	53
2.4. Методика нанесення поліфенілендіамінової мембрани	55
2.5. Методика формування біоселективних мембран	56
2.6. Методика конструювання виготовлення мультибіосенсорного масиву	58
2.7. Методика визначення концентрації лактату у реальних зразках сироватки крові за допомогою спектрофотометричного вимірювання	59
2.8. Методика статистичної обробки отриманих результатів	60
РОЗДІЛ 3 .....	61
РОЗРОБКА ЛАКТАТ-ЧУТЛИВОГО МОНОБІОСЕНСОРА.....	61
3.1. Принцип роботи лактат-чутливого біосенсора.	61
3.2. Визначення оптимального потенціалу для максимальної чутливості амперометричних перетворювачів до пероксиду водню	63
3.3. Забезпечення селективності перетворювачів до пероксиду водню	64
3.4. Визначення оптимальних умов іммобілізації лактатоксидази	65
3.5. Вплив характеристик буферного розчину на роботу лактат-чутливого біосенсора	67
3.6. Стабільність біосенсора при безперервній роботі та при зберіганні	70
3.7. Аналітичні характеристики лактат-чутливого біосенсора	73
3.8. Підсумки до розділу 3	74
РОЗДІЛ 4.....	75
РОЗРОБКА ПІРУВАТ-ЧУТЛИВОГО МОНОБІОСЕНСОРА .....	76
4.1. Принцип роботи піруват-чутливого біосенсора	76
4.2. Визначення оптимальних умов іммобілізації піруватоксидази	77
4.3. Визначення оптимального складу робочого буферного розчину	81
4.4. Стабільність біосенсора при безперервній роботі та при зберіганні	84

	20
4.5. Аналітичні характеристики піруват-чутливого біосенсора	86
4.6. Підсумки до розділу 4	87
РОЗДІЛ 5.....	89
ПОЄДНАННЯ МОНОБІОСЕНСОРІВ У СИСТЕМУ ДЛЯ ОДНОЧАСНОЇ РОБОТИ.....	89
5.1. Дослідження можливості виготовлення біоселективних елементів біосенсорної системи в однакових умовах	89
5.2. Залежність роботи біосенсорів від рН буферного розчину	92
5.3. Вплив концентрації HEPES на роботу біосенсорної системи	93
5.4. Вплив концентрації NaCl на роботу біосенсорної системи	94
5.5. Дослідження перехресного впливу субстратів ензимів на роботу біосенсорної системи	96
5.6. Відтворюваність та операційна стабільність відгуків біосенсорної системи	99
5.7. Аналітичні характеристики біосенсорної системи для визначення пірувату та лактату	101
5.8. Перевірка можливості роботи біосенсорної системи для одночасного визначення концентрації лактату та пірувату у складі мультибіосенсорного масиву для одночасного визначення концентрації глюкози, лактату, пірувату, холіну, ацетилхоліну та глутамату	102
5.8.1. Будова мультибіосенсорного масиву для одночасного визначення концентрації глюкози, лактату, пірувату, холіну, ацетилхоліну та глутамату. ....	103
5.8.2. Принцип роботи масиву біосенсорів.....	104
5.8.3. Відтворюваність відгуків масиву біосенсорів .....	105
5.8.4. Селективність біосенсорів .....	106
5.8.5. Вплив характеристик робочого буферного розчину на роботу мультибіосенсорної системи .....	106
5.8.6. Аналітичні характеристики масиву біосенсорів.....	111
5.9. Підсумки до розділу 5	112

	21
РОЗДІЛ 6.....	115
ВИКОРИСТАННЯ РОЗРОБЛЕНОЇ БІОСЕНСОРНОЇ СИСТЕМИ ДЛЯ ОДНОЧАСНОГО ВИЗНАЧЕННЯ КОНЦЕНТРАЦІЇ ЛАКТАТУ ТА ПІРУВАТУ У ЗРАЗКАХ СИРОВАТКИ КРОВІ.....	115
6.1. Визначення оптимального розведення сироватки крові	115
6.2. Перевірка впливу сироватки крові на лінійність відгуку біосенсорної системи	116
6.3. Відтворюваність відгуків біосенсорної системи при роботі з сироваткою крові	118
6.4. Визначення концентрації лактату, пірувату і їх співвідношення у зразках сироватки крові	119
6.5. Підсумки до розділу 6	122
РОЗДІЛ 7.....	124
АНАЛІЗ ТА УЗАГАЛЬНЕННЯ РЕЗУЛЬТАТІВ ДОСЛІДЖЕНЬ.....	124
ВИСНОВКИ .....	132
СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ.....	133
ДОДАТКИ .....	146

**ПЕРЕЛІК УМОВНИХ СКОРОЧЕНЬ**

**АТФ** – аденозинтрифосфат

**АХЕ** – ацетилхолінестераза

**БСА** – бичачий сироватковий альбумін

**ВЕРХ** – високоефективна рідинна хроматографія

**ГА** – глутаровий альдегід

**ГЛОД**– глутаматоксидаза

**ГОД** – глюкозооксидаза

**ЕМГК** – натрієва сіль 3-(N-етил-3-метиланіліно)-2-гідрокси-пропансульфонової кислоти

**ЛДГ**– лактатдегідрогеназа

**ЛОД** – лактатоксидаза

**ЛПВ** – відношення лактату до пірувату

**НАД** – нікотинамідаденіндинуклеотид

**ПОД** – піруватоксидаза

**ПФД** – поліфенілендіамін

**ТПФ** – тіамініпірофосфат

**УФ** – ультрафіолет

**ФАДН<sub>2</sub>** - флавінаденіндинуклеотид

**ХО** – холіноксидаза

**ЯМР** – ядерно-магнітний резонанс

**НЕРЕС**–(4-(2-гідроксиетил)-1-піперазинетансульфонова кислота

**PVA-SbQ** – полівінілалкоголь з фоточутливими групами

**TEOS** – тетраетилортосилікат

**ТРАОН** – тетрапропіламмонію гідрохлорид

## ВСТУП

**Актуальність теми.** Піруват та лактат є одними з ключових молекул у метаболізмі глюкози. Підвищена концентрація пірувату спостерігається у випадках дефіциту вітаміну В<sub>1</sub>, респіраторного алкалозу, отруєння миш'яком та ртуттю, та патологіях печінки. Підвищена концентрація лактату виникає при тканинній гіпоксії, розладах печінки, нирок, цукровому діабеті, тощо. Тому визначення концентрацій лактату використовується в відділеннях реанімації та інтенсивної терапії для оцінки тяжкості стану пацієнта, прогнозу імовірності шоків станів та смертності пацієнтів. Також в клінічних умовах інформативним є відношення лактату до пірувату (ЛПВ), так на сьогодні ЛПВ у венозній крові використовується для розрізнення вроджених дисфункцій піруватдегідрогеназного комплексу та інших форм вродженого лактатацидозу у новонароджених, для діагностики септичних станів.

Також показано збільшення концентрації пірувату у сироватці крові та слині хворих на рак ротової порожнини у 2-2,8 рази. Оцінка концентрації пірувату розглядається як новий метод скринінгу раку [1, 2].

Тоді як тривалий моніторинг лактату застосовується в клінічній практиці невідкладної терапії, моніторинг пірувату не впроваджено. Це може бути пов'язано з тим, що концентрація пірувату в крові є досить низькою, відповідно, можуть виникнути проблеми з селективністю методу, через високу концентрацію електроактивних інтерферентів у крові.

На сьогодні для оцінки концентрації лактату та пірувату використовуються такі методи як високоефективна рідинна хроматографія, спектроскопія ядерного магнітного резонансу (ЯМР), ензиматична спектрофотометрія та флуориметрія. Однак ці методи потребують тривалої попередньої обробки проби біоматеріалу, а також наявності кваліфікованого персоналу та складного і дорогого обладнання. Тоді як

біосенсорні методи є високоточними, та селективними, при цьому потребують незначних об'ємів зразків біологічних рідин для аналізу, час отримання результату зазвичай не перевищує 10 хв; також існують системи, які працюють в режимі реального часу. Також біосенсорні системи прості у використанні та портативні, що є перспективним для їх використання у клінічних умовах.

На сьогоднішній день уже створено певну кількість лабораторних прототипів та комерційних моделей біосенсорів для визначення концентрацій лактату [3], [4], а також кілька лабораторних прототипів біосенсорів для визначення концентрацій пірувату, як в харчових продуктах, так і в біологічних матеріалах [5]. Однак важливою є необхідність одночасного визначення концентрацій лактату та пірувату та їх співвідношення, оскільки це дає змогу більш комплексно оцінити стан пацієнта у кризовому стані, розрізнити два типи лактатацидозу, та дослідити динаміку розвитку патологічних станів (наприклад, поліорганної недостатності, або гіпоксії у новонароджених) [6].

Тому актуальною є розробка біосенсорної системи для одночасного визначення концентрацій лактату та пірувату у крові, а також обчислення їх співвідношення.

#### **Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами.**

Дисертаційна робота виконувалась в лабораторії біомолекулярної електроніки Інституту молекулярної біології і генетики НАН України в рамках наступних 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); «Підвищення інформативності та метрологічної надійності електрохімічних ферментних біосенсорних систем на основі сучасних



матеріалів» цільової програми наукових досліджень НАН України «Розумні» сенсорні прилади нового покоління на основі сучасних матеріалів та технологій» (№ держ. реєстрації 0118U005167, 2018-2022 рр).

**Мета роботи:** розробити біосенсорну систему для одночасного визначення концентрацій лактату, пірувату та їх співвідношення, у сироватці крові для клінічної діагностики.

Для досягнення вказаної мети були поставлені наступні завдання:

1. Розробка монобіосенсора для визначення концентрації лактату: підбір оптимальних умов іммобілізації лактатоксидази, визначення встановлення аналітичних характеристик біосенсора.
2. Розробка монобіосенсора для визначення концентрації пірувату: підбір оптимальних умов іммобілізації піруватоксидази, визначення оптимального складу робочого розчину, встановлення аналітичних характеристик біосенсора.
3. Поєднання розроблених монобіосенсорів у систему для одночасного визначення концентрації лактату та пірувату: універсалізація виготовлення біосенсорів, вивчення перехресного впливу субстратів та кофакторів, встановлення аналітичних характеристик.
4. Аналіз концентрації лактату та пірувату в реальних біологічних зразках сироватки крові за допомогою розробленої біосенсорної системи і контроль визначення концентрації субстратів за допомогою традиційного спектрофотометричного методу.

**Об'єкт дослідження:** ензиматичні реакції окиснення лактату та пірувату, присутніх у зразках біологічних рідин, за участю іммобілізованих лактатоксидази та піруватоксидази, що супроводжуються утворенням пероксиду водню.

**Предмет дослідження:** амперометричні монобіосенсори для визначення концентрацій лактату та пірувату та біосенсорна система для одночасного визначення даних субстратів.

**Методи дослідження:** в роботі використовували методи амперометричного вимірювання зміни струму внаслідок ензиматичної реакції в біокаталітичному шарі біосенсорів, що супроводжується утворенням пероксиду водню. Для забезпечення селективності біосенсорів відносно інших (крім пероксиду водню) електроактивних речовин, використовували метод електрохімічної полімеризації фенілендіаміну на поверхні електродів. Для іммобілізації ензимів в біокаталітичному шарі використовували методи поперечного зшивання глутаровим альдегідом, фізичної адсорбції на шарі силікаліту, та інкапсуляції ензиму у складі полімеру PVA-SbQ. Як контрольний метод визначення лактату та пірувату у реальних зразках використовували спектрофотометрію.

**Наукова новизна отриманих результатів.** Вперше розроблено біосенсорну систему на основі амперометричних платинових дискових електродів для селективного одночасного визначення концентрацій лактату та пірувату та їхнього співвідношення. Запропоновано нову методику аналізу співвідношення концентрацій лактату та пірувату у реальних зразках сироватки крові з метою розпізнавання відповідних патологічних станів, а саме лактатацидозу А або В типу, та диференційної діагностики патологічних станів у новонароджених.

**Практичне значення отриманих результатів.** Створено лабораторні прототипи амперометричних монобіосенсорів та біосенсорної системи для визначення концентрацій лактату, пірувату та співвідношення лактат/піруват у сироватці крові людини. Продемонстровано ефективність застосування біосенсорної системи для визначення концентрацій лактату та пірувату у реальних зразках.

Отримані дані можуть бути використані для виготовлення промислових моделей біосенсорів для лабораторної клінічної діагностики.

**Особистий вклад здобувача.** Здобувачем самостійно здійснено аналіз літератури за обраною темою, визначено мету та задачі роботи (разом з керівником), виконано основну частину експериментальних

досліджень. Частину експериментальних досліджень із визначення оптимальних умов іммобілізації піруватоксидази, та впливу параметрів буферного розчину на піруват-чутливий монобіосенсор, виконано в тісному співробітництві з Д.В. Книжниковою. Також робота із розробки мультибіосенсорного масиву для одночасного визначення концентрацій глюкози, лактату, пірувату, холіну, ацетилхоліну та глутамату була виконана у співпраці з Д.В. Книжниковою та Д.Ю. Кучеренко. Здобувач здійснювала разом із співавторами написання та підготовку до друку статей у профільних наукових журналах.

Планування експериментів, обговорення та аналіз результатів дослідження проведено спільно з науковим керівником к.б.н., с.н.с. О.О. Солдаткіним, д.б.н., професором С.В. Дзядевичем та к.б.н., н.с. І.С. Кучеренком, яким здобувач висловлює щиру подяку.

**Апробація матеріалів дисертації.** Результати досліджень були представлені на 6 фахових конференціях: на IV всеукраїнській науково-практичній конференції «Біотехнологія: звершення та надії», Київ, 21-22 травня 2015; на конференції-конкурсі молодих учених «Актуальні проблеми біохімії та біотехнології – 2016», Київ, 26-27 травня 2016; на науково-практичній конференції з міжнародною участю «YouthNanoBioTech-2017. Молодіжний форум новітніх технологій у медицині», Київ, 17-18 травня 2017; на конференції молодих учених Інституту молекулярної біології і генетики НАН України, Київ, 6-9 червня 2017; на XVI Міжнародній науковій конференції «Шевченківська весна: досягнення біологічної науки / BioScience Advances», Київ, 24-27 квітня 2018; на XII Відкритій конференції молодих вчених Інституту молекулярної біології і генетики НАН України, Київ, 15-16 травня 2018; на VIII Міжнародній науково-технічній конференції «Сенсорна електроніка та мікросистемні технології» (СЕМСТ-8), Одеса, 28 травня – 01 червня 2018.

**Публікації.** За темою дисертації опубліковано 13 наукових праць, серед яких 6 статей у фахових наукових журналах, в тому числі 2 статті в журналах, які входять до наукометричної бази Scopus, та 7 тез доповідей на міжнародних та вітчизняних науково-практичних конференціях та з'їздах.

**Структура та обсяг дисертації.** Дисертація викладена на 158 сторінках друкованого тексту. Вона складається з розділів «Вступ», «Огляд літератури», «Матеріали та методи досліджень», «Розробка лактат-чутливого монобіосенсора», «Розробка піруват-чутливого монобіосенсора», «Поєднання монобіосенсорів у систему для одночасної роботи», «Використання розробленої біосенсорної системи для одночасного визначення концентрацій лактату та пірувату у зразках сироватки крові», «Аналіз та узагальнення результатів досліджень», «Висновки», «Список використаної літератури» та «Додатки».

Дисертація ілюстрована 46 рисунками, 6 таблицями. Список літератури містить 100 джерел.

## РОЗДІЛ 1

### ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ

#### **1.1. Медико-біологічне значення визначення концентрацій лактату і пірувату**

Піруват це аніон органічної кислоти, що утворюється як продукт гліколізу і, за аеробних умов, може бути далі окиснений до ацетил-коферменту А, який поступає в цикл Кребса. В той же час, лактат утворюється з пірувату в процесі анаеробного гліколізу, та є маркером гіпоксії в клітинах, тканинах та біологічних рідинах.

Тривала гіпоксія спричиняє патологічні процеси на всіх рівнях функціонування біологічного організму, а гіпоксія мозку є остаточною причиною смерті. Продукція лактату зростає при станах, за яких збільшується інтенсивність анаеробного метаболізму внаслідок гіпоксії – наприклад геморагічному шоку, емболії, дихальних розладах. Концентрація лактату в крові відображає баланс між його продукцією та виведенням.

Підвищення рівня лактату виникає також при порушенні роботи системи кліренсу лактату – розладів печінки, нирок, цукровому діабеті [7].

Концентрація пірувату у сироватці крові у нормі складає від 40-50 мкМ до 100 мкМ [1, 7]. Підвищення рівня пірувату виникає як при підвищеному його утворенні при посиленні аеробних процесів, так і при недостатній утилізації в піруватдегідрогеназному комплексі. Однак надлишок пірувату зазвичай швидко перетворюється в лактат при переважанні анаеробних процесів та в ацетилКоА при переважанні

аеробних [8]. Тому оцінка концентрації пірувату без врахування рівня супутніх метаболітів не є вагомим діагностичним критерієм [7].

Рівень лактату у крові у нормі варіює від 0,5 до 2,2 мМ [7]. Під час інтенсивних фізичних навантажень цей показник може досягати 12-25 мМ, однак у нормі рівень лактату зменшується зі швидкістю приблизно 320 мМ за годину переважно завдяки печінковому метаболізму та перетворенню в піруват [9]. Однак при постійній гіперпродукції лактату в тканинах або патологіях системи утилізації, час існування гіперлактатемії набагато більший і саме це є підставою для негативного прогнозу. Тому визначення рівня лактату в динаміці використовується в відділеннях реанімації та інтенсивної терапії для оцінки тяжкості стану пацієнта, прогнозу імовірності шоків станів та колапсу і смертності пацієнтів [6, 10]. А також динаміка рівня лактату в крові використовується для оцінки ефективності лікування. Так, стабільна концентрація лактату в крові більше 5 мМ на фоні тяжкого ацидозу (рН крові менше 7,35) дає прогноз 80% смертності [6]. Важливість лактатацидозу більше 4 мМ як критерію для прогнозу смертності підтверджено численними дослідженнями [11, 12]. Також визначення концентрації лактату в крові використовується в неонатології для оцінки рівня гіпоксії новонароджених [13].

Додавання визначення концентрації лактату до клінічного протоколу у відділеннях реанімації покращило діагностику септичних станів та зупинки серця [14] та покращило швидкість розпізнавання початку сепсису [15, 16].

У клініці лактатацидоз поділяють на два типи – лактатацидоз А-типу, який виникає при станах, асоційованих з гіпоксією, наприклад: геморагічному шоку, емболії, обструкції дихальних шляхів, набряку легень, отруєння дихальними отрутами, тощо; та лактатацидоз В-типу, спричинений окремими ліками та токсинами разом з недостатністю нирок та печінки, на фоні діабету або розладів метаболізму. Вважається, що лактатацидоз типу А спричинений як передусім гіперпродукцією лактату

так і недостатньою його утилізацією, тоді як лактатацидоз типу В – не пов'язаний з гіперпродукцією лактату [17].

На сьогоднішній день метаболічні схеми виникнення та перебігу лактатацидозу є предметом дискусії, особливо у випадках, пов'язаних із септичними станами [18–20]. Однак ця відмінність досі має цінне діагностичне значення для невідкладної терапії. Для розрізнення цих двох станів в клінічних умовах важливим є співвідношення лактату до пірувату у венозній крові (ЛПВ). Коли клітинне дихання порушене і є дефіцит кисню, окислення пірувату зменшується, при цьому накопичується багато відновлених форм НАДН і ФАДН<sub>2</sub>, і відношення лактату до пірувату зростає, на фоні зростання концентрації обох субстратів. Натомість, порушення функції піруватдегідрогенази блокує цикл Кребса та дихальний ланцюг на самому початку, тому ЛПВ не змінюється. Так, на сьогодні ЛПВ у венозній крові використовується для розрізнення вроджених дисфункцій піруватдегідрогеназного комплексу та інших форм вродженого лактатацидозу у новонароджених, а також для діагностики септичних станів [21].

Особливе клінічне значення має швидкість диференційної діагностики піруватдегідрогеназних розладів та розладів дихального ланцюга у новонароджених, оскільки використовується дуже специфічне лікування для розладів піруватдегідрогенази. Було також показано, що релевантність ЛПВ як критерію для диференційної діагностики невідкладних патологічних станів зростає прямо пропорційно концентрації лактату [22]. Також існує думка, що при тяжких та гострих випадках гіпоксії, пониженій перфузії тканин, гострій печінковій чи нирковій недостатності, ЛПВ, можливо, є кращим клінічним індикатором стану хворого, ніж лише концентрація лактату [23]. На користь цього свідчить вузький діапазон (40-100 мкМ) концентрації пірувату у крові здорових індивідів. Нормальне ЛПВ складає 10-20, зазвичай ЛПВ більше 25 вважається завищеним, і маркером первинної або вторинної дихальної

дисфункції, тоді як завищене відношення менше 25 свідчить про дисфункцію піруватдегідрогенази [23].

Підвищена концентрація пірувату спостерігається у випадках дефіциту вітаміну В1, респіраторного алкалозу (різкого зниження рівня двоокису вуглецю в крові, що супроводжується підвищенням рН), отруєння миш'яком та ртуттю та патологіях печінки, таких як алкогольний цироз, гепатит, тощо [23]. Також показано збільшення концентрації пірувату у сироватці крові та слині хворих на рак ротової порожнини у 2-2,8 рази. Оцінка концентрації пірувату розглядається як новий метод скринінгу раку [1, 2].

Важливість визначення лактату не обмежується лише медичним застосуванням. Наприклад, запропоновано біосенсиори для оцінки рівня лактату у вині [24] і молоці [25]. Також визначення лактату та пірувату використовується в молочній промисловості для оцінки перебігу молочнокислого бродіння у промислових умовах та тестування якості готової продукції [9, 26]. Інколи лактат використовується в харчових продуктах як консервант [27, 28]. Тому існує низка біосенсорів, для визначення лактату, націлених на оцінку якості харчових та супутніх продуктів.

## **1.2. Традиційні методи визначення лактату та пірувату**

Тоді як тривалий моніторинг лактату застосовується в клінічній практиці невідкладної терапії, моніторинг пірувату не впроваджено. Це може бути пов'язано з тим, що концентрація пірувату в крові є досить низькою, відповідно, можуть виникнути проблеми з селективністю методу, через високу концентрацію електроактивних інтерферентів у крові. Слід принагідно зауважити, що саме електрохімічні біосенсиори мають високу селективність та один з найкращих показників чутливості порівняно з іншими методами визначення концентрацій біологічно значимих молекул.



Визначення пірувату у клінічній практиці переважно здійснюється разом з визначенням інших метаболітів – лактат, аланін, ацетилКоА [29]. Крім того, концентрація пірувату в біологічних рідинах відносно низька, порівняно з іншими метаболітами, тому метод повинен мати не лише високу чутливість, а й стійкість до численних інтерферентів. Тому переважаючими для визначення пірувату є ензиматичні методи, також хороші результати показує рідинна хроматографія та ЯМР-метод.

Щодо методів визначення концентрації лактату, то на сьогодні використовують колориметричний, спектрофотометричний, флуориметричний, ензиматичний, ЯМР-метод та високоефективну рідинну хроматографію [7] [26].

Колориметричний метод для визначення лактату. Метод винайдений Баркером в 1941 році. Лактат під впливом  $\text{H}_2\text{SO}_4$  або  $\text{H}_2\text{PO}_4$  перетворюється в ацетальдегід, який вступає в кольорову реакцію з р-гідроксифенілом у присутності іонів міді з утворенням сполуки фіолетового кольору. Інтенсивність кольорової реакції, визначеній при довжині хвилі 560 нм, корелює з концентрацією лактату. Діапазон визначення складає від  $1 \cdot 10^{-5}$  до  $1,3 \cdot 10^{-4}$  М [7]. Колориметрія є найдешевшим та найдоступнішим методом, що і визначає його популярність у нашій країні, однак при цьому є менш специфічним, чутливим та селективним, і, відтак, менш надійним методом.

Ензимо-колориметричний метод. У каскаді реакції аналізу з реактивами для утворення забарвленої сполуки використовуються ензими. Так, метод, запропонований Suman et al. базується на вимірюванні пероксиду водню, що утворюється при окисненні лактату лактатоксидазою [30].  $\text{H}_2\text{O}_2$  вступає в кольорову реакцію з 4-амінофеназоном та фенолом. Отриманий барвник рожевого кольору абсорбує при 520 нм. Межа визначення лактату складає 0,1 мМ.

Ензимо-спектрофотометричний метод. Лактат окиснюється до пірувату за допомогою лактатдегідрогенази, що використовує НАД як

кофермент, відновлюючи його до НАДН. Відновлений НАДН абсорбує у діапазоні 340 нм, інтенсивність абсорбції прямо пропорційна концентрації лактату [7].

Ензимо-флуорометричний метод визначення лактату. Визначення лактату базується на утворенні НАДН при окисненні лактату лактатдегідрогеназою. Зміни в концентрації НАДН вимірюються за його природною флуоресцентністю, що вимірюється на флуориметрі. Концентрація НАДН прямо пропорційна концентрації лактату. Так, Хуе та колеги використали ензимо-флуорометричний метод для аналізу лактату та пірувату у присутності лактатдегідрогенази [31].

До переваг ензиматичних методів належать висока селективність, специфічність, та чутливість. Однак собівартість ензимів залишається досить високою.

Високоєфективна рідинна хроматографія (ВЕРХ) для визначення лактату вперше була застосована (Schneider et al., 1987). При застосуванні даного методу досліджуваний зразок елюють через катіонообмінну колонку з розведеною  $H_2SO_4$ , при цьому різний рН рухомої фази дозволяє відділити лактат від інших органічних кислот, присутніх у зразку. Після цього використовують УФ-детекцію для визначення концентрації лактату.

Також ВЕРХ придатна для одночасного визначення пірувату та лактату. Віагі та колеги проводили аналіз концентрацій лактату і пірувату в поті з використанням високоєфективної рідинної хроматографії з оберненою фазою з УФ-детектуванням при 220 нм. Калібрувальні криві були лінійними в досліджуваному діапазоні 0,3 - 350 мМ лактату, 0,003-1 мМ пірувату. Межа виявлення склала 0,03 мМ для лактату і 0,001 мМ для пірувату [32].

Ядерно-магнітний резонанс з використанням динамічної ядерної поляризації використовується для визначення лактату та пірувату в клінічних дослідженнях. Так, Park та колеги використали методику ЯМР-визначення  $[1-(^{13}C)]$ -лактату та  $[1-(^{13}C)]$ -пірувату для моделювання

метаболізму глюкози у м'язах [33]. Ну та колеги використовували визначення концентрацій [1-<sup>(13)</sup>C]-пірувату та [2-<sup>(13)</sup>C]-пірувату для оцінки впливу антиракового агенту дихлорацетату на мітохондріальний метаболізм [34].

Цей метод є зручним для прижиттєвих та динамічних клінічних досліджень. Так, наприклад Takado та колеги використовували ЯМР для дослідження швидкості споживання лактату клітинами мозку при обробці їх ультразвуком [35].

Однак ці методи потребують тривалої попередньої обробки проби біоматеріалу, а також наявності кваліфікованого персоналу та складного і дорогого обладнання.

### **1.3. Біосенсорне визначення аналітів для клінічної діагностики**

**1.3.1. Загальні принципи роботи біосенсорів та вибір матеріалу електрода.** Біосенсор – це автономний інтегральний аналітичний прилад, який забезпечує кількісний чи напівкількісний аналіз, з використанням біологічного розпізнавального елемента, що знаходиться у прямому контакті з фізичним перетворювачем. У ролі біорозпізнавального елемента можуть виступати молекули (ензими, рецептори, антитіла, нуклеїнові кислоти), органели (тилакоїди, мітохондрії), та цілі клітини. Також біосенсори класифікуються за типом перетворювача біохімічного сигналу в електричний. Існують оптичні, акустичні, калориметричні біосенсори, однак найбільш поширеними є біосенсори засновані на електрохімічних перетворювачах. Електрохімічні перетворювачі фіксують зміну сили струму, напруги, електропровідності, які виникають внаслідок біокаталітичної реакції біорозпізнавального елемента.

Амперометричні біосенсори це найбільш розповсюджений, широкий та успішний в плані комерціалізації клас приладів біомолекулярної електроніки [36], [37]. З моменту появи першого амперометричного

біосенсора пройшло вже більш ніж 60 років [38]. Весь цей час постійно проводяться пошуки оптимальних матеріалів та дизайну для створення біосенсорів, особливо для конкретних задач їх різного використання. Аналізи, основані на амперометричному методі визначення, дають деякі переваги у порівнянні з іншими методами, тому що є недорогими, відносно простими у використанні, мають досить широкий діапазон вимірюваних концентрацій для багатьох практичних застосувань.

Амперометричний перетворювач базується на вимірюванні струму що виникає в результаті біохімічного окиснення чи відновлення електроактивних субстратів при певному потенціалі характерному для кожного конкретного аналіта. Цей струм прямо корелює з концентрацією електроактивних сполук в біокаталітичному шарі.

Робочий електрод виготовляють з різноманітних матеріалів. Як провідний елемент в електроді використовуються металеві або вуглецеві матеріали. Електроди на основі металу переважно представлені платиновими електродами, на другому місці золото, також використовується срібло та високоякісна сталь. Електроди на основі вуглецю представлені карбоновими волокнами, графітовими стержнями, пористим або активованим вуглецем, мають високу хімічну інертність [36]. Часто електроди виготовляють зі змішаних матеріалів – таких як вуглецеві волокна, металізовані родієм, паладієм, рутенієм або іридієм; стержні з графітового порошку диспергованого з полімерними матеріалами тощо [39].

Як непровідну підкладку/обгортку для електрода застосовують скло, кремній, кераміку, полістирол, полівінілхлорид. Ключова вимога до матеріалу підкладки – хімічна інертність та фізичні властивості, які найкраще підходять для технології виготовлення (наприклад однаковий коефіцієнт розширення з чутливою частиною електрода).

Вибір матеріалу чутливої частини електрода також обумовлений властивостями робочого ензиму чи системи ензимів та способу його

імобілізації, зокрема забезпечення швидкого потрапляння електронів на поверхню перетворювача. Наприклад, при використанні дегідрогеназ у складі біоселективних елементів, платинові робочі електроди менш схильні до біозабруднення ніж скляні карбонові електроди [40].

Перспективною галуззю застосування біосенсорів є лабораторна діагностика та клінічна практика. Біосенсори використовуються для різноманітних лабораторних аналізів, клінічних досліджень та в окремих випадках для постановки діагнозу. Castillo et al. [41] класифікував біосенсори для медичного застосування так:

*Off-line* прилади – це біосенсори, при роботі яких проби біоматеріалу взяті з досліджуваного суб'єкта поміщаються в вимірювальну комірку і їх вимірювання проводиться на автономному приладі. Також вимірювання може проводитись через деякий час після забору проб при їх належному зберіганні. Наприклад, за таким принципом працює переважна більшість комерційних приладів для визначення глюкози у крові.

*On-line* прилади – біосенсори, що вмонтовані в пристрій для неперервного забору та аналізу проб біологічного матеріалу. Наприклад біосенсор вмонтований в зонд для мікродіалізу.

*In vivo* сенсори – біосенсори, імплантовані в організм (підшкірно, внутрішньовенно, внутрішньотканинно, закріплені на поверхні шкіри, тощо), і можуть детектувати концентрації аналітів в динаміці та впродовж тривалого часу. Однак висока інвазивність цих методів на сьогодні обмежує їх використання переважно для доклінічних досліджень на тваринних моделях [41].

**1.3.2. Методи імобілізації ензимів при розробці біосенсорів для визначення лактату і пірувату.** Імобілізація ензиму – процес, при якому ензими прикріплюються до поверхні перетворювача або закріплюються всередині носія. Конформація імобілізованого ензиму може відрізнитися від конформації ензиму в розчині і як правило, імобілізовані ензими є

більш стабільними. Порівняно з вільними ензимами, іммобілізовані показують нижчу активність, та загалом, вищу константу Міхаеліса [42]. Однак використання іммобілізованих ензимів для каталізу реакцій має ту перевагу, що іммобілізовані ензими на відміну від вільних у розчині не забруднюють вихідний продукт та не змінюють свою концентрацію під час повторних експериментів.

Для іммобілізації ензимів використовують такі методи, як фізична адсорбція, фізичне захоплення ензиму в полімер, біоафінне та ковалентне зв'язування до різноманітних матеріалів основи. Розглянемо ці методи, матеріали та їх використання при виготовленні біосенсорів. В нашому дослідженні було проаналізовано 42 експериментальні статті, в яких використовували різноманітні методи іммобілізації. Результати вказано на рис. 1.1.



Рис. 1.1. Методи іммобілізації ензимів у біосенсорах для визначення лактату та пірувату

**Фізична адсорбція.** Даний метод є найпростішим методом іммобілізації, зокрема вона здійснюється шляхом занурення електрода в розчин ензиму на певний час, або висушування розчину ензиму на робочій

поверхні. Зв'язок між ензимом та матеріалом підложки здійснюється за рахунок слабких сил: вандерваальсових, гідрофобних та водневих зв'язків. При фізичній адсорбції, як і при інших видах нековалентної взаємодії, нативна конформація ензиму доволі часто не зазнає суттєвих змін, і тому його активність може зберігатися на високому рівні.

Метод фізичної адсорбції ензиму використовували у розробках низки біосенсорів для лактату та пірувату [39, 43–46].

Однак при взаємодії адсорбованих ензимів з розчином, завжди має місце спонтанна дисоціація ензимів і їх вимивання у робочий розчин, а відтак – постійна зміна концентрації ензиму в шарі. Тому при виборі цього методу іммобілізації часто використовують додаткові захисні мембрани або інші додаткові способи закріплення ензимовмісного шару [47, 48].

#### **Фізичне захоплення ензиму у гель-зольні та полімерні матеріали.**

При цьому ензим змішується з мономерами, які зшиваються численними ковалентними зв'язками шляхом електрополімеризації, фотозшивання, зшивання за допомогою гамма-випромінювання, тощо. Даний метод має такі переваги, як високу стійкість ензимів до вимивання, високу механічну, хімічну та теплову стійкість, призводить до значної стабілізації ензиму та його захисту від бактеріальної деградації біоселективного елемента біосенсора внаслідок зменшення доступу бактерій до ензимів через мембрану. Так, наприклад Schabmueller та колеги застосували іммобілізацію лактатоксидази у порах агарозного гелю, з подальшим ущільненням поліефірною плівкою, для виготовлення біосенсора для визначення концентрацій лактату у слині [49]. Також при розробці біосенсорів для визначення лактату та пірувату використовували такі матеріали: поліанілін [50, 51], поліпірол-полівінілсульфонатний композит [52], тетраетилортосилікат [53].

При порівнянні з фізичною адсорбцією ензиму, при захопленні в гель-зольні та полімерні матеріали дещо зменшується швидкість дифузії субстрату, і відповідно, чутливість біосенсора [54]. Зате загальна кількість

іммобілізованого ензиму – значно більша, що позитивно впливає на величину сенсорного відгуку і стабільність роботи біосенсора.

**Ковалентне зв'язування ензиму та підложки.** Даний метод іммобілізації ґрунтується на утворенні ковалентних зв'язків між ензимом та підложкою. В утворенні цих зв'язків беруть участь функціональні групи амінокислотних залишків на поверхні ензиму, зокрема аміногрупи L-лізину та карбоксильні групи глутамінової і аспарагінової кислот. Оскільки існує необхідність захистити від ковалентного зшивання амінокислотні залишки в активному центрі ензиму, при іммобілізації забезпечують захист їх зв'язуванням зворотними інгібіторами або аналогами субстратів [55]. Ковалентне зв'язування можливе для будь-яких електродів, за умови обробки їх поверхні функціональними агентами [56]. Внаслідок цього на поверхні електрода формується моношар стабільно зв'язаного ензиму, що привабливо з точки зору уникнення нерівномірності дифузії у різних частинах біоселективного елемента. Однак при цьому кількість іммобілізованого ензиму залежить від площі поверхні електрода, тому на сьогодні використовуються різні способи збільшити площу поверхні електрода, зокрема, модифікацією поверхні електроду наноматеріалами, та іммобілізації ензимів на золотих наночастинках [57] або карбонових нанотрубках [58].

**Поперечне зшивання біфункціональними реагентами.** Метод полягає в утворенні великих тривимірних сіток, в яких молекули білка (ензиму або ензиму і допоміжного білка-носія) ковалентно пов'язані біфункціональним реагентом. В цьому методі досягається висока стабільність системи та можливість захоплення великої кількості ензиму, порівняно з ковалентним зв'язуванням на поверхні перетворювача. Дифузні характеристики мембрани залежать від типу і концентрації біфункціонального реагенту та білків і можуть варіабельно підбиратись. При цьому формується ензимовмісна мембрана, яка приєднується до поверхні електрода. Так, Yao et al. іммобілізували лактатоксидазу та



піруватоксидазу шляхом поперечного зшивання глутаровим альдегідом на платинових дискових електродах [59], аналогічний метод застосували Minagawa et al. [60]. Tatsuma et al. використали для іммобілізації лактатоксидази та піруватоксидази як ковалентне зшивання ензиму глутаровим альдегідом, так і подальше зшивання ензимовмісної мембрани з поверхнею електрода, модифікованою 2-амінопропіл-триетоксісіланом [61].

