

НАЦІОНАЛЬНА АКАДЕМІЯ НАУК УКРАЇНИ
ІНСТИТУТ МОЛЕКУЛЯРНОЇ БІОЛОГІЇ І ГЕНЕТИКИ

Жибак Михайло Тарасович

УДК 577.15+543.06+543.55+573.6

**РОЗРОБКА АМПЕРОМЕТРИЧНИХ НАНОКОМПОЗИТНИХ
БІО/ХЕМОСЕНСОРІВ ДЛЯ ВИЗНАЧЕННЯ
НИЗЬКОМОЛЕКУЛЯРНИХ МЕТАБОЛІТІВ У БІОЛОГІЧНИХ
РІДИНАХ**

03.00.20 – біотехнологія

АВТОРЕФЕРАТ

дисертації на здобуття наукового ступеня
кандидата біологічних наук

КИЇВ – 2018

Дисертацією є рукопис.

Роботу виконано в лабораторії біомолекулярної електроніки відділу механізмів трансляції генетичної інформації Інституту молекулярної біології і генетики НАН України (м. Київ).

Науковий керівник: кандидат біологічних наук, старший науковий співробітник
Корпан Ярослав Ізидорович,
Інститут молекулярної біології і генетики НАН України, лабораторія біомолекулярної електроніки, відділ механізмів трансляції генетичної інформації.

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

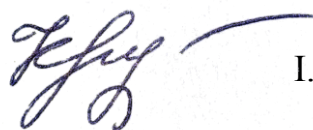
доктор біологічних наук, старший науковий співробітник
Верьовка Сергій Вікторович,
Державна установа «Інститут отоларингології ім. проф. О.С. Коломійченка» НАМН України, завідувач лабораторії біохімії.

Захист відбудеться «22» січня 2019 року о 10³⁰ годині на засіданні спеціалізованої вченої ради Д 26.237.01 Інституту молекулярної біології і генетики НАН України за адресою: 03680, м. Київ, вул. Ак. Заболотного, 150.

З дисертацією можна ознайомитися в бібліотеці Інституту молекулярної біології і генетики НАН України за адресою: 03680, м. Київ, вул. Ак. Заболотного, 150.

Автореферат розіслано «21» грудня 2018 року.

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



І.В. Крупська

ЗАГАЛЬНА ХАРАКТЕРИСТИКА РОБОТИ

Актуальність теми. Протягом останніх десятиліть одним з пріоритетних напрямів розвитку молекулярних біотехнологій стали роботи з ідентифікації біомаркерів різних захворювань людини із застосуванням метаболомних підходів (Medina et al., 2014). Реєстрація зміни концентрацій метаболітів в біологічних рідинах добре підходить для опису біохімічного стану організму (Rimbach et al., 2008), дає можливість діагностувати захворювання на ранніх стадіях, або попередити процеси різкого загострення хвороби. Зокрема, своєчасний контроль за зміною концентрації в крові креатиніну (Ashwood et al., 2006), сечовини (Eggenstein et al., 1999), іонів амонію (Barsotti, 2001), L-аргініну (Nijveldt et al., 2004) та холіну (Kim et al., 2016), які є комплексними біомаркерами для діагностики захворювань нирок та печінки, дає змогу підтримувати життєдіяльність пацієнтів, що страждають на хронічну хворобу нирок (ХХН) та цироз печінки. Такі клінічні стани характеризуються високим рівнем смертності (Haynes and Winearls, 2010), і тому швидкість проведення та отримання результатів аналізу мають вирішальне значення. В цих випадках застосування стандартних методів визначення метаболітів (флуорометрії, газової хроматографії поєднаної з мас-спектрометрією, ядерного магнітного резонансу та прямої інфузійної мас-спектрометрії (Inoue et al., 2015; Dominguez et al., 2015) є незручним через складність, високу вартість, необхідність попередньої підготовки зразків та загальну тривалість процесу.

Електрохімічні біосенсори ідеально підходять для експрес-визначення низькомолекулярних метаболітів у біологічних рідинах, завдяки високій чутливості, швидкому відгуку та вибірковості до цільових молекул, компактним розмірам, та відносно низькій вартості. Так, електрохімічні сенсорні прилади вже сьогодні є незамінними інструментами у клінічній діагностиці, зокрема при лікуванні та моніторингу клінічного стану пацієнтів, що страждають на цукровий діабет. Проте, на даний момент біосенсори для визначення глюкози становлять 85-90 % від всього світового ринку біосенсорів (Turner, 2013), тоді як експрес-системи для визначення рівня креатиніну, сечовини, іонів амонію, L-аргініну та холіну є дефіцитними або відсутніми взагалі.

На даний момент існує ціла низка лабораторних прототипів електрохімічних (амперометричних, потенціометричних, кондуктометричних) хемо- та біосенсорів для визначення вищезгаданих метаболітів – комплексних біомаркерів для діагностики захворювань нирок та печінки. Проте, більшість даних прототипів біосенсорів мали ряд спільних недоліків. Так, у випадку біосенсорів для визначення холіну все ще невирішеною залишилася проблема іммобілізації холіноксидази (Ren et al., 2009; Qin et al., 2010), а також нейтралізації впливу аскорбінової кислоти під час вимірювань у реальних зразках. Амперометричні сенсори для визначення іонів амонію та сечовини відзначалися низькою чутливістю, високою мінімальною межею визначення і низькою відтворюваністю сигналу (Luo and Do, 2004). Через відсутність

високочутливого до іонів амонію композиту, в основі більшості розробок амперометричних біосенсорів для визначення креатиніну були мультиферментні каскадні комплекси (зокрема, креатиніназа + креатиназа + саркозиноксидаза (Tsuchida and Yoda, 1983)), іммобілізовані на золотих або платинових електродах з подальшим визначенням перекису водню. Внаслідок застосування трьох, а інколи чотирьох ферментів (деякі автори додавали у каскад ще і пероксидазу (Nieh et al., 2013)) при визначенні креатиніну, чутливість біосенсора, а також стабільність іммобілізованих ферментів, була досить низькою, що ускладнювало використання таких прототипів під час вимірювань у біологічних рідинах. Подібна проблема є характерною і для більшості прототипів біосенсорів для визначення L-аргініну. Біоселективним елементом в даному випадку найчастіше були бі-ферментні комплекси, що складаються із ко-іммобілізованих аргінази I та уреази (Nikolelis and Nadjioannou, 1983; Stasyuk et al., 2012). Авторам не вдалося забезпечити оптимальні умови функціонування для обох ферментів в одній мембрані, що позначалося на чутливості і стабільності сенсорів. Також, через використання уреази за допомогою даних сенсорів неможливо проводити вимірювання у біологічних рідинах без попередньої обробки зразків.

Саме тому актуальним завданням є пошук ефективних підходів для формування високоспецифічних амоній- та пероксидчутливих наноконструктивів, а також іммобілізації біорозпізнавальних молекул на поверхню електродів та розробка на їхній основі нових амперометричних сенсорних систем для визначення холіну, іонів амонію, L-аргініну, креатиніну і сечовини.

Зв'язок з науковими програмами, планами, темами, грантами.

Дисертація відповідає основному плану науково-дослідних робіт лабораторії біомолекулярної електроніки відділу механізмів трансляції генетичної інформації Інституту молекулярної біології і генетики НАН України і виконувалася у рамках бюджетної теми 2.2.4.22 «Розробка наукових засад створення афінних біосенсорів на основі біологічних молекул та біоміметиків» (№ держ. реєстрації 012U004025; термін виконання: 2013-2017 рр.); проекту «Ідентифікація низькомолекулярних метаболітів сироватки крові як основа тест-систем для діагностики ішемічного ушкодження мозку та деяких дегенеративних захворювань» (№ держ. реєстрації 0115U002948; термін виконання: 2015-2019 рр.) цільової комплексної міждисциплінарної програми наукових досліджень НАН України «Молекулярні та клітинні біотехнології для потреб медицини, промисловості та сільського господарства»; проекту «Розробка, тестування та випуск пробної серії ензиматичного набору «Аргітест» для аналізу аргініну в клінічних зразках» (№ держ. реєстрації 0115U002952; термін виконання: 2015 р.) у рамках загальноакадемічного конкурсу науково-технічних проектів у 2015 р.; проекту «Розробка біоселективних мембран на основі вуглецевих наноматеріалів, функціоналізованих біомолекулами для створення аналітичних мікроприладів нового покоління» (№ держ. реєстрації 0110U006053; термін виконання: 2010-

2014 рр.) у рамках Державної цільової науково-технічної програми «Нанотехнології та наноматеріали»; проекту для молодих вчених «Амоній-селективні композити як основа високочутливих тест-систем для визначення креатиніну, сечовини та аргініну – маркерів захворювань нирок» (№ держреєстрації 0113U007554; термін виконання: 2013-2014 рр.). Частина результатів дисертаційної роботи отримана в рамках міжнародних проектів НАТО «Наука заради миру» (NATO Science for Peace Program; № проекту СВР.NUKR.SFPP 984173; термін виконання: 2013-2016 рр.) та в рамках програми ЄС РП7 (№ проекту PIRSES-GA-2012-318053; термін виконання: 2013-2016 рр.).

Мета та завдання дослідження. Метою роботи була розробка амперометричних нанокompозитних біо/хемосенсорів для визначення у біологічних рідинах низькомолекулярних метаболітів, зокрема холіну, іонів амонію, L-аргініну, сечовини та креатиніну.

Досягнення поставленої мети передбачало розв'язання таких завдань:

- ❖ розробка підходів для модифікації поверхонь комерційних друкованих електродів нанокompозитами на основі золь-гелів (на основі SiO_2), електропровідних полімерів (поліанілін), іономерів (нафіон), вуглецевих наноматеріалів (нанотрубки), наночастинок металів/оксидів металів (мідь/оксиди міді) за допомогою електрохімічних методів;
- ❖ розробка ефективних методів іммобілізації оксидоредуктаз та гідролаз на поверхні друкованих електродів різного походження (платина, золото, вуглець);
- ❖ дослідження структурних (морфологія та компонентний склад) та аналітичних (чутливість, селективність, стабільність, діапазон вимірювання та ін.) характеристик нанокompозитних електродів;
- ❖ конструювання лабораторних прототипів моноферментних амперометричних сенсорів на основі нанокompозитів та іммобілізованих ферментів (холіноксидази, аргініндеїмінази, креатиніндеїмінази, уреазі) для визначення холіну, іонів амонію, L-аргініну, креатиніну і сечовини; дослідження їхніх основних аналітичних характеристик;
- ❖ оптимізація характеристик створених нанокompозитних амперометричних біосенсорів для вимірювання метаболітів у реальних біологічних рідинах (сироватка та плазма людини) та їх порівняльний аналіз із стандартними методами.

Об'єкт дослідження – сукупність фізико-хімічних процесів під час формування та функціонування нанокompозитних елементів сенсорів на основі оксидоредуктаз та гідролаз для визначення холіну, іонів амонію, L-аргініну, креатиніну і сечовини.

Предмет дослідження – амперометричні сенсорні системи із використанням ензимів для визначення холіну, іонів амонію, L-аргініну, креатиніну і сечовини.

Методи дослідження: електрохімічні (вольтаметрія, хроноамперометрія, хронокулонометрія, електрохімічна імпедансна спектроскопія), фізичні (оптична спектроскопія, скануюча електронна та атомно-силова мікроскопія, X-променева фотоелектронна спектроскопія), біохімічні методи досліджень ферментативних реакцій, методи ковалентної та нековалентної іммобілізації ферментів, статистичні методи.

Наукова новизна отриманих результатів.

- Виявлено особливості іммобілізації холіноксидази на поверхні золотих друкованих електродів в БСА мембрані за присутності амінованих багат шарових нанотрубок, а також за допомогою електронанесення в силікатному золі.
- Вперше розроблено моноферментний амперометричний сенсор на основі рекомбінантної аргініндеїмінази та амоній-чутливого поліанілін/нафіон композиту, електроосадженого на друкований платиновий електрод, для визначення концентрації аргініну у зразках плазми крові людини.
- Вперше розроблено високочутливий до іонів амонію нанокомпозит на основі електроосаджених частинок міді, нафіону та електрополімеризованого поліаніліну (ПАНі/Нафіон/Cu).
- Вперше нанокомпозит ПАНі/Нафіон/Cu застосовано для розробки моноферментних сенсорів на основі креатиніндеїмінази та уреазу для визначення креатиніну і сечовини у зразках сироватки крові людини.

Практичне значення отриманих результатів. Створено лабораторні прототипи амперометричних біо/хемосенсорів для експрес-аналізу низькомолекулярних клінічно важливих метаболітів (холін, іони амонію, L-аргінін, креатинін та сечовина) та успішно проведена їх апробація в реальних зразках (дитячі молочні суміші, фармацевтичні препарати, сироватка і плазма крові). Висока селективність і чутливість, а також простота запропонованих методів значно полегшують процедуру аналізу та можуть скласти конкуренцію традиційним низькоселективним хімічним та дорогим загальноновживаним методам.

Особистий внесок здобувача. Формування наукового напрямку та вибір об'єктів дослідження, визначення мети, розробку програми проведення експериментів було здійснено автором разом із науковим керівником. Експериментальну роботу виконано здобувачем особисто, або за його безпосередньої участі. Частина роботи щодо розробки амперометричних біосенсорів для визначення холіну було виконано спільно із іншими працівниками лабораторії біомолекулярної електроніки (ЛБМЕ) ІМБГ НАНУ,

(Білоіван О.А.) та колегами із кафедри аналітичної хімії КНУ (Мазуренком Є., Тананайко О., Зайцевим В.). У тісному співробітництві із Центром біосенсорів і біоелектроніки університету м. Лінчопінг (ЛіУ) (Швеція) в особі проф. Е. Тернера (А. Turner), М. Вагіна (М. Vagin), В. Бені (V. Beni) було проведено розробку амперометричних біосенсорів для визначення іонів амонію, креатиніну та сечовини. Розробку біосенсора для визначення L-аргініну проведено у співпраці із ЛіУ та Інститутом біології клітини (ІБК) НАНУ в м. Львів (Гончар М.). У процесі написання дисертаційної роботи автором самостійно проаналізовано наукові літературні джерела за темою дослідження. Разом із співавторами здобувачем проведено підготовку наукових статей до друку у профільних наукових виданнях, а також тез та стендових доповідей.

Практичне випробування біо/хемосенсорів проведено у ЛБМЕ ІМБГ НАНУ із використанням біоматеріалу, наданого Київським міським науково-практичним центром нефрології та гемодіалізу та Центром переливання крові Київської міської лікарні «Феофанія».

Автор висловлює шире подяку всім колегам і співавторам за допомогу у підготовці і проведенні експериментальних досліджень, обговоренні отриманих результатів та підготовці результатів до публікації.

Апробація матеріалів дисертації. Матеріали дисертації доповідалися та були представлені на Міжнародній конференції “Recent Advances in Micro/Nano Sensors” (Київ, 2013); VII щорічній науковій конференції молодих вчених ІМБіГ (Київ, 2013); VIII щорічній науковій конференції молодих вчених ІМБіГ (Київ, 2014); 24-му Всесвітньому конгресі Biosensors-2014 (Мельбурн, Австралія, 2014); Міжнародній конференції “MADICA 2014” (Махдія, Туніс, 2014); 26-му Всесвітньому конгресі Biosensors-2016 (Гетеборг, Швеція, 2016).

Публікації за темою дисертації. За темою дисертації опубліковано 5 статей у фахових журналах та тези 5-ти доповідей на наукових конференціях.

Структура та обсяг роботи. Дисертація складається із наступних частин: вступу, огляду літератури, матеріалів та методів досліджень, експериментальної частини та обговорення одержаних результатів, висновків, списку використаних джерел, додатків. Загальний обсяг дисертації – 153 сторінок. Робота містить 48 рисунків і 8 таблиць. Список літератури охоплює 255 найменувань, з них кирилицею – 3, латиницею – 252.

ОСНОВНИЙ ЗМІСТ РОБОТИ

Огляд літератури. В огляді літератури розглянуто основні тенденції у розробці електрохімічних біосенсорів, а також основні проблеми при їхньому створенні та можливі шляхи їх вирішення. Описано існуючі методи, в тому числі біосенсорні, для визначення цільових метаболітів (холіну, L-аргініну,

креатиніну та сечовини). Детально проаналізовано основні характеристики існуючих методів та визначено їх головні недоліки.

Матеріали та методи. Реактиви. В роботі використано наступні реактиви: холін оксидазу (ХОД) (КФ 1.1.3.17), виділену з *Alcaligenes species*, з активністю 13,1 од.акт./мг (“Sigma”, Німеччина); аргініндеіміназу (АДІ) (КФ 3.5.3.6), виділену з *Mycoplasma hominis*, з активністю 30-35 од.акт./мг (фермент отримано і очищено в Інституті біології клітини НАН України, м. Львів); креатиніндеіміназу (КДІ) (КФ 3.5.4.21), виділену з мікроорганізмів, з активністю ≥ 25 од.акт./мг (“Sorachim”, Іспанія); уреазу (КФ 3.5.1.5), виділену із *Canavalia ensiformis*, з активністю ≥ 600 од.акт./мг; бичачий сироватковий альбумін (БСА, фракція V) (“Sigma-Aldrich Chemie”, Німеччина); тетраетилортосилікат (ТЕОС, 98%), хлорид холіну (“Fluka”, Швейцарія); цетилтриметиламоній бромід (ЦТАБ) (“Sigma”, США); сечовину, креатинін (ангідрид), хлоридну кислоту, нітрат купруму, нітратну кислоту, 5% Nafion® (нафіон), глутаральдегід (ГА) (50% м/о водний розчин), етиловий спирт (98%), D-лактитол моногідрат, гліцерин, анілін, L-аргінін моногідрохлорид (L-Арг) (“Sigma-Aldrich Chemie”, Німеччина); хлорид амонію (“Fluka”, Швейцарія); $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (99,5%) (“Merck”, Німеччина); KH_2PO_4 (99,9%) (“Prolabo”, Франція); багатошарові вуглецеві нанотрубки модифіковані аміногрупами (БШВНТ- NH_2) (“Unidym, Inc.”, США); полівінілпіролідон (ПВП) (“Merck”, Німеччина). Інші реагенти, що використовувались у роботі, були вітчизняного виробництва із ступенем чистоти “х.ч.” і “ч.д.а.”. Як робочий (електролітний) розчин використовували 1 – 200 мМ фосфатний буферний розчин (ФБ) (Na_2HPO_4 - KH_2PO_4) в залежності від експерименту. В окремих експериментах до складу ФБ також включали 1 – 20 мМ хлорид натрію.

Електроди. В роботі використовувалися друковані електроди (ДЕ), виготовлені з використанням вуглецевої (DS C110), золотої (C220 AT-type) чи платинової (DS C550) чорнильної пасти, виробництва “DropSens” (Іспанія). Діаметр робочого електрода у всіх ДЕ становив 4 мм. Кожен ДЕ також містив срібний електрод порівняння та вуглецевий (C110), золотий (C220) чи платиновий (C550) допоміжні електроди.

Методика проведення електрохімічних вимірювань. Амперометричні та вольтаметричні вимірювання проводились на портативному біпотенціостаті/гальваностаті μStat 400 (“DropSens”, Іспанія), з використанням програмного забезпечення DropView 2.0 (“DropSens”, Іспанія) згідно інструкції виробника. Амперометричні вимірювання проводили при фіксованому значенні потенціалу проти інтегрованого срібного електрода порівняння ДЕ, в комірках об’ємом 2-7 мл, наповнених буферним розчином, при постійному активному перемішуванні за допомогою магнітної мішалки “ІКА” (Німеччина).

Диференційне пульс-вольтаметричне вимірювання (ДПВ) та електрохімічну імпедансну спектроскопію проводили на приладі Autolab model

PGSTAT 30 (потенціостат/гальваностат), з використанням програмного забезпечення General Purpose Electrochemical System ("Eco Chemie", Нідерланди). Під час вимірювань електрохімічна комірка, заповнена електролітом, знаходилася у закритій клітці Фарадея. Експеримент проводили за температури 20-22 °С.

Усі вимірювання повторювали щонайменше три рази з подальшим статистичним врахуванням похибки вимірювання.

Модифікація поверхонь електродів. Модифікація платиного друкованого електроду (ПЕ) композитом ПАНі-Нафіон проводилася наступним чином: (i) на поверхню ПЕ наносили 2% нейтралізований розчин нафіону; (ii) шар ПАНі електроосадували на модифіковану нафіоном поверхню ПЕ у розчині аніліну в НСІ методом циклічної вольтаметрії (-0,4 – 1,0 В). ПЕ, модифікований композитом ПАНі-Нафіон, ретельно промивали деіонізованою водою та сушили на повітрі за температури 20-22 °С.