**1.3.3. Поширені проблеми при біосенсорному визначенні реальних зразків.** Оскільки більшість реальних зразків (такі як біологічні рідини, їжа, поживні середовища) складаються з великої кількості різноманітних речовин, виникають додаткові вимоги до біосенсорів: вони мусять бути механічно стійкими, легко каліброваними, мати широкий лінійний діапазон для охоплення концентрацій, необхідних для конкретного аналізу у фізіологічній нормі та патологіях, а також бути стійкими до забруднення і впливу електроактивних інтерферентів.

При роботі з реальними зразками можливе порушення роботи окремих компонентів біосенсора: розшарування ензимовмісних мембран, забруднення мембрани або пасивації електрода біомолекулами, а також біодеградації мембрани [62, 63]. Забруднення мембрани є звичним для біосенсорів що працюють *in vivo*. При цьому білки, фрагменти зруйнованих клітин, або живі клітини адсорбуються на зовнішню поверхню біосенсора, утруднюючи дифузію аналіту до робочої поверхні і знижуючи величину відгуку.

Біозабруднення та пасивацію можуть спричиняти багато речовин, присутніх в біологічних рідинах. Наприклад фенольні сполуки утворюють полімерний шар на поверхні електрода при прикладенні відповідного потенціалу [64]. Білки, як і інші макромолекули, забруднюють мембрану шляхом спонтанної адсорбції. Дрібні молекули можуть забивати пори напівпроникної мембрани, заважаючи дифузії аналіту до ензимовмісного

шару. Ступінь забруднення за рахунок адсорбції білків може бути оцінена за допомогою вимірювання імпедансу або циклічної вольтамперометрії. Поглинання білків впливає на ширину піків на цикловольтамперограмі, або зміну опору при вимірюванні імпедансу [65].

Для зменшення впливу електроактивних та інших речовин, присутніх у зразках, на роботу біосенсора часто використовуються захисні мембрани, нанесені на поверхню електрода, зокрема шляхом електрополімеризації. Ефективними матеріалами для таких захисних шарів є такі полімери, як фенілєндіамін, полієвгенол, поліпірол, також специфічні мембрани - нафіонові, поліметилцелюлозні або гідрогельні [63].

**1.3.4. Розробка мультибіосенсорних систем для одночасного визначенні кількох аналітів: додаткові виклики.** Зростає попит на мультибіосенсорні системи для одночасного вимірювання кількох аналітів – наприклад спектру токсинів, або кількох клітинних метаболітів, які є важливими для діагностики певного захворювання або клінічних досліджень.

При виготовленні біосенсорних систем чи мультибіосенсорних приладів також виникають додаткові вимоги до процесу іммобілізації біоселективного матеріалу. Так, необхідно вирішити задачу просторового розміщення ензимів на мультисенсорному чипі, уникаючи їх змішування, яке може поставити під загрозу специфічність мультибіосенсора. Для цього використовують технології іммобілізації в краплі [66], струменевого та трафаретного друку [67].

Одною з проблем для амперометричних біосенсорних систем є перехресний вплив пероксиду водню, що виробляється на сусідніх електродах, внаслідок дифузії пероксиду водню від одного електрода до сусіднього, що призводить до генерації хибного сигналу.

Так, Dempsey et al. для захисту двохензимної біосенсорної системи для одночасного визначення глюкози та лактату використовували чотири шари мембран для кожного сенсора: внутрішня мембрана проти інтерферентів з фенілендіаміну, ензимовмісний шар (глюкозооксидаза або лактатоксидаза) з захисним шаром без ензиму для обмеження дифузії, та зрештою, зовнішня ензиматична мембрана що містила каталазу для розщеплення пероксиду водню, продукованого іншими сенсорами [68]. Osborne et al. розробили дисковий вуглецевий електрод, покритий тришаровою мембраною [69]. Так, на внутрішній мембрані розміщувався осмієвмісний окисно-відновний гель з іммобілізованою пероксидазою хрому для зменшення робочого потенціалу, у другому шарі основний ензим – іммобілізована оксидаза, та зовнішня мембрана з ацетату целюлози для захисту від інтерферентів. Однак цей біосенсор міг нехтувати перехресним впливом лише за низьких концентраціях субстрату, а також показано, що деякі інтерференти, зокрема ацетамінофен можуть проходити через ацетатцелюлозну мембрану.

Тому при розробці біосенсорної мультисистеми для визначення концентрацій аналітів у реальних зразках слід шукати оптимальні рішення, що б враховували і оптимальні умови іммобілізації для збереження стабільності та активності ензиму, і найкраще його просторове розміщення та провідні шари для ефективного транспорту електронів від активного центру до поверхні електрода, і захист від інтерферентів. При цьому слід додатково вжити заходів для захисту від адсорбції сторонніх речовин та біозабруднення на всіх компонентах біосенсора при роботі з реальними зразками. А також слід знайти оптимальне рішення для просторового розміщення різних біосенсорів з мультисистеми, визначити величину перехресного впливу, і, якщо нею не можна знехтувати, вжити заходів для нейтралізації цього впливу.

## 1.4. Існуючі біосенсори та біосенсорні системи для визначення концентрацій лактату та пірувату

**1.4.1. Біосенсори для визначення лактату.** На сьогодні існує багато описаних в літературі і декілька комерційних біосенсорів для визначення лактату. Оскільки цей метод визначення лактату є одним з найбільш зручних та дешевих, біосенсори для лактату є затребуваними. Так, біосенсори що призначені для клінічної діагностики зорієнтовані на визначення лактату в крові, лікворі, слині та інших біологічних рідинах, біосенсори, які використовують в спортивній медицині визначають концентрацію лактату у поті спортсменів, також лактат-чутливі біосенсори затребувані у харчовій промисловості, зокрема для визначення концентрацій лактату у молочнокислих продуктах та соках.

Для створення лактат-чутливих біосенсорів найчастіше використовуються ензими лактатдегідрогеназа та лактатоксидаза. Ми проаналізували деякі сучасні лабораторні прототипи біосенсорів для визначення лактату, їх характеристики наведено в Додатку 2.

Jena et al. розробили високочутливий біосенсор для визначення лактату, оснований на поєднанні ЛДГ та золотих наночастинок. При його роботі НАДН, що утворювався при наявності субстратів у каталітичній реакції ЛДГ, окиснювався на поверхні золотих наночастинок, змінюючи їх потенціал [70].

Garjonyte et al. розробили біосенсор на основі лактатоксидази з використанням берлінської лазурі для каталітичного відновлення пероксиду, утвореного в реакції окислення лактату [71]. Однак цей біосенсор містив велику концентрацію ензиму - 6 одиниць активності на 1 електрод, завдяки чому вдалося досягнути межі визначення 1 мкМ.

Monošík et al. розробили амперометричний біосенсор з використанням одношарових вуглецевих нанотрубок для визначення концентрації лактату у вині та харчових продуктах. Шар іммобілізованої

лактатоксидази розміщувався між двома хітозановими шарами, як медіатор було використано ферроціанід. Даний біосенсор відрізнявся хорошою операційною стабільністю (60 послідовних вимірювань без втрати чутливості) та можливістю зберігання впродовж 15 місяців [4].

Romero et al. розробили амперометричний біосенсор на основі лактатоксидази [72]. Поперечно зшитий з глутаровим альдегідом ензим утворював полімерну матрицю, яку було розміщено між двома полікарбонатними мембранами. Даний біосенсор відзначався низькою кількістю ензиму - лише 0,1 одиниць активності лактатоксидази на один перетворювач, а також високою стабільністю впродовж 30 днів.

Naghighi та Vozorgzadeh розробили надзвичайно чутливий електрохемілюмінісцентний біосенсор для визначення лактату, межа визначення якого склала 4 нМоль/л [48]. Даний біосенсор продемонстрував збереження 80% активності впродовж тижня.

Özkan et al. розробили біосенсор на основі термостабільної лактатдегідрогенази із *Clostridium thermocellum* іммобілізованої на золотому електроді та провели порівняння з аналогічним пристроєм на основі стандартної ЛДГ [73]. Біосенсор на основі мутантної термо-ЛДГ мав підвищену чутливість, ширший лінійний діапазон визначення та кращу стабільність при зберіганні порівняно з біосенсором на основі звичайної ЛДГ. Також визначення аналітів при високій температурі (50-60 °C) забезпечувала кращу чутливість та лінійний діапазон визначення порівняно з визначеннями за кімнатної температури та температури тіла.

**1.4.2. Біосенсори для визначення пірувату.** Біосенсорне визначення концентрації пірувату, як і визначення концентрації лактату, проводиться для клінічної діагностики, зокрема аналізу сироватки крові, а також для фундаментальних досліджень. Також визначення концентрації пірувату використовують для оцінки якості харчових та алкогольних продуктів, зокрема за рівнем пірувату оцінюються смакові якості

(гострота) різних сортів цибулі та часнику. Було розроблено низку лабораторних прототипів біосенсорів для визначення пірувату, характеристики яких наведені в Додатку 3. Інформації про комерційні біосенсори для визначення концентрації пірувату в науковій літературі не виявлено.

Situmorang et al. розробили амперометричний біосенсор на основі піруватоксидази, та випробували різноманітні способи іммобілізації ензиму [74]. Так, поперечне зшивання за участі глутаральдегіду, ефективно для іммобілізації глюкозооксидази призводило до значного зменшення активності піруватоксидази. Захоплення ензиму всередині політирамінової плівки також призводило до втрати активності. Натомість використання як зшиваючого агента карбодііміду гідрохлориду виявилось більш ефективним.

Gajovic et al. розробили біосенсор для визначення пірувату у сироватці крові на основі рекомбінантної піруватоксидази [23]. Електроактивна поверхня мікроелектрода була збільшена шляхом електроосадження черні платини. Біосенсор показав межу визначення 30 мкМ для сироватки крові теляти, що, відзначають автори, достатньо для безперервного моніторингу пірувату в органах і тканинах, що зазнали гіпоксії.

Bergmann et al. для розробки магній-незалежного піруват-чутливого біосенсора також використали рекомбінантну піруватоксидазу *Lactobacillus plantarum* отриману методом прямого мутагенезу, а також піруватоксидазу з *Pediococcus sp.* та пероксидазу хрому [75]. Біосенсори на основі рекомбінантної пероксидази не потребували іонів магнію та тіамініпрофосфату для роботи. Біосенсор на основі цього ензиму показав стійкість до інтерферентів, таких як альфа-кетоглутарат, лактат, урат та глутатіон, однак фосфоенолпіруват, альфа-кетобутират, цистеїн та НАДН показували невеликий вплив на відгук.

Arai et al. іммобілізували піруватоксидазу в шарі провідного окисно-відновного полімера полі-(меркапто-р-бензохінону) шляхом електрополімеризації на поверхні електрода [76]. При цьому молекули полімера виступали ланцюжком для передачі електронів між активним центром ензиму та поверхнею електрода. Динамічний діапазон роботи біосенсора склав від 1 мкМ до 2 мМ.

Ваграм et al. використали 3-меркаптопропіонову і 6-амінокапронову кислоти для утворення самозбірного шару на поверхні золотого дискового електрода для покращення його адсорбційних властивостей [5]. Піруватоксидаза була іммобілізована на поверхні самозбірного моношару за допомогою глутарового альдегіда. Динамічний діапазон визначення концентрації пірувату – в межах 2,5 – 50 мкМ, а час відгуку – 2 с для амперометричного методу та 6 с для вольтамограм.

**1.4.3. Біосенсорні системи та мультибіосенсори для одночасного визначення пірувату та лактату.** Як вказувалось раніше, одночасне визначення лактату та пірувату є корисним в ряді випадків. Тому було розроблено низку ензимних та бактеріальних мультибіосенсорів та біосенсорних систем для одночасного визначення лактату та пірувату, їх характеристики наведені в Додатку 4.

Так, Sanbay et al. розробили біосенсорну систему для одночасного визначення лактату та пірувату на основі бактерій *Lactobacillus delbrueckii*, іммобілізованих у шарі поліпіролу шляхом електрополімеризації. Біосенсорна система була застосована для визначення субстратів у молоці та кефірі [77].

Revzin et al. розробили біосенсорний масив для одночасного визначення глюкози, лактату та пірувату. Золоті електроди були функціоналізовані хемісорбцією негативно зарядженої 11-меркаптоундеканої кислоти з подальшим утворенням нанокompatитної плівки з осміївмісних полімерів та оксидоредуктаз - глюкозооксидази,

піруватоксидази, лактатоксидази. Проблему можливості перехресного впливу автори вирішували, тестуючи біосенсори індивідуально, та у складі масиву. Оскільки відгук пари електродів був приблизно вдвічі більший ніж одинарного електрода, це вважалось показником відсутності перехресного впливу між біосенсорами [78].

Tatsuma et al. розробили мультисистему для одночасного визначення пірувату, лактату, холестеролу та сечової кислоти. На поверхні кожного електроду із оксиду олова розміщувався шар, що містив пероксидазу хрому та шар, що містив відповідну до субстрату оксидазу. Використання двоензимної структури було спрямоване на те, щоб зменшити кількість ензиму на один електрод. Лінійний діапазон для лактату та пірувату становив  $10^{-6} - 10^{-4}$  М. Однак, стабільність біосенсорів а також питання перехресного впливу у цій роботі не досліджувались [61].

#### 1.4.4. Комерційні системи для визначення концентрацій лактату.

На сьогодні існує кілька комерційних біосенсорів для визначення концентрацій лактату в крові (таблиця 1.1).

*Таблиця 1.1.*

#### Комерційні біосенсорні системи для визначення лактату

Комерційна назва приладу	Мінімальна межа визначення, ммоль/л	Час вимірювання, с	Об'єм проби крові	Стабільність	Посилання
Lactate Pro 2 LT-1730	0,5	15	0,3 мкл	18 місяців	[79]
Biosen	0,5	20-45	20 мкл	50 днів	[80]
StatStrip	0,3	13	0,6 мкл	-	[81]
ApexBio	0,7	45	3 мкл	-	[82]



Так, система для одночасного визначення концентрацій лактату та глюкози фірми Biosen використовує цільну капілярну кров і не потребує її обробки, час вимірювання складає 20–45 с [3]. Система для моніторингу лактату фірми ArxVio також використовує цільну кров, яка наноситься безпосередньо на тест-стрічку. Однак ця система працює в обмеженому діапазоні гематокриту 35% ~ 50%. Виробники пропонують використовувати систему передусім спортсменам для визначення зміни рівня лактату після тренування. Система фірми StatStrip орієнтована на визначення лактату в крові в клінічній практиці та в домашніх умовах з метою діагностики ранніх етапів сепсису.

### **1.5. Підсумки до розділу 1**

Одночасне визначення концентрацій лактату та пірувату є актуальним для клінічної діагностики та інших потреб, і на сьогодні з цією метою було розроблено низку електрохімічних монобіосенсорів та біосенсорних систем.

Наявні біосенсори для визначення лактату та пірувату переважно представлені монобіосенсорами для клінічних, харчових та інших потреб. Щодо мультибіосенсорів для визначення концентрації цих субстратів, то в науковій літературі є всього кілька прикладів таких систем, які перебувають на ранніх стадіях розробки і які ще не тестували з реальними зразками.

Тому перспективним є розроблення біосенсорної системи для одночасного визначення концентрації лактату та пірувату. При цьому слід врахувати особливості роботи з реальними зразками та уникнути перехресного впливу субстратів на відгуки монобіосенсорів. Використання такої системи дасть можливість моніторингу лактату та пірувату та їхнього співвідношення в крові пацієнтів та спортсменів.

## РОЗДІЛ 2

### МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ

#### 2.1. Матеріали

В роботі використовували ензими: лактатоксидазу (ЛОД) із *Pedococcus sp.* (КФ 1.1.3.2) з активністю 35 од. акт. мг<sup>-1</sup> (Sigma–Aldrich Chimie, Німеччина) та піруватоксидазу (ПОД) з *Aerococcus sp.* (КФ 1.2.3.3) з активністю 54 од. акт. мг<sup>-1</sup> тієї ж фірми. Як субстрати використовували лактат натрію (Sigma–Aldrich Chimie, США) і піруват натрію (Sigma–Aldrich Chimie, Японія). Як компоненти біоселективних мембран використовували бичачий сироватковий альбумін (БСА), фотополімер полівінілалкоголь, що містить стирилпіридинові групи (PVA-SbQ), 25% водний розчин глутарового альдегіду (Sigma–Aldrich Chimie, США) Для виготовлення захисної мембрани використовувався *m*-фенілендіамін, (Sigma–Aldrich Chimie, США). Як робочий буферний розчин використовували HEPES-NaOH (Sigma–Aldrich Chimie, США) та фосфатний буферний розчин (KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>-NaOH). Як додаткові компоненти робочого буферного розчину використовувався тіамінпірофосфат (ТПФ) виробництва «Biofarma», Україна (ліофілізат для приготування розчинів для ін'єкцій), та Mg(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub> (Sigma–Aldrich Chimie, Німеччина). Інші неорганічні сполуки, що використовувалися в роботі, були вітчизняного виробництва та мали ступінь чистоти «хч» та «чда».

Мікрочастинки силікаліту були синтезовані штучно, їх характеристики описані в таблиці 2.1. Тетраетилортосилікат (TEOS) виступав джерелом кремнію, тетрапропіламмонію гідрохлорид (ТРАОН) виступав як шаблон. Вихідна суміш для синтезу містила сполуки у

наступних молярних співвідношеннях: ТРАОН : 5 TEOS : 500 H<sub>2</sub>O. Суміш перемішували за кімнатної температури впродовж 6 годин, після чого ставили в термостат на 18 годин при 125 °С. Отримані тверді частинки центрифугували при 13000 об./хв., відмивали деіонізованою водою та висушували при 80 °С.

Таблиця. 2.1.

### Характеристики мікрочастинок силікаліту

Тип мікрочастинок	Розмір частинок (мкм)	Площа поверхні (м <sup>2</sup> /г)	Об'єм пор (см <sup>3</sup> /г)	Діаметр пор (Å)
Силікаліт	0,45	281,7	2	5

Для виготовлення мультибіосенсорного масиву використовували також наступні ензими: глутаматоксидаза (ГЛОД, ЕС 1.4.3.11) зі *Streptomyces sp.* (рекомбінантна) з активністю 7 од. акт./мг (Yamasa Corporation, Японія), глюкозооксидаза (ГОД, ЕС 1.1.3.4) з *Aspergillus niger* з активністю 272 од. акт./мг (Genzyme, Великобританія), холіноксидаза (ХО, ЕС 1.1.3.17) з *Alcaligenes sp.* з активністю 15 од. акт./мг та ацетилхолінестераза (АХЕ, ЕС 3.1.1.7) з *Electrophorus electricus* з активністю 426 од. акт./мг (Sigma-Aldrich, США). Хлорид ацетилхоліну, хлорид холіну, глутамат натрію, аскорбінова кислота, дофамін, цистеїн, парацетамол та сечова кислота були виробництва Sigma-Aldrich (США).

Зразки сироватки крові людини були люб'язно надані Інститутом ендокринології та обміну речовин ім. В.П. Комісаренка Національної академії медичних наук України. Зразки містили відносно невеликі концентрації пірувату (до 50 мкМ), тому в декілька зразків було штучно додано піруват для перевірки роботи біосенсорної системи в усьому діапазоні можливих концентрацій пірувату і співвідношень лактату до пірувату.

## 2.2. Конструкція амперометричних перетворювачів

Платинові дискові електроди (рис. 2.1) виготовляли в нашій лабораторії за наступною технологією: шматочок платинового дроту діаметром 0,5 мм і довжиною 3 мм поміщали в звужений з одного боку скляний капіляр з зовнішнім діаметром 3,5 мм, після чого звужений кінець капіляру із платиною у середині герметизували запаюванням в полум'ї пальника. Електричне з'єднання платини з провідником у вигляді срібного дроту забезпечували низькотемпературним запаюванням за допомогою сплаву Вуда. Відкритий кінець капіляру заповнювали епоксидною смолою, частина провідника знаходилась в середині капіляру, а частина залишалась ззовні, до нього в свою чергу припаювали мідний контакт, необхідний для з'єднання з вимірювальною установкою.

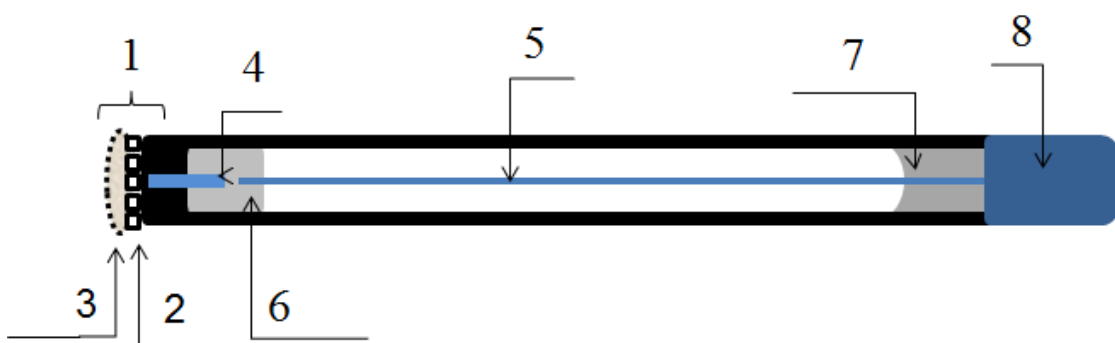


Рис. 2.1. Схематичне зображення амперометричного біосенсора на основі платинового електрода, що складається з чутливої ділянки (1), на якій нанесено шар поліфенілендіаміну (2), та шару іммобілізованої лактатоксидази або піруватоксидази (3), платинового дроту (4), внутрішнього провідника (5), електричного з'єднання за допомогою легкоплавкого сплаву Вуда (6), епоксидної смоли (7) та контактного майданчика (8)

Перед першим використанням, робоча частина електроду зі впаяною платиною проходила механічну обробку (шліфування) наждачним папером та за допомогою мікрочастинок оксиду алюмінію (розміром 0,3 мкм та 0,05 мкм). При необхідності, робоча поверхня платинового електрода поновлювалася за допомогою повторного шліфування.

Фотографія використаного в роботі перетворювача приведена на рис. 2.2.

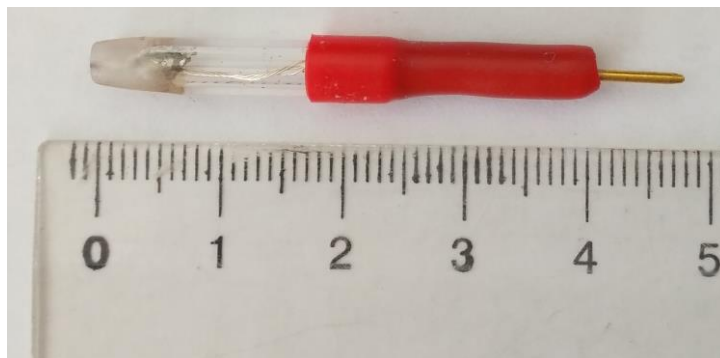


Рис. 2.2. Зовнішній вигляд амперометричного перетворювача на основі платинового дискового електрода

### **2.3. Схема експериментальної установки для амперометричних вимірювань**

Використовувалась триелектродна схема амперометричного аналізу, наведена на рис. 2.3.

Робочі амперометричні перетворювачі на основі платинових дискових електродів, допоміжний платиновий електрод та Ag/AgCl електрод порівняння (хлорсрібний) підключали до потенціостату PalmSens (Palm Instruments BV, Нідерланди). 8-ми канальний пристрій (CH-8 multiplexer, Palm Instruments BV, Нідерланди), що підключали до потенціостату, дозволяв отримувати сигнали одночасно з декількох (до 8-ми) робочих електродів або біосенсорів. Відстань між допоміжним платиновим електродом та усіма робочими біосенсорами в процесі вимірювання була однаковою і складала приблизно 5 мм.



Рис. 2.3. Схема вимірювальної установки для амперометричних вимірювань

Фотографія вимірювальної установки для амперометричних вимірювань приведена на рис. 2.4.

Вимірювання проводили за кімнатної температури у відкритій вимірювальній комірці об'ємом 2 мл при постійному перемішуванні та при постійному потенціалі +0,6 В відносно Ag/AgCl електрода порівняння. Як робочі буфери використовували 25 мМ HEPES, рН 7,4, та 50 мМ фосфатний буфер, рН 6,5, до яких, за необхідності, додавали кофактори піруватоксидази – іони магнію, ТПФ та фосфат-іони. Усі вимірювання проводили щонайменше у трьох повторностях.



Рис. 2.4. Зовнішній вигляд вимірювальної установки для амперометричних вимірювань

#### **2.4. Методика нанесення поліфенілендіамінової мембрани**

Для забезпечення селективності біосенсорів до пероксиду водню у присутності електроактивних інтерферентів, які наявні у реальних зразках біоматеріалу, використовували захисну мембрану із поліфенілендіаміну (ПФД). Для формування ПФД мембрани на робочій поверхні амперометричних перетворювачів, очищені робочі електроди, допоміжний електрод та електрод порівняння занурювали у свіжоприготований розчин 5 мМ *m*-фенілендіаміну у 10 мМ калій-фосфатному буферному розчині, після чого отримували 10-15 циклічних вольтамперограм. Параметри циклічних вольтаграм 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. Проводили висушування

електродів на повітрі, після чого поверх ПФД мембрани формували ензимовмісну мембрану.

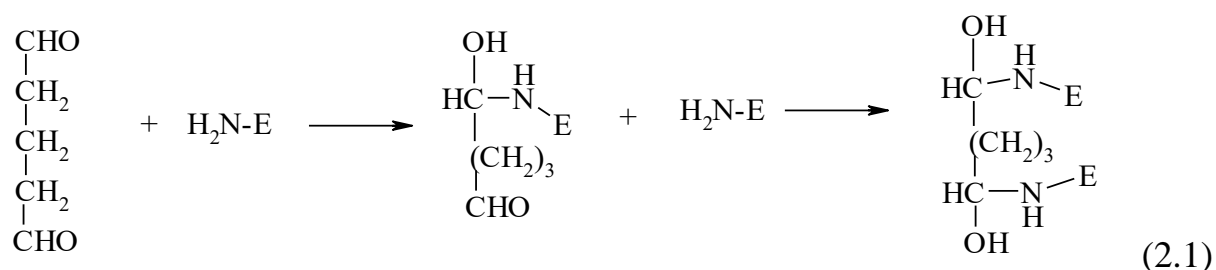
## 2.5. Методика формування біоселективних мембран

Біоселективні елементи біосенсорів формували шляхом іммобілізації ензимів і допоміжних речовин на поверхні амперометричного перетворювача. Вихідний розчин для іммобілізації лактатоксидази містив 8 % (тут і далі – масова частка) ЛОД, 4 % БСА, 10 % гліцеролу в 100 мМ фосфатному буферному розчині, рН 6,5. Вихідний розчин для іммобілізації піруватоксидази містив 20% ПОД, 5% БСА, 10% гліцеролу в 100 мМ фосфатному буферному розчині, рН 6,5. Гліцерол додавали, щоб стабілізувати ферменти впродовж їх іммобілізації та запобігти передчасному висиханню краплі і поліпшити адгезію мембрани до поверхні перетворювача.

Нами було використано 3 методики іммобілізації ензимів. Після кожної іммобілізації, біосенсори відмивали в робочому буферному розчині від незв'язаних компонентів біоселективної мембрани.

Іммобілізація ензимів шляхом поперечного зшивання глутаровим альдегідом.

Біфункціональний агент глутаровий альдегід містить дві альдегідні групи, які вступають в реакцію з вільними аміногрупами білків при нейтральному рН. Для іммобілізації ензиму використовується зшивання молекул ензиму та БСА за допомогою глутарового альдегіду (2.1), з утворенням полімерної мембрани:





Між глутаровим альдегідом та аміногрупами білків утворюються ковалентні зв'язки, які стійкі до змін рН та температури. Тому ензим іммобілізується досить міцно, проте при цьому може змінюватися його конформація і, відповідно, може знижуватися його активність. Також можливе просторове блокування активних центрів ензимів. До недоліків даного методу іммобілізації можна віднести і токсичність зшивавального агента.

Вихідний розчин, що містив ензими, змішували з 0,7 %, 0,5 % або 0,3 % водним розчином глутарового альдегіду (зшиваючого агенту) у пропорції 1:1. Одразу після цього суміш наносили на робочі поверхні перетворювачів та висушували впродовж 40 хв. на повітрі за кімнатної температури.

#### Іммобілізація шляхом адсорбції на поверхні частинок силікату.

Перед проведенням адсорбції проводили модифікацію поверхні перетворювачів силікалітом. Для цього використовували 10%-ну суспензію силікаліту у дистильованій воді. Невеликий об'єм (0,2 мкл) розчину силікаліту наносили на чутливу частину електрода, після чого перетворювач нагрівали до 100 °С впродовж 5 хв. у термостаті. Така температура не впливала на силікаліт та на робочі характеристики перетворювача. В результаті цього, на перетворювачах було сформовано закріплений шар силікаліту. Потім на чутливу область наносили розчин ензиму та очікували 15 хв для адсорбції ензиму на силікаліті.

#### Іммобілізація шляхом інкапсуляції ензиму в фотополімері PVA-SbQ.

Вихідний розчин, що містив ензими, змішували з 13,3%-ним водним розчином PVA-SbQ у пропорції 1:1. Одразу після цього суміш наносили на чутливу поверхню перетворювача і опромінювали її ультрафіолетом впродовж 20 хв. за допомогою УФ лампи КФ-4М для формування мембран при довжині хвилі 365 нм, відстань від лампи до перетворювача становила 5 см.

## 2.6. Методика конструювання мультибіосенсорного масиву

При виготовленні мультибіосенсорного масиву, як робочі електроди використовували платинові дискові електроди, аналогічні до тих що використовували для виготовлення монобіосенсорів для визначення лактату та пірувату. Біоселективні елементи біосенсорів для визначення глутамату, глюкози, холіну та ацетилхоліну отримували шляхом поперечного зшивання ферментів і допоміжних речовин на поверхні перетворювачів. Зшиваючим агентом виступав глутаровий альдегід, який формує ковалентні зв'язки з аміногрупами ферменту та білків-носіїв.

Вихідний розчин для виготовлення глутамат-чутливого біосенсора містив 8% (тут і дали – масова частка) ГЛОД, 4% БСА та 10% гліцеролу в 100 мМ фосфатному буферному розчині, рН 6,5. Цей розчин змішували з 0,4% водним розчином глутарового альдегіду в співвідношенні 1:1 і одразу наносили на чутливу поверхню перетворювача, після чого перетворювач висушували впродовж 40 хв за кімнатної температури. Після іммобілізації біосенсор розміщували у робочій комірці і відмивали від незв'язаних компонентів біомембрани робочим буферним розчином.

Іммобілізація ферментів при створенні інших біосенсорів проводили за аналогічною процедурою, проте концентрація глутарового альдегіду та час іммобілізації могли відрізнятися, бо були підібрані раніше для кожного біосенсора. Так, розчин для створення біосенсора для визначення глюкози містив 5 % ГОД, 3 % БСА, 10 % гліцеролу у 20 мМ фосфатному буферному розчині, рН 6,5. Концентрація розчину глутарового альдегіду становила 0,4 %, час іммобілізації складав 40 хв. Розчин для створення біосенсора для визначення холіну містив 8 % ХО, 4 % БСА, 10 % гліцерину у 100 мМ фосфатному буферному розчині, рН 6,5. Концентрація розчину глутарового альдегіду становила 1,6 %, час іммобілізації складав 10 хв. Для створення біосенсора для визначення ацетилхоліну проводили дві послідовні іммобілізації – спершу наносили АХЕ, а потім ХО. Розчин,

що містив 0,5 % АХЕ, 5 % БСА, 10 % гліцерину у 100 мМ фосфатному буферному розчині, рН 6,5, змішували з 1%-ним розчином глутарового альдегіду і наносили на перетворювачі на 10 хвилин. Після цього, розчин, що містив 8 % ХО, 4 % БСА, 10 % гліцерину у такому ж буферному розчині, змішували з 1,6%-ним розчином глутарового альдегіду і проводили іммобілізацію впродовж 10 хв.

## **2.7. Методика визначення концентрації лактату у реальних зразках сироватки крові за допомогою спектрофотометричного вимірювання**

Для спектрофотометричного вимірювання концентрацій лактату та пірувату застосовували кольорові реакції.

Вимірювання проводили у пластикових кюветах об'ємом 1 мл. У кювету додавали: 0,3 мМ ЕМГК, 0,1 мМ 4-аміноантипірину, 1 од. акт. пероксидази хрому, 25 мМ НЕРЕС, рН 7,4, та аліквоту сироватки крові конкретного пацієнта (10 мкл для визначення лактату та 100 мкл для визначення пірувату). Реакцію запускали додаванням 0,56 од. акт. лактатоксидази або 0,74 од. акт. піруватоксидази. Лактат окиснювався ЛОД до пірувату і пероксиду водню, який в присутності пероксидази реагував з ЕМГК з утворенням фіолетової сполуки. Інтенсивність забарвлення була пропорційна концентрації лактату у пробі. Аналогічно відбувалось і визначення пірувату, оскільки ПОД окиснювала піруват і утворювала пероксид водню.

Оскільки сироватка крові може мати певне забарвлення навіть у розведеному вигляді, а також містити власний пероксид водню, значення абсорбції досліджуваного розчину перед додаванням ЛОД чи ПОД прирівнювали до нуля. Після цього в кювету додавали ЛОД чи ПОД і інкубували впродовж 5 хв, після чого вимірювали значення абсорбції проби. Підбір оптимального часу інкубації було проведено попередньо.

Вимірювання абсорбції (інтенсивності поглинання світла розчином) розчину сироватки проводили спектрофотометром Bio Mate 5 (Thermo Electron Corporation, США). На початку роботи було підібрано оптимальну довжину хвилі світла для вимірювання абсорбції – найвищий пік поглинання продукту реакції спостерігали при довжині хвилі 555 нм, і тому всі спектрофотометричні вимірювання проводили саме при цій довжині хвилі.

Абсорбцію невідомого зразку порівнювали з попередньо отриманими калібрувальними кривими, які показували залежність абсорбції розчину від концентрацій лактату та пірувату.

## **2.8. Методика статистичної обробки отриманих результатів**

Результати представлені як середньо квадратичне значення  $\pm$  квадратична похибка середнього значення за результатами  $n$  незалежних експериментів. Різницю між двома групами оцінювали з використанням  $t$ -тесту Стюдента. Різниця вважалася статистично достовірною, коли  $P \leq 0,05$ .

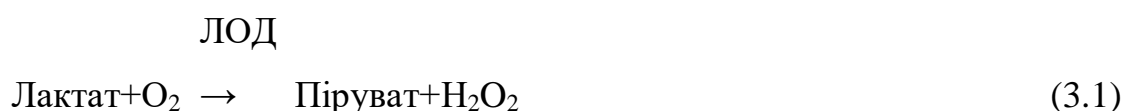
## РОЗДІЛ 3

### РОЗРОБКА ЛАКТАТ-ЧУТЛИВОГО МОНОБІОСЕНСОРА

Як було показано в огляді літератури, визначення концентрації лактату є актуальним у клінічній практиці. Раніше описані лабораторні прототипи лактат-чутливих біосенсорів переважно базувались на використанні ензимів лактатоксидази та лактатдегідрогенази.

#### 3.1. Принцип роботи лактат-чутливого біосенсора

В основі роботи амперометричного лактат-чутливого біосенсора лежить ензиматична реакція (3.1), яка відбувається в біоселективній мембрані. Внаслідок реакції відбувається окиснення лактату до пірувату та утворення пероксиду водню, що є електрохімічно-активною речовиною. Прикладення позитивного потенціалу до платинового дискового електрода (+0,6 В відносно Ag/AgCl електрода порівняння) викликає реакцію окиснення пероксиду водню (3.2), в результаті якої утворюються вільні електрони. Вони забезпечують посилення струму (пропорційне концентрації лактату), яке безпосередньо реєструється біосенсором:



Чутливу ділянку біосенсора, під'єданого до приладу для амперометричних вимірювань, занурювали у вимірювальну комірку, робочий об'єм якої складав 2 мл, заповнену 10 мМ буферним розчином HEPES, рН 7,4, та витримували декілька хвилин для отримання початкової стабільної величини сили струму (стабільної базової лінії). Потім додавали певну аліквоту модельного розчину лактату і отримували сигнал біосенсора. Цей сигнал автоматично оброблявся комп'ютером і виводився у графічному вигляді на екран монітора.