Модифікація вуглецевого друкованого електроду (ВЕ) композитом ПАНі-Нафіон/Si проводилася наступним чином: (i) ВЕ модифікували шаром міді методом циклічної вольтаметрії (-0,9 – 0,7 В) у розчині нітрату міді (II); (ii) ВЕ, модифікований шаром міді, промивали деіонізованою водою та висушували, а далі наносили 2% нейтралізований розчину нафіону та повторно висушували за кімнатної температури; (iii) на модифіковану Нафіон/Si поверхню електроду наносили ПАНі шляхом електроосадження із розчину аніліну в НСІ методом циклічної вольтаметрії (-0,4 – 1,0 В). ВЕ, модифікований композитом ПАНі-Нафіон/Si, ретельно промивали деіонізованою водою та висушували на повітрі за кімнатної температури.

Імобілізація ферментів. Імобілізація ХОД в SiO₂ на поверхні золотого друкованого електрода (ЗЕ) проводили наступним чином: силікатну плівку, що містила ХОД, осадували на поверхню ЗЕ електрохімічно, за методикою, описаною раніше (Rozhanchuk et al. 2009) із незначними модифікаціями. До приготованого золю почергово додавали певну кількість ЦТАБ, ФБ (рН 6,0) і розчину ХОД (10 мг·мл⁻¹). Після ретельного і обережного перемішування, 80 мкл отриманої суміші наносили на поверхню ЗЕ, таким чином, щоб покрити всі три електроди. Для завершення процесу формування золь-гель плівки, до ЗЕ прикладали потенціал -1,1 В. Після утворення плівки, вкриті золь-гель електроди промивали деіонізованою водою та висушували за кімнатної температури.

Імобілізацію ХОД за присутності багатошарових вуглецевих нанотрубок модифікованих аміногрупами (БШВНТ-NH₂) на поверхні ЗЕ проводили шляхом змішування розчинів ХОД, БСА, гліцерину, декстрану, лактитолу та БШВНТ-NH₂ у різних пропорціях з подальшим нанесенням відповідної вихідної суміші на поверхню ЗЕ. Імобілізацію проводили у насичених парах ГА протягом 35 хв. після чого залишали не менше ніж на 1

годину за температури 4°C для стабілізації структури мембран. Після цього мембрани тричі відмивали 25 мМ ФБ (рН 7,9).

Для іммобілізації АДІ готували суміш, що містила розчин АДІ та БСА у ФБ рН 7,2. 2 мкл утвореного розчину АДІ-БСА наносили на поверхню ПАНі-Нафіон/ПЕ та залишали у насичених випарах ГА на 35 хв., після чого висушували протягом 1 год. за температури 4 °С. Готові біоелектроди промивалися щонайменше 3 рази 20 мМ ФБ, рН 7,4.

Іммобілізацію КДІ та уреазу на поверхні ВЕ, модифікованого композитом ПАНі-Нафіон/Cu, проводили наступним чином: вихідний розчин відповідного ферменту змішували у відповідній пропорції із сумішшю, що містила розчинений у 20 мМ ФБ БСА, лактитол і гліцерол. 2 мкл відповідної готової ферментної суміші наносили на поверхню робочого електроду, модифікованого композитом ПАНі-Нафіон/Cu, та витримували у насичених випарах ГА для завершення процесу іммобілізації, а потім висушували впродовж 1 год. за температури 4 °С та промивали 20 мМ ФБ рН 7,4 щонайменше 3 рази.

Вимірювання в реальних зразках. В роботі використано зразки сироватки і плазми венозної крові. Зразки сироватки крові пацієнтів, що страждали на ХХН та дисфункції печінки було отримано в Київському міському науково-практичному центрі нефрології та гемодіалізу. Зразки плазми крові здорових волонтерів було отримано в Центрі переливання крові Київської міської лікарні «Феофанія». Зразки від пацієнтів було отримано з дотриманням правил і норм етики у науці, захисту персональних даних, згідно із принципами, що викладені в Гельсінській декларації Всесвітньої медичної асоціації "Етичні принципи медичних досліджень за участю людини у якості об'єкта дослідження" та інструкціями Етичного Комітету Інституту молекулярної біології та генетики НАН України.

Аналіз зразків сироватки/плазми крові на вміст іонів амонію, креатиніну, сечовини чи L-аргініну за допомогою сконструйованих амперометричних біосенсорів проводили за кімнатної температури, використовуючи метод стандартних додавань. Амперометричні відгуки сенсора фіксували у потенціостатичному режимі при значенні потенціалу -0,35 В проти Ag/AgCl електроду порівняння. Зразок сироватки/плазми додавали безпосередньо у вимірювальну комірку в такій пропорції, щоб досягти розведення зразка в 100-500 разів під час визначення рівнів креатиніну чи іонів амонію, 1000-2000 разів під час вимірювання концентрації сечовини, і 10-100 разів під час вимірювання концентрації L-аргініну.

Порівняльні дані щодо концентрації іонів амонію, креатиніну чи сечовини в досліджуваних зразках сироватки крові отримано комерційною медичною лабораторією (використано стандартні ферментні колориметричні методи). Порівняльні дані щодо концентрації L-аргініну у зразках плазми крові отримано за допомогою аналітичного флуориметричного набору «Аргітест» (Стасюк та ін. 2017).

Статистична обробка даних. Графічну та статистичну обробку результатів досліджень проводили з використанням програмного забезпечення OriginLab (Origin), та Excel (Microsoft). Експериментальні дані представлені як середні арифметичні значення із зазначенням стандартної похибки середнього значення.

РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕНЬ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Розробка амперометричних біосенсорів для визначення холіну на основі золотих друкованих електродів. У даному розділі представлені результати розробки біосенсорів для визначення холіну на основі ХОД та ЗЕ. В ході роботи було застосовано два різні підходи щодо іммобілізації ХОД (рис. 1): **а** – використання БШВНТ-NH₂ як структурного елементу БСА-ХОД мембрани; **б** – іммобілізація ХОД у силікатній плівці за допомогою електрохімічного нанесення (ЕХН). Було досліджено ефективність методів іммобілізації ХОД, а також роботу виготовлених біосенсорів, та визначені основні аналітичні параметри біосенсорів (чутливість, лінійний діапазон, мінімальна межа визначення (ММВ), операційна стабільність та стабільність при зберіганні).

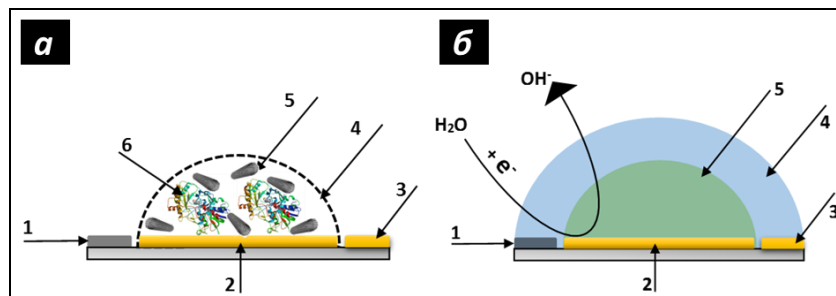


Рис.1. Схематичне зображення процесів іммобілізації ХОД на поверхні ЗЕ: **а** – схема ферментної мембрани з іммобілізованою у ГА випарах ХОД за присутності БШВНТ-NH₂ (1 – срібний псевдо-електрод порівняння; 2 – ЗЕ; 3 – золотий допоміжний електрод; 4 – БСА мембрана; 5 – БШВНТ-NH₂; 6 – ХОД); **б** – схема процесу ЕХН на поверхні ЗЕ (1 – срібний псевдо-електрод порівняння; 2 – ЗЕ; 3 – золотий допоміжний електрод; 4 – силікатний золь-гель; 5 – зона високого рН)

Методами циклічної вольтаметрії та амперометрії проведено дослідження впливу БШВНТ-NH₂ у складі біоселективної мембрани на основі ХОД, декстрану (Д) і лактитолу (Л) на чутливість та стабільність біосенсора. Встановлено, що включення БШВНТ-NH₂ за концентрації 2% в склад БСА-ХОД мембрани суттєво збільшує активну поверхню електроду, внаслідок чого зростає загальний рівень струму. Після внесення холіну у вимірювальну комірку суттєво зростає анодний струм при 0,68 В, зумовлений окисленням перекису водню (рис. 2).

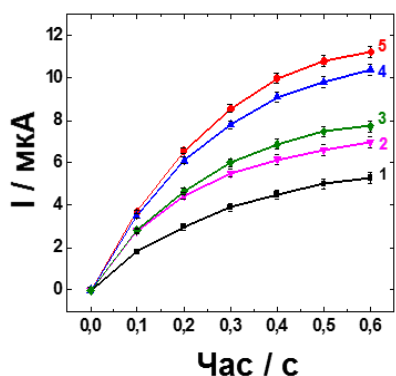


Рис. 2. Калібрувальні криві біосенсорів на основі ЗЕ та іммобілізованої ХОД: **1** – БСА-ХОД; **2** – БСА-ХОД-Д-Л-БШВНТ- NH_2 (0,5%); **3** – БСА-ХОД-Д-Л-ПВП, **4** – БСА-ХОД-Д-Л-БШВНТ- NH_2 (2%), **5** – БСА-ХОД-Д-Л. Виміри проводили у 25 мМ ФБ, рН 7,9, за кімнатної температури; $E = 0,68 \text{ В}$

Так, чутливість ЗЕ модифікованих БСА-ХОД-Д-Л-БШНТ- NH_2 (2%) складала $523 \text{ А} \cdot \text{М}^{-1} \cdot \text{М}^{-2}$, ММВ становила 5 мкМ, а лінійний діапазон – від 0,03 до 0,2 мМ, операційна стабільність складала 100 вимірювань. Мембрани, що містили БШВНТ- NH_2 , зберігали стабільність впродовж 2 тижнів, а також зберігали близько 70% чутливості після 5 місяців зберігання. Отримані дані свідчать, що застосування БШВНТ- NH_2 як структурного елементу біоселективної БСА-ХОД мембрани сприяє суттєвому підвищенню її стабільності, імовірно за рахунок підвищення кількості ковалентних зв'язків ($\text{NH}_2\text{-NH}_2$) в мембрані та зменшення набрякання мембрани в буфері, що перешкоджає вимиванню ферменту в процесі зберігання. Слід також зазначити, що не зважаючи на відмінні показники стабільності і чутливості, біосенсори характеризувалися досить вузьким лінійним діапазоном. Використання нанотрубок також призводило до збільшення фонового шуму при вимірюванні, що ускладнювало визначення холіну в концентраціях нижче 10^{-5} М .