На рис. 3.1 приведено типовий вигляд біосенсорних відгуків на лактат. Після отримання кожного відгуку біосенсор відмивали від компонентів ферментативної реакції, змінюючи робочий буфер мінімум 3 рази.

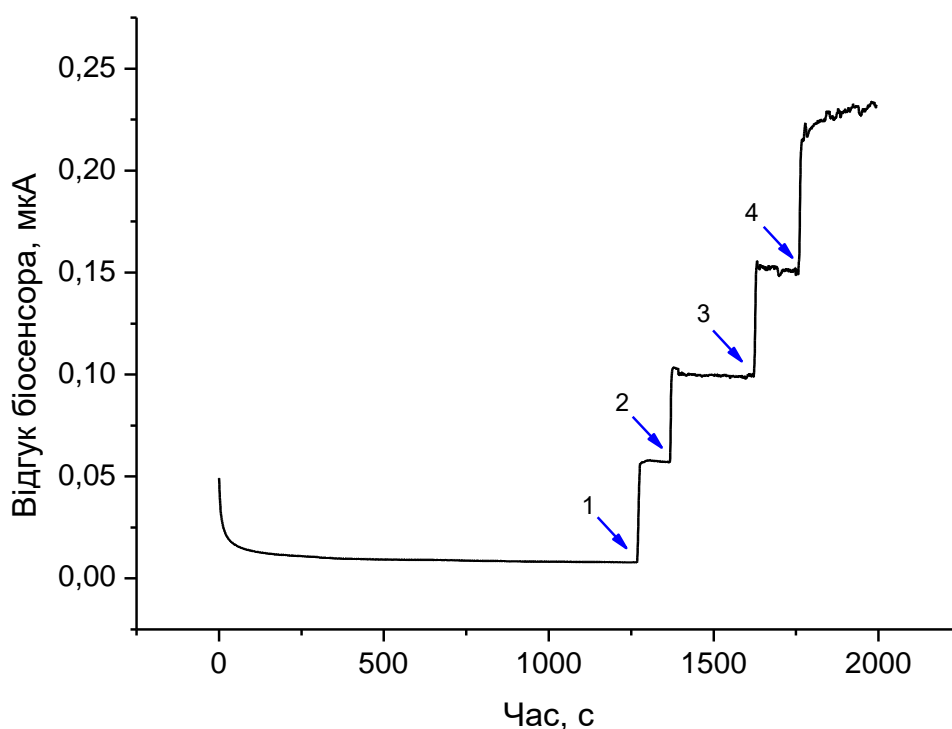


Рис. 3.1. Реальний вигляд відгуків лактат-чутливого біосенсора на послідовне додавання різних концентрацій лактату. Концентрації лактату у вимірювальній комірці: 0,3 мМ (1), 0,3 мМ (2), 0,4 мМ (3), 1 мМ (4). Вимірювання проводили у 25 мМ HEPES, рН 7.4, за постійного потенціалу +0,6 В відносно Ag/AgCl електрода порівняння

### 3.2. Визначення оптимального потенціалу для максимальної чутливості амперометричних перетворювачів до пероксиду водню

На початку роботи нами було досліджено залежність відгуків (величини струму) платинового дискового електроду  $d=0,4$  mm, що використовували як робочий амперометричний перетворювач, на 1 мМ концентрацію пероксиду водню від величини прикладеного потенціалу в діапазоні потенціалів 0,5-0,9 В з кроком 0,1 В (рис. 3.2).

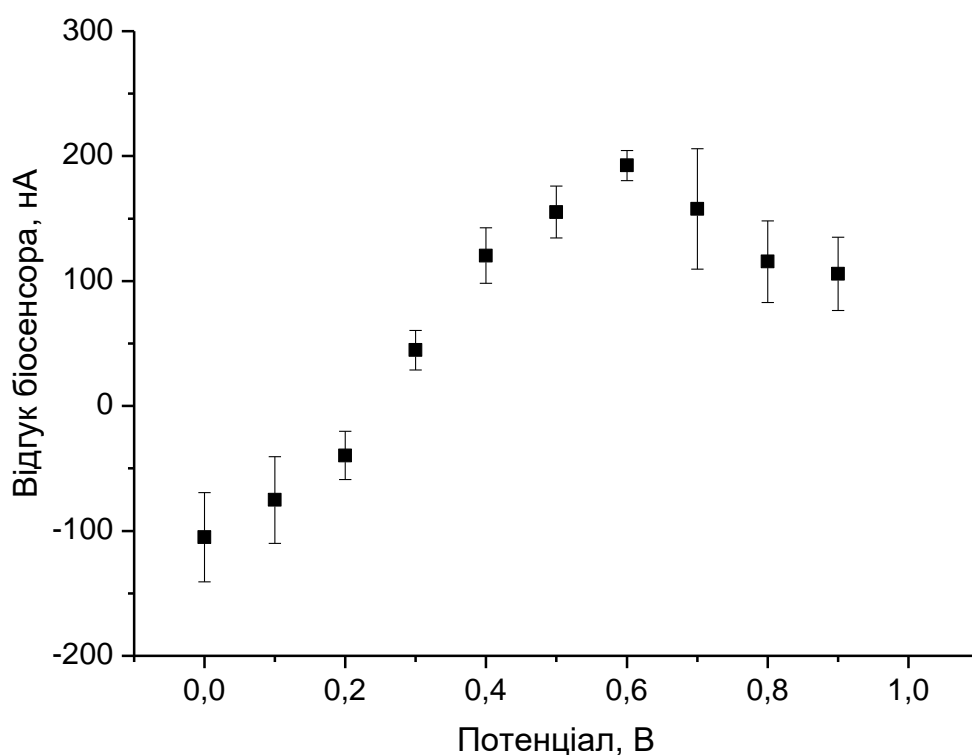


Рис. 3.2. Залежність величини відгуків амперометричного перетворювача від прикладеного потенціалу. Концентрація пероксиду водню – 1 мМ. Вимірювання проводили у 5 мМ фосфатному буферному розчині, рН 6,5

Як оптимальний потенціал для подальших досліджень було обрано 0,6 В відносно Ag/AgCl електрода порівняння.

### 3.3. Забезпечення селективності перетворювачів до перексиду водню

При роботі з реальними зразками біологічних рідин, важливим параметром є стійкість біосенсорів до інтерферуючих електроактивних речовин, присутніх у зразках. Оскільки нами був використаний безмедіаторний біосенсор з відносно високим робочим потенціалом (+0,6 В відносно Ag/AgCl електрода порівняння), на поверхні електрода можливе окиснення ряду електроактивних сполук.

Для запобігання цьому, на поверхню електроду була нанесена мембрана із полі-*m*-фенілендіаміну. Ця мембрана пропускала до поверхні електроду перекис водню, проте запобігала дифузії більших молекул.

Для підтвердження ефективності застосування такої мембрани, необхідно було перевірити величину відгуку амперометричних перетворювачів на внесення поширених у біологічних рідинах електроактивних сполук, а саме: дофаміну (6 мкМ), цистеїну (300 мкМ), аскорбінової кислоти (120 мкМ), сечової кислоти (450 мкМ) та парацетамолу (100 мкМ), до та після нанесення ПФД-мембрани.

Як видно з рис. 3.3. відгуки біосенсорів на дані електроактивні речовини були практично відсутні (< 0,2 нА), що свідчить про високу ефективність ПФД захисної мембрани.



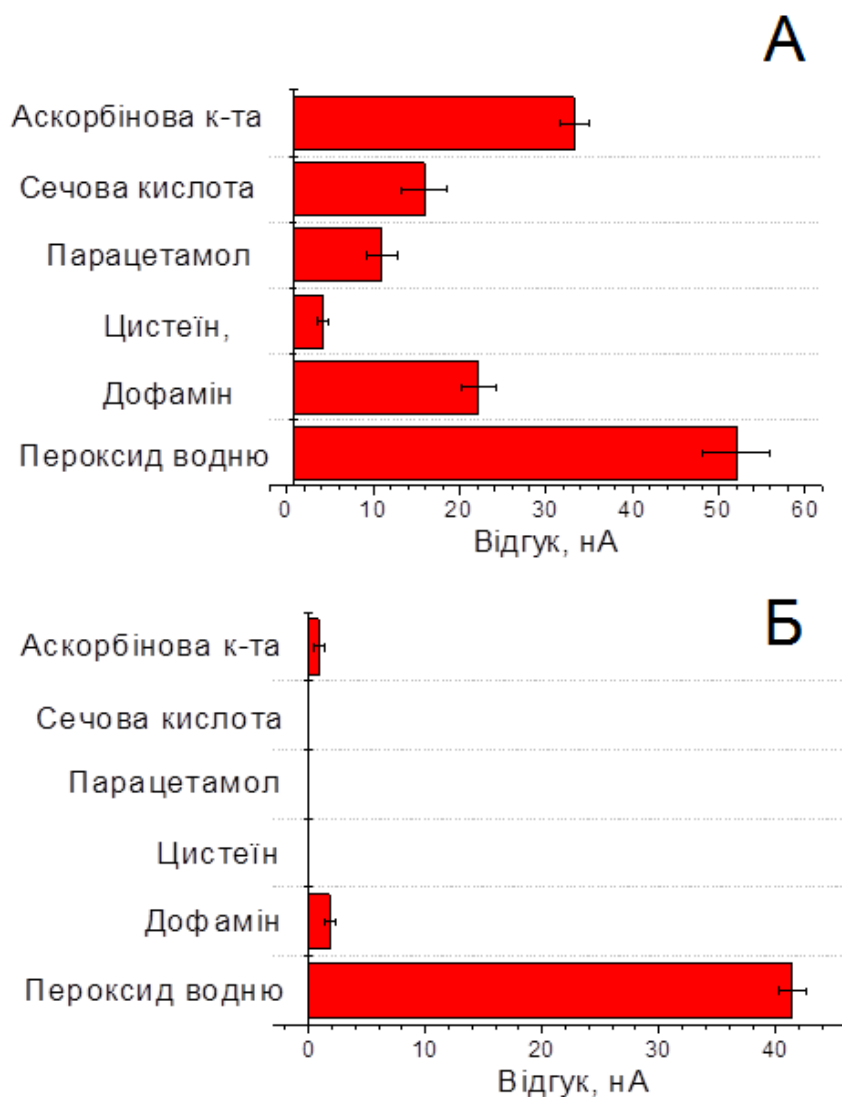


Рис. 3.3. Відгуки амперометричних перетворювачів на електроактивні речовини до (А) та після (Б) нанесення ПФД-мембрани. Вимірювання проводили у 5 мМ НЕРЕС буферному розчині, рН 7,4, за постійного потенціалу +0,6 В відносно Ag/AgCl електрода порівняння

### 3.4. Визначення оптимальних умов іммобілізації лактатоксидази

На сьогодні існує певна кількість лабораторних прототипів біосенсорів на основі іммобілізованих оксидаз. Для створення біоселективного елемента біосенсора нами було обрано ензим лактатоксидаза із *Aerococcus*, та, на основі аналізу літератури про

властивості іммобілізованої за допомогою різних методик лактатоксидази ми обрали метод поперечного зшивання ГА.

Першим етапом нашої роботи по створенню біоселективного елементу біосенсора став підбір оптимальних параметрів іммобілізації лактатоксидази. Одним з найбільш впливових факторів є концентрація ГА в вихідній суміші ензимовмісної мембрани. Як відомо з літератури, занадто низька концентрація ГА призводить до незв'язування великої кількості ензиму і вимивання його з мембрани, що призводить до швидкої втрати активності ензиму та нестабільності відгуку біосенсора. В той же час надмірна концентрація ГА призводить до інактивації ензиму і, як наслідок, низької чутливості біосенсора.

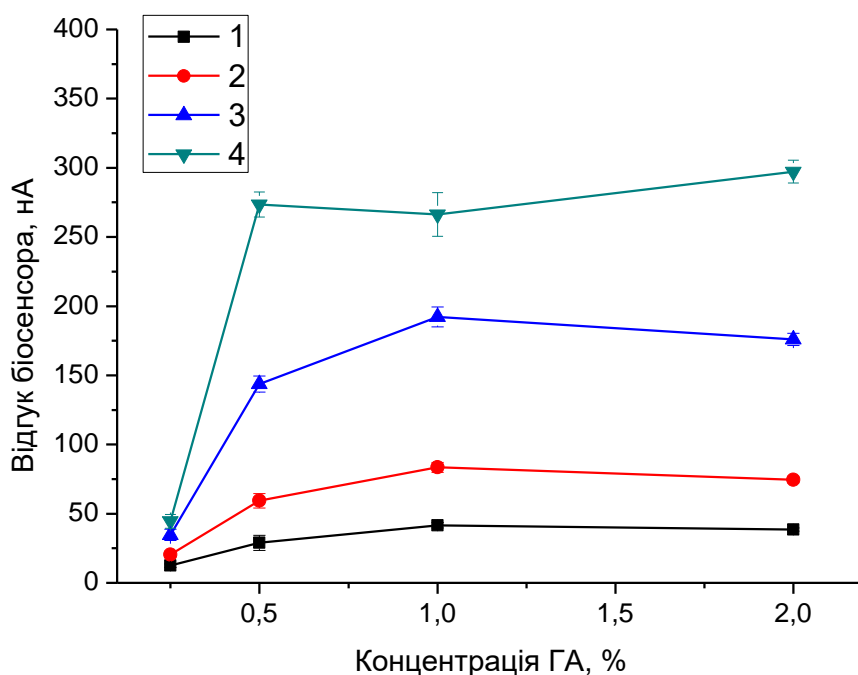


Рис. 3.4. Вплив концентрації ГА в вихідній суміші ензимовмісної мембрани на відгук біосенсора. Концентрація лактату: 100 мкМ (1), 200 мкМ (2), 500 мкМ (3), 1000 мкМ (4). Вимірювання проводили у 25 мМ НЕРЕС, рН 7,4, за постійного потенціалу +0,6 В відносно Ag/AgCl електрода порівняння

Нами було проведено порівняння відгуків біосенсорів при іммобілізації при різних концентраціях ГА на лактат у діапазоні 100 до 1000 мкМ. При іммобілізації було використано 5% розчин лактатоксидази, розчин ГА змінної концентрації, час іммобілізації 40 хв.

Як видно з рис. 3.4, оптимальною концентрацією ГА є 1%, тому саме цю концентрацію ми використовували надалі.

### **3.5. Вплив характеристик буферного розчину на роботу лактат-чутливого біосенсора**

Як відомо з літератури, робота біосенсора може залежати як від його власних характеристик, так і від характеристики робочого розчину, зокрема буферної ємності та іонної сили аналізованого розчину [36].

У реальних біологічних системах, зокрема в крові, наявна велика кількість іонів, зокрема  $K^+$ ,  $Na^+$ ,  $Mg^{2+}$ ,  $Cl^-$ , бікарбонат іон, іони органічних кислот та ін. Електролітний баланс в крові може варіювати внаслідок різних фізіологічних та особливо патологічних процесів. Тому нами було проведено дослідження стабільності відгуку біосенсора в умовах різної іонної сили розчину. Експеримент проводили додаванням робочого буферного розчину NaCl різної концентрації від 1мМ до 50 мМ (рис. 3.5.) Концентрації NaCl вибирали з врахуванням іонної сили реальних біологічних зразків та можливих варіантів їх розведення. Значної розбіжності відгуків біосенсора при різних концентраціях NaCl не спостерігали. Це свідчить про можливість використання даного біосенсора для аналізу біологічних рідин, що характеризуються варіабельною іонною силою.

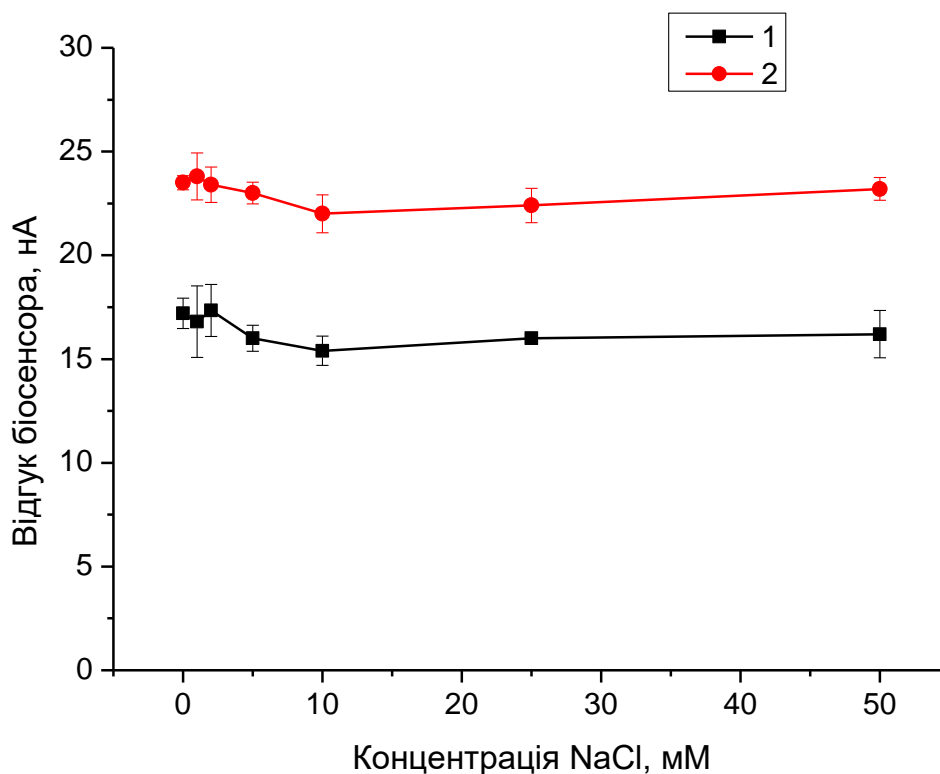


Рис. 3.5. Залежність величини відгуків лактат-чутливого біосенсора від іонної сили розчину. Концентрації лактату – 0,5 мМ (1) та 1 мМ (2). Вимірювання проводили у 10 мМ HEPES буферному розчині, рН 7,4, за постійного потенціалу +0,6 В відносно Ag/AgCl електрода порівняння

Оскільки біологічним системам у важких патологічних станах властива зміна буферного балансу, було вирішено дослідити також вплив концентрації буферного розчину на величину відгуків біосенсора. Для цього був використаний буфер HEPES в діапазоні концентрації від 1 до 25 мМ. На рис. 3.6 приведено результати проведеного експерименту.

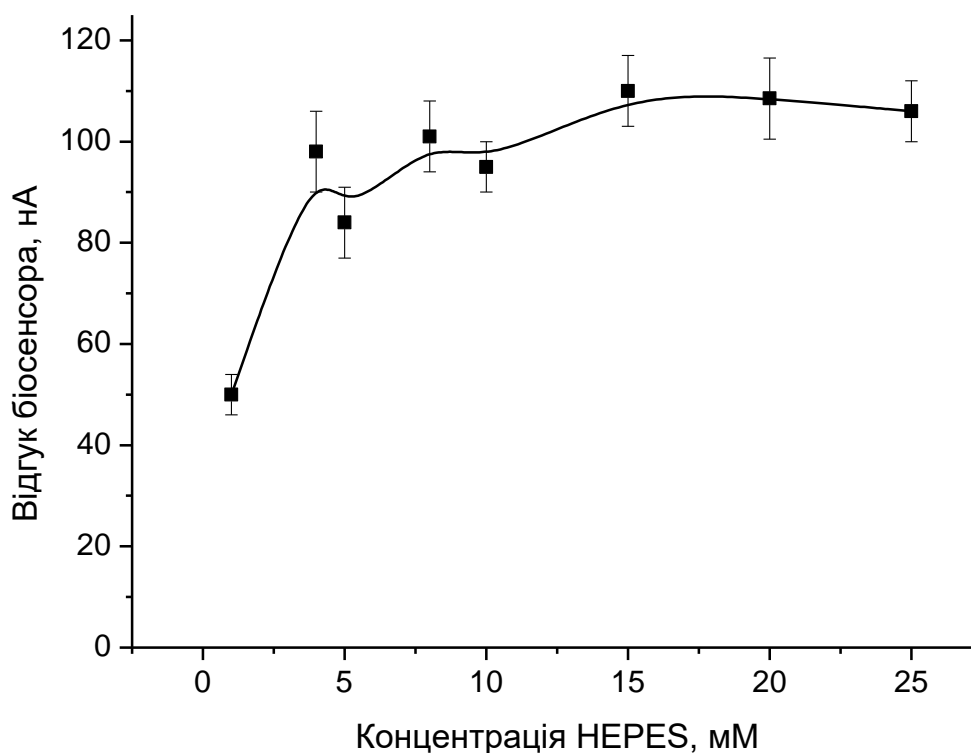


Рис. 3.6. Залежність величин відгуків лактат-чутливого біосенсора від концентрації робочого буферного розчину (буферної ємності розчину). Концентрація лактату – 0,5 мМ. Вимірювання проводили у НЕРЕС буферному розчині за різних концентрацій, рН 7,4, за постійного потенціалу +0,6 В відносно Ag/AgCl електрода порівняння

Величина відгуків біосенсора практично не змінювалась зі збільшенням концентрації буферного розчину, за винятком дуже малих концентрацій, що може бути пов'язано з недостатнім забезпеченням стабільності рН. Це дає можливість використовувати розроблений лактат-чутливий біосенсор в біологічних зразках, що характеризуються різними буферними ємностями.

Також оскільки кров та інші біологічні рідини містять високу концентрацію білків, було перевірено вплив зміни концентрації БСА на роботу біосенсора (рис. 3.7).

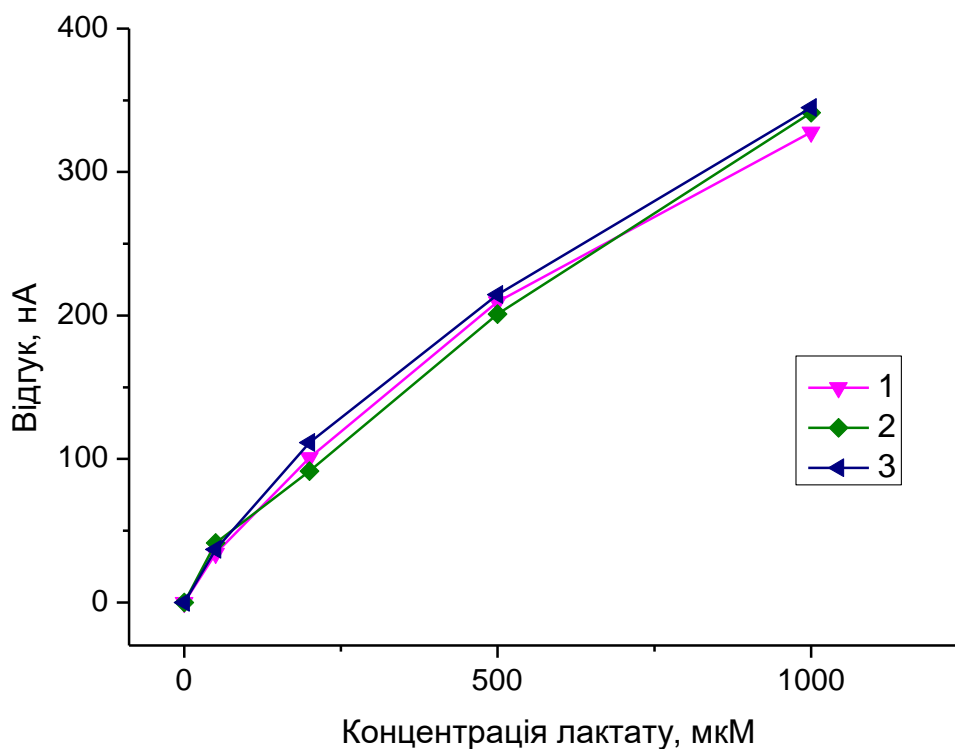


Рис. 3.7. Відгук лактат-чутливого біосенсора без (2) та у присутності 0,85% БСА (1), 0,4% БСА(3). Вимірювання проводили у 10 мМ HEPES буферному розчині, рН 7,4, за постійного потенціалу +0,6 В відносно Ag/AgCl електрода порівняння

Було показано, що зміна концентрації білка не призводить до зміни відгуку біосенсора, що свідчить про добру перспективу його застосування для визначення концентрацій лактату у зразках біоматеріалу, зокрема сироватці крові.

### **3.6. Стабільність біосенсора при безперервній роботі та при зберіганні**

Відтворюваність відгуків біосенсора впродовж роботи є одним з основних показників якості його роботи. Особливо це важливо при визначенні малих концентрацій. Тому нами було досліджено

відтворюваність відгуків біосенсорів впродовж кількох годин безперервної роботи. Результати дослідження відтворюваності відгуків біосенсорів на лактат представлено на рис. 3.8.

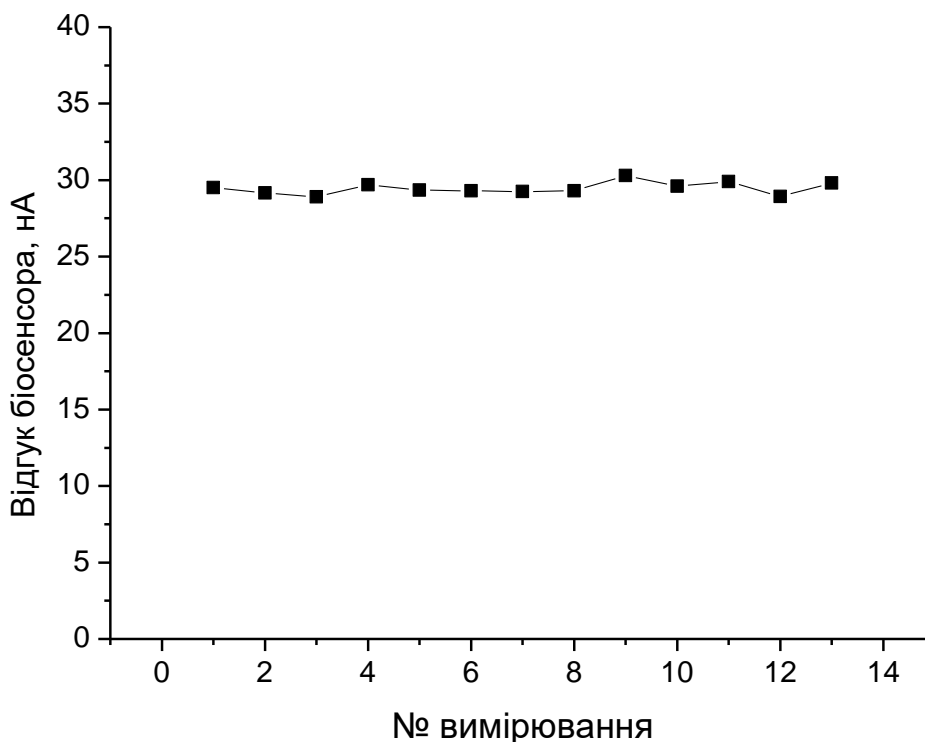


Рис. 3.8. Відтворюваність відгуків біосенсора на лактат при безперервній роботі. Концентрація лактату – 0,05 мМ. Вимірювання проводили у 10 мМ HEPES буферному розчині, рН 7,4, за постійного потенціалу +0,6 В відносно Ag/AgCl електрода порівняння

Одне вимірювання відгуку займало 5 хв, проміжок між ними – 4-5 хв., за цей час біосенсори відмивали від продуктів реакції кілька разів змінюючи робочий буферний розчин. Помітного падіння відгуків за 12 вимірювань не відбувалось; відносне середньоквадратичне відхилення відгуків на лактат в середньому становило 1,4 %.

Ще однією дуже важливою характеристикою біосенсора, є можливість його багаторазового використання впродовж тривалого часу. Інколи в процесі використання біосенсорів внаслідок перемішування робочого буферного розчину та інших чинників може відбуватися деяке

вимивання іммобілізованих компонентів з біоселективної мембрани та/або інактивація самого ензиму. Тому наступним етапом нашої роботи стала перевірка стабільності відгуків біосенсора при його зберіганні впродовж тривалого часу, а також вибір оптимальних умов зберігання.

Для цього лактат-чутливі біосенсори було вирішено зберігати в наступних умовах: 1) +4 °С, в сухому стані; 2) +4 °С, в буферному розчині; 3) -18 °С, в сухому стані; 4) +25 °С, в буферному розчині; 5) +25 °С, в сухому стані. Перевірка активності проводилась впродовж 30 днів з моменту створення біосенсорів, з періодичністю в 3-4 дні, а саме було проведено визначення відгуків на ідентичну концентрацію лактату. Результати дослідження представлено на рис. 3.9.

Так, при зберіганні в буферному розчині при +4 °С біосенсори зберігали 79% та 58% своєї початкової активності на 12-й та 30-й день зберігання відповідно, тоді як зберігання за цієї ж температури у сухому стані залишало лише 49% та 39% активності, відповідно. Було встановлено, що оптимальними умовами для зберігання лактат-чутливих біосенсорів є -18 °С в сухому стані та +4 °С за умови зберігання в буферному розчині. Зберігання при +4 °С в сухому стані є менш ефективним. Зберігання за кімнатної температури для даних лактат-чутливих біосенсорів є взагалі непридатним.



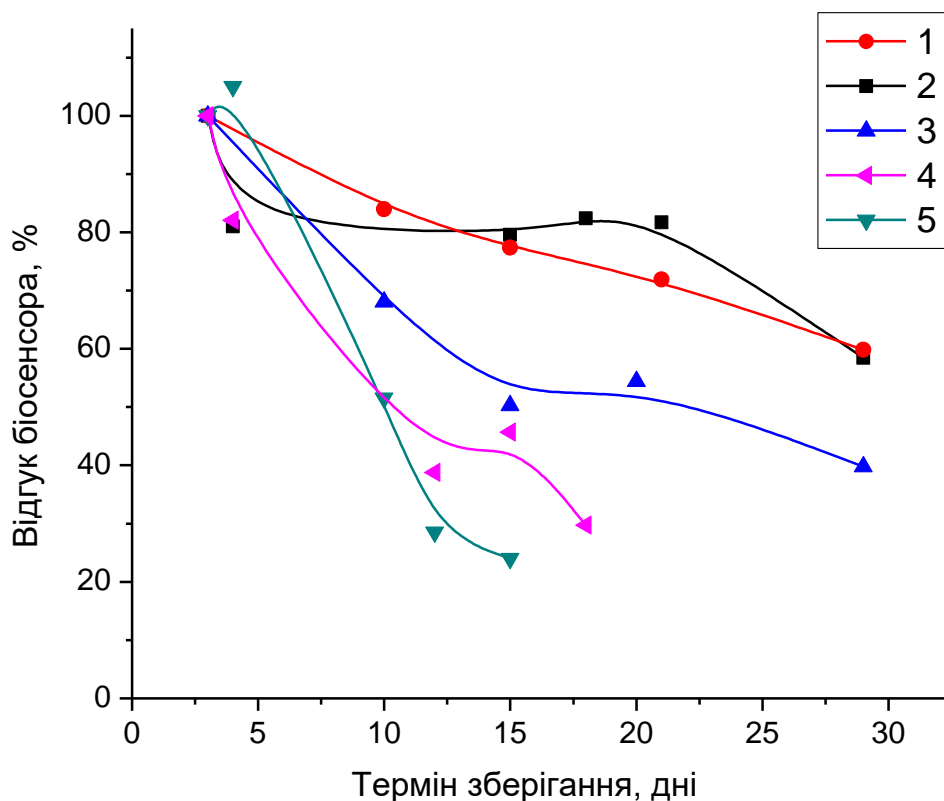


Рис. 3.9. Порівняльна динаміка відгуків біосенсорів на лактат за різних умов зберігання впродовж 30 днів:  $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$ , в сухому стані (1);  $+4\text{ }^{\circ}\text{C}$ , в буферному розчині (2);  $+4\text{ }^{\circ}\text{C}$ , в сухому стані (3);  $+25\text{ }^{\circ}\text{C}$ , в сухому стані (4);  $+25\text{ }^{\circ}\text{C}$ , в буферному розчині (5). Дані нормалізовані, за 100% прийнято перше вимірювання. Експеримент проводився у 10 мМ НЕРЕС буферному розчині, рН 7,4, за постійного потенціалу  $+0,6\text{ В}$  відносно  $\text{Ag}/\text{AgCl}$  електрода порівняння

### 3.7. Аналітичні характеристики лактат-чутливого біосенсора

Після розробки та оптимізації роботи лактат-чутливого біосенсора необхідно було визначити основні аналітичні характеристики запропонованого біосенсора.

Показано, що при використанні 10 мМ НЕРЕС буферного розчину, рН 7,4, як робочого буферного розчину, мінімальна межа визначення

лактату, яку вимірювали як концентрація лактату, що дає відгук в три рази більший за величину шуму базової лінії, становила 3 мкМ. Вона несуттєво змінювалась в залежності від конкретного біосенсора.

Лінійний діапазон роботи був від 5 мкМ до 300 – 350 мкМ (залежно від конкретного біосенсора), чутливість до лактату становила 204 нА/мМ. Типова калібрувальна крива лактат-чутливого біосенсора наведена на рис. 3.10.

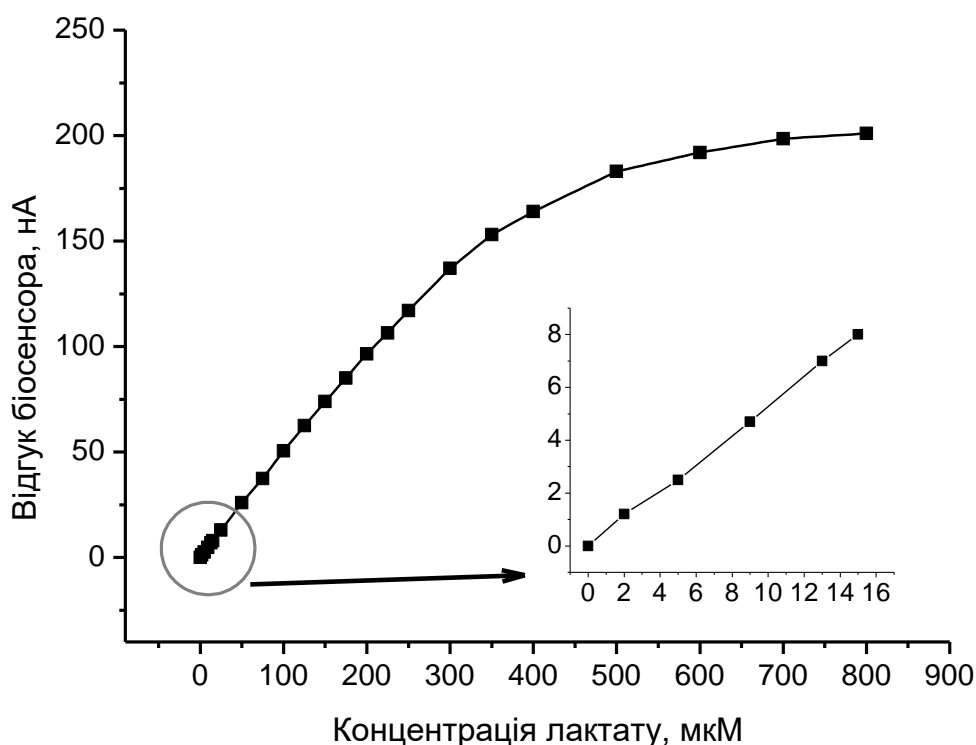


Рис. 3.10. Залежність величини відгуку лактат-чутливого біосенсора від концентрації лактату. Вимірювання проводили у 10 мМ НЕРЕС, рН 7,4; за постійного потенціалу +0,6 В відносно Ag/AgCl електрода порівняння

### 3.8. Підсумки до розділу 3

Було розроблено амперометричний біосенсор для визначення концентрації лактату в водних розчинах та визначено його основні аналітичні характеристики. Даний сенсор характеризувався хорошою відтворюваністю відгуків, також відносно незначним падінням активності

під час тривалого зберігання в оптимальних умовах. Оптимальними були умови зберігання біосенсора за температури  $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$  в сухому стані та за  $+4\text{ }^{\circ}\text{C}$  при зберіганні в буферному розчині (10 мМ HEPES, рН 7,4). Показано відсутність відчутного впливу зміни параметрів розчину (іонної сили в діапазоні 1-50 мМ NaCl та концентрації робочого буферного розчину в діапазоні 2-25 мМ) на роботу біосенсора. Лінійний діапазон визначення лактату становить від 5 мкМ до 300-350 мкМ, з мінімальною межею визначення лактату – 3 мкМ.