З метою подолання недоліків вищеописаного способу іммобілізації ХОД, проведено низку експериментів із використанням силікатних золь-гелів і методу ЕХН для іммобілізації ХОД. Встановлено, що електроосаджена SiO_2 -ХОД плівка істотно не впливала на провідність та роботу ЗЕ завдяки своїй незначній товщині та пористості. При амперометричному вимірюванні (рис. 3 **а**(крива 2) та **б**) на модифікованому SiO_2 -ХОД електроді на внесення холіну спостерігався чіткий і стабільний відгук пропорційний до концентрації холіну у розчині. При вимірюваннях на ЗЕ, модифікованому у такий же спосіб, але без ферменту (рис. 3 **а**(крива 1)), жодної зміни струму за присутності холіну не відбувалося.

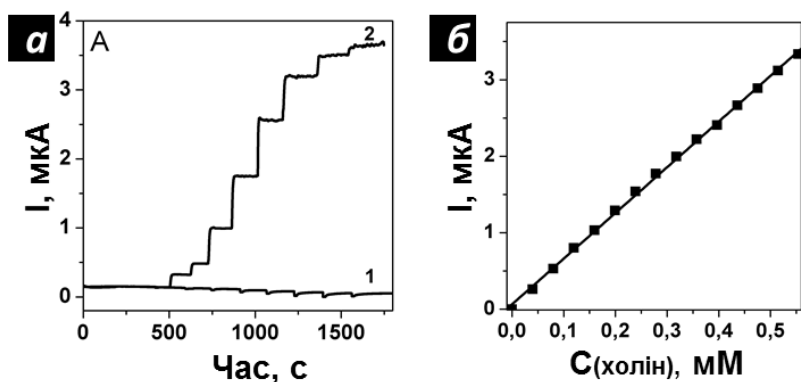


Рис. 3. Амперометричне визначення холіну: **а** – амперометричний відгук (**1**) ЗЕ- SiO_2 та (**2**) ЗЕ- SiO_2 -ХОД у відповідь да внесення холіну. Концентрації холіну у послідовності внесення: 0,01; 0,02; 0,06; 0,14; 0,30; 0,62; 1,26; 2,06 мМ. $E = 0,7$

В; б – калібрувальна крива визначення холіну, $n = 3$

Встановлене значення позірної константи Міхаеліса-Ментен ($K_M^{\text{поз}}$) для ХОД в SiO_2 -матриці ($K_M^{\text{поз}} = 0,22 \text{ мМ}$). Дане значення є нижчим за попередньо отримані для ХОД, іммобілізованої у плівці ПДДА (0,42 мМ (Qin et al., 2010) чи в ГА-ПВА (0,78 мМ (Ren et al., 2009) і значно нижче ніж значення для ХОД у розчині (0,87 мМ (Ohta-Fukuyama et al., 1980)). Отримані дані свідчать, що ХОД, іммобілізована у SiO_2 -плівці, має кращу афінність до субстрату. Чутливість ЗЕ- SiO_2 -ХОД до холіну становила $480 \text{ А} \cdot \text{М}^{-1} \cdot \text{м}^{-2}$, калібрувальна крива була лінійною в діапазоні концентрацій холіну від 0,02 до 0,6 мМ (рис. 3 б), ММВ становила 6 мкМ, чого цілком достатньо для вимірювання вмісту холіну у зразках їжі та крові. Біосенсор зберігав стабільність протягом 3 днів при зберіганні за температури 4°C , операційна стабільність становила 30 вимірювань. Середня похибка становила 8%.

При дослідженні впливу інтерферентів на роботу біосенсора було виявлено, що лише аскорбінова кислота істотно впливала на роботу сенсора, оскільки її пряме окислення на золотих електродах відбувається за того ж потенціалу. Попередня обробка зразка 11 мМ MnO_2 протягом 15 хвилин повністю нейтралізувала вплив аскорбінової кислоти. При цьому не зафіксовано впливу на роботу ХОД і результати визначення холіну.

За допомогою створених біосенсорів було проведено вимірювання концентрації холіну у зразках дитячого харчування. Дані, отримані біосенсорним методом, добре корелювали із даними, вказаними виробником дитячого харчування, а також з результатами спектрофотометричного аналізу.

Амперометричний сенсор для визначення L-аргініну на основі рекомбінантної аргініндегімінази та композиту нафіон/поліанілін. В даному розділі описано розробку високочутливого, селективного та стабільного амперометричного моно-ферментного сенсора для визначення L-аргініну. В ході даної розробки було використано амоній-чутливий шар поліаніліну (ПАНі), електрополімеризований на вкритий нафіоном платиновий друкований електрод (ПЕ). Далі, рекомбінантну АДІ було осаджено на поверхню ПАНі/Нафіон/ПЕ, з наступним формуванням біоселективної мембрани під дією поперечного зшивання у насичених випарах ГА.

Для модифікації поверхні ПЕ шаром ПАНі вибрано метод електрохімічної полімеризації через електро-окислення аніліну. Усі параметри процесу електрополімеризації (значення потенціалів, швидкість сканування, кількість циклів) підбирали емпірично. Встановлено, що оптимальними параметрами є 7 циклів від -0,4 до +1,0 В, при швидкості сканування $0,02 \text{ В} \cdot \text{с}^{-1}$ проти Ag/AgCl електроду порівняння.

Електрохімічні властивості ПАНі/Нафіон вивчалися за допомогою методів циклічної вольтаметрії та амперометрії. За відсутності іонів амонію у вимірювальному розчині не спостерігалось окисних чи відновних процесів. Після додавання амоній хлориду у вимірювальну комірку відбувалося підвищення катодного струму між -0,20 В і -0,40 В (проти Ag/AgCl електроду порівняння). Іони амонію досить швидко дифундують до шару ПАНі/Нафіон,

де спричиняють процес відновлення ПАНі на поверхні ПЕ. Іммобілізовані сульфонатні групи нафіону затримують проникнення аніонів у композит, в той час як проникнення катіонів амонію стає необхідним для проходження окисно-відновних процесів ПАНі. Тому, при катодній поляризації композиту ПАНі/Нафіон зміни катодного струму є пропорційними до концентрації іонів амонію у розчині. Максимальне зростання катодного струму зафіксовано при $-0,35$ В. За тих самих умов модифікований композитом електрод був повністю нечутливий до L-Арг.

Із калібрувальної кривої, побудованої на основі результатів амперометричного визначення іонів амонію (рис. 4 а), визначено лінійний діапазон (від $0,003$ до $0,200$ мМ NH_4Cl) (рис. 4 б), чутливість ($701 \pm 33 \text{ А} \cdot \text{М}^{-1} \cdot \text{м}^{-2}$), ММВ ($0,001$ мМ NH_4Cl).

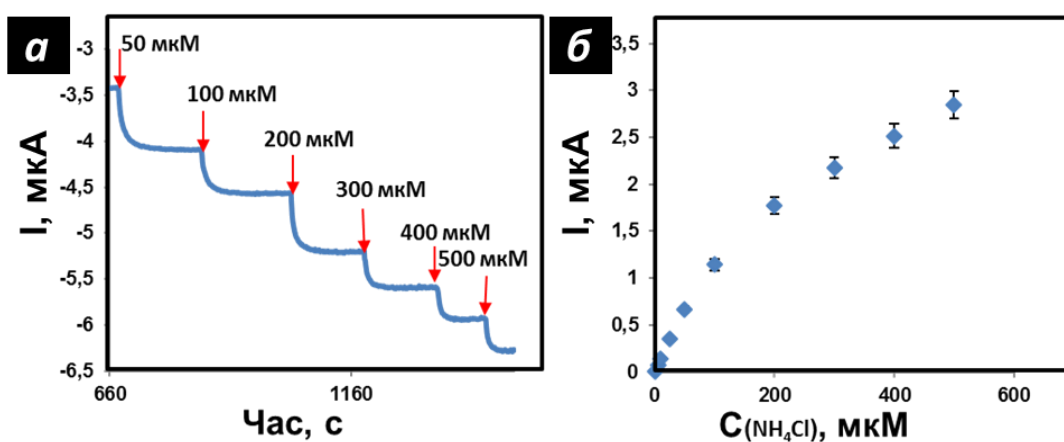


Рис. 4. Амперометричне визначення іонів амонію на ПЕ, модифікованому ПАНі/Нафіон-композитом: **а** – приклад амперометричного відгуку у відповідь на додавання NH_4Cl ($-0,35$ В, ФБ рН 7,4); **б** – калібрувальна крива визначення іонів амонію на ПАНі/Нафіон/ПЕ ($n=3$)

Наступним етапом роботи була іммобілізація АДІ. АДІ іммобілізували на поверхні ПАНі/Нафіон/ПЕ за допомогою зшивання із БСА в насичених випарах ГА. При додаванні L-Арг до вимірювальної комірки під час вольтаметричних та амперометричних досліджень біосенсора спостерігалось різке зростання катодного струму аналогічно до сигналів, отриманих під час визначення іонів амонію (рис. 5 а та б). На основі даних амперметрії побудовано калібрувальну криву і визначено основні аналітичні параметри: $K_M^{\text{поз}}$ ($0,31 \pm 0,05$ мМ L-Арг), лінійний діапазон (від $0,003$ до $0,2$ мМ L-Арг), чутливість ($684 \pm 32 \text{ А} \cdot \text{М}^{-1} \cdot \text{м}^{-2}$), ММВ ($0,001$ мМ) (рис. 5 б та в). Створений біосенсор відзначався швидким відгуком на внесення L-Арг (15 с).

Стабільність АДІ/ПАНі/Нафіон/ПЕ досліджувалась шляхом моніторингу відгуків біосенсора на внесення $0,2$ мМ розчину L-Арг протягом 35 діб. Протягом даного періоду, а також після 100 вимірювань, біосенсор зберігав стабільність (СП = 6,5%). Також було перевірено можливий інтерферуючий вплив амінокислот на роботу біосенсора. Так, додавання L-лізину і ГАМК не призводило до появи відгуків.