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

Топольнікова Я.В., Кучеренко І.С., Солдаткін О.О., Солдаткін О.П. Розробка амперометричного біосенсора для визначення лактату. *Тези всеукраїнської науково-практичної конференції «Біотехнологія: звершення та надії»*, Київ, 21-22 травня 2015, С. 106-107.

Топольнікова Я.В., Кучеренко І.С., Шкотова Л.В., Хоменко І.І., Дзядевич С.В., Солдаткін О.О. Розробка амперометричного біосенсора на основі лактатоксидази для визначення лактату. *Sensor Electronics and Microsystem Technologies*. 2016. Т. 13, № 1, С. 87-97.

Топольнікова Я.В., Солдаткін О.О., Солдаткін О.П. Оптимізація роботи амперометричного біосенсора для визначення лактату. *Тези конференції-конкурсу молодих учених “Актуальні проблеми біохімії та біотехнології – 2016”*, Київ, 26-27 травня 2016, С. 52.

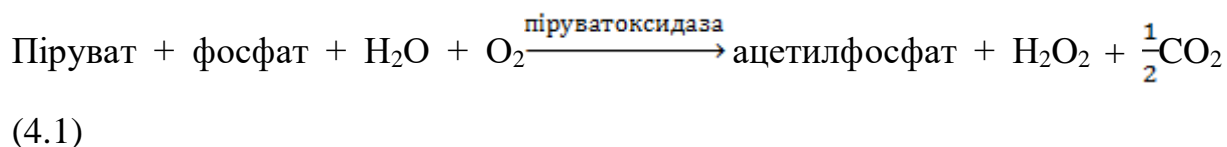
## РОЗДІЛ 4

### РОЗРОБКА ПІРУВАТ-ЧУТЛИВОГО МОНОБІОСЕНСОРА

Наступним етапом нашої роботи стала розробка піруват-чутливого монобіосенсора, оскільки визначення концентрації пірувату необхідне для розрахунку співвідношення лактату до пірувату, що є цінним діагностичним показником для аналізу станів лактатацидозу.

#### 4.1. Принцип роботи піруват-чутливого біосенсора

В основі роботи амперметричного піруват-чутливого біосенсора лежить ферментативна реакція (4.1), яка відбувається в біоселективній мембрані.



Внаслідок реакції відбувається окиснення пірувату з утворенням електрохімічно-активного пероксиду водню. Як і у випадку біосенсора для визначення концентрацій лактату, прикладення позитивного потенціалу до платинового дискового електрода (+0,6 В відносно Ag/AgCl електрода порівняння) викликає реакцію окиснення пероксиду водню (3.2), в результаті якої утворюються вільні електрони. Вони забезпечують посилення струму (пропорційне концентрації пірувату), яке безпосередньо реєструється біосенсором.

Чутливу ділянку біосенсора, під'єданого до приладу для амперометричних вимірювань, занурювали у вимірювальну комірку об'ємом 2,5 мл, заповненої 25 мМ HEPES буферним розчином, рН 7,4, та витримували декілька хвилин для отримання початкової стабільної величини сили струму (стабільної базової лінії). Потім додавали певну аліквоту модельного розчину пірувату і отримували сигнал біосенсора. Цей сигнал автоматично оброблявся комп'ютером і виводився у графічному вигляді на екран монітора.

#### **4.2. Визначення оптимальних умов іммобілізації піруватоксидази**

В процесі формування біоселективної мембрани важливим кроком є іммобілізація біологічного матеріалу на поверхні перетворювача. Тому були перевірені наступні методи іммобілізації піруватоксидази: поперечне зшивання молекул ензиму та БСА з використанням розчину глутарового альдегіда, адсорбція на поверхні частинок силікаліту, інкапсуляція ензиму у фотополімерну мембрану на основі PVA-SbQ. У всіх методах іммобілізації було використано однакову кількість ензиму, для вимірювання використовували однаковий склад буферного розчину. Всі процедури іммобілізації піруватоксидази проводили на поверхні дискових платинових електродів з попередньо нанесеною ПФД-мембраною.

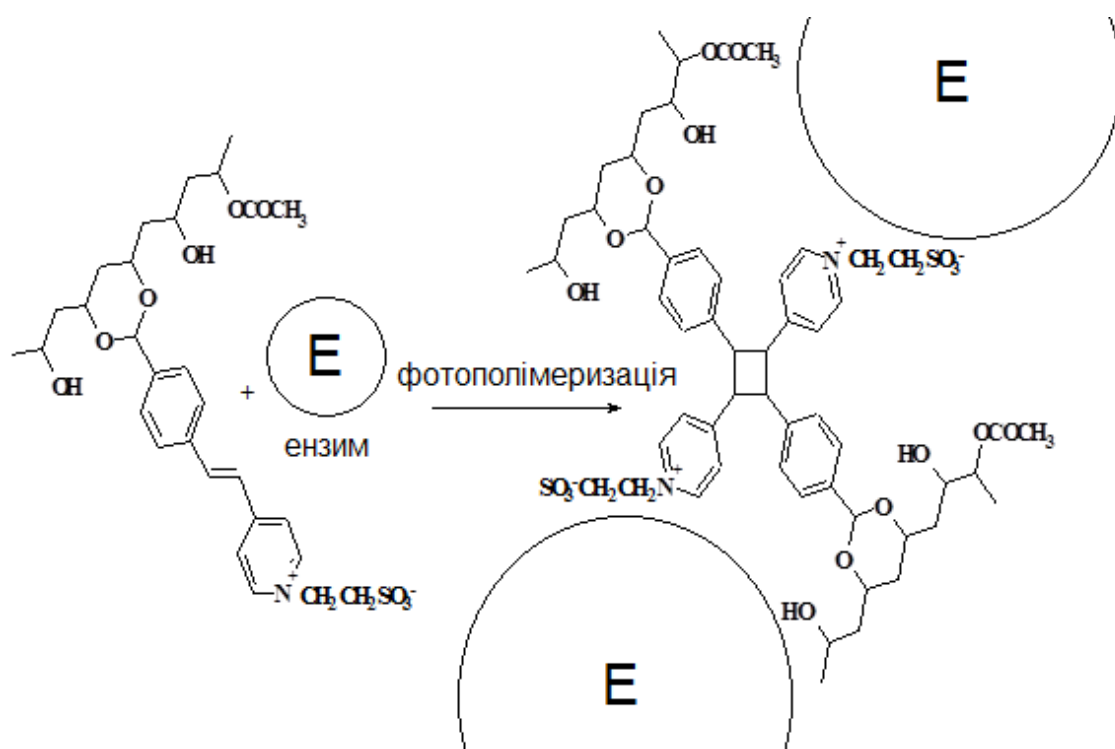
Спершу було перевірено іммобілізацію піруватоксидази методом поперечного зшивання молекул ензиму та БСА з використанням розчину глутарового альдегіда.

Цей метод був ефективним для іммобілізації лактатоксидази, однак у даному випадку після іммобілізації ензим показав незадовільно низьку активність.

Тому наступним був випробуваний метод іммобілізації на основі адсорбції ензиму на мікрочастинках силікаліту. Спочатку на перетворювач наносили та закріплювали шар силікаліту, після чого молекули ензиму

адсорбувались на поверхні силікаліту. Даний метод є значно кращим для іммобілізації низькостабільних ензимів, бо при адсорбції майже не відбувається порушення конформації ензиму. Проте і міцність іммобілізації не висока.

Третім використаним методом іммобілізації була інкапсуляція ензиму у фотополімерну мембрану на основі PVA-SbQ. В цьому методі відбувається захоплення ензиму в сітку полімеру, яка утворюється під час фотополімеризації мономерів. PVA-SbQ – це розчинний фотомономер, який під впливом ультрафіолетового світла полімеризується та утворює нерозчинну полімерну сітку, в яку захоплює молекули ензиму (реакція 4.2). Цей метод є не агресивним і сприяє кращому збереженню нативної конформації ензиму у порівнянні з ковалентним зшиванням.



(4.2)

Для порівняння методів було побудовано типові калібрувальні криві піруват-чутливих біосенсорів на основі ПОД іммобілізованої різними методами (рис. 4.1) Найбільшу чутливість до пірувату показали біосенсори, отримані інкапсуляцією ензиму у фотополімерну мембрану на

основі PVA-SbQ, а також шляхом поперечного зшивання молекул ензиму та БСА 0,15%-ним розчином глутарового альдегіда. Тоді як біосенсори (імобілізація ПОД в БСА мембрані з використанням краплі 0,25% та 0,35% ГА) мали низьку чутливість до пірувату.

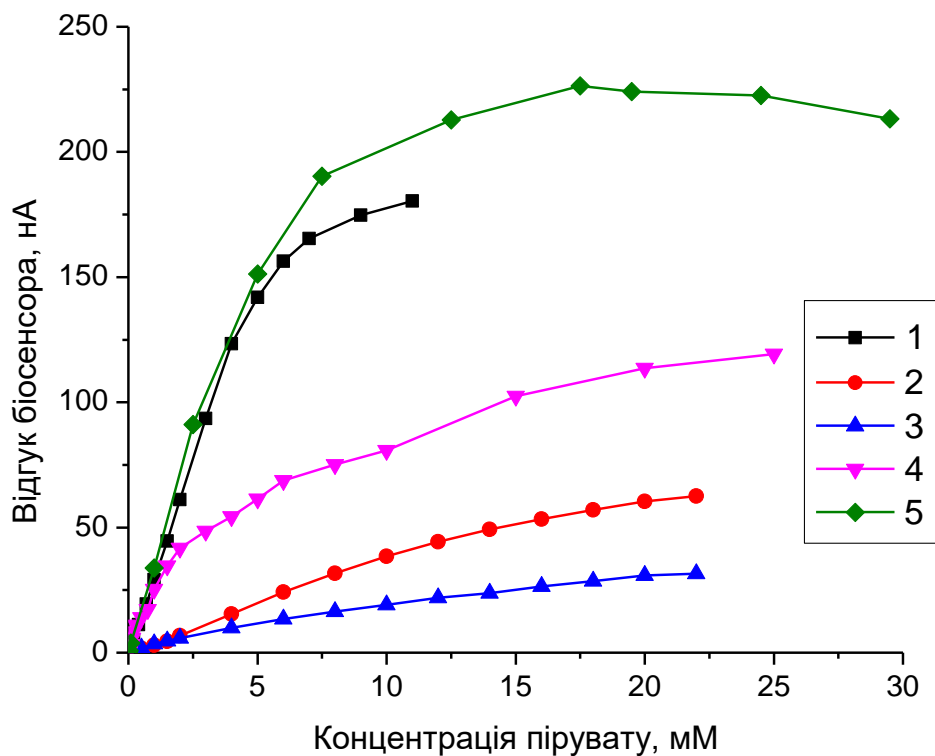


Рис. 4.1. Типові калібрувальні криві біосенсорів на основі різних методів іммобілізації ПОД: в БСА мембрані з використанням краплі розчину глутарового альдегіду 0,15% (1), 0,25% (2), 0,35% (3), адсорбція на мікрочастинках силікаліту (4) та інкапсуляції ензиму у фотополімерну мембрану на основі PVA-SbQ (5). Концентрація іонів магнію – 120 мкМ, ТПФ – 0,5 мМ. Вимірювання проводили за однакових умов у 50 мМ фосфатному буферному розчині, рН 6,5; за постійного потенціалу +0,6 В відносно Ag/AgCl електрода порівняння

Порівняння аналітичних характеристик біосенсорів на основі різних методів іммобілізації піруватоксидази приведено в таблиці 4.1.

Таблиця 4.1.

**Порівняння аналітичних характеристик біосенсорів на основі піруватоксидази, іммобілізованої за допомогою різних методів**

Аналітичні характеристики біосенсора	Метод іммобілізації		
	Зшивання ГА 0,35%	Адсорбція на силікаліті	Фото-полімеризація в PVA-SbQ
Чутливість, нА/мМ	2,9	11,5	23,7
Лінійний діапазон роботи, мМ	0,31-11	0,08-6,7	0,01-5
Мінімальна межа визначення, мкМ	170	6	5
Верхня межа динамічного діапазону роботи, мМ	17	8,1	16,8
Шум базової лінії, нА	0,1	<0,1	<0,1
Похибка визначення, %	55,4	11,7	6,2

Як видно з таблиці 4.1, метод інкапсуляції ензиму у фотополімерну мембрану на основі PVA-SbQ показав високу чутливість, широкий лінійний діапазон та низький рівень шуму порівняно з іншими методами. Також біосенсори створені з використанням саме цього методу іммобілізації ензиму виявили високу стабільність при роботі. Тому для іммобілізації піруватоксидази надалі було використано метод інкапсуляції ензиму у фотополімерну мембрану на основі PVA-SbQ.

Типовий вигляд відгуків біосенсора на додавання субстрату у вимірвальну комірку наведено на рис. 4.2.



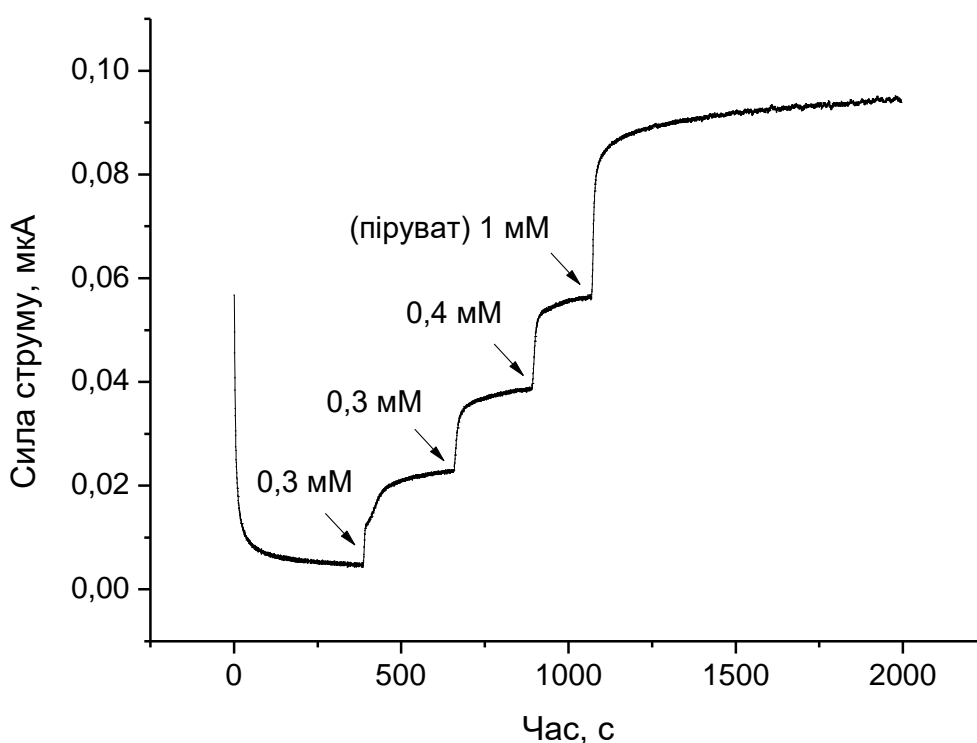


Рис. 4.2. Типові відгуки біосенсора на основі піруватоксидази іммобілізованої за допомогою інкапсуляції ензиму в PVA/SbQ на додавання різних концентрацій пірувату у вимірювальну комірку. Вимірювання проводили у 25 мМ HEPES, рН 7,4, за постійного потенціалу +0,6 В відносно Ag/AgCl електрода порівняння

#### 4.3. Визначення оптимального складу робочого буферного розчину

Як відомо, реакція окиснення пірувату до ацетилфосфату та пероксиду водню відбувається у присутності таких речовин, як фосфат (косубстрат), і коферменти тіамінпірофосфат (ТПФ) та двовалентний катіон  $Mg^{2+}$ , які необхідні для ензиматичної активності піруватоксидази. Тому перш за все необхідно було дослідити вплив кожного компонента та підібрати їх оптимальні концентрації.

Тому нами було досліджено вплив концентрацій ТПФ на відгуки біосенсора на піруват (рис. 4.3). До складу робочого буферного розчину додавали різні концентрації ТПФ від 1 до 2500 мкМ. З отриманих даних видно, що зростання відгуків досягало максимальних значень при збільшенні концентрації ТПФ до 500 мкМ, тому ми обрали саме цю концентрацію для подальшої роботи.

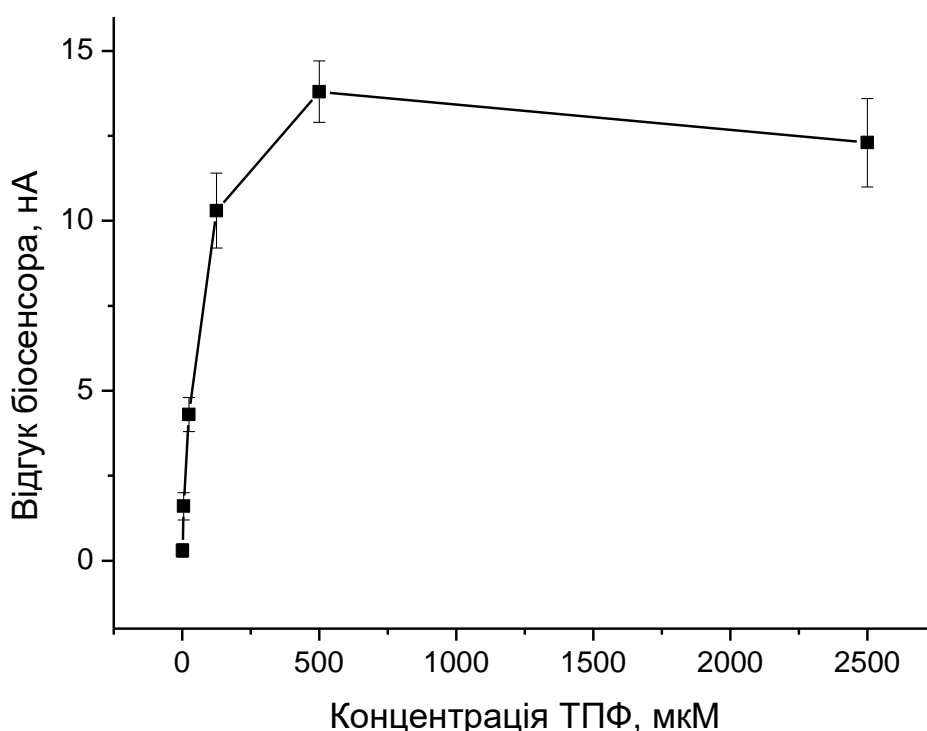


Рис. 4.3. Залежність величини відгуку піруват-чутливого біосенсора від концентрації ТПФ. Концентрація пірувату – 5 мМ, магнію – 150 мкМ. Вимірювання проводили у 10 мМ НЕРЕС, рН 7,4, за постійного потенціалу +0,6 В відносно Ag/AgCl електрода порівняння

Для підбору оптимальної концентрації магнію для роботи піруват-чутливих біосенсорів ми порівняли їх відгук на 5 мМ пірувату в робочих буферних розчинах, що містили магній в діапазоні концентрацій від 20 мкМ до 2400 мкМ (рис. 4.4). Як видно з отриманого графіку, найбільший відгук на піруват спостерігали при концентрації магнію 120 мкМ. При

подальшому збільшені концентрації магнію приросту відгуку на піруват не відбувалось. Тому була обрана оптимальна концентрація магнію, що складає 120 мкМ.

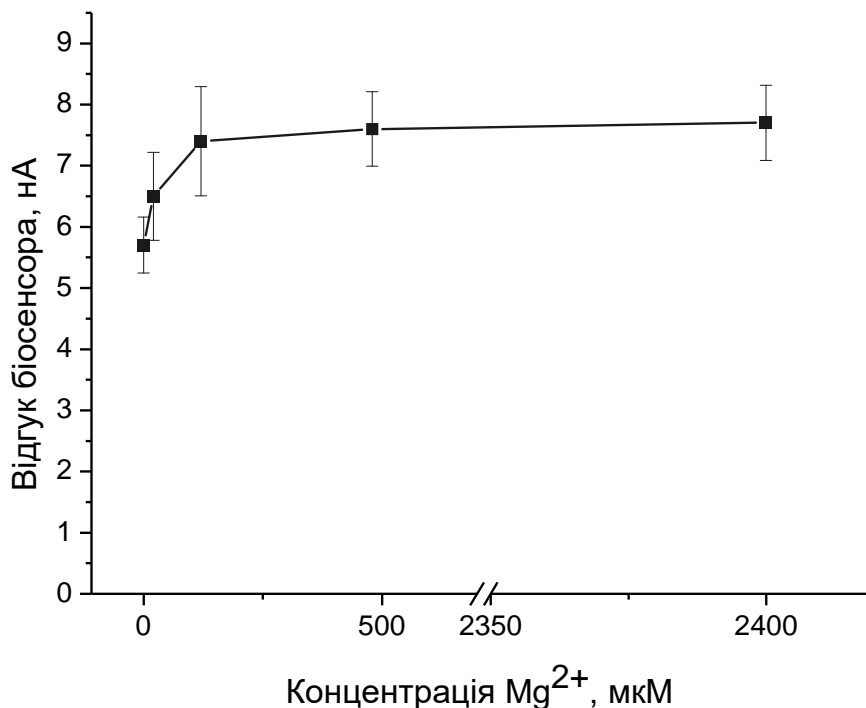


Рис. 4.4. Залежність величини відгуку піруват-чутливого біосенсора, від концентрації іонів магнію. Концентрація пірувату – 5 мМ, ТПФ – 0,5 мМ. Вимірювання проводили у 10 мМ НЕРЕС, рН 7,4, за постійного потенціалу +0,6 В відносно Ag/AgCl електрода порівняння

Величина відгуку піруват-чутливого біосенсора, також залежить від концентрації фосфатів, які є субстратом ензиматичної реакції за участі ПОД. Тому було здійснено дослідження впливу концентрації фосфатів в буферному розчині на величину відгуку розробленого біосенсора. Розроблений піруват-чутливий біосенсор планується використовувати в масиві з іншими біосенсорами, для роботи яких буде необхідний інший робочий буферний розчин, а саме НЕРЕС. Тому було проведено дослідження роботи піруват-чутливого біосенсора в робочому буферному розчині НЕРЕС, з наявними в ньому різної концентрації фосфат-іонів (1 –

100 мМ). З рис. 4.5 видно, що відгуки біосенсора спочатку сильно збільшувались при зростанні концентрації фосфатів до 20 мМ. А далі при подальшому збільшенні концентрації фосфат-іонів відгуки на піруват вже не змінювались. Тому для подальших експериментів було вирішено використовувати робочий буфер з 20 мМ фосфатів.

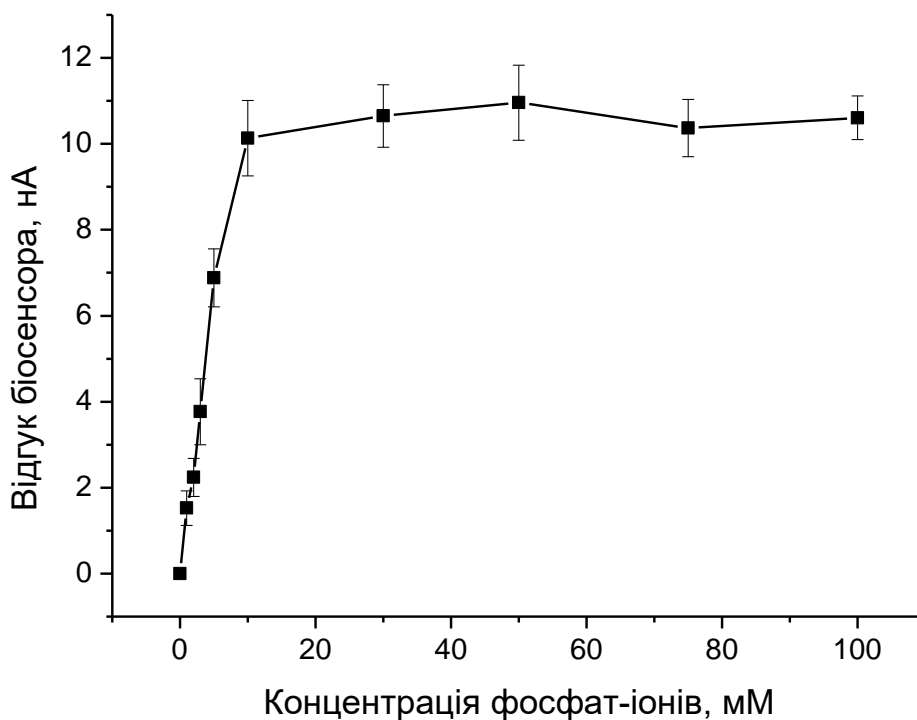


Рис. 4.5. Залежність величини відгуку біосенсора від концентрації фосфат-іонів. Концентрація пірувату – 5 мМ, ТПФ – 500 мкМ, магнію – 120 мкМ. Вимірювання проводили у 20 мМ буферному розчині HEPES рН 7,4, за постійного потенціалу +0,6 В відносно Ag/AgCl електрода порівняння

#### **4.4. Стабільність біосенсора при безперервній роботі та при зберіганні**

Наступним етапом нашої роботи стала перевірка відтворюваності відгуків біосенсорів впродовж декількох годин безперервної роботи. Для цього впродовж дня було отримано 15 відгуків біосенсора на 5 мМ піруват

(рис. 4.6). Помітного падіння відгуків за безперервної роботи біосенсора впродовж дня не відбувалось; відносне середньоквадратичне відхилення відгуків на піруват становило 3,7 %.

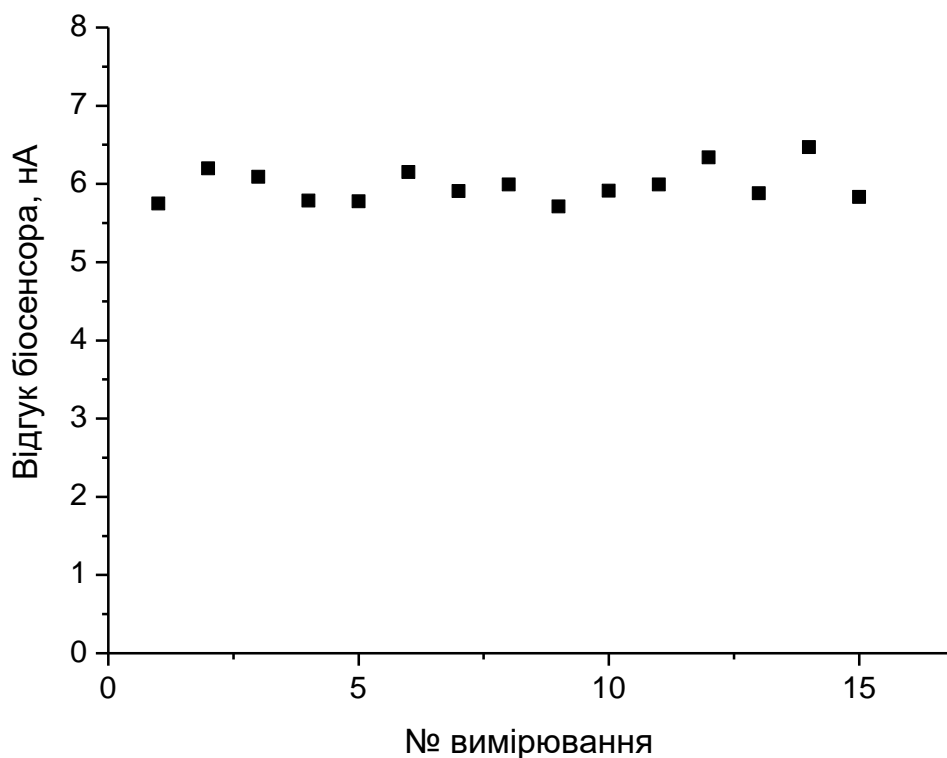


Рис. 4.6. Відтворюваність відгуків біосенсора на піруват при безперервній роботі впродовж дня. Концентрація пірувату - 5 мМ, магнію – 120 мкМ, ТПФ – 500 мкМ, фосфат-іонів - 20 мМ. Вимірювання проводили у 25 мМ HEPES, рН 7,4; за постійного потенціалу +0,6 В відносно Ag/AgCl електрода порівняння

Щоб перевірити операційну стабільність розробленого піруват-чутливого біосенсора, після виготовлення біосенсора було отримано три відгуки на 5 мМ піруват, після чого біосенсор зберігали в сухому вигляді за температури +4 °С до наступного використання. Далі, через кілька діб, експеримент повторювали: знову отримували відгуки біосенсора на ту ж саму концентрацію пірувату. Сумарний термін проведення тесту становив 19 діб. Результати дослідження представлено на рис. 4.7. Впродовж

експерименту спостерігалось невеличке зменшення відгуків на піруват. Але за умов додаткового калібрування вимірювання можна проводити щонайменше до 14 діб, за цей період активність роботи біосенсора впала лише на 18%.

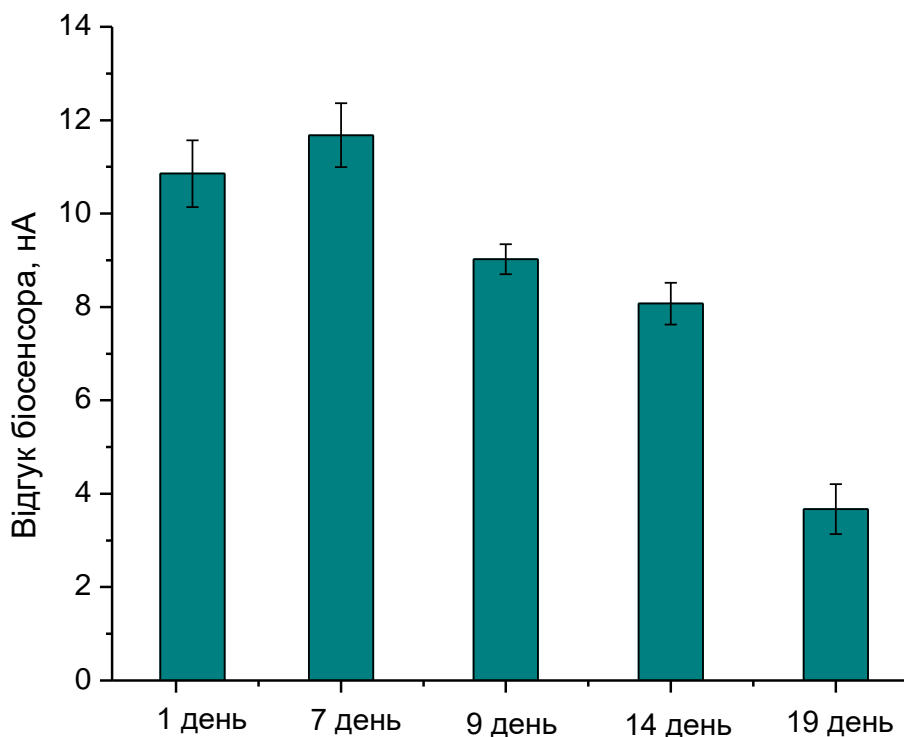


Рис. 4.7. Операційна стабільність відгуків біосенсора на піруват впродовж 19 діб. Концентрація пірувату - 5 мМ, магнію – 120 мкМ, ТПФ – 500 мкМ, фосфат-іонів – 20 мМ. Вимірювання проводили в 25 мМ буферному розчині НЕРЕС, рН 7,26; за постійного потенціалу +0,6 В відносно Ag/AgCl електрода порівняння

#### 4.5. Аналітичні характеристики піруват-чутливого біосенсора

Було визначено основні аналітичні характеристики біосенсора. Типова калібрувальна крива піруват-чутливого біосенсора наведена на рис. 4.8. Мінімальна межа визначення пірувату, яка вимірювалась як

концентрація пірувату, що дає відгук в три рази більший за величину шуму базової лінії, становила 5 мкМ. Вона несуттєво змінювалась в залежності від конкретного біосенсора. Лінійний діапазон роботи складав від 0,01 мМ до 5 мМ, чутливість до пірувату становила близько 31 нА/мМ. Лінійна ділянка даної калібрувальної кривої описується рівнянням  $I=31.06 \cdot C + 1.88$  ( $R^2=0,989$ ), де  $I$  – сила струму після виходу відгуку на плато (нА),  $C$  – концентрація пірувату (мМ).

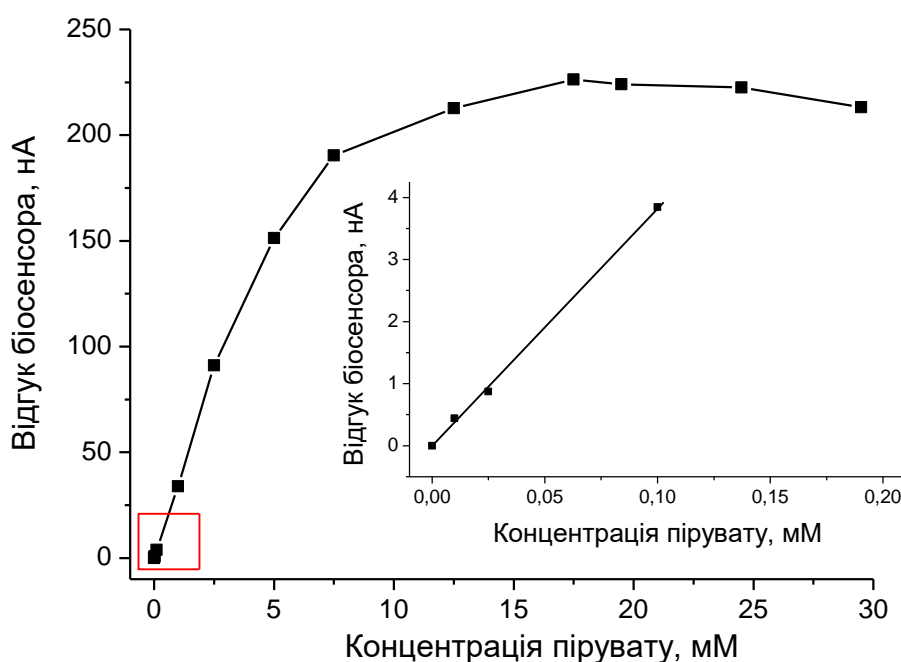


Рис. 4.8. Залежність величини відгуку піруват-чутливого біосенсора від концентрації пірувату. Концентрація магнію – 120 мкМ, ТПФ – 0,5 мМ фосфат-іонів – 20 мМ. Вимірювання проводили у 10 мМ HEPES, рН 7,4, за постійного потенціалу +0,6 В відносно Ag/AgCl електрода порівняння

#### 4.6. Підсумки до розділу 4

Було розроблено амперометричний біосенсор для визначення концентрації пірувату в водних розчинах та визначено його основні аналітичні характеристики. Оптимальним методом іммобілізації

піруватоксидази було обрано інкапсуляцію ензиму у фотополімерну мембрану на основі PVA, оптимальний склад робочого буферного розчину містить 500 мкМ ТПФ, 120 мкМ іонів магнію, та 20 мМ фосфат-іонів. Даний сенсор характеризувався хорошою відтворюваністю відгуків, зберігав 82% активності при зберіганні та роботі впродовж 14 днів. Лінійний діапазон визначення пірувату становить від 0,01 мМ до 5 мМ, з мінімальною межею визначення пірувату 5 мкМ, чутливість до пірувату становила 31 нА/мМ.

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

Knyzhnykova D.V., Topolnikova Ya.V., Kucherenko I.S., Soldatkin O.O. Development of pyruvate oxidase-based biosensor for pyruvate determination. *Biopolymers and Cell*. 2018. Т.34, №1, С.14-23.

Топольнікова Я.В., Книжнікова Д.В., Кучеренко І.С., Солдаткін О.О. Розробка електрохімічного біосенсора для вимірювання концентрації пірвиноградної кислоти. *Тези XVI International Scientific Conference «Шевченківська весна: досягнення біологічної науки / BioScience Advances»*, Київ, 24-27 квітня 2018, С.63-64.



## РОЗДІЛ 5

ПОЄДНАННЯ МОНОБІОСЕНСОРІВ У СИСТЕМУ ДЛЯ  
ОДНОЧАСНОЇ РОБОТИ5.1. Дослідження можливості виготовлення біоселективних  
елементів біосенсорної системи в однакових умовах

Як відомо, ЛОД більш стабільна і невибаглива до умов іммобілізації ніж ПОД. Оскільки, для іммобілізації ПОД оптимальним виявився метод інкапсуляції ензиму у фотополімерну мембрану на основі PVA-SbQ, виникла необхідність перевірити, чи підходить цей метод для іммобілізації ЛОД. В результаті такої перевірки була отримана залежність величини відгуку лактат-чутливого біосенсора від концентрації лактату (рис. 5.1).