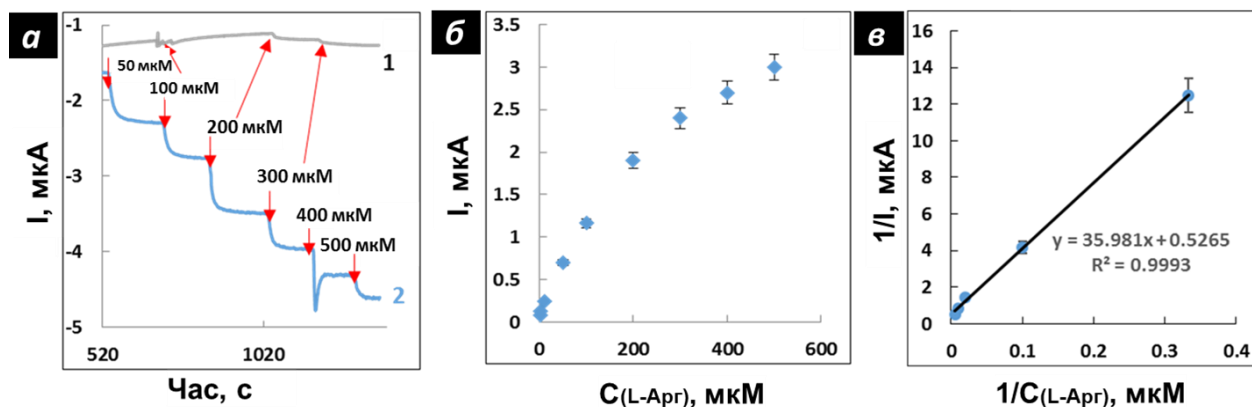


Рис. 5. Амперометричне визначення L-Арг: *а* – приклад амперометричного відгуку ПАНі/Нафiон/ПЕ (1) і АДІ/ПАНі/Нафiон/ПЕ (2) у відповідь на додавання L-Арг (-0,35 В, ФБ рН 7,4); *б* – калібрувальна крива визначення L-Арг на АДІ/ПАНі/Нафiон/ПЕ ($n=3$); *в* – крива Лайнуївера-Берка для калібрувальної кривої

За допомогою створеного біосенсора проаналізовано L-Арг-вмісний препарат “Аміноплазмаль 10% Е” (табл. 1). Результати аналізу вмісту L-Арг в препараті порівнювали із даними задекларованими виробником. Відмінність у результатах становила менше 2,5 % ($n=3$). Біосенсор також випробували для вимірювання в зразках плазми крові здорових людей, а також пацієнтів, що страждають на захворювання печінки. Отримані результати чітко свідчать, що даний біосенсор може використовуватися для швидкого і ефективного визначення L-Арг в простих і складних багатокомпонентних розчинах.

Таблиця 1

Вимірювання L-Арг в реальних зразках за допомогою створеного біосенсора

Зразок	L-Арг + NH ₄ ⁺ , мМ	NH ₄ ⁺ , мМ	L-Арг розраховано, мМ	L-Арг порівняльний метод, мМ
	Виміряно біосенсором	Виміряно ПАНі/Нафiон/ПЕ		Флуориметричне визначення
Фарм. препарат	7.8±0.3	-	7.8±0.3	8.0**
Зразок плазми 1	0.157±0.022	0.07±0.01	0.087±0.014	0.082±0.008***
Зразок плазми 2	0.127±0.018	0.047±0.006	0.079±0.012	0.071±0.007***
Зразок плазми 3*	0.392±0.051	0.23±0.02	0.162±0.021	0.144±0.015***
Зразок плазми 4*	0.445±0.063	0.25±0.03	0.195±0.027	0.179±0.018***

Примітка. * – зразки, взяті у пацієнтів із захворюванням печінки; ** – задекларовано виробником; *** – флуор. ферментний аналіз

Розробка амоній-чутливого нанокompозитного сенсора на основі ПАНі/Нафіон/Cu. В даному розділі описано розробку лабораторного прототипу високочутливого до іонів амонію сенсора на основі нанокompозиту ПАНі/Нафіон/Cu з використанням технології пошарового електроосадження. Згідно запропонованої концепції, іони амонію дифундують з розчину, в якому ведеться вимірювання, в нанокompозит ПАНі/Нафіон/Cu, внаслідок чого відбувається формування амонійних комплексів Cu (I). З іншого боку амонійні сполуки Cu (I) проявляють каталітичну дію щодо реакції відновлення кисню при значенні потенціалу $-0,45$ В проти Ag/AgCl електроду порівняння.

В ході роботи було розроблено оптимальну технологію модифікації вуглецевих електродів (ВЕ) наночастинками міді та ПАНі (рис. 6 *a* та *б*). Встановлено, що найкращим способом для електроосадження міді на поверхню ВЕ є циклічна вольтаметрія з 50 мМ розчину нітрату міді у азотній кислоті. ПАНі електрополімеризували на поверхню Нафіон/Cu/ВЕ методом циклічної вольтаметрії. Експериментально встановлено оптимальні параметри для даного процесу: 10 циклів ($-0,4 - +1,0$ В) із 0,2 М розчину аніліну в 0,5 М HCl.

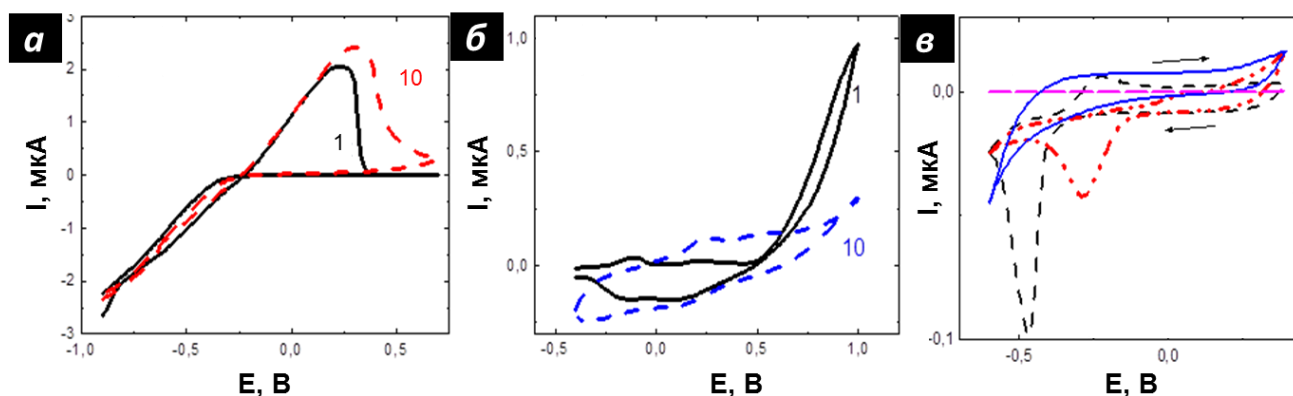


Рис. 6. Конструкція ПАНі/Нафіон/Cu композиту на поверхні ВЕ: *a* – електроосадження міді (100 мМ HNO_3 , 50 мМ $\text{Cu}(\text{NO}_3)_2$, швидкість сканування $50 \text{ мВ} \cdot \text{с}^{-1}$). Порядок циклів: **—** – 1-й; **- - -** – 10-й; *б* – електрохімічна полімеризація ПАНі на Нафіон/Cu/ВЕ (0,5 М HCl, 0,2 М анілін, швидкість сканування $50 \text{ мВ} \cdot \text{с}^{-1}$). Порядок циклів: **—** – 1-й; **- - -** – 10-й; *в* – вольтаметричний відгук електроду на різних стадіях модифікації у ФБ рН 7,4. Стадії модифікації електроду: **- - -** – ВЕ; **—** – Cu/ВЕ; **- - -** – Нафіон/Cu/ВЕ; **—** – ПАНі/Нафіон/Cu/ВЕ

На кожній стадії модифікації поверхні електроду проводились вольтаметричні дослідження (рис. 6 *в*), а зміни в морфології поверхні електроду, та зміни у хімічному складі композиту перевіряли за допомогою відповідних методів. Модифікований електрод перевіряли на чутливість до іонів амонію. Після додавання розчину NH_4Cl у вимірювальну комірку утворювався відгук у вигляді збільшення катодного і анодного струмів (рис. 7 *a*). За допомогою амперметричного вимірювання при $-0,45$ В фіксували електрохімічний відгук на підвищення концентрації іонів амонію (рис. 7 *б*).

В ході амперометричних досліджень (рис. 7 б та в) було встановлено, що ПАНі/Нафіон/Cu композит володіє значно вищою чутливістю до іонів амонію ($2500 \pm 100 \text{ A} \cdot \text{M}^{-1} \cdot \text{M}^{-2}$) ніж ПАНі ($59,5 \pm 8 \text{ A} \cdot \text{M}^{-1} \cdot \text{M}^{-2}$) або електроосаджена мідь ($184 \pm 14 \text{ A} \cdot \text{M}^{-1} \cdot \text{M}^{-2}$) окремо на поверхні ВЕ, що свідчить про вагомую роль всіх компонентів у електрокаталітичному процесі.

На основі даних амперометрії побудовано калібрувальну криву (рис. 7 в) і визначено основні аналітичні параметри хемосенсора: лінійний діапазон (0,001 – 0,15 мМ), динамічний діапазон (0,001 – 1 мМ), ММВ (0,5 мкМ). Хемосенсор зберігав стабільність (операційну і під час зберігання) більше 1 року.

В ході амперометричних досліджень у безкисневому буфері виявлено, що підвищення катодного струму у відповідь на внесення амоній хлориду є незначними у порівнянні із збагаченням киснем ФБ. Це є свідченням того, що реакція відновлення кисню (РВК) є частиною механізму електрохімічного відгуку.