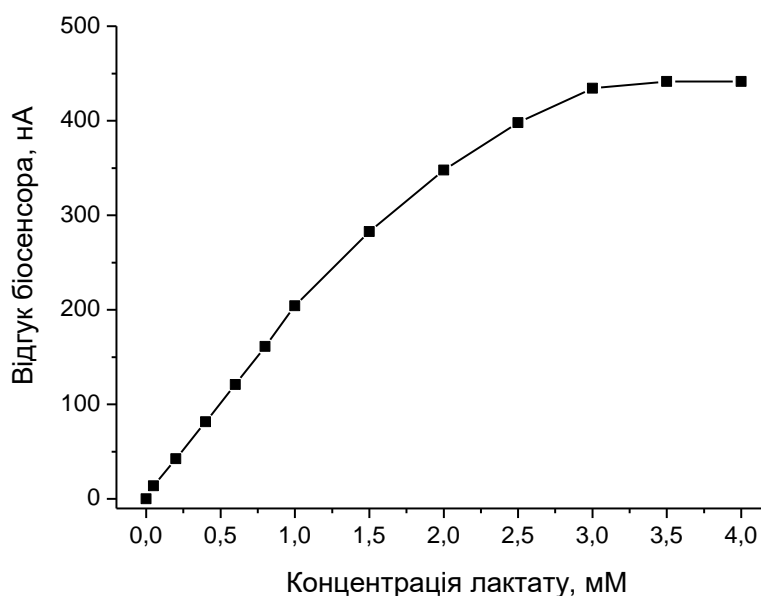


Рис. 5.1. Залежність величини відгуку лактат-чутливого біосенсора на основі ЛОД, іммобілізованої методом інкапсуляції ензиму у фотополімерну мембрану на основі PVA-SbQ, від концентрації лактату.

Чутливість до лактату суттєво не відрізнялась від біосенсорів на основі лактатоксидази, іммобілізованої поперечним зшиванням молекул ензиму та БСА з використанням розчину глутарового альдегіда, і становила 204 нА/мМ. Порівняння калібрувальних кривих біосенсорів чутливих до лактату, виготовлених з використанням різних методів іммобілізації представлено на рис. 5.2.

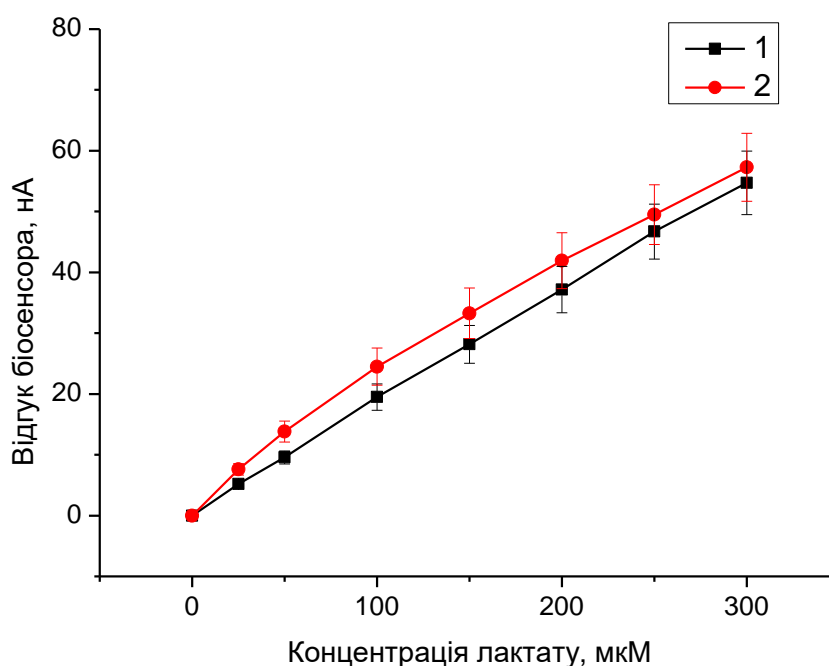


Рис. 5.2. Залежність відгуків лактат-чутливих біосенсорів на основі ЛОД, іммобілізованої (1) – інкапсуляція ензиму у фотополімерну мембрану на основі PVA-SbQ, та (2) – поперечним зшиванням ГА, від концентрації лактату. Вимірювання проводили у 25 мМ НЕРЕС буферному розчині, рН 7,4, за постійного потенціалу +0,6 В відносно Ag/AgCl електрода порівняння

Отже, характеристики лактат-чутливого біосенсора на основі ЛОД, іммобілізованої інкапсуляцією ензиму у фотополімерну мембрану на основі PVA-SbQ порівняно з раніше розробленим біосенсором на основі ЛОД, іммобілізованої поперечним зшиванням молекул ензиму та БСА з використанням розчину глутарового альдегіда, були незмінними.

Винятком був лінійний діапазон, який розширився в кілька разів. Тому для іммобілізації в однакових умовах нами було обрано саме іммобілізацію обох ензимів методом їх інкапсуляції у фотополімерну мембрану на основі PVA-SbQ.

Було отримано типові відгуки біосенсорної системи при одночасній роботі (рис. 5.3).

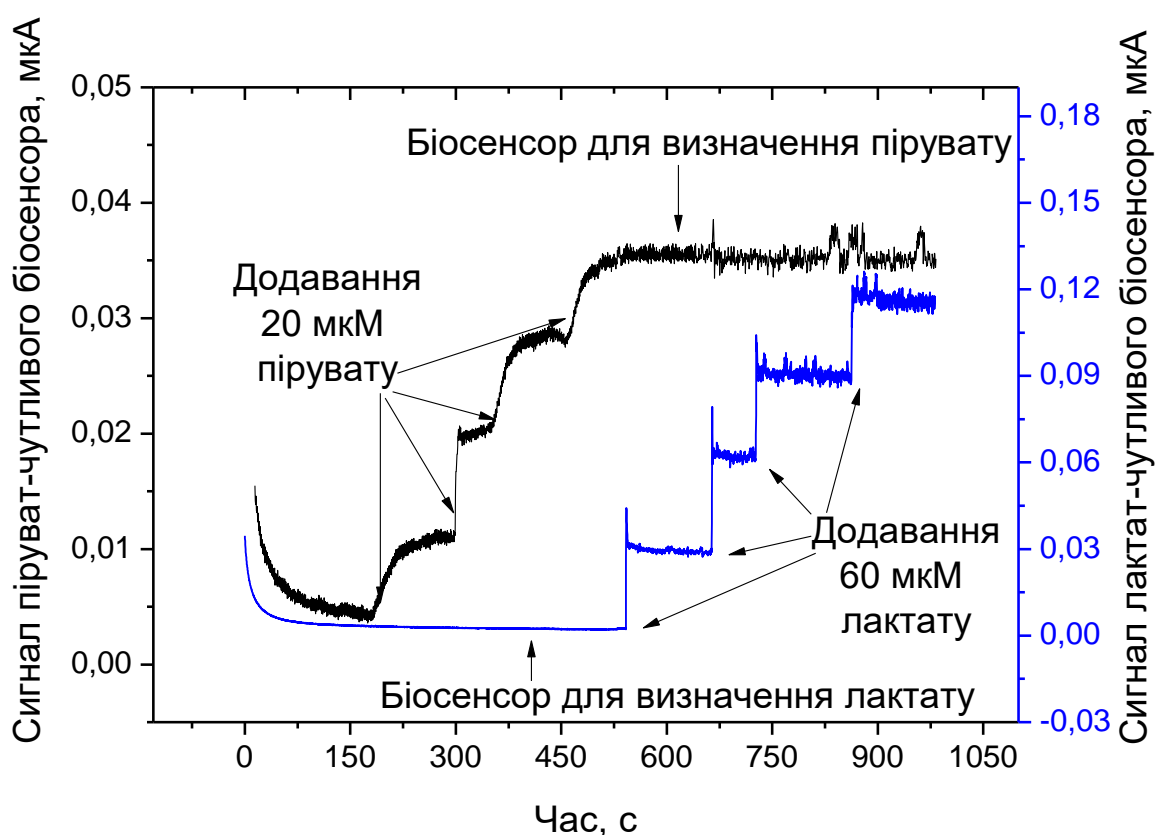


Рис. 5.3. Реальний вигляд відгуків біосенсорної системи на додавання різних концентрацій лактату та пірувату при їх одночасному вимірюванні. Вимірювання проводили у 25 мМ НЕРЕС, рН 7.4, за постійного потенціалу +0,6 В відносно Ag/AgCl електрода порівняння

При цьому перехресного впливу субстратів на відгуки монобіосенсорів (відгук лактат-чутливого біосенсора на піруват, або піруват-чутливого біосенсора на лактат) не спостерігалось

## 5.2. Залежність роботи біосенсорів від рН буферного розчину

Як відомо, кожен ензим має рН-оптимум своєї роботи. Відповідно для оптимізації роботи біосенсорної системи необхідно було підібрати такий діапазон рН робочого буферного розчину, в якому іммобілізовані лактатоксидаза та піруватоксидаза будуть працювати з найбільшою ефективністю.

Як відомо, рН-оптимум для вільних та іммобілізованих ензимів може суттєво відрізнятись. Оскільки ми застосовуємо іммобілізацію у шарі фотополімеру, а літературні та попередньо отримані нами дані для використовуваних нами ензимів переважно стосувались методу поперечного зшивання ГА, необхідно було перевірити чи є суттєва залежність відгуків біосенсорної системи від зміни рН буферного розчину, принаймні у діапазоні, який очікується за аналізу реальних зразків біоматеріалу.

Тому нами було визначено оптимальне значення рН робочого буферного розчину для обох ензимів іммобілізованих в фотополімері PVA-SbQ шляхом вимірювання величини відгуку біосенсорної системи у розчинах з змінним рН (рис. 5.4). Для цього було використано універсальний (“полімікс”) буфер (50 мМ  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ ; 50 мМ тетраборату натрію; 50 мМ тріс; 50 мМ лимонної кислоти) із різними значеннями рН.

Оптимум для іммобілізованої в PVA-SbQ піруватоксидази склав від 7,0 до 8,0. Оптимальний діапазон значень рН для лактатоксидази починався від 7, досягаючи піку близько 7,7. Але оскільки біосенсорна система призначалась для визначення концентрацій аналітів у зразках сироватки крові, а коливання рН сироватки крові при різноманітних патологічних станах відбувається в діапазоні від 7,3 до 7,5, то було вирішено надалі працювати з буферними розчинами з рН 7,4, який відповідає фізіологічному значенню рН.

Таким чином біосенсорна система здатна працювати у всьому діапазоні значень сироватки рН крові, як в фізіологічному так і в патологічних станах.

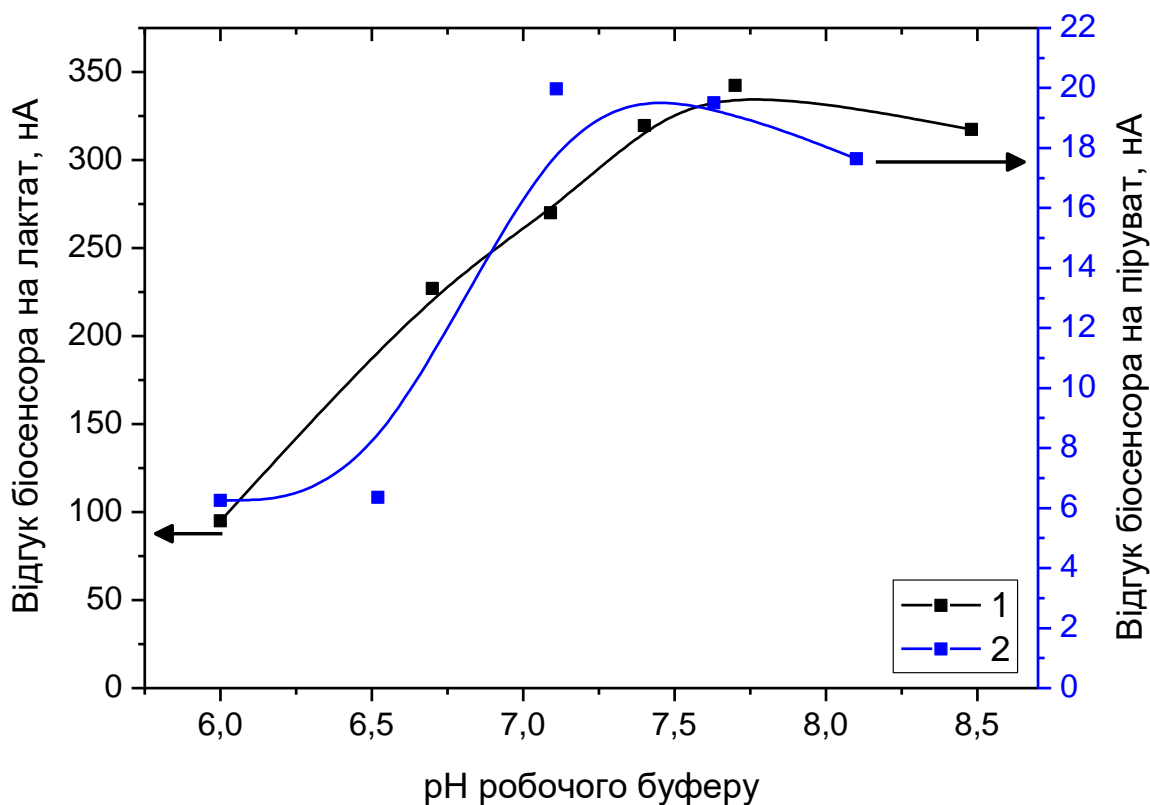


Рис. 5.4. Криві залежності відгуків біосенсорної системи для визначення 1 мМ лактату та 1 мМ пірувату від рН розчину. Вимірювання проводили у 50 мМ універсальному буферному розчині, з додаванням 120 мкМ  $Mg^{2+}$ , 500 мкМ ТПФ

### 5.3. Вплив концентрації HEPES на роботу біосенсорної системи

Оскільки біологічним системам у важких патологічних станах властива зміна буферного балансу, а характеристики робочого розчину є одним з факторів, що можуть впливати на роботу біосенсорної системи, потрібно було знайти оптимальний діапазон концентрацій робочого буферного розчину, а, відповідно, і буферної ємності, щоб їх коливання не впливали на одночасну роботу кожного з біосенсорів в складі системи.

Було показано (рис. 5.5), що відгуки біосенсорної системи практично не залежать від концентрації HEPES у буферному розчині при концентраціях більше 4 мМ. Тому обидва біосенсори та система, що з них складається, можна використовувати для визначення зразків з різною буферною ємністю.

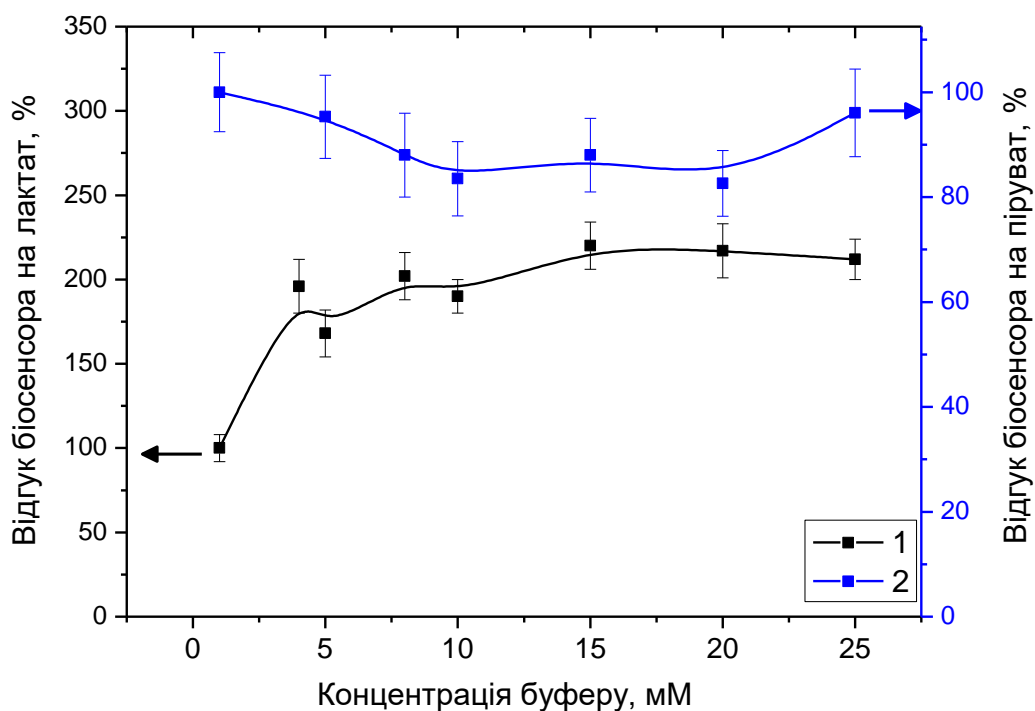


Рис. 5.5. Криві залежності відгуків біосенсорної системи для одночасного визначення концентрації лактату (1) та пірувату (2) від концентрації буферного розчину. Концентрації субстратів: 0,5 мМ лактату та 1 мМ пірувату. Вимірювання проводили у HEPES буферному розчині різних концентрацій, у присутності 120 мкМ  $Mg^{2+}$ , 500 мкМ ТПФ, 20 мМ фосфат-іонів за постійного потенціалу +0,6 В відносно Ag/AgCl електрода порівняння

#### 5.4. Вплив концентрації NaCl на роботу біосенсорної системи

У реальних біологічних зразках, зокрема в сироватці крові, присутня велика кількість іонів, зокрема  $K^+$ ,  $Na^+$ ,  $Mg^{2+}$ ,  $Cl^-$ , іони органічних та

неорганічних кислот та ін. Також іонний склад крові може суттєво змінюватись під час різних фізіологічних та особливо патологічних процесів. Тому нами було проведено дослідження величини відгуків біосенсорної системи в робочому буферному розчині (25 мМ НЕРЕС) за різної концентрації NaCl, тобто за різної іонної сили розчину (рис. 5.6).

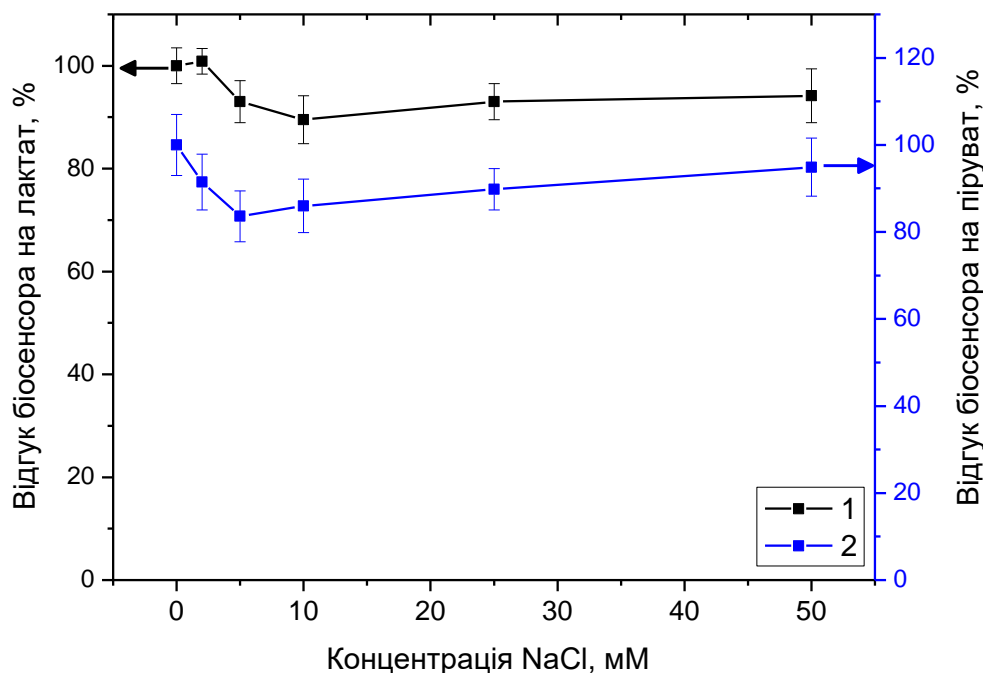


Рис. 5.6. Залежність відгуків біосенсорної системи для одночасного визначення концентрації лактату (1) та пірувату (2) від іонної сили розчину. Концентрація субстратів становила 1 мМ. Вимірювання проводили у 25 мМ НЕРЕС буферному розчині, рН 7,4, у присутності 20 мМ фосфат-іонів, 120 мкМ  $Mg^{2+}$ , 0,5 мМ ТПФ; за постійного потенціалу +0,6 В відносно Ag/AgCl електрода порівняння

Діапазон концентрацій NaCl вибрано з урахуванням майбутнього розведення реальних зразків сироватки крові. Експеримент проводили додаванням до вимірювальної комірки концентрованих розчинів NaCl різного об'єму. Значної розбіжності відгуків біосенсора при різних концентраціях NaCl не спостерігалось. Це свідчить про можливість

використання даної біосенсорної системи для аналізу біологічних рідин, що характеризуються варіабельною іонною силою.

### 5.5. Дослідження перехресного впливу субстратів ензимів на роботу біосенсорної системи

Як відомо з літератури, піруватоксидаза та лактатоксидаза є високоспецифічними ензимами (ЛОД не каталізує розщеплення пірувату, а ПОД – лактату). Тим не менш, оскільки біоселективні елементи біосенсорної системи повинні працювати одночасно в одному і тому ж середовищі та за однакових умов, нами було проаналізовано перехресний вплив відповідних субстратів на роботу монобіосенсорів. Було показано, що наявність пірувату (2 мМ) у вимірювальній комірці не впливає на роботу лактат-чутливого біосенсора (рис. 5.7).

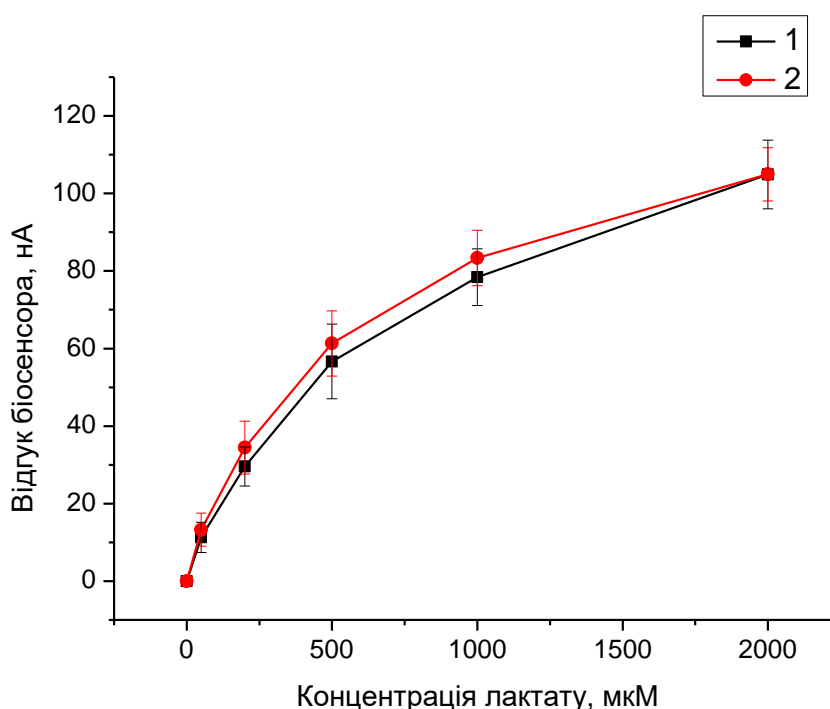


Рис. 5.7. Калібрувальні криві лактат-чутливого монобіосенсора без (1) та у присутності 2 мМ пірувату (2) у вимірювальній комірці. Визначення проводили у 25 мМ буферному розчині HEPES, рН 7,4, за постійного потенціалу +0,6 В відносно Ag/AgCl електрода порівняння



Аналогічно, наявність лактату (2 мМ) у вимірювальній комірці не змінює відгук піруват-чутливого біосенсора на піруват (рис. 5.8).

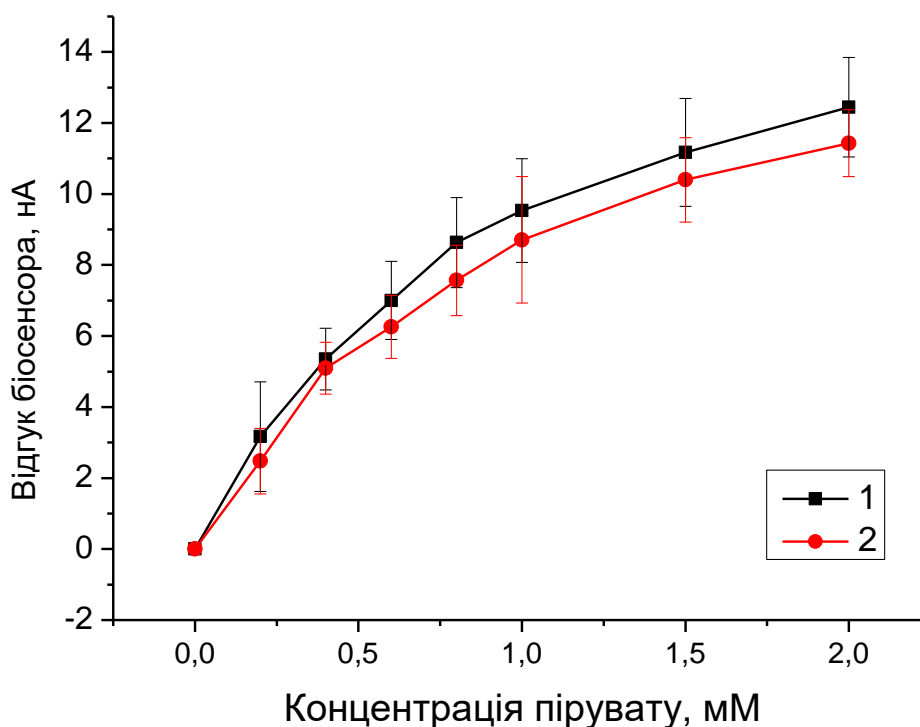


Рис. 5.8. Калібрувальні криві піруват-чутливого монобіосенсора пірувату без (1) та у присутності (2) 2 мМ лактату у вимірювальній комірці. Вимірювання проводили у 25 мМ буферному розчині HEPES за постійного потенціалу +0,6 В відносно Ag/AgCl електрода порівняння

Крім того, оскільки піруват-чутливий біосенсор потребує застосування кофакторів, а саме іонів магнію та тіамінпірофосфату, та присутності косубстрату фосфат-йонів, було також перевірено їх вплив на монобіосенсор для визначення лактату. Для цього було отримано калібрувальні криві для визначення лактату у чистому буферному розчині, а також у буферному розчині з додаванням кофакторів (рис. 5.9). Калібрувальні криві були однакові незалежно від наявності чи відсутності кофакторів, тому можна зробити висновок, що наявність у робочому буферному розчині кофакторів піруватоксидази не впливає на відгуки монобіосенсора для визначення лактату.

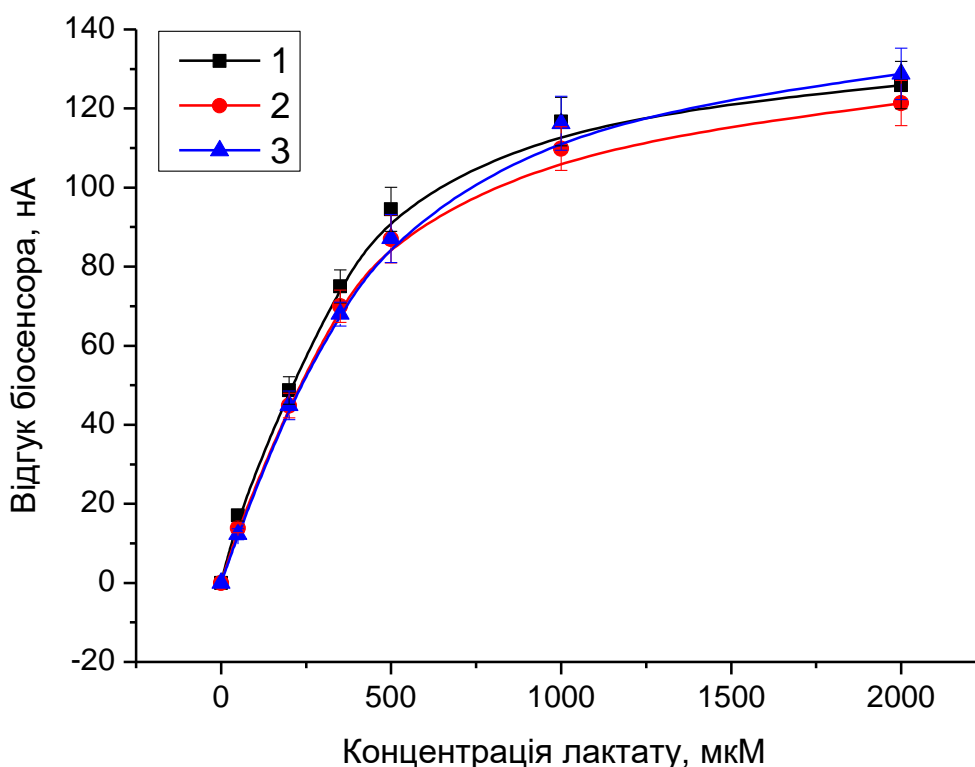


Рис. 5.9. Калібрувальні криві лактат-чутливого біосенсора, отримані: без додавання кофакторів в робочий буфер (1); з додаванням 20 мМ фосфат-іонів (2); з додаванням 20 мМ фосфат-іонів, 120 мкМ  $Mg^{2+}$  та 500 мкМ ТПФ (3). Вимірювання проводили за постійного потенціалу +0,6 В відносно  $Ag/AgCl$  електрода порівняння

Таким чином, при поєднанні в систему для одночасного визначення концентрації лактату та пірувату субстрати та кофактори ПОД не впливають на роботу іншого монобіосенсора, а отже, розроблені монобіосенсори можуть працювати в складі системи в однакових умовах та єдиному буферному розчині.

## 5.6. Відтворюваність та операційна стабільність відгуків біосенсорної системи

Важливим показником роботи біосенсорної системи є відтворюваність відгуків. Тому ми отримували відгуки на субстрати впродовж кількох годин безперервної роботи. Одне вимірювання відгуку займало 5 хв, проміжок між ними – 4-5 хв, за цей час біосенсори відмивали від субстратів, кілька разів змінюючи робочий буфер. Помітного падіння відгуків за 20 вимірювань не відбувалось; відносне середньоквадратичне відхилення відгуків на лактат в середньому становило 5,0 %, а на піруват – 6,2 %. Таким чином, біосенсорна система відтворювано працювала з модельними розчинами субстратів.

Також важливим показником роботи біосенсорної системи є можливість використання її впродовж тривалого часу. Термін роботи біосенсора обмежується переважно терміном зберігання активності біоселективного елемента, оскільки фізична частина біосенсора може зберігатися практично необмежений час. Поступово іммобілізовані ензими втрачають активність, що зрештою призводить до втрати чутливості біосенсора до субстратів. Тому наступним етапом нашої роботи було визначення операційної стабільності та стабільності при зберіганні біосенсорної системи (змішаний тест). Впродовж дня ми отримували по 3 відгуки на відповідні субстрати. У перерві між вимірюваннями біосенсорну систему зберігали в сухому стані при +4 °С. Результати експериментів впродовж 19 днів представлені на рис. 5.10.

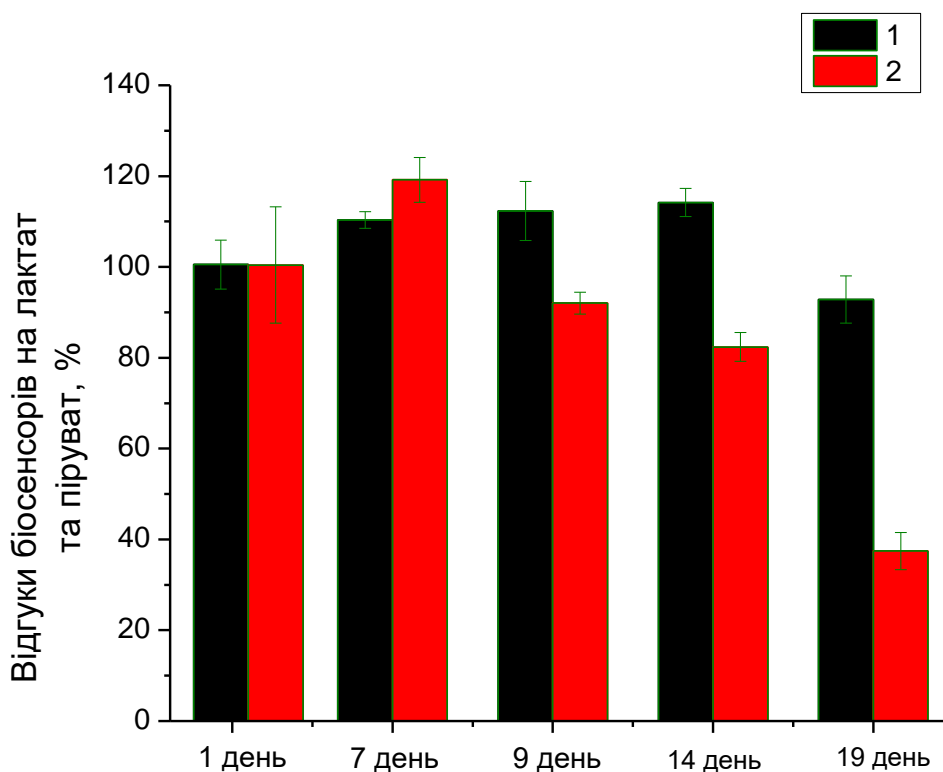


Рис. 5.10. Стабільність відгуків біосенсорної системи для одночасного визначення концентрації лактату та пірувату на 1 мМ лактат (1) та 1 мМ піруват (2), відповідно, впродовж 19 днів. Вимірювання проводили у 25 мМ HEPES буферному розчині, рН 7,4, за постійного потенціалу +0,6 В відносно Ag/AgCl електрода порівняння. Умови зберігання – в сухому стані при +4 °С

Було показано, що лактат-чутливий монобіосенсор не втратив активності після 14 днів зберігання в сухому стані при +4 °С. Тоді як піруват-чутливий монобіосенсор на 14 день зберігає 82,3 % активності. Також лактат-чутливий монобіосенсор зберігає 92 % активності після 19 днів зберігання, тоді як піруват-чутливий монобіосенсор пірувату – 37 %. Це свідчить про необхідність додаткового калібрування біосенсорів після зберігання впродовж періоду більшого ніж два тижні, а також про гіршу стабільність піруватоксидази у порівнянні з лактатоксидазою.

### 5.7. Аналітичні характеристики біосенсорної системи для визначення пірувату та лактату

Після розробки та оптимізації роботи біосенсорної системи необхідно було визначити її основні аналітичні характеристики (таблиця 5.1).

Таблиця 5.1.

#### Основні аналітичні характеристики біосенсорної системи для одночасного визначення концентрації лактату та пірувату

Аналітична характеристика	Визначення пірувату	Визначення лактату
Мінімальна межа визначення субстрату, мкМ	5	5
Лінійний діапазон, мкМ	10 - 5000	5-1000
Відтворюваність (відносна середньоквадратична розбіжність між відгуками біосенсора), %	6,2	5,0
Час аналізу, хв	5	5
Стабільність при зберіганні, дні	14	14

Мінімальна межа визначення концентрацій лактату, яка вимірювалась як концентрація лактату, що призводить до відгуку біосенсора в три рази більшого за величину шуму базової лінії, становила 5 мкМ, мінімальна межа вимірювання пірувату – 5 мкМ. Межа визначення несуттєво змінювалась в залежності від конкретного біосенсора. Лінійний діапазон роботи лактат-чутливого біосенсора складав від 5 до 1000 мкМ концентрації, чутливість до лактату становила 204 нА/мМ. Лінійний

діапазон піруват-чутливого біосенсора складав від 10 мкМ до 5 мМ, чутливість до пірувату становила 31 нА/мМ.

### **5.8. Перевірка можливості роботи біосенсорної системи для одночасного визначення концентрації лактату та пірувату у складі мультибіосенсорного масиву для одночасного визначення концентрації глюкози, лактату, пірувату, холіну, ацетилхоліну та глутамату**

Для визначення стану пацієнта важливими показниками є не лише концентрації лактату і пірувату та їх співвідношення. Також значний інтерес має визначення концентрації нейротрансмітерів та деяких інших метаболітів. Глутамат та ацетилхолін є найважливішими збуджувальними нейротрансмітерами у нервовій системі. Тому визначення їх концентрації у міжклітинній рідині мозку є актуальною потребою для фармакології та нейрохімії. Холін є попередником у синтезі ацетилхоліну, тому при нестачі холіну виникає ряд нервових розладів [83]. Моніторинг рівня холіну і ацетилхоліну є важливим для виявлення нейродегенеративних захворювань, таких як нервово-м'язові захворювання, хвороба Альцгеймера, міастенія, порушення холінергічної нейротрансмісії [84, 85]. Визначення концентрації глюкози, глутамату та лактату є важливим для розуміння динаміки енергетичного балансу мозку [86, 87]. Одночасний моніторинг глюкози, лактату та глутамату є корисним для досліджень енергетичних процесів та комунікації нейронів у мозку [88]. Таким чином, при одночасному аналізі цих показників у спинномозковій рідині можна отримати більш комплексну картину стану нейропроцесів у пацієнта.