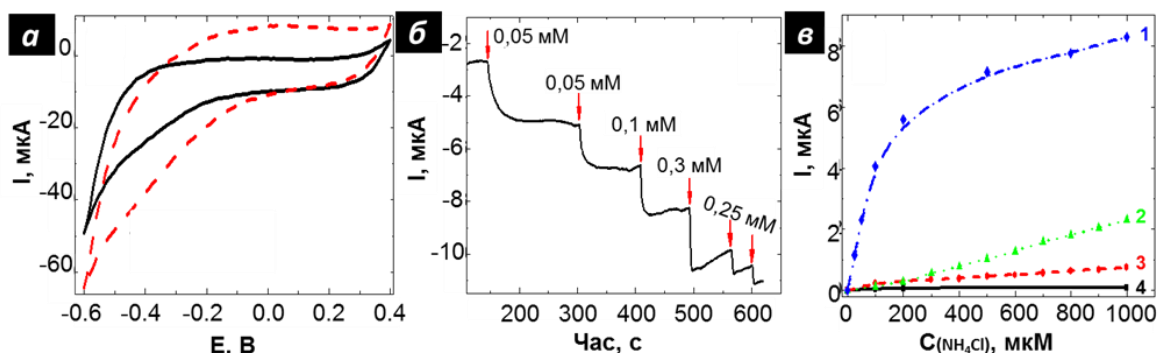


Рис. 7. Визначення іонів амонію за допомогою ПАНі/Нафіон/Cu/ВЕ: *a* – циклічна вольтамограма записана до (—) і після (---) внесення 0,25 мМ NH_4Cl (20 мМ ФБ рН 7.4, шв. скан. 50 мВ/с); *б* – приклад амперометричного відгуку хемосенсора на послідовне додавання NH_4Cl (-0,45 В, 20 мМ ФБ рН 7.4); *в* – калібрувальні криві, створені на основі амперометричних відгуків: 1- ПАНі/Нафіон/Cu/ВЕ; 2 – Cu/ВЕ; 3 – ПАНі/Нафіон/ВЕ; 4 – чистий ВЕ

Після додавання в розчин іонів амонію відбувається формування комплексів між Cu (I) і нейтральними молекулами аміаку (NH_3). Новоутворені комплекси, в свою чергу, легко окислюються розчиненим у буфері киснем до Cu (II), з наступним електрохімічним відновленням до Cu (I), в результаті якого утворюється катодний відгук (рис. 8). Іншими словами, формування амонійних комплексів ініціює реакцію відновлення кисню на Cu (I)-утвореннях. Весь процес можна описати як амоній-асоційований електрокаталіз відновлення кисню.

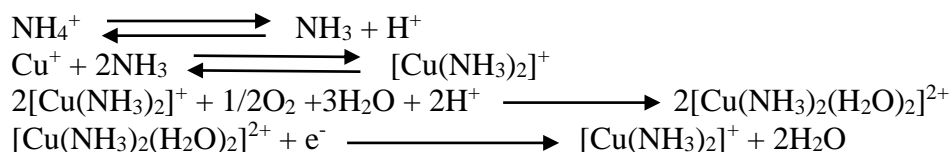


Рис. 8. Реакція відновлення кисню на Cu(I)-ПАНі за присутності іонів амонію

Проведено контрольні дослідження на чутливість даного нанокompозиту до можливих інтерферентів в сироватці крові людини: білків, креатиніну, сечовини та їхніх сумішей. Встановлено, що їхня присутність на роботу сенсора не впливає. Виготовлений амоній-чутливий сенсор використано для визначення NH_4^+ в зразках сироватки крові отриманих від здорових людей та пацієнтів, що страждають на захворювання печінки та нирок.

Вимірювання проводили амперометрично із застосуванням методу стандартних додавань. Результати, отримані за допомогою хемосенсора добре корелювали із результатами стандартного методу (рис. 9).

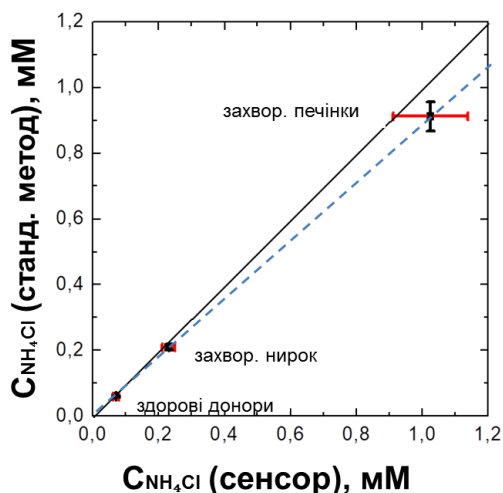


Рис. 9. Порівняння результатів визначення концентрації NH_4^+ в сироватці крові отриманих за допомогою ПАНі/Нафіон/Cu/BE і стандартним спектрофотометричним методом (— лінія ідеальної кореляції; - - - лінія кореляції, отримана на основі експериментальних даних)

Отримані результати демонструють можливість використання ПАНі/Нафіон/Cu/BE для визначення NH_4^+ в сироватці крові людини, що може бути застосовано для розробки високоточних аналітичних приладів для медичної діагностики.

Біосенсори для визначення креатиніну і сечовини створені на основі амоній-селективного нанокompозиту ПАНі/Нафіон/Cu. У даному розділі описано результати розробки біосенсорів для визначення креатиніну та сечовини на основі ПАНі/Нафіон/Cu композиту та іммобілізованих гідролізуючих ферментів креатиніндеїмінази (КДІ) та уреаз.

Так, нами використано КДІ та уреазу як біорозпізнавальні молекули біосенсорів для визначення креатиніну і сечовини, відповідно. В обох ферментативних реакціях одним з продуктів є амоній. Іммобілізацію ферментів проводили на поверхні ПАНі/Нафіон/Cu/BE у 5% БСА із наступним поперечним зшиванням у випарах ГА. Стабільність і робота біосенсорів досліджувались шляхом вимірювання електрохімічних відгуків на внесення стандартних концентрацій відповідних речовин у вимірювальну комірку. Біосенсор на основі уреазу демонстрував високу стабільність, тоді як фермент КДІ був нестабільний (втрата активності становила 90% протягом 3 годин). Для покращення стабільності біосенсорів (під час роботи і під час зберігання) під час процесу іммобілізації ферментів використано стабілізуючі агенти – D-лактитол і гліцерол. Використання гліцеролу запобігало втраті ензимної

активності, а також забезпечувало кращу гомогенність та адгезію мембрани. Використання стабілізуючих агентів значно покращило роботу біосенсора на основі КДІ (біосенсор працював без втрати стабільності 72 години).

На основі даних, отриманих методами вольтаметрії, амперометричне визначення креатиніну/сечовини проводили при значенні потенціалу $-0,35$ В проти Ag/AgCl електроду порівняння. Із калібрувальних кривих (рис. 10) були розраховані основні аналітичні характеристики сенсорів: лінійний діапазон ($1 - 125$ мкМ), чутливість ($850 \pm 34 \text{ А} \cdot \text{М}^{-1} \cdot \text{м}^{-2}$ і $1120 \pm 33,6 \text{ А} \cdot \text{М}^{-1} \cdot \text{м}^{-2}$ для біосенсора для визначення креатиніну і сечовини, відповідно), ММВ для обох біосенсорів становила $0,5$ мкМ.

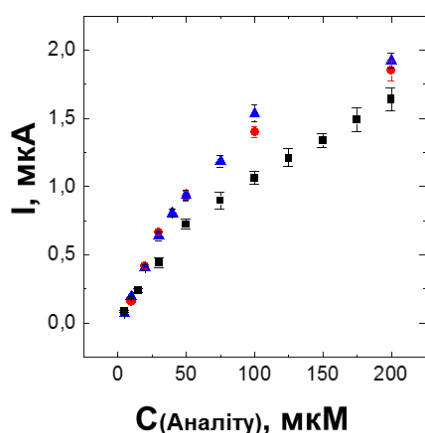


Рис. 10. Калібрувальні криві, побудовані на основі даних амперометричних вимірювань біосенсорів (■ – креатинін; ● – сечовина; ▲ – NH_4Cl ; $-0,35$ В, ФБ рН 7,4)

Для вимірювань у реальних біологічних рідинах взято зразки сироватки крові пацієнтів, що страждають на ХХН, і проведений аналіз на вміст креатиніну (рис. 11 *а*) і сечовини (рис. 11 *б*). Результати, отримані за допомогою біосенсорів, добре корелювали із результатами стандартних ферментних спектрофотометричних методів визначення креатиніну і сечовини (рис. 11).

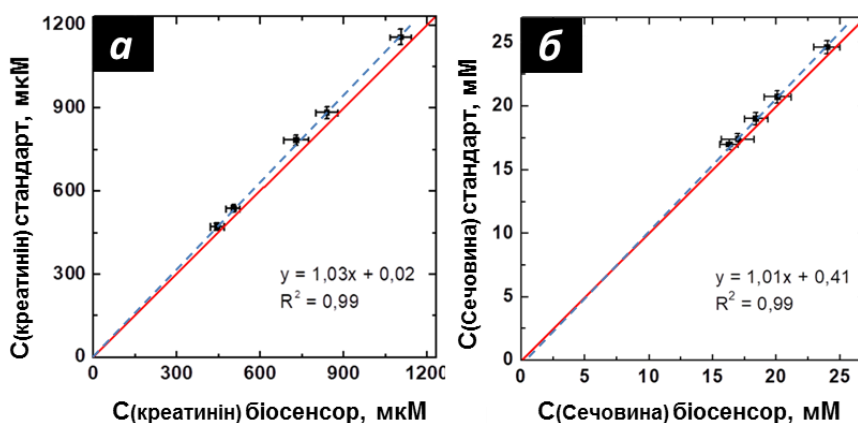


Рис. 11. Порівняння результатів визначення концентрації креатиніну (*а*) і сечовини (*б*) в сироватці крові пацієнтів, що страждають на ХХН, отриманих за допомогою сконструйованих біосенсорів і стандартним спектрофотометричним методом (■ – лінія ідеальної кореляції; ■ – лінія кореляції, отримана на основі експериментальних даних; R^2 – коефіцієнт лінійної регресії)

Таким чином, сконструйовані в ході дисертаційної роботи лабораторні прототипи біо/хемосенсорів володіють низкою переваг над існуючими підходами, зокрема, кращою стабільністю іммобілізованих ферментів (завдяки використанню амінованих вуглецевих нанотрубок та стабілізуючих агентів) та вищою чутливістю. Завдяки використанню лише одного ферменту у біоселективній мембрані вдалося забезпечити оптимальні умови для збереження високої активності ферментів, сильної афінності та високого коефіцієнту перетворення цільових субстратів, що дало змогу отримувати швидкі відгуки (від 5 до 20 с) на цільові аналіти, і, фактично, проводити вимірювання цілого комплексу клінічно важливих метаболітів в біологічних рідинах в реальному часі. Завдяки новому механізму визначення іонів амонію хемосенсор на основі ПАНі/Нафіон/Si-нанокомпозиту володіє найвищою чутливістю та селективністю в умовах нейтрального рН-середовища серед всіх відомих на сьогодні амперометричних сенсорів для визначення іонів амонію. Даний хемосенсор може стати надійною платформою для іммобілізації ензимів, що каталізують амоній-генеруючі реакції. Це наочно продемонстровано в нашій роботі за розробки біосенсорів для визначення сечовини і креатиніну.