Тому наступним завданням стало поєднання розроблених в даному дослідженні та розроблених раніше в нашій лабораторії амперометричних біосенсорів та біосенсорних систем у мультибіосенсорний масив для

одночасного визначення концентрації глюкози, лактату, пірувату, холіну, ацетилхоліну та глутамату.

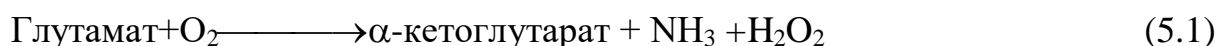
**5.8.1. Будо́ва мультибіосенсорного масиву для одночасного визначення концентрації глюкози, лактату, пірувату, холіну, ацетилхоліну та глутамату.** Всі біосенсори в складі масиву містили однакові амперометричні перетворювачі на основі платинових дискових електродів. Біоселективні елементи масиву біосенсорів отримували шляхом іммобілізації ензимів: ЛОД, ПОД, глюкозооксидази (ГОД), глутаматоксидази (ГЛОД), холіноксидази(ХО) та ацетилхолінестерази (АХЕ) та допоміжних речовин на поверхні амперометричних перетворювачів з попередньо сформованою ПФД-мембраною. Шість амперометричних біосенсорів, допоміжний платиновий електрод та хлорсрібний електрод порівняння були під'єднані до потенціостату PalmSens (Palm Instruments BV, The Netherlands) через восьмиканальний мультиплексор СН-8 цього ж виробника. Вимірювання проводили за кімнатної температури у відкритій вимірювальній комірці об'ємом 4 мл за постійного перемішування і при прикладеному потенціалі +0,6 В відносно електрода порівняння.

Як робочий буферний розчин використовували 25 мМ HEPES, рН 7,4 або «полімікс». Для роботи біоселективного елемента піруват-чутливого біосенсора до робочого буферного розчину додавали іони магнію, ТПФ та фосфат-іони. Всі вимірювання проводили щонайменше у трьох повторностях; результати на графіках представлені у вигляді середнього значення вимірювань  $\pm$  середньоквадратичне відхилення.

**5.8.2. Принцип роботи масиву біосенсорів.** В основі роботи масиву біосенсорів лежать ферментативні реакції, що протікають в біоселективних мембранах біосенсорів. Глутамат-чутливий біосенсор працює на основі реакції (5.1); глюкозо-чутливий біосенсор – на основі реакції (5.2); ацетилхолін-чутливий біосенсор – на основі реакцій (5.3, 5.4); холін-чутливий біосенсор – на основі реакції (5.4); лактат-чутливий біосенсор – на основі реакції (3.1); піруват-чутливий біосенсор – на основі реакції (4.1). В результаті реакцій (5.1, 5.2.,5.4) відбувається окиснення субстратів (глутамату, глюкози, холіну, лактату та пірувату), і утворення електрохімічно-активного пероксиду водню, а також перетворення ацетилхоліну в холін з утворенням протонів (5.3).

Прикладення позитивного потенціалу до платинового дискового електрода (+0,6 В відносно Ag/AgCl електрода порівняння) викликає реакцію окиснення пероксиду водню (3.2), в результаті якої утворюються вільні електрони. Вони забезпечують посилення струму (пропорційне концентрації лактату), яке безпосередньо реєструється біосенсором.

ГЛОД



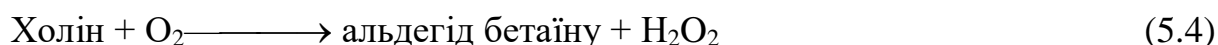
ГОД



АХЕ



ХО





**5.8.3. Відтворюваність відгуків масиву біосенсорів.** Даний масив біосенсорів призначений для багаторазових вимірювань, тому було досліджено відтворюваність відгуків біосенсорів впродовж декількох годин безперервної роботи.

Біосенсори весь час знаходились у робочому буферному розчині, який постійно перемішували. Одне вимірювання субстрату займало 3 – 5 хв, проміжок між вимірюваннями складав близько 10 хв; за цей час біосенсори відмивали від субстратів, кілька разів змінюючи робочий буфер. Концентрації субстратів були вибрані з лінійної ділянки калібрувальних кривих для всіх біосенсорів.

Результати дослідження відтворюваності відгуків біосенсорів представлено на рис. 5.11.

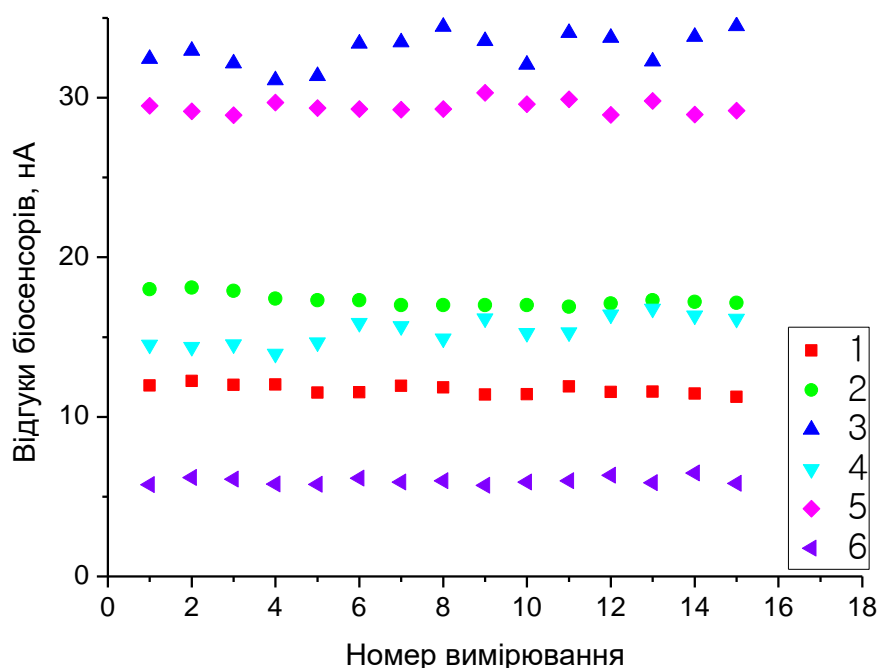


Рис. 5.11. Відтворюваність відгуків масиву біосенсорів впродовж 15 вимірювань. Концентрації субстратів у вимірювальній комірці: глутамат (1) – 50 мкМ, глюкоза (2) – 100 мкМ, холін (3) – 100 мкМ, ацетилхолін (4) – 100 мкМ, лактат (5) – 50 мкМ та піруват (6) – 250 мкМ. Вимірювання

проводили у 5 мМ НЕРЕС буферному розчині, рН 7,4, за постійного потенціалу +0,6 В відносно Ag/AgCl електрода порівняння

Всі біосенсори характеризувалися високою відтворюваністю відгуків; відносне середньоквадратичне відхилення відгуків не перевищувало 5 %, що свідчить про можливість ефективного використання масиву біосенсорів для проведення багатьох вимірювань впродовж дня.

**5.8.4. Селективність біосенсорів.** Було необхідним перевірити перехресний вплив субстратів, тобто дослідити чутливість кожного біосенсора в складі масиву до субстратів інших біосенсорів. З цією метою у вимірювальну комірку додавали глютамат, глюкозу, холін, ацетилхолін, лактат та піруват в концентрації 1 мМ.

Було встановлено, що при додаванні пірувату, лактату, глюкози, глютамату та холіну реагує лише біосенсор, чутливий до даного субстрату, а інші біосенсори не проявляють перехресний відгук. Натомість біосенсор для визначення ацетилхоліну був чутливий не тільки до ацетилхоліну, але і до холіну, оскільки біоселективний елемент біосенсора містить ацетилхолінестеразу та холінооксидазу. Відгук даного біосенсора на холін становив 109% від відгуку на ацетилхолін. З цієї причини для аналізу реальних зразків слід використовувати одночасно холіновий і ацетилхоліновий біосенсори, щоб можливо було роздільно визначити концентрації холіну та ацетилхоліну.

**5.8.5. Вплив характеристик робочого буферного розчину на роботу мультибіосенсорної системи.** Властивості розчину, в якому проводять вимірювання, впливають на роботу біосенсорів. Зокрема, зміна концентрації буферного компонента або додавання біологічного зразку до вимірювальної комірки призводить до зміни буферної ємності, що може впливати на роботу біосенсорів. Тому було вирішено дослідити, як

зміняться відгуки масиву біосенсорів при різних концентраціях буферного компонента (HEPES). Результати дослідження представлені на рис. 5.12.

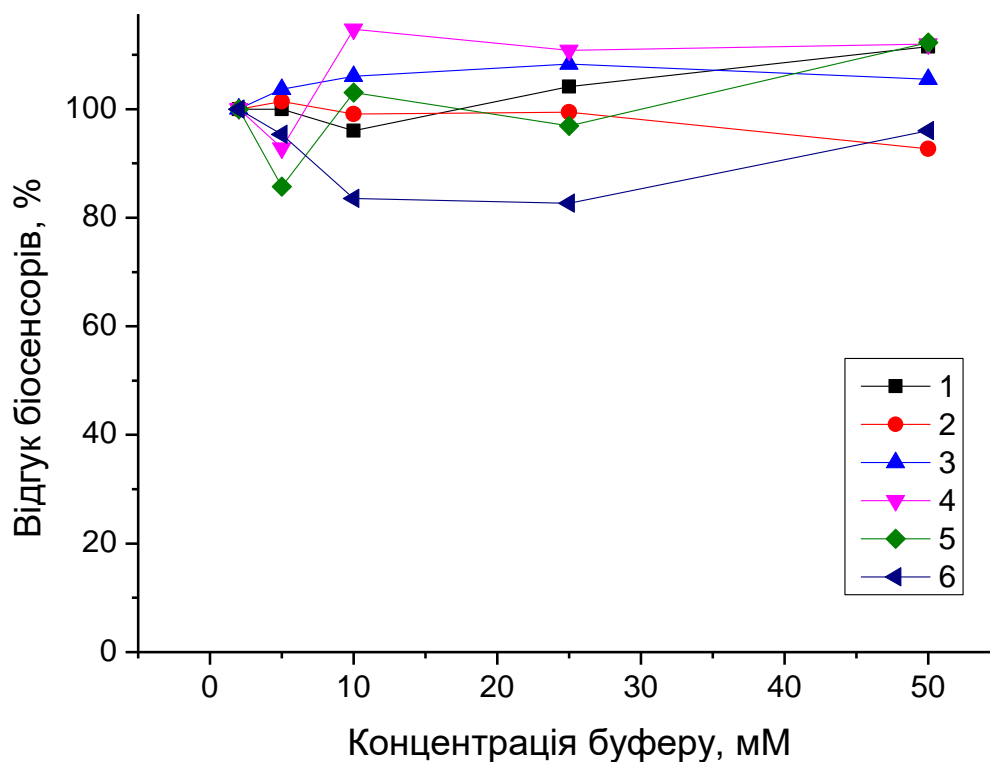


Рис. 5.12. Залежність відгуків біосенсорної системи для одночасного визначення концентрації глутамату (1), глюкози (2), холіну (3), ацетилхоліну (4), лактату (5) та пірувату (6) від буферної ємності розчину. Вимірювання проводили в універсальному буферному розчині, за постійного потенціалу +0,6 В відносно Ag/AgCl електрода порівняння

Величини відгуків всіх біосенсорів практично не змінювались зі збільшенням концентрації буферного розчину. Швидкість відгуків теж залишилась однаковою. Це дає можливість використовувати пропонований масив біосенсорів в біологічних зразках, що характеризуються різними буферними ємностями.

Також проведено дослідження роботи біосенсорів в залежності від різної концентрації іонів у розчині. Як джерело іонів було використано

розчин NaCl, який додавали до робочої комірки в різних аліквотах, щоб отримати в робочому буферному розчині концентрації від 0 мМ до 50 мМ. Результати дослідження представлено на рис. 5.13.

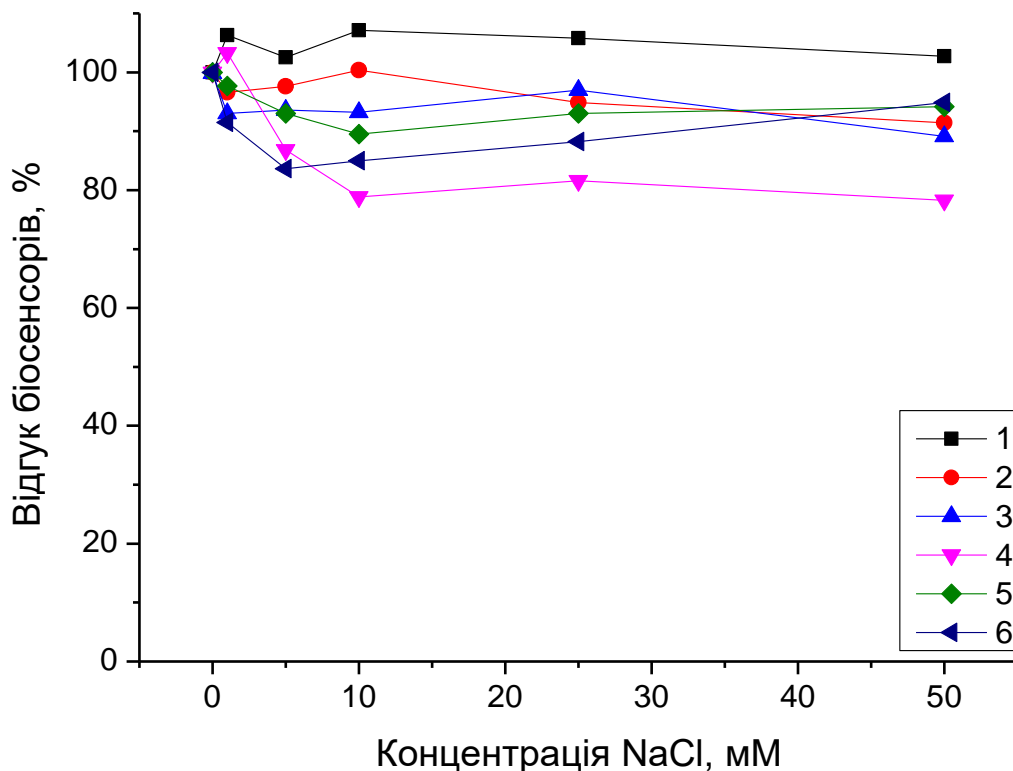


Рис. 5.13. Залежність відгуків біосенсорної системи для одночасного визначення концентрації глутамату (1), глюкози (2), холіну (3), ацетилхоліну (4), лактату (5) та пірувату(6) від концентрації іонів у розчині. Вимірювання проводили 25 мМ HEPES буферному розчині, рН 7,4, за постійного потенціалу +0,6 В відносно Ag/AgCl електрода порівняння

Як бачимо, значних змін відгуків біосенсорів при наявності в робочій комірці різних концентрацій NaCl не спостерігалось. Це свідчить про можливість використання даного масиву біосенсорів в біологічних зразках, що характеризуються різною іонною силою.

Будь-який ензим має робочий діапазон рН та оптимальне значення рН. За даними виробників, оптимальне значення рН для роботи ГЛОД становить 7-9; ГОД – 5,5 (4-7); ХО – 8,0-8,5; АХЕ – 8,0; ЛОД – 6,5; ПОД – 6,7. Проте рН-оптимум ензимів часто змінюється після іммобілізації. Інколи робочий діапазон рН стає суттєво ширшим після іммобілізації ензиму [89]. В нашому випадку біосенсиори містять ензими з різними рН-оптимумами, тому було необхідно визначити оптимальний рН для одночасної роботи всіх біосенсорів.

Для проведення експерименту було використано універсальний буфер («полімікс»), що містив Тріс-НСІ,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , лимонну кислоту та тетраборат натрію в концентраціях 5 мМ. Цей буфер має приблизно однакову буферну ємність у широкому діапазоні значень рН. Були приготовлені розчини з рН в діапазоні від 4,5 до 10,5, які по чергово поміщали у робочу комірку і отримували відгуки біосенсорів на субстрати. Результати експерименту наведено на рис. 5.14.

Оптимальний діапазон рН для визначення глутамату становив: рН 7-9; глюкози – рН 7,5-9; холіну – рН 7,5-9,5; ацетилхоліну – рН 8-8,5; лактату – рН 7,3-8,5; пірувату – рН 7-8.

Для подальшої роботи було обрано рН 7,4, що відповідає рН крові та інших біологічних рідин і знаходиться в оптимальному діапазоні роботи всіх біосенсорів, за винятком ацетилхолін-чутливого біосенсора. Проте відгуки ацетилхолін-чутливого біосенсора при рН 7,4 є достатньо високими для роботи і те, що рН не відповідає оптимальному значенню, не становить проблеми.

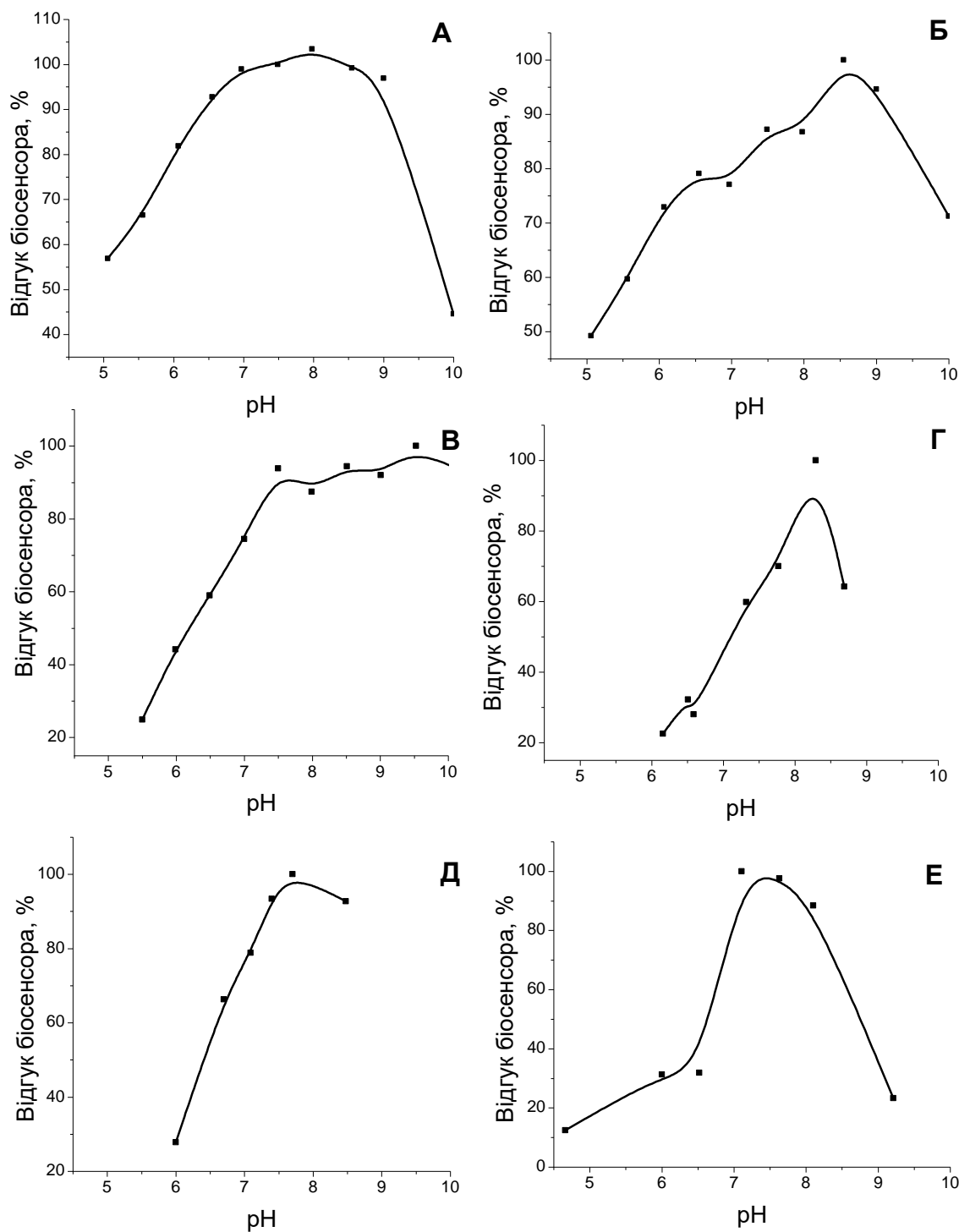


Рис. 5.14. Залежність величини відгуків масиву біосенсорів від рН буферного розчину. Показано відгуки на наступні субстрати: глутамат 200  $\mu$ М (А), глюкозу 500  $\mu$ М (Б), холін 1мМ (В), ацетилхолін 1мМ (Г), лактат 1мМ (Д), піруват 1 мМ (Е). Відгуки нормалізовано відносно максимального значення для кожного біосенсора. Вимірювання проводили у 5 мМ універсальному буферному розчині, за постійного потенціалу +0,6 В відносно Ag/AgCl електрода порівняння

**5.8.6. Аналітичні характеристики масиву біосенсорів.** Після розробки та оптимізації біосенсорів для одночасної роботи у складі масиву, було визначено аналітичні характеристики мультибіосенсорного масиву. Типові калібрувальні криві біосенсорів у складі масиву при одночасній роботі наведені на рис. 5.15, а узагальнені аналітичні характеристики монобіосенсорів – в таблиці 5.2.

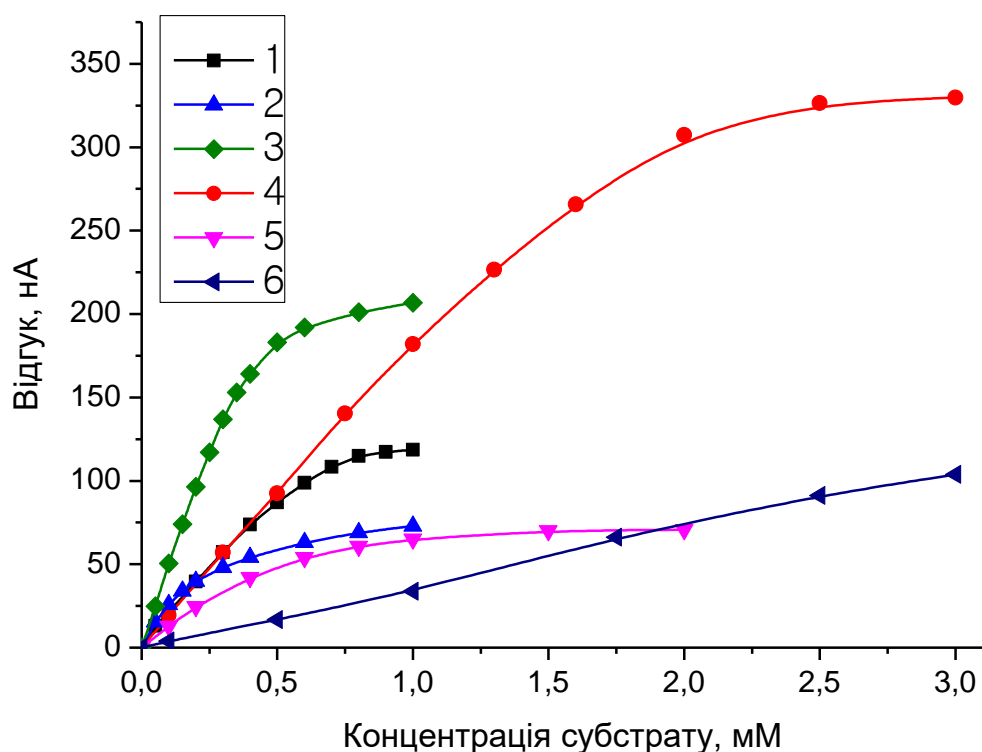


Рис. 5.15. Калібрувальні криві масиву біосенсорів для визначення: глутамату (1), холіну (2), лактату (3), глюкози (4), ацетилхоліну (5) та пірувату (6). Вимірювання проводили у 25 мМ НЕРЕС буферному розчині, рН 7,4, за постійного потенціалу +0,6 В відносно Ag/AgCl електрода порівняння

Всі біосенсори мали невеликий час відгуку (до 5 хв), що є перспективним у подальшому використанні масиву для екстреної клінічної діагностики. Відтворюваність відгуків біосенсорів впродовж дня була

високою, що дозволяло використовувати біосенсори багаторазово для точного визначення субстратів.

Таблиця 5.2.

### Аналітичні характеристики масиву біосенсорів

Субстрат	Характеристики масиву біосенсорів				
	Час відгуку, с	Чутливість нА/мМ	Лінійний діапазон, мМ	Межа визначення, мкМ	Похибка вимірювання, %
Глутамат	10 - 20	170 – 200	0,005 – 0,7	1	2,5
Холін	20 - 30	130 – 150	0,001 – 0,2	2	3
Ацетилхолін	60 - 150	100 – 120	0,01 – 0,3	3	5
Глюкоза	10-30	150 – 170	0,01 – 2	1	2
Лактат	60 - 120	440 – 460	0,005 – 1	5	2
Піруват	30 - 60	35 – 40	0,01 – 5	5	4

Найвищу чутливість до субстрату проявив лактат-чутливий біосенсор, найнижчу – піруват-чутливий біосенсор. Межа визначення у всіх біосенсорів становила до 5 мкМ. Найбільший лінійний діапазон проявили піруват-чутливий біосенсор, також глюкозо-чутливий та лактат-чутливий біосенсори.

### 5.9. Підсумки до розділу 5

Було розроблено амперометричну біосенсорну систему для одночасного визначення концентрацій лактату та пірувату в біологічних рідинах. Для поєднання монобіосенсорів у систему було оптимізовано та уніфіковано методи виготовлення біосенсорів та параметри робочого розчину. Показано, що зміна параметрів робочого розчину (таких як іонна сила та концентрація робочого буферного розчину) не впливає на роботу



біосенсорної системи. Виявлено, що рН оптимум робочого розчину для роботи іммобілізованих ензимів лежить у діапазоні від 7 до 8 та підходить для вимірювання біологічних зразків. Продемонстровано відсутність перехресного впливу субстратів монобіосенсорів, а також впливу концентрації кофакторів та компонентів буферного розчину.

Біосенсорна система відзначалась хорошою відтворюваністю відгуків та операційною стабільністю. Лінійний діапазон визначення лактату становить від 5 до 1000 мкМ, визначення пірувату - від 10 мкМ до 5 мМ, з мінімальною межею визначення лактату – 5 мкМ, пірувату – 5 мкМ.

Було проведено апробацію роботи біосенсорної системи у складі мультибіосенсорного масиву для одночасного визначення концентрацій глюкози, холіну, ацетилхоліну, глутамату, лактату та пірувату. Продемонстровано відсутність перехресного впливу біосенсорної системи з іншими компонентами масиву, а також прийнятні аналітичні показники під час одночасної роботи.

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

Топольнікова Я.В., Книжнікова Д.В., Кучеренко І.С., Дзядевич С.В., Солдаткін О.О. Розробка амперометричної біосенсорної системи для одночасного вимірювання пірувату і лактату. *Sensor Electronics and Microsystem Technologies*. 2017. Т.14, №4, С.13-26.

Топольнікова Я.В., Книжнікова Д.В., Кучеренко І.С., Солдаткін О.О. Розробка амперометричної біосенсорної системи для визначення лактату та пірувату. *Тези науково-практичної конференції з міжнародною участю «YouthNanoBioTech-2017. Молодіжний форум новітніх технологій у медицині»*, Київ, 17-18 травня 2017, С.193-194.

Topolnikova Ya.V., Knyzhnykova D.V., Kucherenko I.S., Soldatkin O.O. Development of amperometric biosensors for the determination of lactate and

pyruvate. *Abstracts of «Conference of Young Scientists Institute of Molecular Biology and Genetics NAS of Ukraine»*, Kyiv, 2017, С.235.

Кучеренко Д.Ю., Кучеренко І.С., Солдаткін О.О., Топольнікова Я.В., Книжникова Д.В., Дзядевич С.В., Солдаткін О.П. Масив ферментних біосенсорів для визначення концентрацій нейротрансмітерів та метаболітів *Sensor Electronics and Microsystem Technologies*. 2018. Т. 15, № 2, С. 39 – 53.

## РОЗДІЛ 6

### **ВИКОРИСТАННЯ РОЗРОБЛЕНОЇ БІОСЕНСОРНОЇ СИСТЕМИ ДЛЯ ОДНОЧАСНОГО ВИЗНАЧЕННЯ КОНЦЕНТРАЦІЇ ЛАКТАТУ ТА ПІРУВАТУ У ЗРАЗКАХ СИРОВАТКИ КРОВІ**

Розроблену біосенсорну систему планується використовувати для визначення концентрації лактату та пірувату в біологічних рідинах, зокрема сироватці крові для потреб клінічної діагностики.

На сьогодні у клінічній практиці використовується визначення рівня лактату та пірувату та ЛПВ для визначення рівня лактатацидозу пацієнтів, а також для розрізнення типів лактатацидозу. Зокрема, використання даних показників дозволяє передбачити такі зміни у стані пацієнта, як ймовірність настання поліорганної недостатності, колапсу, коми та клінічної смерті. Крім того, ЛПВ у крові використовується для диференційної діагностики дисфункції піруватдегідрогеназного комплексу у новонароджених.

Тому потрібно було адаптувати розроблену біосенсорну систему для одночасного визначення концентрації лактату та пірувату у реальних зразках сироватки крові людини.

#### **6.1. Визначення оптимального розведення сироватки крові**

В принципі біосенсорна система придатна для визначення лактату та пірувату у нерозведеній сироватці крові, але це не є доцільним, оскільки сироватка містить велику кількість компонентів (білки, ліпіди, фрагменти зруйнованих клітин), які можуть адсорбуються на чутливій поверхні

біосенсорів [62, 90]. Це призводить до погіршення дифузії речовин до поверхні і зменшення чутливості біосенсора.

Для зменшення впливу компонентів зразка і збільшення кількості зразків, які можуть бути проаналізовані біосенсорною системою без необхідності заміни біосенсорів, потрібно проводити розведення зразка. Друга необхідність у розведенні зразка полягає в надто високій концентрації лактату в сироватці, яка часто перевищує лінійний діапазон роботи лактат-чутливого біосенсора. Розведення зразка дозволяє зменшити концентрацію лактату у зразку, щоб отримана концентрація знаходилась в межах лінійного діапазону роботи біосенсора.

В нашому випадку розведення відбувається безпосередньо у робочій комірці, тобто попередньої обробки проби проводити не потрібно.

Концентрація лактату в крові становить від 0,5 до 2,2 мМ у нормі, а при патологічних станах може зростати до 5-8 мМ, в особливо важких станах до 10 мМ. Концентрація пірувату у крові у нормі складає від 40-50 до 100 мкМ, при патологічних станах зростає до 200-250 мкМ. Тому необхідно було підібрати таке розведення зразку сироватки крові, при якому можна оцінити концентрацію як лактату так і пірувату за умов одночасного вимірювання.

Виходячи з концентрацій лактату і пірувату в реальних зразках та лінійних діапазонів визначення даних субстратів біосенсорною системою, було обчислено можливе розведення проби – 5 – 10 разів.

В подальшій роботі використовували 5-кратне розведення зразку для забезпечення необхідної чутливості біосенсорної системи.

## **6.2. Перевірка впливу сироватки крові на лінійність відгуку біосенсорної системи**

Як було згадано раніше, передбачалося, що під час вимірювань сироватки крові можливе осадження речовин на поверхні біоселективної

мембрани біосенсорів, що призведе до поступового зменшення чутливості біосенсорів. Тому необхідно було порівняти калібрувальні криві біосенсорної системи до та після аналізу сироватки. Як виявилось, після вимірювання 7 зразків сироватки крові чутливість біосенсорної системи не тільки не зменшилась, а навіть збільшилась на 10-20 % (рис. 6.1, рис. 6.2).

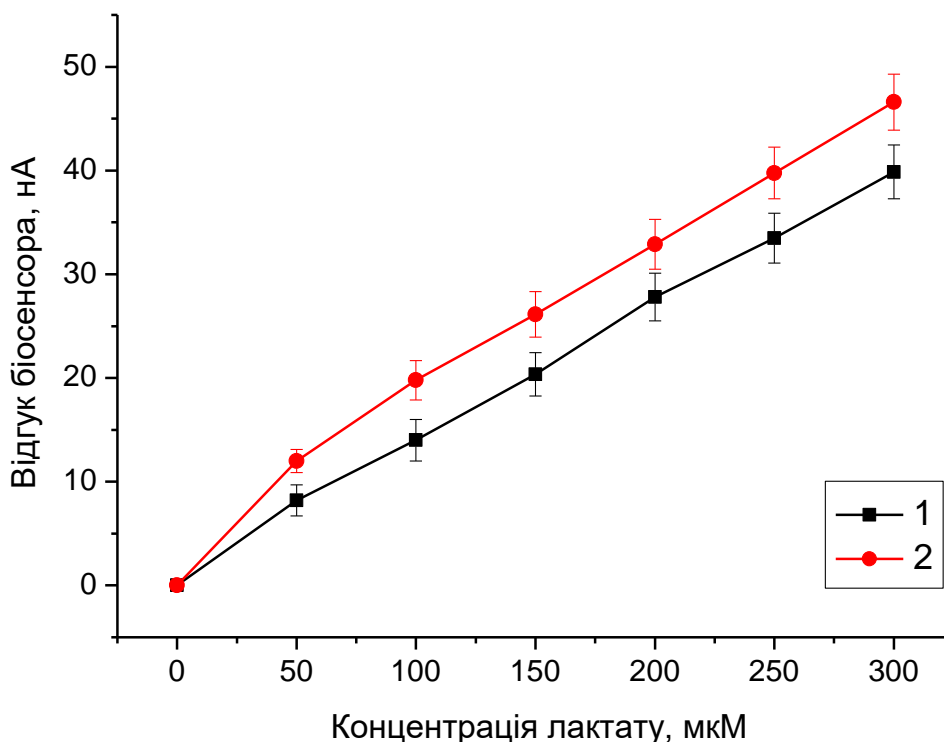


Рис. 6.1. Калібрувальні криві лактат-чутливого біосенсора, отримані до (1) та після (2) вимірювання 7 зразків сироватки крові

Ймовірно, цей ефект пояснюється поступовим відновленням активності ензимів після іммобілізації, в той час як блокування чутливої поверхні компонентами сироватки було несуттєвим. Цей ефект слід враховувати при проведенні вимірювань. Наприклад, для розрахунків концентрацій речовин можливо використовувати середню чутливість біосенсорів до та після аналізів сироватки, або ввести коефіцієнт збільшення чутливості біосенсорів з часом. Також можливе використання

методу стандартних додавань, для якого не потрібне попереднє отримання калібрувальних кривих.

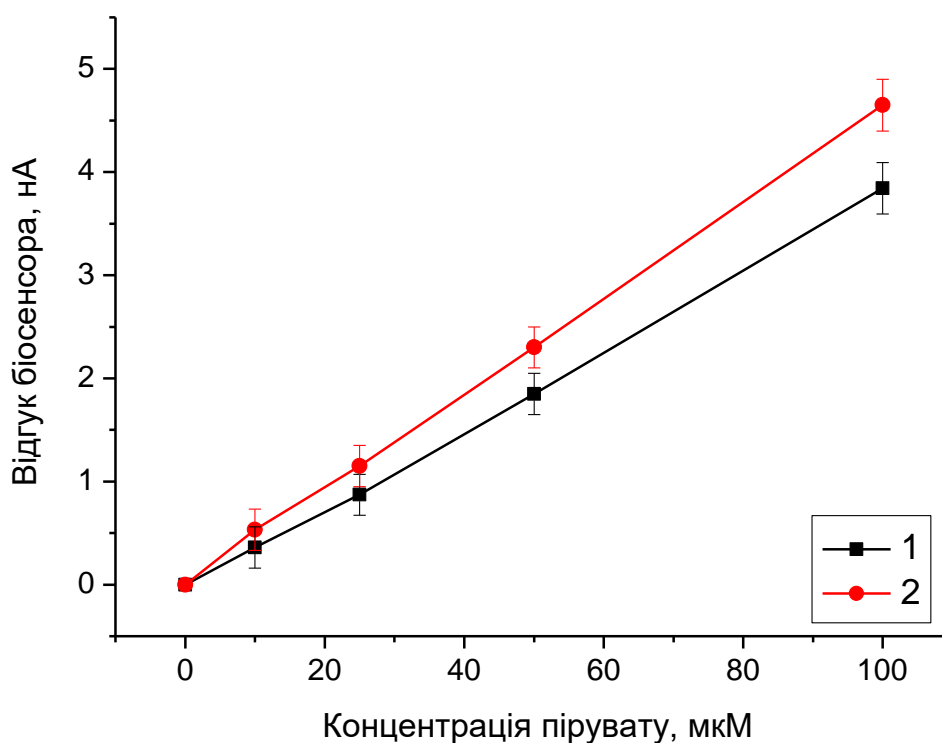


Рис. 6.2. Калібрувальні криві піруват-чутливого біосенсора, отримані до (1) та після (2) семи вимірювань сироватки крові

### 6.3. Відтворюваність відгуків біосенсорної системи при роботі з сироваткою крові

Відтворюваність відгуків біосенсорів є важливою аналітичною характеристикою, яка показує розбіжність між результатами декількох вимірювань одного зразку. Для її оцінки було отримано 7 відгуків біосенсорної системи на додавання сироватки крові до робочої комірки (рис. 6.3). Під час вимірювань, зменшення відгуків не спостерігалось. Відносне середньоквадратичне відхилення відгуків лактат-чутливого біосенсора становило 5 %, а піруват-чутливого – 9,3%. Це свідчить про достатньо високу точність біосенсорної системи і можливість її

практичного використання для багаторазового вимірювання реальних зразків.