Представлені у роботі лабораторні прототипи біо/хемосенсорів успішно апробовані в реальних зразках (дитяча молочна суміш, фармацевтичний препарат, зразки плазми і сироватки крові людини) та готуються до подальшої сертифікації і впровадження у виробництво.

ВИСНОВКИ

У дисертаційній роботі представлено нові підходи щодо розробки амперометричних хемо- та біосенсорних систем на основі високочутливих електронанесених наноккомпозитів та іммобілізованих ферментів (оксидоредуктаз чи гідролаз) для визначення клінічно важливих низькомолекулярних метаболітів, а саме: холіну, іонів амонію, L-аргініну, креатиніну та сечовини. Створено відповідні лабораторні прототипи хемо- та біосенсорних систем і проведено їх оптимізацію для роботи у реальних зразках (дитяча молочна суміш, фармакологічні препарати, зразки сироватки і плазми крові людини).

1. Досліджено вплив багатошарових вуглецевих нанотрубок модифікованих аміногрупами (БШВНТ-NH₂) на збереження стабільності ферментних мембран на основі БСА-ХОД, іммобілізованих у випарах глутаральдегіду. Показано, що при наявності БШВНТ-NH₂ за концентрації 2% у складі ферментних мембран, біосенсори зберігають стабільність впродовж 2 тижнів, а через 5 місяців втрачають ~30% початкової чутливості.

2. Розроблено амперометричний біосенсор для визначення холіну на основі іммобілізованої ХОД у SiO₂-золі методом ЕХН на поверхні друкованих золотих електродів. Всебічно досліджені аналітичні характеристики розроблених біосенсорів: K_M^{103} ХОД (0,22 мМ), чутливість (480 А·М⁻¹·м²),

лінійний діапазон (0,02 - 0,6 мМ), ММВ (6 мкМ), стабільність при зберіганні (3 дні), операційна стабільність (30 вимірювань). Оптимізовано спосіб передобробки реальних зразків MnO_2 (11 мМ MnO_2 протягом 15 хвилин) для повного усунення інтерферуючого впливу аскорбінової кислоти. Біосенсор апробовано при аналізі складу зразків дитячого харчування.

3. Вперше розроблено та оптимізовано амперометричний моноферментний сенсор на основі рекомбінантної АДІ та амоній-чутливого ПАНі/Нафіон/ПЕ для визначення L-аргініну. Досліджено аналітичні характеристики біосенсора: $K_M^{\text{ноз}}$ АДІ (0,31±0,05 мМ L-Арг), чутливість (684±32 $\text{A}\cdot\text{M}^{-1}\cdot\text{M}^{-2}$), лінійний діапазон (0,003 - 0,2 мМ), ММВ (0,001 мМ), стабільність при зберіганні - 35 днів, операційна стабільність - 100 вимірювань. За допомогою АДІ/ПАНі/Нафіон/ПЕ проведено вимірювання L-Арг в реальних зразках (фармацевтичні препарати та зразки плазми крові людини), результати яких добре корелюють із флуорометричним ферментним методом.

4. Розроблено амперометричний хемосенсор на основі електроосадженої міді та електрополімеризованого поліаніліну (ПАНі) для визначення іонів амонію. Встановлено, що специфічний до NH_4^+ амперометричний відгук утворюється в результаті амоній-опосередкованого каталітичного процесу реакції відновлення кисню, що відбувається на мідних частинках у товщі композитної плівки. ПАНі/Нафіон/Cu/BE володів кращими аналітичними характеристиками (чутливість (2500±100 $\text{A}\cdot\text{M}^{-1}\cdot\text{M}^{-2}$), лінійний діапазон (0,001 – 0,15 мМ), динамічний діапазон (0,001 – 1 мМ), ММВ (0,5 мкМ), стабільність операційна і при зберіганні – 1 рік) у порівнянні із існуючими аналогами. Хемосенсор успішно застосований для вимірювання концентрації NH_4^+ в зразках сироватки крові людей.

5. Розроблено амперометричні біосенсори для визначення креатиніну і сечовини на основі ПАНі/Нафіон/Cu композиту та іммобілізованих гідролаз (КДІ або уреазі). Досліджено аналітичні характеристики біосенсорів: лінійний діапазон (1 – 125 мкМ), чутливість (850±34 $\text{A}\cdot\text{M}^{-1}\cdot\text{M}^{-2}$ і 1120±33,6 $\text{A}\cdot\text{M}^{-1}\cdot\text{M}^{-2}$ для біосенсорів для визначення креатиніну і сечовини, відповідно), ММВ для обох біосенсорів – 0,5 мкМ, стабільність 72 години. За допомогою створених біосенсорів проведені вимірювання креатиніну і сечовини в зразках сироватки крові людей. Отримані результати добре корелювали із результатами стандартних методів.

ПЕРЕЛІК НАУКОВИХ ПРАЦЬ, ОПУБЛІКОВАНИХ ЗА ТЕМОЮ ДИСЕРТАЦІЇ

1. Белоиван О.А., Дуда Т.И., Васильев А.А, Гарбуз В.В., Муратов В.Б., Шкотова Л.В., Жибак М.Т., Бойчук Ю.В., Бардаков Б.В., Корпан Я.И. Углеродные наноматериалы: исследование характеристик и использование в биосенсорной технологии // Наноразмерные системы и наноматериалы: исследования в Украине / Редкол.: А.Г. Наумовец (глав. ред.); НАН Украины. – К.: Академперіодика, 2014. – 768 с., – ISBN 978-966-360-260-8. – С. 541-545.

(Особистий внесок здобувача: розробка біоселективної мембрани біосенсора на основі БШВНТ-NH₂ і ХОД).

2. Mazurenko E., Tananaiko O., Biloivan O., Zhybak M., Pelyak I., Zaitsev V., Etienne M., Walcarius A. Amperometric biosensor for choline based on gold screen-printed electrode modified with electrochemically- deposited silica biocomposite // *Electroanalysis*. – 2015. – Vol. 27, № 7. – P. 1685-1692. *(Особистий внесок здобувача: розробка біоселективної мембрани біосенсора на основі SiO₂ і ХОД).*

3. Zhybak M.T., Vagin M.Y., Beni V., Liu X., Dempsey E., Turner A.P.F., Korpan Y.I. Direct detection of ammonium ion by means of oxygen electrocatalysis at a copper-polyaniline composite on a screen-printed electrode // *Microchimica Acta*. – 2016. – Vol. 183, № 6. – P. 1981-1987. *(Особистий внесок здобувача: розробка амперометричного хемосенсора на основі ПАНі/Нафіон/Си, вимірювання в реальних зразках, обговорення результатів, написання статті).*

4. Zhybak M., Beni V., Vagin M.Y., Dempsey E., Turner A.P.F., Korpan Y.I. Creatinine and urea biosensors based on a novel ammonium ion-selective copper-polyaniline nano-composite // *Biosensors and Bioelectronics*. – 2016. – Vol. 77. – P. 505-511. *(Особистий внесок здобувача: розробка амперометричних біосенсорів на основі ПАНі/Нафіон/Си та КДІ чи уреази, вимірювання в реальних зразках, обговорення результатів, написання статті).*

5. Zhybak M.T., Fayura L., Boretsky Y., Gonchar M.V., Sibirny A.A., Dempsey E., Turner A.P.F., Korpan Y.I. Amperometric L-arginine biosensor based on a novel recombinant arginine deiminase // *Microchimica Acta*. – 2017. – Vol. 184, № 8. – P. 2679–2686. *(Особистий внесок здобувача: розробка амперометричного біосенсора на основі ПАНі/Нафіон і АДІ, вимірювання в реальних зразках, обговорення результатів, написання та подача статті до друку).*

6. Biloivan O., Zhybak M., Boychuk Y., Vasil'ev O., Duda T., Muratov V., Korpan Y. Carbon nanomaterial based three-dimensional enzyme membranes for amperometric sensors // *Seventh Framework programme, International Workshop "Recent Advances in Micro/Nano Sensors"*. – Kyiv, Ukraine, 19-23 May, 2013. – P. 12. *(Особистий внесок здобувача: розробка біоселективного елементу біосенсора на основі БШВНТ-NH₂ і ХОД).*

7. Zhybak M., Dempsey E., Tutner A.P.F., Korpan Y. Ammonium ion nanocomposite sensor fabricated at copper-plate/nafion/polyaniline screen-printed carbon electrodes // *Seventh Framework programme, International Workshop "Recent Advances in Micro/Nano Sensors"*. – Kyiv, Ukraine, 19-23 May, 2013. – P. 23. *(Особистий внесок здобувача: розробка амперометричного хемосенсора на основі ПАНі/Нафіон/Си, оптимізація роботи, аналіз результатів).*

8. Zhybak M., Dempsey E., Korpan Y.I. Ammonium ion nanocomposite sensor fabricated at copperplated/nafion/polyaniline screen-printed carbon electrodes // *Materials of VII annual Conference of Young Scientist of the Institute of Molecular Biology and Genetics NASU. – Biopolymer and cell. – № 29, Special issue. – 2013. – P. 28. (Особистий внесок здобувача: розробка амперометричного*

хемосенсора на основі ПАНі/Нафіон/Si, визначення механізму роботи сенсора, аналіз результатів).

9. Zhybak M., Beni V., Turner A., Korpan Y. Ammonium ion selective copper/polyaniline-based nanocomposite for creatinine and urea biosensing // Materials of VIII annual Conference of Young Scientist of the Institute of Molecular Biology and Genetics NASU. – Biopolymer and cell. – № 30, Special issue. – 2014. – P. 23. (*Особистий внесок здобувача: розробка амперметричних біосенсорів на основі ПАНі/Нафіон/Si та КДІ чи уреаз, аналіз результатів*).