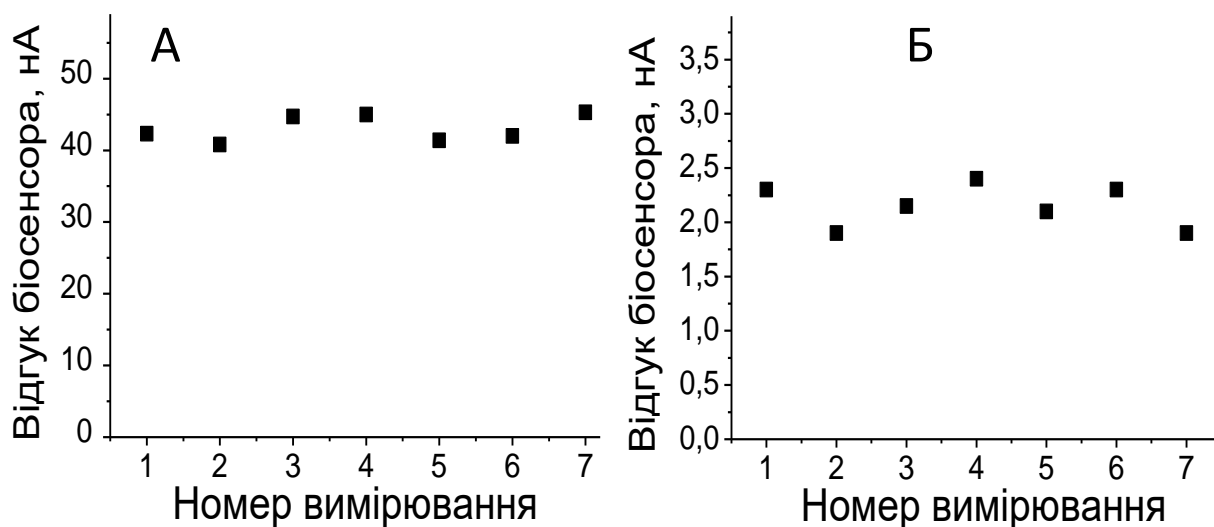


Рис. 6.3. Відтворюваність відгуків лактат-чутливого біосенсора (А) та піруват-чутливого біосенсора (Б) при проведенні послідовних вимірювань сироватки крові.

#### 6.4. Визначення концентрації лактату, пірувату і їх співвідношення у зразках сироватки крові

Після оптимізації процедури вимірювання було проведено визначення концентрації лактату та пірувату у зразках сироватки крові пацієнтів Інституту ендокринології та обміну речовин. Біосенсорне визначення проводили із використанням калібрувальних кривих. Контрольним методом визначення концентрації лактату та пірувату виступав спектрофотометричний метод (таблиця 6.1).

Таблиця 6.1.

**Результати визначення концентрацій лактату та пірувату в зразках сироватки крові за допомогою біосенсорної системи та спектрофотометричного метода.**

Номер зразку	Концентрація лактату		Концентрація пірувату		Співвідношення лактату до пірувату	
	Біосенсор*, мМ	Спектрофотометрія, мМ	Біосенсор*, мкМ	Спектрофотометрія, мкМ	Б**	СФ***
1	2,7 ± 0,7	3,0 ± 0,7	113 ± 19	121 ± 21	24	25
2	1,4 ± 0,3	1,1 ± 0,3	116 ± 18	108 ± 20	12	10
3	1,1 ± 0,3	1,1 ± 0,3	98 ± 15	91 ± 14	11	12
4	0,6 ± 0,1	0,54 ± 0,2	31 ± 4	25 ± 4	19	21
5	1,3 ± 0,3	1,3 ± 0,4	32 ± 3	27 ± 5	41	48
6	1,2 ± 0,3	1,0 ± 0,3	26 ± 6	35 ± 7	46	29
7	1,4 ± 0,3	1,6 ± 0,6	134 ± 17	146 ± 20	10	10

\*Визначення проводили на 4 різних біосенсорах. \*\*Біосенсор.

\*\*\*Спектрофотометрія.

Також були побудовані кореляційні графіки (рис. 6.4, рис. 6.5). Кореляція ( $R^2$ ) між результатами, отриманими за допомогою лактат-чутливого біосенсора і спектрофотометрією становила 0,944, результатами піруват-чутливого біосенсора і спектрофотометрією – 0,964, що є досить високими показниками і свідчить про співвідносність результатів біосенсорної системи та контрольного метода. Таким чином, біосенсорну систему можна використовувати для одночасного визначення концентрацій лактату, пірувату і їх співвідношення у сироватці крові.



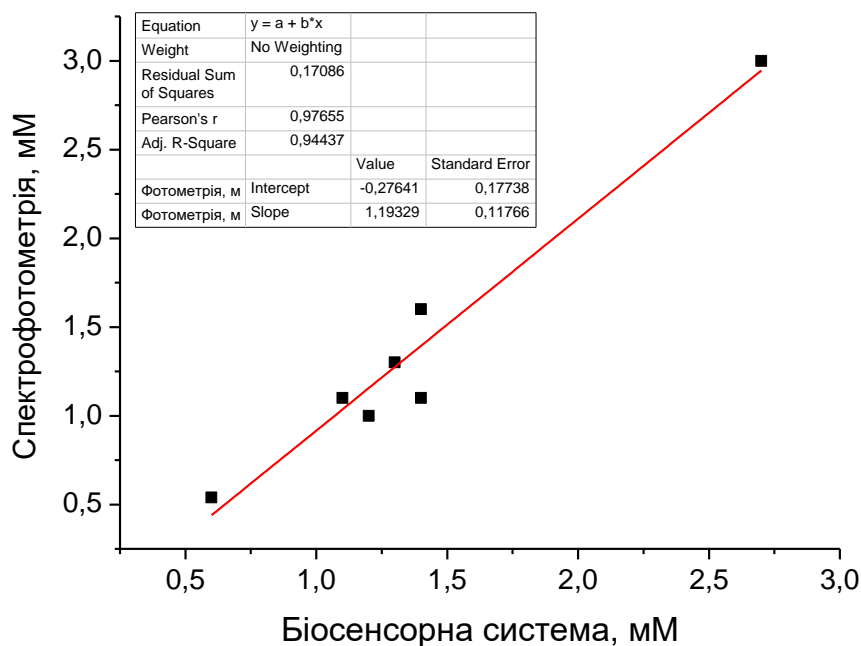


Рис. 6.4. Кореляція між результатами визначення концентрацій лактату в сироватці крові за допомогою біосенсорної системи та спектрофотометричного метода.

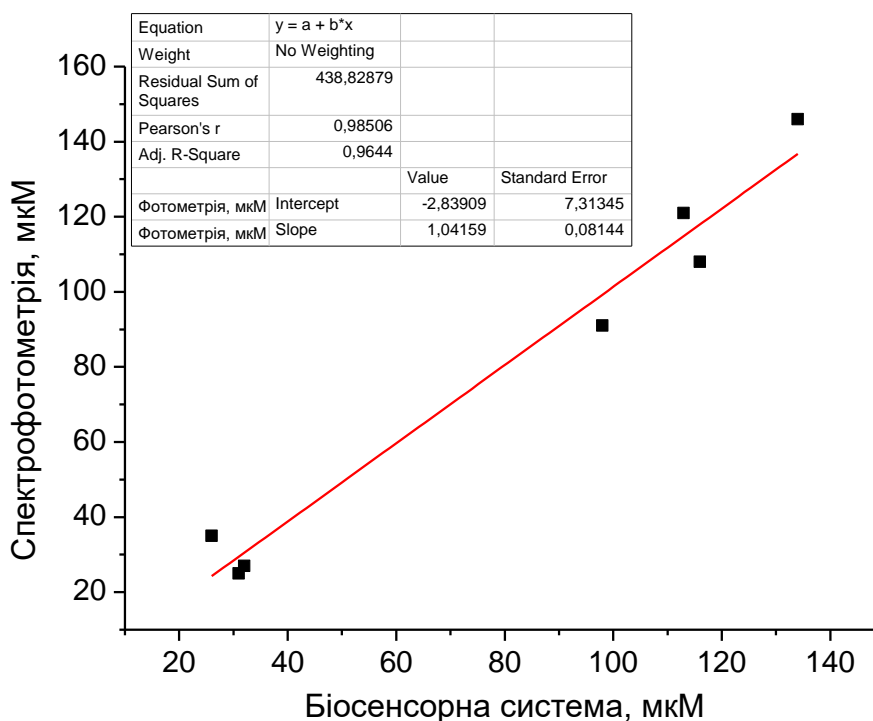


Рис. 6.5. Кореляція між результатами визначення концентрацій пірувату в сироватці крові за допомогою біосенсорної системи та спектрофотометричного метода.

Доцільно порівняти отримані результати з літературними даними. Зокрема, в роботі [91] у 7 здорових людей у стані спокою концентрація лактату в крові була встановлена як  $0,8 \pm 0,03$  мМ, а пірувату –  $0,11 \pm 0,04$  мМ. Співвідношення лактату до пірувату становило  $8,9 \pm 3,2$ . В іншій роботі досліджували концентрації лактату і співвідношення лактату до пірувату у 60 пацієнтів з шоківим станом і лактатацидозом [92]. У випадку септичного шоку, концентрації лактату становили від 4,6 мМ до 12,2 мМ, а співвідношення лактату до пірувату – від 19 до 37. В пацієнтів, які одужували, концентрація лактату зменшилась до  $2,8 \pm 0,4$  мМ, а співвідношення лактату до пірувату зменшилось до  $14 \pm 1$  після 24 годин. У випадку кардіогенного шоку, концентрація лактату складала  $4 \pm 1$  мМ, а співвідношення лактату до пірувату –  $40 \pm 6$ . В іншій роботі були встановлені співвідношення лактату до пірувату в 110 дітей з гострою печінковою недостатністю, які становили від 2,8 до 170,0, а середнє значення складало 22,5 [93]. Таким чином, наші результати вимірювань концентрацій лактату та пірувату і їх співвідношення, наведені в таблиці 6.1, є цілком співставними з літературними даними.

### 6.5. Підсумки до розділу 6

Було застосовано розроблену біосенсорну систему для одночасного визначення концентрації лактату та пірувату в сироватці крові. Обрано оптимальне розведення сироватки крові для проведення вимірювань, яке становить 5 разів. Показано, що після послідовних аналізів 7 зразків сироватки крові, біосенсорна система демонструє незначне збільшення чутливості до субстратів, що, ймовірно, пояснюється поступовою активацією ензимів в складі біоселективних елементів після їх іммобілізації. Відтворюваність відгуків біосенсорної системи при роботі з сироваткою становила 5 % для лактат-чутливого біосенсора та 9,3 % – піруват-чутливого.

Проведено визначення концентрації лактату і пірувату в 7 зразках сироватки крові, визначено співвідношення лактату та пірувату і показано високу кореляцію отриманих результатів з контрольним методом – спектрофотометричним визначенням.

Розроблену біосенсорну систему можна використовувати у клінічній діагностиці захворювань, які пов'язані зі змінами концентрації лактату та пірувату у сироватці крові.

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

Кучеренко І.С., Топольнікова Я.В., Книжникова Д.В., Солдаткін О.О. Оптимізація процедури визначення лактату та пірувату у сироватці крові за допомогою біосенсорної системи. *Sensor Electronics and Microsystem Technologies*. 2018. Т. 15, № 3, С. 31-42.

Topolnikova Ya., Knyzhnykova D., Kucherenko I., Soldatkin O. Development an electrochemical biosensor system for the determination of lactate and pyruvate concentration in human serum. *Materials of XII annual Conference of Young Scientists Institute of Molecular Biology and Genetics NAS of Ukraine*. Kyiv, 2018, С.160

## РОЗДІЛ 7

### АНАЛІЗ ТА УЗАГАЛЬНЕННЯ РЕЗУЛЬТАТІВ ДОСЛІДЖЕНЬ

Визначення концентрацій лактату та пірувату у венозній крові є актуальним у клінічних дослідженнях для оцінки перебігу патологічних станів, що обумовлюються багатьма травматичними подіями, та супроводжуються виникненням лактатацидозу. Показники рівня лактату та пірувату є інформативними для оцінки загального стану пацієнта, прогнозу розвитку поліорганної недостатності, коми та летального наслідку, а також дозволяють розрізнити різні типи лактатацидозу, та виявити дисфункцію піруватдегідрогеназного комплексу у новонароджених.

Тому метою нашої роботи стала розробка біосенсорної системи для одночасного визначення концентрації лактату та пірувату у сироватці крові.

В результаті проведених досліджень було розроблено амперометричні монобіосенсиори на основі іммобілізованих ензимів піруватоксидази та лактатоксидази для визначення концентрації лактату та пірувату у реальних зразках сироватки крові та створено їхні лабораторні прототипи.

Лабораторний прототип складається з амперометричного перетворювача на основі платинового дискового електрода та біоселективного елемента, який становить собою ензимовмісну мембрану, в товщі якої відбувається реакція окиснення субстрату та накопичується пероксид водню. Утворений пероксид водню окиснюється на поверхні робочого електрода, змінюючи силу струму, що протікає через вимірювальну комірку, пропорційно концентрації субстрату у розчині. Додаткова ПФД-мембрана забезпечує селективність до пероксиду водню

відносно електроактивних інтерферентів. Чутливі до лактату та пірувату монобіосенсиори, кожен з яких складається з окремого електрода та ензимовмісної мембрани, були поєднані у систему для одночасного визначення концентрації лактату та пірувату. Узагальнююча схема розробки монобіосенсорів приведена на рис. 7.1.



Рис. 7.1. Схема етапів виготовлення лабораторного прототипу монобіосенсора для визначення концентрацій лактату або пірувату

Першим етапом роботи з виготовлення монобіосенсорів стала підготовка платиногового дискового електрода до імобілізації ензимів. Вона включала в себе шліфування поверхні електрода, її промивання, висушування і формування ПФД-мембрани.

Оскільки лактат-чутливий біосенсор має високу селективність, відтворюваність та стабільність як при імобілізації поперечним зшиванням молекул ензиму та БСА з використанням розчину глутарового альдегіда, так і при інкапсуляції ензиму у фотополімерну мембрану на

основі PVA-SbQ, підбір універсального методу проводився з огляду на властивості піруватоксидази як менш стабільного та чутливого ензиму.

Було порівняно 3 методи іммобілізації за такими параметрами як чутливість біосенсора до субстрату, межа визначення, лінійний діапазон, шум базової лінії, дрейф базової лінії, та зниження стабільності впродовж робочого дня. Цими трьома методами були: поперечне зшивання молекул ензиму та БСА з використанням розчину глутарового альдегіда, адсорбція на поверхні частинок силікаліту, інкапсуляція ензиму у фотополімерну мембрану на основі PVA-SbQ. Як оптимальний метод іммобілізації ензимів було обрано інкапсуляцію ензиму у фотополімерну мембрану на основі PVA-SbQ, оскільки біосенсори сформовані цим методом показали високу чутливість, широкий лінійний діапазон та низький рівень шуму.

На початку роботи також проводили підбір оптимального складу робочого буферного розчину. Так, до складу буферного розчину для роботи піруват-чутливого біосенсора входили кофактори піруватоксидази: тіамінпірофосфат, іони магнію та фосфат-іони. Була досліджена залежність відгуку біосенсора від концентрації даних компонентів, та обрано найбільш оптимальні їх концентрації.

Наступним етапом стала перевірка відтворюваності відгуків монобіосенсорів при неперервній роботі, а також перевірка операційної стабільності та стабільності при зберіганні. Так, були застосовані наступні умови зберігання біосенсорів: в сухому стані за кімнатної температури, +4 °C, та -18 °C, а також в буферному розчині за кімнатної температури та +4°C. Як оптимальні умови для зберігання монобіосенсорів було обрано зберігання при -18°C в сухому стані.

На наступному етапі проводили визначення аналітичних характеристик біосенсора. За калібрувальною кривою визначали лінійний діапазон та чутливість до субстрату. Також визначали мінімальну межу визначення, яку вимірювали як концентрацію аналіту, що призводить до відгуку біосенсора в три рази більшого за величину шуму базової лінії. Для

лактату мінімальна межа визначення становила 5 мкМ, для пірувату – 5 мкМ. Лінійний діапазон роботи лактат-чутливого біосенсора складав від 5 мкМ до 1000 мкМ, чутливість до лактату становила 204 нА/мМ. Лінійний діапазон піруват-чутливого біосенсора складав від 10 мкМ до 5 мМ, чутливість до пірувату становила 31 нА/мМ.

Наступним завданням після розробки монобіосенсорів стала адаптація їх до одночасної роботи та поєднання у масив. Ці етапи відображені на Рис 7.2.

Передусім було проведено універсалізацію методів та умов іммобілізації ензимів. Оскільки для монобіосенсорів для визначення лактату та пірувату, оптимальні методи іммобілізації відрізнялись, було проведено оптимізацію умов та вибір інкапсуляції ензиму в PVA-SbQ як оптимального методу.

Основною небезпекою при одночасній роботі монобіосенсорів у складі біосенсорної системи, є перехресний вплив субстратів, продуктів і кофакторів на роботу іншого біосенсора. Тому були проведені дослідження перехресного впливу, і показано, що субстрати і кофактори не впливають на протилежні біосенсори.

Наступним етапом стала перевірка відтворюваності та операційної стабільності біосенсорної системи при одночасній роботі з реальними зразками сироватки крові людини. Відносне середньоквадратичне відхилення відгуків на лактат в середньому становило 5,0 %, а на піруват – 6,2 %. Таким чином, біосенсорна система відтворювано працювала з модельними розчинами субстратів.

Також було проведено дослідження впливу параметрів робочого буферного розчину на роботу монобіосенсорів у складі біосенсорної системи. Встановлено, що зміни концентрацій фонового електроліта, буферної ємності, та рН в діапазоні 7.1-7.5 не впливають на роботу біосенсорної системи. Оскільки кров, особливо у патологічних станах, має високу іонну силу, також може змінюватись рН і буферна ємність, це

дослідження показує, що розроблена біосенсорна система для одночасного визначення концентрації лактату та пірувату може бути придатною для роботи з реальними зразками сироватки крові, бо охоплює весь діапазон коливань цих параметрів як у нормі, так і за умови патології.

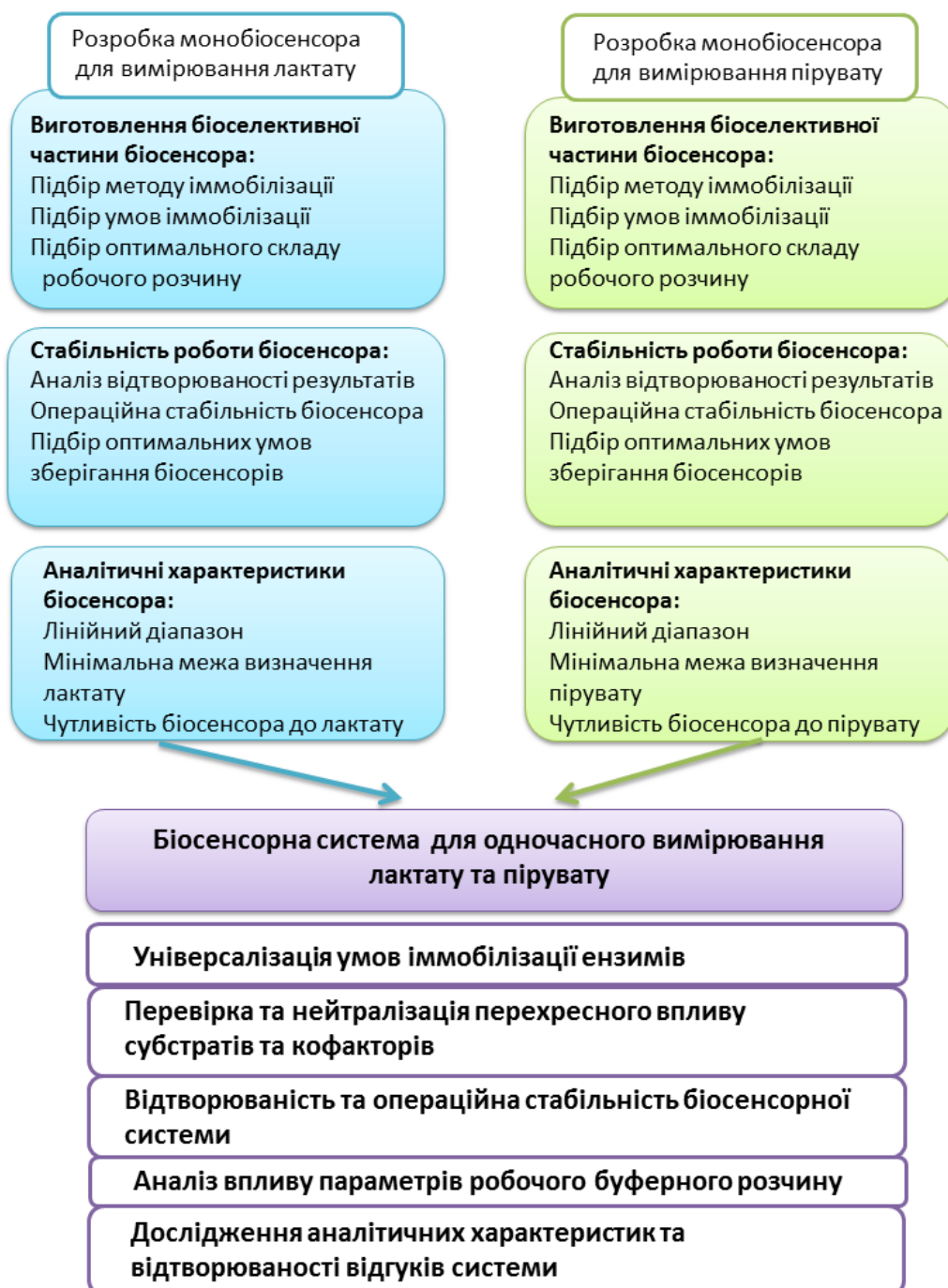


Рис. 7.2. Етапи розробки біосенсорної системи для одночасного визначення лактату та пірувату



Лінійний діапазон роботи лактат-чутливого біосенсора складав від 5 мкМ до 1000 мкМ, чутливість до лактату становила 204 нА/мМ. Лінійний діапазон піруват-чутливого біосенсора складав від 10 мкМ до 5 мМ, чутливість до пірувату становила 31 нА/мМ.

Лабораторні прототипи розроблених біосенсорів було апробовано при аналізі зразків сироватки крові. Отримані результати продемонстрували високу кореляцію з даними методу спектрофотометрії (коефіцієнт кореляції ( $R^2$ ) для визначення лактату складав 0,944, а для пірувату - 0,964).

Для аналізу реальних зразків сироватки крові нами було запропоновано схема аналізу концентрацій лактату та пірувату у венозній крові людей (рис. 7.3).

Так, відповідно до схеми, на першому етапі проводиться забір крові у пацієнта та отримання сироватки. Зразок сироватки піддають аналізу біосенсорною системою шляхом додавання аліквоти сироватки у вимірювальну комірку. Стандартне розведення при цьому складає 1: 5.

Після визначення концентрацій лактату та пірувату визначають, чи потрапляють ці значення в лінійний діапазон роботи біосенсорів. Якщо ж значення занадто великі, проводять додаткове розведення проби та повторне вимірювання.

Показники лактату та пірувату у венозній крові людини передбачається оцінювати за таким алгоритмом. За допомогою біосенсорної системи визначається рівень концентрації лактату, за цим показником робиться висновок про наявність чи відсутність лактатацидозу у пацієнта. Якщо рівень лактату суттєво підвищений відносно норми, наступним важливим показником є співвідношення лактату до пірувату.

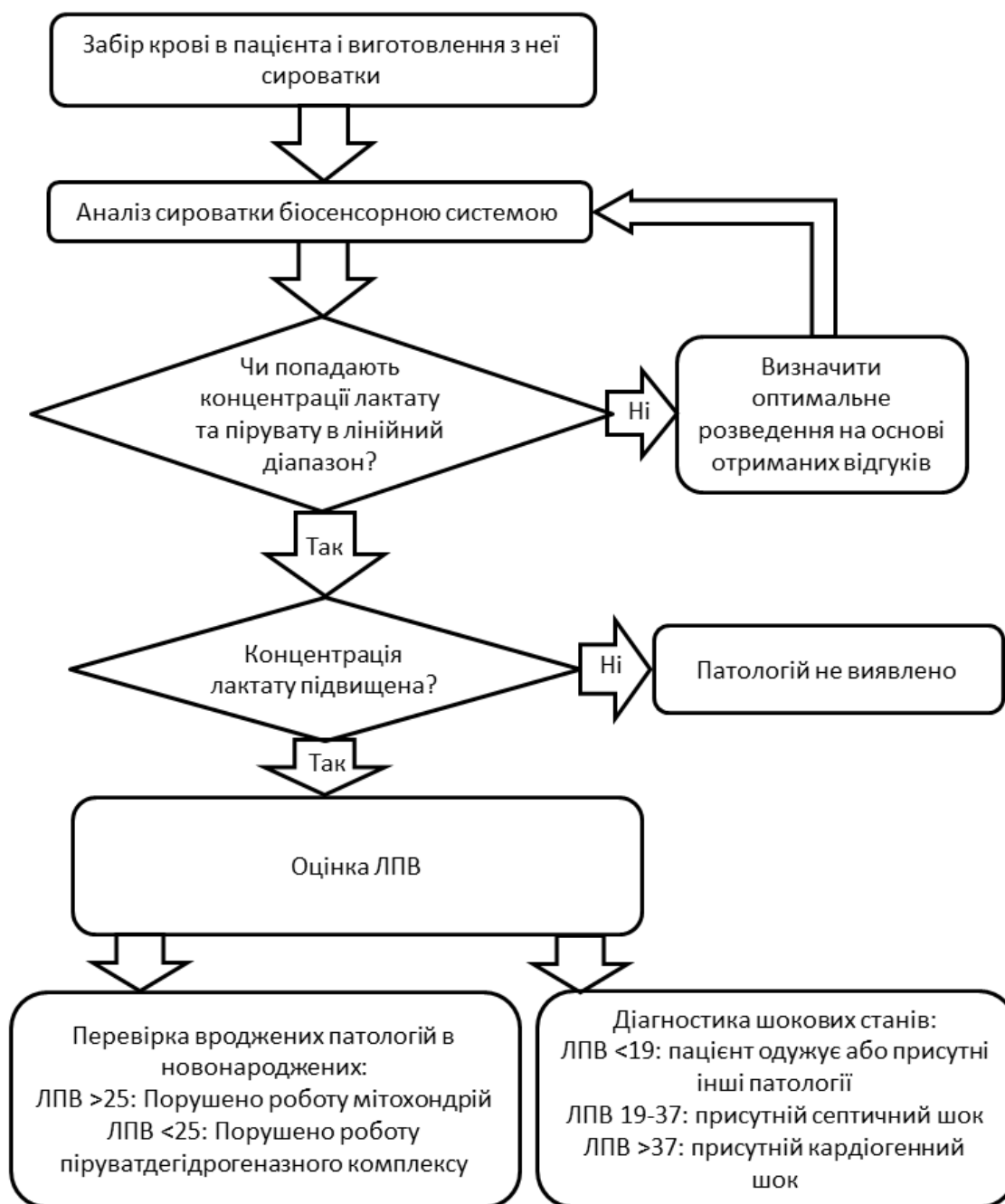


Рис. 7.3. Схема аналізу концентрацій лактату і пірувату у венозній крові людей

Так, у відділеннях неонатології, ЛПВ служить диференційним критерієм для розрізнення лактатацидозу внаслідок вродженої дисфункції піруватдегідрогеназного комплексу у новонароджених (ЛПВ>25), та лактатацидозу внаслідок порушення роботи дихального ланцюга

(ЛПВ<25), як пов'язаних з тканинною гіпоксією, так і з генетичними порушеннями.

Також за співвідношенням лактату та пірувату можна визначити тип лактатацидозу в дорослих людей, а саме, чи виник лактатацидоз внаслідок тканинної гіпоксії, характерної для багатьох патологічних станів (ішемія, пневмоторакс, асфіксія, масована крововтрата, політравма, тощо), чи в його виникненні суттєву роль відіграє порушення кліренсу лактату внаслідок патологій печінки або нирок, наприклад, при хронічному алкоголізмі.

Таким чином, розроблені біосенсори можна з високим ступенем достовірності використовувати для діагностики концентрацій лактату та пірувату у венозній крові. Слід зауважити, що метод аналізу за допомогою біосенсорів є простим, селективним, не потребує спеціальної підготовки проби, та дає переваги у швидкості аналізу.

## ВИСНОВКИ

Було розроблено біосенсорну систему для одночасного визначення концентрацій лактату і пірувату та їх співвідношення у сироватці крові людини.

1. Розроблено амперометричний лактат-чутливий монобіосенсор для визначення концентрації лактату у сироватці крові, визначено його основні аналітичні характеристики, та підібрано оптимальні умови функціонування.

2. Розроблено амперометричний піруват-чутливий монобіосенсор на основі піруватоксидази, досліджено його основні робочі характеристики та підібрано оптимальні умови функціонування для подальшого аналізу сироватки крові.

3. Проведено поєднання монобіосенсорів у систему для одночасної роботи, універсалізовано їх виготовлення, встановлено відсутність перехресного впливу субстратів. Лінійний діапазон роботи біосенсорної системи для визначення лактату склав 5 мкМ – 1 мМ, пірувату – 10 мкМ – 5 мМ, з мінімальною межею визначення лактату 5 мкМ, пірувату 5 мкМ, час аналізу 5 хв.

Апробовано функціонування розробленої біосенсорної системи у складі мультибіосенсорного масиву для одночасного визначення глюкози, лактату, пірувату, ацетилхоліну, холіну та глутамату.

4. Створену біосенсорну систему для одночасного визначення концентрацій лактату, пірувату та їх співвідношення апробовано при аналізі реальних зразків сироватки крові людини та показано високу кореляцію отриманих результатів з результатами традиційного спектрофотометричного методу (коефіцієнт кореляції ( $R^2$ ) для визначення лактату склав 0,944 а для пірувату - 0,964).

**СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ**

1. Bhat M. Pyruvic acid levels in serum and saliva: a new course for oral cancer screening? / M. Bhat, K. V. V. Prasad, D. Trivedi[et al.] // *Journal of Oral and Maxillofacial Pathology*. — 2016. — Vol. 20, No. 1. — P. 102.
2. Bhat A. Estimation of pyruvic acid in serum and saliva among healthy and potentially malignant disorder subjects - a stepping stone for cancer screening? / A. Bhat, M. Bhat, K. Prasad[et al.] // *Journal of Clinical and Experimental Dentistry*. — 2015. — P. e462–e465.
3. Bahadır E. B. Applications of commercial biosensors in clinical, food, environmental, and biotreat/biowarfare analyses / E. B. Bahadır, M. K. Sezgintürk // *Analytical Biochemistry*. — 2015. — Vol. 478. — P. 107–120.
4. Monošík R. A rapid method for determination of l-lactic acid in real samples by amperometric biosensor utilizing nanocomposite / R. Monošík, M. Stred'anský, G. Greif, E. Šturdík // *Food Control*. — 2012. — Vol. 23, No. 1. — P. 238–244.
5. Bayram E. A new pyruvate oxidase biosensor based on 3-mercaptopropionic acid/6-aminocaproic acid modified gold electrode / E. Bayram, E. Akyilmaz // *Artificial Cells, Nanomedicine, and Biotechnology*. — 2014. — Vol. 42, No. 6. — P. 418–422.
6. Zhang Z. Lactate clearance is a useful biomarker for the prediction of all-cause mortality in critically ill patients / Z. Zhang, X. Xu // *Critical Care Medicine*. — 2014. — Vol. 42, No. 9. — P. 2118–2125.
7. Pundir C. S. Determination of lactic acid with special emphasis on biosensing methods: a review / C. S. Pundir, V. Narwal, B. Batra // *Biosensors and Bioelectronics*. — 2016. — Vol. 86. — P. 777–790.
8. Fisher M. Lehninger principles of biochemistry, 3rd edition; by david l. nelson and michael m. cox / M. Fisher // *The Chemical Educator*. — 2001.

— Vol. 6, No. 1. — P. 69–70.

9. Batra B. An amperometric lactate biosensor based on lactate dehydrogenase immobilized onto graphene oxide nanoparticles-modified pencil graphite electrode / B. Batra, V. Narwal, C. S. Pundir // *Engineering in Life Sciences*. — 2016. — Vol. 16, No. 8. — P. 786–794.
10. Kruse O. Blood lactate as a predictor for in-hospital mortality in patients admitted acutely to hospital: a systematic review / O. Kruse, N. Grunnet, C. Barfod // *Scandinavian Journal of Trauma, Resuscitation and Emergency Medicine*. — 2011. — Vol. 19, No. 1. — P. 74.
11. Puskarich M. A. Prognosis of emergency department patients with suspected infection and intermediate lactate levels: a systematic review / M. A. Puskarich, B. M. Illich, A. E. Jones // *Journal of Critical Care*. — 2014. — Vol. 29, No. 3. — P. 334–339.
12. Morris E. Point-of-care lactate testing for sepsis at presentation to health care: a systematic review of patient outcomes / E. Morris, D. McCartney, D. Lasserson[et al.] // *British Journal of General Practice*. — 2017. — Vol. 67, No. 665. — P. e859–e870.
13. Luttkus A. K. Technical performance of lactate biosensors and a test-strip device during labour / A. K. Luttkus, C. Fotopoulou, J. Sehouli[et al.] // *Zeitschrift für Geburtshilfe und Neonatologie*. — 2010. — Vol. 214, No. 2. — P. 62–67.
14. Andersson P. Lactate improves sepsis prognostication / P. Andersson, A. Frigyesi // *Acta Anaesthesiologica Scandinavica*. — 2018. — Vol. 62, No. 2. — P. 220–225.
15. Kuttub H. I. Early recognition and treatment of sepsis after the addition of lactate to the laboratory's critical result call list / H. I. Kuttub, E. Sterk, M. A. Rech[et al.] // *Journal of Intensive Care Medicine*. — 2018. — Vol. 33, No. 2. — P. 111–115.
16. Singer A. J. Ed bedside point-of-care lactate in patients with suspected sepsis is associated with reduced time to iv fluids and mortality / A. J.

- Singer, M. Taylor, D. LeBlanc[et al.] // *The American Journal of Emergency Medicine*. — 2014. — Vol. 32, No. 9. — P. 1120–1124.
17. Seheult J. Lactic acidosis: an update / J. Seheult, G. Fitzpatrick, G. Boran // *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine (CCLM)*. — 2016.
18. Suetrong B. Lactic acidosis in sepsis: it's not all anaerobic / B. Suetrong, K. R. Walley // *Chest*. — 2016. — Vol. 149, No. 1. — P. 252–261.
19. Nuzzo E. Pyruvate dehydrogenase levels are low in sepsis / E. Nuzzo, X. Liu, K. Berg[et al.] // *Critical Care*. — 2015. — Vol. 19, No. Suppl 1. — P. P33.
20. Garcia-Alvarez M. Sepsis-associated hyperlactatemia / M. Garcia-Alvarez, P. Marik, R. Bellomo // *Critical Care*. — 2014. — Vol. 18, No. 5. — P. 503.
21. Debray F.-G. Diagnostic accuracy of blood lactate-to-pyruvate molar ratio in the differential diagnosis of congenital lactic acidosis / F.-G. Debray, G. A. Mitchell, P. Allard[et al.] // *Clinical Chemistry*. — 2007. — Vol. 53, No. 5. — P. 916–921.
22. Suistomaa M. Time-pattern of lactate and lactate to pyruvate ratio in the first 24 hours of intensive care emergency admissions. / M. Suistomaa, E. Ruokonen, A. Kari, J. Takala // *Shock (Augusta, Ga.)*. — 2000. — Vol. 14, No. 1. — P. 8–12.
23. Gajovic N. Operation of a miniature redox hydrogel-based pyruvate sensor in undiluted deoxygenated calf serum / N. Gajovic, G. Binyamin, A. Warsinke[et al.] // *Analytical Chemistry*. — 2000. — Vol. 72, No. 13. — P. 2963–2968.
24. Mazzei F. Peroxidase based biosensors for the selective determination of d,l-lactic acid and l-malic acid in wines / F. Mazzei, F. Botrè, G. Favero // *Microchemical Journal*. — 2007. — Vol. 87, No. 1. — P. 81–86.
25. Marrazza G. L- and d-lactate assay in real milk samples with immobilized enzyme reactors and graphite electrode. / G. Marrazza, A. Cagnini, M. Mascini // *Talanta*. — 1994. — Vol. 41, No. 6. — P. 1007–14.
26. Bravo I. Reagent-less and robust biosensor for direct determination of lactate

- in food samples / I. Bravo, M. Revenga-Parra, F. Pariente, E. Lorenzo // *Sensors*. — 2017. — Vol. 17, No. 1. — P. 144.
27. Wei W. Evaluation of sanitizing methods for reducing microbial contamination on fresh strawberry, cherry tomato, and red bayberry / W. Wei, X. Wang, Z. Xie[et al.] // *Frontiers in Microbiology*. — 2017. — Vol. 8.
28. Boor K. J. A 100-year review: microbiology and safety of milk handling / K. J. Boor, M. Wiedmann, S. Murphy, S. Alcaine // *Journal of Dairy Science*. — 2017. — Vol. 100, No. 12. — P. 9933–9951.
29. Inaba Y. Determination of d- and l-alanine concentrations using a pyruvic acid sensor. / Y. Inaba, N. Hamada-Sato, T. Kobayashi[et al.] // *Biosensors & bioelectronics*. — 2003. — Vol. 18, No. 8. — P. 963–71.
30. Suman S. Development of a lactate biosensor based on conducting copolymer bound lactate oxidase / S. Suman, R. Singhal, A. L. Sharma[et al.] // *Sensors and Actuators B: Chemical*. — 2005. — Vol. 107, No. 2. — P. 768–772.
31. Xue Q. Indirect fluorescence determination of lactate and pyruvate in single erythrocytes by capillary electrophoresis / Q. Xue, E. S. Yeung // *Journal of Chromatography A*. — 1994. — Vol. 661, No. 1–2. — P. 287–295.
32. Biagi S1, Ghimenti S, Onor M B. E. Simultaneous determination of lactate and pyruvate in human sweat using reversed-phase high-performance liquid chromatography: a noninvasive approach. / B. E. Biagi S1, Ghimenti S, Onor M // *Biomed Chromatogr*. — P. 1408–15.
33. Park JM, Josan S, Mayer D, Hurd R, Chung Y, Bendahan D, Spielman DM J. T. Hyperpolarized  $^{13}\text{C}$  nmr observation of lactate kinetics in skeletal muscle. / J. T. Park JM, Josan S, Mayer D, Hurd R, Chung Y, Bendahan D, Spielman DM // *J Exp Biol*. — 2015. — Vol. Oct;218, No. (Pt 20). — P. 3308–18.
34. Hu S, Yoshihara HA, Bok R, Zhou J, Zhu M, Kurhanewicz J V. D. Use of hyperpolarized  $[1-^{13}\text{C}]$ pyruvate and  $[2-^{13}\text{C}]$ pyruvate to probe the effects of



- the anticancer agent dichloroacetate on mitochondrial metabolism in vivo in the normal rat. / V. D. Hu S, Yoshihara HA, Bok R, Zhou J, Zhu M, Kurhanewicz J // *Magn Reson Imaging*. — 2012. — Vol. Dec., No. 30(10). — P. :1367-72.
35. Yuhei Takado, Tian Cheng, Jessica A. M. Bastiaansen, Hikari A. I. Yoshihara, Bernard Lanz, Mor Mishkovsky S. L. and A. C. Hyperpolarized <sup>13</sup>c magnetic resonance spectroscopy reveals the rate-limiting role of the blood-brain barrier in the cerebral uptake and metabolism of l-lactate in vivo / S. L. and A. C. Yuhei Takado, Tian Cheng, Jessica A. M. Bastiaansen, Hikari A. I. Yoshihara, Bernard Lanz, Mor Mishkovsky // *ACS Chem Neurosci*. — 2018. — Vol. Nov 21; 9(.
36. Nikolaus N. Amperometric lactate biosensors and their application in (sports) medicine, for life quality and wellbeing / N. Nikolaus, B. Strehlitz // *Microchimica Acta*. — 2008. — Vol. 160, No. 1–2. — P. 15–55.
37. Sin M. L. Advances and challenges in biosensor-based diagnosis of infectious diseases / M. L. Sin, K. E. Mach, P. K. Wong, J. C. Liao // *Expert Review of Molecular Diagnostics*. — 2014. — Vol. 14, No. 2. — P. 225–244.
38. Clark L. . Monitor and control of blood and tissue oxygen tensions / L. . Clark // *Trans. Am. Soc. Artif. Intern. Organs*. — 1956. — Vol. 2. — P. 41–48.
39. White S. F. Lactate, glutamate and glutamine biosensors based on rhodinised carbon electrodes / S. F. White, A. P. F. Turner, U. Bilitewski[et al.] // *Analytica Chimica Acta*. — 1994. — Vol. 295, No. 3. — P. 243–251.
40. Salimi A. Electrocatalytic reduction of h<sub>2</sub>o<sub>2</sub> and oxygen on the surface of thionin incorporated onto mwcnts modified glassy carbon electrode: application to glucose detection / A. Salimi, A. Noorbakhsh, H. Mamkhezri, R. Ghavami // *Electroanalysis*. — 2007. — Vol. 19, No. 10. — P. 1100–1108.
41. Castillo J. Biosensors for life quality / J. Castillo, S. Gáspár, S. Leth[et al.] //

- Sensors and Actuators B: Chemical. — 2004. — Vol. 102, No. 2. — P. 179–194.
42. Kress J. Enzyme accessibility and solid supports: which molecular weight enzymes can be used on solid supports? an investigation using confocal raman microscopy / J. Kress, R. Zanaletti, A. Amour[et al.] // Chemistry - A European Journal. — 2002. — Vol. 8, No. 16. — P. 3769.
43. Parra A. Design and characterization of a lactate biosensor based on immobilized lactate oxidase onto gold surfaces / A. Parra, E. Casero, L. Vázquez[et al.] // Analytica Chimica Acta. — 2006. — Vol. 555, No. 2. — P. 308–315.
44. Uzunoglu A. Layer by layer construction of ascorbate interference-free amperometric lactate biosensors with lactate oxidase, ascorbate oxidase, and ceria nanoparticles / A. Uzunoglu, I. Ramirez, E. Andreasen, L. A. Stanciu // Microchimica Acta. — 2016. — Vol. 183, No. 5. — P. 1667–1675.
45. Shkotova L. V. Amperometric biosensor for lactate analysis in wine and must during fermentation / L. V. Shkotova, T. B. Goriushkina, C. Tran-Minh[et al.] // Materials Science and Engineering: C. — 2008. — Vol. 28, No. 5–6. — P. 943–948.
46. Abayomi L. A. Development of a disposable pyruvate biosensor to determine pungency in onions (*allium cepa* l.) / L. A. Abayomi, L. A. Terry, S. F. White, P. J. Warner // Biosensors and Bioelectronics. — 2006. — Vol. 21, No. 11. — P. 2176–2179.
47. Sprules S. D. A reagentless, disposable biosensor for lactic acid based on a screen-printed carbon electrode containing meldola's blue and coated with lactate dehydrogenase, nad<sup>+</sup> and cellulose acetate / S. D. Sprules, J. P. Hart, S. A. Wring, R. Pittson // Analytica Chimica Acta. — 1995. — Vol. 304, No. 1. — P. 17–24.
48. Haghghi B. Fabrication of a highly sensitive electrochemiluminescence lactate biosensor using zno nanoparticles decorated multiwalled carbon nanotubes / B. Haghghi, S. Bozorgzadeh // Talanta. — 2011. — Vol. 85,

- No. 4. — P. 2189–2193.
49. Schabmueller C. G. J. Micromachined sensor for lactate monitoring in saliva / C. G. J. Schabmueller, D. Loppow, G. Piechotta[et al.] // *Biosensors and Bioelectronics*. — 2006. — Vol. 21, No. 9. — P. 1770–1776.
50. Chaubey A. Co-immobilization of lactate oxidase and lactate dehydrogenase on conducting polyaniline films / A. Chaubey, K. K. Pande, V. S. Singh, B. D. Malhotra // *Analytica Chimica Acta*. — 2000. — Vol. 407, No. 1–2. — P. 97–103.
51. Gerard M. Immobilization of lactate dehydrogenase on electrochemically prepared polyaniline films / M. Gerard, K. Ramanathan, A. Chaubey, B. D. Malhotra // *Electroanalysis*. — 1999. — Vol. 11, No. 6. — P. 450–452.
52. Chaubey A. Immobilization of lactate dehydrogenase on electrochemically prepared polypyrrole–polyvinylsulphonate composite films for application to lactate biosensors / A. Chaubey, M. Gerard, R. Singhal[et al.] // *Electrochimica Acta*. — 2001. — Vol. 46, No. 5. — P. 723–729.
53. Chaubey A. Application of polyaniline/sol-gel derived tetraethylorthosilicate films to an amperometric lactate biosensor. / A. Chaubey, K. K. Pande, B. D. Malhotra // *Analytical sciences : the international journal of the Japan Society for Analytical Chemistry*. — 2003. — Vol. 19, No. 11. — P. 1477–80.
54. Hakala T. K. Enzyme-aided alkaline extraction of oligosaccharides and polymeric xylan from hardwood kraft pulp / T. K. Hakala, T. Liitiä, A. Suurnäkki // *Carbohydrate Polymers*. — 2013. — Vol. 93, No. 1. — P. 102–108.
55. Homaei A. A. Enzyme immobilization: an update / A. A. Homaei, R. Sariri, F. Vianello, R. Stevanato // *Journal of Chemical Biology*. — 2013. — Vol. 6, No. 4. — P. 185–205.
56. Schückel J. One-copper laccase-related enzyme from *marasmius* sp.: purification, characterization and bleaching of textile dyes / J. Schückel, A. Matura, K.-H. van Pée // *Enzyme and Microbial Technology*. — 2011. —

- Vol. 48, No. 3. — P. 278–284.
57. Sun Y. Multilayered construction of glucose oxidase and silica nanoparticles on au electrodes based on layer-by-layer covalent attachment / Y. Sun, F. Yan, W. Yang, C. Sun // *Biomaterials*. — 2006. — Vol. 27, No. 21. — P. 4042–4049.
58. Putzbach W. Immobilization techniques in the fabrication of nanomaterial-based electrochemical biosensors: a review / W. Putzbach, N. Ronkainen // *Sensors*. — 2013. — Vol. 13, No. 4. — P. 4811–4840.
59. Yao T. Simultaneous in vivo monitoring of glucose, l-lactate, and pyruvate concentrations in rat brain by a flow-injection biosensor system with an on-line microdialysis sampling / T. Yao, T. Yano, H. Nishino // *Analytica Chimica Acta*. — 2004. — Vol. 510, No. 1. — P. 53–59.
60. Minagawa H. Development of long life lactate sensor using thermostable mutant lactate oxidase / H. Minagawa, N. Nakayama, T. Matsumoto, N. Ito // *Biosensors and Bioelectronics*. — 1998. — Vol. 13, No. 3–4. — P. 313–318.
61. Tatsuma T. Oxidase/peroxidase bilayer-modified electrodes as sensors for lactate, pyruvate, cholesterol and uric acid / T. Tatsuma, T. Watanabe // *Analytica Chimica Acta*. — 1991. — Vol. 242. — P. 85–89.
62. Wisniewski N. Methods for reducing biosensor membrane biofouling / N. Wisniewski, M. Reichert // *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*. — 2000. — Vol. 18, No. 3–4. — P. 197–219.
63. Rocchitta G. Analytical problems in exposing amperometric enzyme biosensors to biological fluids / G. Rocchitta, A. Spanu, S. Babudieri[et al.] // *Sensors*. — 2016. — Vol. 16, No. 6. — P. 780.
64. Yang X. Modeling analysis of electrode fouling during electrolysis of phenolic compounds / X. Yang, J. Kirsch, J. Fergus, A. Simonian // *Electrochimica Acta*. — 2013. — Vol. 94. — P. 259–268.
65. O'Hare D. Biosensors and sensor systems / D. O'Hare // *Body Sensor Networks*. — London : Springer London, 2014. — P. 55–115.

66. Arkhypova V. N. Multibiosensor based on enzyme inhibition analysis for determination of different toxic substances. / V. N. Arkhypova, S. V Dzyadevych, A. P. Soldatkin[et al.] // *Talanta*. — 2001. — Vol. 55, No. 5. — P. 919–27.
67. Palmisano F. Simultaneous monitoring of glucose and lactate by an interference and cross-talk free dual electrode amperometric biosensor based on electropolymerized thin films / F. Palmisano, R. Rizzi, D. Centonze, P. G. Zambonin // *Biosensors and Bioelectronics*. — 2000. — Vol. 15, No. 9–10. — P. 531–539.
68. Dempsey E. Design and development of a miniaturised total chemical analysis system for on-line lactate and glucose monitoring in biological samples / E. Dempsey, D. Diamond, M. R. Smyth[et al.] // *Analytica Chimica Acta*. — 1997. — Vol. 346, No. 3. — P. 341–349.
69. Osborne P. G. Plastic film carbon electrodes: enzymatic modification for on-line, continuous, and simultaneous measurement of lactate and glucose using microdialysis sampling / P. G. Osborne, O. Niwa, K. Yamamoto // *Analytical Chemistry*. — 1998. — Vol. 70, No. 9. — P. 1701–1706.
70. Jena B. K. Electrochemical biosensor based on integrated assembly of dehydrogenase enzymes and gold nanoparticles / B. K. Jena, C. R. Raj // *Analytical Chemistry*. — 2006. — Vol. 78, No. 18. — P. 6332–6339.
71. Garjonyte R. Prussian blue- and lactate oxidase-based amperometric biosensor for lactic acid / R. Garjonyte, Y. Yigzaw, R. Meskys[et al.] // *Sensors and Actuators B: Chemical*. — 2001. — Vol. 79, No. 1. — P. 33–38.
72. Romero M. R. Design and optimization of a lactate amperometric biosensor based on lactate oxidase cross-linked with polymeric matrixes / M. R. Romero, F. Garay, A. M. Baruzzi // *Sensors and Actuators B: Chemical*. — 2008. — Vol. 131, No. 2. — P. 590–595.
73. Özkan M. Thermostable amperometric lactate biosensor with *Clostridium thermocellum* l-ldh for the measurement of blood lactate / M. Özkan, E.

- Erhan, Ö. Terzi[et al.] // *Talanta*. — 2009. — Vol. 79, No. 5. — P. 1412–1417.
74. Situmorang M. The development of a pyruvate biosensor using electrodeposited polytyramine / M. Situmorang, J. J. Gooding, D. B. Hibbert, D. Barnett // *Electroanalysis*. — 2002. — Vol. 14, No. 1. — P. 17–21.
75. Bergmann W. A bienzyme modified carbon paste electrode for amperometric detection of pyruvate / W. Bergmann, R. Rudolph, U. Spohn // *Analytica Chimica Acta*. — 1999. — Vol. 394, No. 2–3. — P. 233–241.
76. Arai G. Pyruvate sensor based on pyruvate oxidase immobilized in a poly(mercapto-p-benzoquinone) film / G. Arai, T. Noma, H. Habu, I. Yasumori // *Journal of Electroanalytical Chemistry*. — 1999. — Vol. 464, No. 2. — P. 143–148.
77. Canbay E. A microbial biosensor based on lactobacillus delbruecki sp. bacterial cells for simultaneous determination of lactic and pyruvic acid / E. Canbay, A. Habip, G. Kara[et al.] // *Food Chemistry*. — 2015. — Vol. 169. — P. 197–202.
78. Revzin A. F. Glucose, lactate, and pyruvate biosensor arrays based on redox polymer/oxidoreductase nanocomposite thin-films deposited on photolithographically patterned gold microelectrodes / A. F. Revzin, K. Sirkar, A. Simonian, M. V. Pishko // *Sensors and Actuators B: Chemical*. — 2002. — Vol. 81, No. 2–3. — P. 359–368.
79. Офіційний сайт компанії-розробника lactate pro  
<http://www.lactatepro.com.au/lactatepro/2018-06-06/> / .
80. Офіційний сайт компанії ekf diagnostic for life  
[https://www.ekfdiagnostics.com/biosen-analyzer.html](https://www.ekfdiagnostics.com/biosen-analyzer.html/) / .
81. Офіційний сайт компанії nova biomedica <http://www.novabio.us/statstrip-lactate/#/> / .
82. Офіційний сайт компанії apexbio  
<http://www.apexbio.com/web/products/content.php?product=as60000f3/> / .

83. Dani J. A. Synaptic plasticity and nicotine addiction / J. A. Dani, D. Ji, F.-M. Zhou // *Neuron*. — 2001. — Vol. 31, No. 3. — P. 349–352.
84. Wise D. Internal standard method for the measurement of choline and acetylcholine by capillary electrophoresis with electrochemical detection / D. Wise, T. Barkhimer, P. Brault[et al.] // *Journal of Chromatography B*. — 2002. — Vol. 775, No. 1. — P. 49–56.
85. Upadhyay S. Immobilization of acetylcholinesterase–choline oxidase on a gold–platinum bimetallic nanoparticles modified glassy carbon electrode for the sensitive detection of organophosphate pesticides, carbamates and nerve agents / S. Upadhyay, G. R. Rao, M. K. Sharma[et al.] // *Biosensors and Bioelectronics*. — 2009. — Vol. 25, No. 4. — P. 832–838.
86. Boutelle M. G. Enzyme packed bed system for the on-line measurement of glucose, glutamate, and lactate in brain microdialyzate / M. G. Boutelle, L. K. Fellows, C. Cook // *Analytical Chemistry*. — 1992. — Vol. 64, No. 17. — P. 1790–1794.
87. Shram N. F. In vivo voltammetric detection of rat brain lactate with carbon fiber microelectrodes coated with lactate oxidase / N. F. Shram, L. I. Netchiporouk, C. Martelet[et al.] // *Analytical Chemistry*. — 1998. — Vol. 70, No. 13. — P. 2618–2622.
88. Zhang F.-F. Simultaneous assay of glucose, lactate, l-glutamate and hypoxanthine levels in a rat striatum using enzyme electrodes based on neutral red-doped silica nanoparticles / F.-F. Zhang, Q. Wan, C.-X. Li[et al.] // *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. — 2004. — Vol. 380, No. 4. — P. 637–642.
89. Dizge N. Immobilization of invertase onto poly(3-methylthienyl methacrylate)/poly(3-thiopheneacetic acid) matrix / N. Dizge, O. Gunaydin, F. Yilmaz, A. Tanriseven // *Biochemical Engineering Journal*. — 2008. — Vol. 40, No. 1. — P. 64–71.
90. Rocchitta G. Enzyme biosensors for biomedical applications: strategies for safeguarding analytical performances in biological fluids / G. Rocchitta, A.

- Spanu, S. Babudieri[et al.]. — 2016.
91. Mintun M. A. Increased lactate/pyruvate ratio augments blood flow in physiologically activated human brain / M. A. Mintun, A. G. Vlassenko, M. M. Rundle, M. E. Raichle // *Proceedings of the National Academy of Sciences*. — 2004. — Vol. 101, No. 2. — P. 659–664.
  92. Levy B. Evolution of lactate/pyruvate and arterial ketone body ratios in the early course of catecholamine-treated septic shock / B. Levy, L.-O. Sadoune, A.-M. Gelot[et al.] // *Critical Care Medicine*. — 2000. — Vol. 28, No. 1. — P. 114–119.
  93. Feldman A. G. Lactate and lactate: pyruvate ratio in the diagnosis and outcomes of pediatric acute liver failure / A. G. Feldman, R. J. Sokol, R. M. Hardison[et al.] // *The Journal of Pediatrics*. — 2017. — Vol. 182. — P. 217–222.e3.
  94. Palleschi G. Determination of lactate in human saliva with an electrochemical enzyme probe / G. Palleschi, M. H. Faridnia, G. J. Lubrano, G. G. Guilbault // *Analytica Chimica Acta*. — 1991. — Vol. 245, No. 9. — P. 151–157.
  95. Shimomura T. Amperometric l-lactate biosensor based on screen-printed carbon electrode containing cobalt phthalocyanine, coated with lactate oxidase-mesoporous silica conjugate layer / T. Shimomura, T. Sumiya, M. Ono[et al.] // *Analytica Chimica Acta*. — 2012. — Vol. 714. — P. 114–120.
  96. Piano M. Amperometric lactate biosensor for flow injection analysis based on a screen-printed carbon electrode containing meldola's blue-reinecke salt, coated with lactate dehydrogenase and NAD<sup>+</sup> / M. Piano, S. Serban, R. Pittson[et al.] // *Talanta*. — 2010. — Vol. 82, No. 1. — P. 34–37.
  97. Berezhetska O. Conductometric biosensor based on flavocytochrome b2 for l-lactate determination / O. Berezhetska, Y. Korpan, M. Gonchar // *Sensor Letters*. — 2011. — Vol. 9, No. 6. — P. 2388–2391.
  98. Gajovic N. Operation of a miniature redox hydrogel-based pyruvate sensor in undiluted deoxygenated calf serum / N. Gajovic, G. Binyamin, A.



- Warsinke[et al.] // *Analytical Chemistry*. — 2000. — Vol. 72, No. 13. — P. 2963–2968.
99. Akyilmaz E. Construction of an amperometric pyruvate oxidase enzyme electrode for determination of pyruvate and phosphate / E. Akyilmaz, E. Yorganci // *Electrochimica Acta*. — 2007. — Vol. 52, No. 28. — P. 7972–7977.
100. Ghica M. E. Development of novel glucose and pyruvate biosensors at poly(neutral red) modified carbon film electrodes. application to natural samples / M. E. Ghica, C. M. A. Brett // *Electroanalysis*. — 2006. — Vol. 18, No. 8. — P. 748–756.

## ДОДАТКИ

## Додаток А

Список публікацій здобувача:

1. Топольнікова Я.В., Кучеренко І.С., Шкотова Л.В., Хоменко І.І., Дзядевич С.В., Солдаткін О.О. Розробка амперометричного біосенсора на основі лактатоксидази для визначення лактату. *Sensor Electronics and Microsystem Technologies*. 2016. Т. 13, № 1, С. 87-97. (Особистий внесок здобувача: аналіз літературних джерел, проведення експериментальних досліджень, аналіз результатів, підготовка роботи до публікації).
2. Топольнікова Я.В., Книжникова Д.В., Кучеренко І.С., Дзядевич С.В., Солдаткін О.О. Розробка амперометричної біосенсорної системи для одночасного вимірювання пірувату і лактату. *Sensor Electronics and Microsystem Technologies*. 2017. Т.14, №4, С.13-26. (Особистий внесок здобувача: аналіз літературних джерел, проведення експериментальних досліджень, аналіз результатів, підготовка роботи до публікації).
3. Knyzhnykova D.V., Topolnikova Ya.V., Kucherenko I.S., Soldatkin O.O. Development of pyruvate oxidase-based biosensor for pyruvate determination. *Biopolymers and Cell*. 2018. Т. 34, №1, С. 14-23. (Особистий внесок здобувача: аналіз літературних джерел, проведення частини експериментальних досліджень, аналіз результатів, підготовка роботи до публікації).
4. Кучеренко Д.Ю., Кучеренко І.С., Солдаткін О.О., Топольнікова Я.В., Книжникова Д.В., Дзядевич С.В., Солдаткін О.П. Масив ферментних біосенсорів для визначення концентрацій нейротрансмітерів та метаболітів. *Sensor Electronics and Microsystem Technologies*. 2018. Т. 15, № 2, С. 39-53. (Особистий внесок здобувача: аналіз частини літературних джерел, проведення частини експериментальних досліджень з інтеграції

біосенсорів для аналізу лактату та пірувату у мультибіосенсорний масив, аналіз результатів).

5. Кучеренко І.С., Топольнікова Я.В., Книжникова Д.В., Солдаткін О.О. Оптимізація процедури визначення лактату та пірувату у сироватці крові за допомогою біосенсорної системи. *Sensor Electronics and Microsystem Technologies*. 2018. Т. 15, № 3, С. 31-42. (Особистий внесок здобувача: аналіз літературних джерел, проведення частини експериментальних досліджень, аналіз результатів).

6. Kucherenko I.S., Topolnikova Ya.V., Soldatkin O.O. Advances in the biosensors for lactate and pyruvate detection for medical applications: A review. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*. 2019. Т. 110, С. 160-172. (Особистий внесок здобувача: аналіз літературних джерел, участь в написанні статті).

7. Топольнікова Я.В., Кучеренко І.С., Солдаткін О.О., Солдаткін О.П. Розробка амперометричного біосенсора для визначення лактату. *Тези всеукраїнської науково-практичної конференції «Біотехнологія: звершення та надії»*, Київ, 21-22 травня 2015, С. 106-107.

8. Топольнікова Я.В., Солдаткін О.О., Солдаткін О.П. Оптимізація роботи амперометричного біосенсора для визначення лактату. *Тези конференції-конкурсу молодих учених «Актуальні проблеми біохімії та біотехнології – 2016»*, Київ, 26-27 травня 2016, С. 52.

9. Топольнікова Я.В., Книжникова Д.В., Кучеренко І.С., Солдаткін О.О. Розробка амперометричної біосенсорної системи для визначення лактату та пірувату. *Тези науково-практичної конференції з міжнародною участю «YouthNanoBioTech-2017. Молодіжний форум новітніх технологій у медицині»*, Київ, 17-18 травня 2017, С.193-194.

10. Topolnikova Ya.V., Knyzhnykova D.V., Kucherenko I.S., Soldatkin O.O. Development of amperometric biosensors for the determination of lactate and pyruvate. *Abstracts of the Conference of Young Scientists Institute of Molecular Biology and Genetics NAS of Ukraine*, Kyiv, 2017, С. 235.

11. Топольнікова Я.В., Книжникова Д.В., Кучеренко І.С., Солдаткін О.О. Розробка електрохімічного біосенсора для вимірювання концентрації піровиноградної кислоти. *Тези XVI Міжнародної наукової конференції «Шевченківська весна: досягнення біологічної науки / BioScience Advances»*, Київ, 24-27 квітня 2018, С. 63-64.

12. Кучеренко І.С., Кучеренко Д.Ю., Топольнікова Я.В., Книжникова Д.В., Солдаткін О.О., Дзядевич С.В., Солдаткін О.П. Масив біосенсорів для одночасного визначення глутамату, глюкози, холіну, ацетилхоліну, лактату та пірувату у водних зразках. *Тези 8-ї Міжнародної науково-технічної конференції «Сенсорна електроніка та мікросистемні технології» (СЕМСТ-8)*, Одеса, 28 травня – 01 червня 2018, С. 122.

13. Topolnikova Ya., Knyzhnykova D., Kucherenko I., Soldatkin O. Development an electrochemical biosensor system for the determination of lactate and pyruvate concentration in human serum. *Materials of XII annual Conference of Young Scientists Institute of Molecular Biology and Genetics NAS of Ukraine*, Kyiv, 2018, С. 160.

## ДОДАТОК Б

Таблиця Б.1.

## Біосенсори для визначення лактату

№	Ензим	Матеріал перетворювача	Метод іммобілізації	Час відгуку, с	Межа визначення, мкМ/Лінійний діапазон мкМ	Реальні зразки	Тривалість зберігання	Джерело
1	ЛДГ	Полікристалічний Au робочий електрод	Інкапсуляція ензиму у біокомпозиті з наступною адсорбцією	2-3	100/100-600	Н.д.	4 дні без втрати активності, 89 % активності впродовж 8 днів	[70]
2	ЛОД	Скляний карбоновий електрод, покритий берлінською лазур'ю.	Поперечне зшивання ензиму ГА	Н.д.	1/1-800	Н.д.	5 днів у сухому стані без втрати активності, 75% активності впродовж 2 тижнів	[71]

3	ЛДГ	Надрукований карбоновий модифікований 2% Meldola's Blue	Адсорбція ензиму з закріпленням за допомогою нітроцелюлози.	30-60	500/1000-20000	Н.д.	Н.д.	[47]
4	ЛОД	Золотий електрод	Фізична адсорбція	70	10/10-300	Вино, пиво	50% впродовж місяця при зберіганні в розчині фосфатного буферу при 4°C	[43]
5	ЛОД	Золотий планарний електрод з одношаровими карбоновими нанотрубками	«Сандвіч»: розміщення ензимовмісного шару між двома хітозановими шарами	65	0,96/5-244	Вино, томатна паста, яблучний сік	90% впродовж 15 міс активності при зберіганні в ексікаторі при +20°C	[4]
6	ЛОД	Платиновий електрод	Поперечне зшивання ензиму ГА у присутності альбуміну і муцину	90	0,7/0,7 – 1500	Н.д.	87% - активності при зберіганні в буферному розчині 4°C 1 місяць	[72]

7	ЛОД	Робочий електрод з тонкої плівки 20 нм титану і 200 нм платини на поверхні чіпа з багатошарового полірованого силікону	Імобілізація ензиму в порах агарозного гелю, ущільнення поліефірною плівкою	Н.д.	100/100-2500	Слина і кров людини	Н.д.	[49]
8	ЛДГ	Графітний електрод модифікований наночастинками оксиду графіту	Ковалентне зв'язування з карбоксильними групами на поверхні вуглецевих наночастинок	5	100/500-50000	Сироватка крові людини, молоко, вино, йогурт	75% активності впродовж 60 днів активного використання, зберігання в сухому стані при 4°C.	[9]
9	ЛОД	Платиновий електрод модифікований наночастинками (CeO <sub>2</sub> -CuO)	Фізична адсорбція ензиму на поверхні електроду модифікованого поліетиленіміном	10	20/20 - 1000	Н.д.	77% активності впродовж 20 день зберігання	[44]
10	ЛОД	Карбоновий електрод металізований родієм	Адсорбція ензиму (висушування у краплі без зшиваючих агентів)	60	100/100-1000	Н.д.	50% активності після 25 днів при 4 °C.	[39]

1 1	ЛОД	Платиновий електрод	Поперечне зшивання ензиму ГА у присутності альбуміну	120	Н.д.	Слина людини	Н.д.	[94]
1 2	ЛОД	Друкований карбоновий електрод покритий шаром кобальт-фталоціаніну	Імобілізація ензиму всередині мезопористого діоксиду кремнію з використанням полімерної матриці денатурованого полівінілового спирту	90	18.3/18.3-1500	Н.д.	98% активності впродовж 9 місяців при зберіганні в сухому стані при 4°C.	[95]
1 3	ЛОД	Скляний карбоновий електрод покритий шаром з наночастинками ZnO та одношаровими вуглецевими нанотрубками	Адсорбція ензиму на поверхні наночастинок, закріплення нафіоновою мембраною	Н.д.	4/10 - 1000	Плазма крові	80% активності після тижня використання (зберігання в буфері при 4°C	[48]



1 4	ЛДГ термостабільна мутантна	Золотий електрод покритий плівкою з поліпірол- поліглутаральдегіду	Поперечне зшивання ензиму ГА	Н.д.	t-ЛДГ: 155/100 0- 17500	Сироватка крові людини	100% активності t- ЛДГ впродовж тижня інкубації при 5 ° C	[73]
	ЛДГ				ЛДГ: 1160/11 60- 13000			
1 5	ЛДГ	Друкований карбоновий електрод, модифікований Meldola's Blue- Reinecke Salt	Поперечне зшивання ензиму ГА	10	500/550 -10000	Сироватка крові телят	Збереження стабільності 17 днів при 4 ° C	[96]
1 6	ЛОД	Друкований карбоновий електрод, модифікований золотими наночастинками	Адсорбція ензиму на поверхні шару наночастинок	Н.д.	2,6/5- 800	Йогурт вино, пиво	85% активності після місяця зберігання	[26]

Продовження Табл.Б.1.

1 7	ЛОД термостабільна мутантна	Платиновий електрод	Поперечне зшивання глутаровим альдегідом у присутності БСА	20	100/100 -800	Н.д.	40% активності після 40 днів зберігання	[60]
1 8	Флавоцито- хром b2	Золотий плаский електрод	Поперечне зшивання у парах ГА, у присутності БСА та феритину	Н.д.	100/100 – 15000	Н.д.	87,5% активності після 19 днів зберігання	[97]
1 9	ЛОД	Платинові друковані електроди	Фізична адсорбція на полімері	60	4/4 – 500	Вино, вино- матеріал	Н.д.	[45]

## ДОДАТОК В

Таблиця В.1.

## Біосенсори для визначення пірувату

№	Ензим	Матеріал перетворювача	Метод іммобілізації	Час відгуку, с	Межа визначення /лінійний діапазон, мкМ	Реальні зразки	Тривалість зберігання	Джерело
1	ПОД	Скляний карбоновий електрод	Поперечне зшивання ензиму у присутності поліетилен-гліколь-дігліцидил етеру	70	100/600- 1500	Сироватка телят	Н.д.	[98]
2	ПОД	Золотий дисконий електрод	Поперечне зшивання ензиму ГА	2	1.87/2.5 – 50	Н.д.	Н.д.	[5]

3	Рекомб. ПОД/ ПОД, перок- сидаза хрону	Вуглецевий пастовий електрод	Адсорбція ензиму у середині пастового електрода	Н.д.	5/10 -500	Н.д.	66% після 6 місяців в ексикаторі під шаром силікагелю	[75]
---	--	------------------------------------	---	------	-----------	------	---	------

4	ПОД	Золотий електрод Кларка	Поперечне зшивання ензиму ГА у присутності желатину	180	0.0025/0.0025 - 0.05	Н.д.	Н.д.	[99]
5	ПОД	Скляний карбоновий електрод	Імобілізація ензиму в середині провідного полімеру полі(меркапто- <i>p</i> -бензохінон)у шляхом електрополімеризації	Н.д.	1/1-2000	Н.д.	95% активності після 7 днів у розчині	[76]
6	ПОД	Друкований планарний карбо-новий електрод	Фізична адсорбція	Н.д.	2 мМ/2–12 мМ	Цибуля	Н.д.	[46]

7	ПОД	Карбоновий планарний електрод	Поперечне зшивання ензиму ГА	Н.д.	34/90 - 600	Цибуля, часник	69% актив- ності після 42 днів у буфері	[100]
8	ПОД	Скляний карбоновий електрод, платинизований та покритий політираміном	Ковалентне зшивання ензиму таполі(4- вінілпіридин Os(біпіридин) <sub>2</sub> Cl)-ко- алліламінполімеру	Н.д.	50/100-3000	Н.д.	74% активності після 50 днів при 4°C.	[74]

## ДОДАТОК Г

Таблиця Г.1.

## Біосенсорні системи та мультибіосенсори для одночасного визначення пірувату та лактату

№	Біоселективні елементи/субстрати	Матеріал перетворювача	Метод іммобілізації	Час, с	Межа вимірювання/лінійний діапазон, мкМ	Зберігання	Реальні зразки	Джерело
1	ЛОД, ГОД, ПОД / лактат, глюкоза, піруват	Платиновий дисковий електрод	Поперечне зшивання ензиму ГА у присутності альбуміну	120	Лактат, піруват: 100/100-1000	35 днів ГОД~120% ЛОД ~70% ПОД ~85%	Діалізат мозкової рідини щура	[59]
2	Мікроорганізми <i>Lactobacillus delbrueckii</i> / лактат, піруват	Платиновий електрод	Захоплення бактерій під час електрополімеризації піролу у присутності ГА	40	Лактат: 12/100-1000; піруват: 18/100-1000	Н.д.	Кефір, молоко	[77]
3	ЛОД, ПОД, ПХ, ХО, уратоксидаза / лактат, піруват, холестерол, урат	Електрод з оксиду олова	Пришивка ГА до поверхні електрода через 2-амінопропілтриетоксілан	300	Лактат:1/1-100 піруват: 1/1-100	Н.д.	Н.д.	[61]
4	ГОД, ЛОД, ПОД/ глюкоза, лактат, піруват	Золотий електрод	Іммобілізація у самозбірному шарі осмійвмісних полімерів.	20	Лактат: 0-10000 піруват:0-2000	Н.д.	Н.д.	[78]