10. Zhybak M., Fayura L., Boretsky Y., Gonchar M., Sibirny A., Dempsey E., Korpan Y. Novel L-arginine-selective amperometric sensor based on recombinant arginine deiminase and platinum screen-printed electrodes // Book of Abstracts “MADICA 2014”. – Mahdia, Tunisia, 5-7 November, 2014. – P. B23. (*Особистий внесок здобувача: розробка амперметричного біосенсора на основі ПАНі/Нафіон і АДІ, обговорення результатів*).

АНОТАЦІЯ

Жибак М.Т. Розробка амперметричних нанокompatитних біо/хемосенсорів для визначення низькомолекулярних метаболітів у біологічних рідинах. – Рукопис.

Дисертація на здобуття наукового ступеня кандидата біологічних наук за спеціальністю 03.00.20 – біотехнологія. – Інститут молекулярної біології і генетики НАН України, Київ, 2018.

Дисертаційна робота присвячена розробці амперметричних нанокompatитних біо/хемосенсорів для високоточного визначення концентрацій клінічно важливих низькомолекулярних метаболітів у біологічних зразках. На основі комерційних друкованих електродів, високочутливих електронанесених композитів та іммобілізованих ферментів створено лабораторні прототиби амперметричних хемосенсорів та моноферментних біосенсорів для визначення іонів амонію, холіну, L-аргініну, креатиніну та сечовини.

Розроблено високоефективні способи іммобілізації ферментів на поверхні золотих електродів на прикладі холіноксидази з використанням амінованих нанотрубок чи SiO₂ золь-гелю. Представлено прототиби біосенсорів для визначення холіну та, використовуючи їх, проведено аналіз на вміст холіну у зразках дитячого харчування. Вперше розроблено моноферментний амперметричний сенсор для визначення L-аргініну на основі рекомбінантної аргініндеімінази та ПАНі/Нафіон-композиту, за допомогою якого проведено вимірювання концентрації аргініну у фармацевтичних препаратах та зразках плазми крові людей. Вперше представлено високочутливий до іонів амонію нанокompatит на основі ПАНі/Нафіон/Si, який було застосовано як основу для високочутливих амперметричних сенсорів для визначення креатиніну і

сечовини. Досліджено основні морфологічні, електрохімічні та аналітичні параметри нанокompозиту ПАНІ/Нафiон/Cu, запропонований його механiзм роботи. Представленi хемо- та бiосенсиори випробуванi для визначення iонiв амонiю, креатинiну та сечовини у зразках сироватки кровi людини.

Ключові слова: амперометричні бiосенсиори, iмобiлізованi ферменти, нанокompозити, полiанiлiн, холiноксидаза, рекомбiнантна аргiнiндеiмiназа, уреаза, креатинiндеiмiназа, iони амонiю.

АННОТАЦІЯ

Жибак М.Т. Разработка амперометрических нанокompозитных био/хемосенсоров для определения низкомолекулярных метаболитов в биологических жидкостях. – Рукопись.

Диссертация на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.00.20 – биотехнология. – Институт молекулярной биологии и генетики НАН Украины, Киев, 2018.

Диссертационная работа посвящена разработке амперометрических нанокompозитных био/хемосенсоров для высокоточного определения концентраций клинически важных низкомолекулярных метаболитов в биологических образцах. На основе коммерческих печатных электродов, высокочувствительных электро-нанесенных композитов, а также иммобилизованных ферментов, были созданы лабораторные прототипы амперометрических хемосенсоров и моноферментных биосенсоров для определения ионов аммония, холина, L-аргинина, креатинина и мочевины.

Разработаны высокоэффективные способы иммобилизации ферментов на поверхности золотых электродов на примере холиноксидазы с применением аминированных нанотрубок или SiO₂ золь-геля. Представлены прототипы биосенсоров для определения холина, а также с их использованием проведен анализ определения холина в детском питании. Впервые разработан моноферментный амперометрический сенсор для определения L-аргинина на основе рекомбинантной аргининдеиминазы и композита полианилин (ПАНИ) / нафiон. С помощью разработанного биосенсора проведено измерения концентрации аргинина в фармацевтическом препарате, а также в образцах плазмы крови человека. Впервые представлен высокочувствительный к ионам аммония нанокompозит на основе ПАНИ/Нафiон/Cu, который был использован в качестве основы амперометрических ферментных сенсоров для определения креатинина и мочевины. Исследованы и оптимизированы основные электрохимические и аналитические параметры нанокompозита ПАНИ/Нафiон/Cu, а также предложен механизм его работы. Представленные хемо- и биосенсиоры были испытаны для определения ионов аммония, креатинина и мочевины в образцах сыворотки крови человека.

Ключевые слова: амперометрические биосенсоры, иммобилизированные ферменты, нанокompозиты, полианилин, холиноксидаза, рекомбинантная аргининдеиминаза, уреазы, креатининдеиминаза, ионы аммония.

SUMMARY

Zhybak M.T. The development of the amperometric nanocomposite-based bio-/chemosensors for the detection of low molecular weight metabolites in biological liquids. – Manuscript.

Thesis for Philosophy Doctor (PhD) degree in Biology, speciality – 03.00.20 – Biotechnology. – Institute of Molecular Biology and Genetics, NAS of Ukraine, Kyiv, 2018.

The PhD thesis is dedicated to the research and development of the amperometric nanocomposite-based bio-/chemosensors for the detection of clinically important low molecular weight metabolites in biological samples. The laboratory prototypes of the biosensors for the detection of choline, ammonium ions, L-arginine, creatinine, urea have been developed using commercial screen-printed electrodes, highly sensitive electro-deposited nanocomposites, and immobilized enzymes.

The choline biosensors were developed using two different enzyme immobilization strategies: i) usage of the NH₂-modified carbon nanotubes (MWCNT-NH₂) as a structural element of the choline oxidase (ChOx) membrane; ii) electrochemically assisted sol-gel deposition (ECD) of the ChOx on gold screen-printed electrodes. In the first case, it was estimated that existence of the MWCNT-NH₂ 2% (v/v) in the ChOx membrane enhanced greatly the stability of the enzyme, due to increasing number of covalent bonds (NH₂-NH₂) and decreasing of the soaking of the membrane in the buffer. The biosensors retained catalytic activity to choline without decreasing in amperometric response for over 2 weeks with the sensitivity of 523,71 A·M⁻¹·m⁻², linear range (LR) from 0.03 to 0.2 mM, limit of detection (LOD) of 5 μM.

In the second case, using ECD, it was established that the addition of 12 mM of cationic surfactant CTAB in silica sol allowed enhancing the stability of the sensor. The modified electrode demonstrated catalytic activity and stable amperometric response to choline for 3 days of exploitation with the sensitivity of 480 A·M⁻¹·m⁻², LR from 0.02 to 0.6 mM, and LOD of 6 μM. The interference of ascorbic acid was reduced by pretreating the analyzed solution with MnO₂ powder. The application of the sensor with the purpose of identifying choline in the baby milk demonstrated satisfactory metrological characteristics.

An amperometric biosensor for the amino acid L-arginine (L-Arg) has been fabricated. It is based on the use of a Nafion/Polyaniline (PANi) composite on a platinum screen-printed electrode (Pt-SPE) using a novel recombinant arginine deiminase isolated from *Mycoplasma hominis*. The protein was over-expressed, purified and employed as a biorecognition element of the sensor. Enzymatic

hydrolysis of L-Arg leads to the formation of ammonium ions which diffuse into the Nafion/PANi layer and induce the electroreduction of PANi at a potential of -0.35 V (vs Ag/AgCl). L-Arg sensitivity is 684 ± 32 $\text{A} \cdot \text{M}^{-1} \cdot \text{m}^{-2}$, and the apparent Michaelis-Menten constant (K_M^{app}) is 0.31 ± 0.05 mM. The calibration plot is linear over the range $3\text{--}200$ μM L-Arg, the LOD is 1 μM , and the response time is 15 s. The sensor is selective and exhibits good storage stability over 1 month without loss in signal. The biosensor was applied to the analysis of L-Arg in pharmaceutical samples and of ammonium and L-Arg in spiked human plasma. The data generated were found to be in good agreement with a reference fluorometric enzymatic assay.

A novel composite material for use in ammonium ions detection is described. A carbon SPE was consecutively modified with electrodeposited copper, a Nafion membrane and electropolymerized PANi to give an electrocatalytic composite of type PANi/Nafion/Cu/SPE. It is found that the presence of ammonia causes complex formation with Cu(I), and this causes electroreduction of oxygen to result in an increased cathodic current. The finding was applied to the quantification of ammonium ions in the 1 to 1000 μM concentration range by amperometry at -0.45 V (vs. Ag/AgCl). This Faradaic phenomenon offers the advantage of direct voltammetric detection, one of the lowest known limits of detection (0.5 μM), and high sensitivity (2500 $\text{A} \cdot \text{M}^{-1} \cdot \text{m}^{-2}$). It was applied to the determination of ammonium ion in human serum where it compared well with the photometric routine approach for clinical analysis using glutamate dehydrogenase.

The use of a novel ammonium ion-specific copper-polyaniline nano-composite as transducer for hydrolase-based biosensors is proposed. A combination of creatinine deaminase and urease has been chosen as a model system to demonstrate the construction of urea and creatinine biosensors. Immobilisation of enzymes was shown to be a crucial step in the development of the biosensors. The use of glycerol and lactitol as stabilisers resulted in a significant improvement, especially in the case of the creatinine deiminase, of the operational stability of the biosensors (from few hours to at least 3 days). The developed biosensors exhibited high selectivity towards creatinine and urea. The sensitivity was found to be 850 ± 34 $\text{A} \cdot \text{M}^{-1} \cdot \text{m}^{-2}$ for the creatinine biosensor and $1120 \pm 33,6$ $\text{A} \cdot \text{M}^{-1} \cdot \text{m}^{-2}$ for the urea biosensor, with K_M^{app} of 0.163 mM for creatinine deaminase and 0.139 mM for urease, respectively. The biosensors responded linearly over the concentration range $1\text{--}125$ μM , with a limit of detection of 0.5 μM and a response time of 15 s. The performance of the biosensors in human serum samples was evaluated and a good correlation with standard spectrophotometric clinical laboratory techniques was found.

Keywords: amperometric biosensors, immobilized enzymes, nano-composites, polyaniline, choline oxidase, recombinant arginine deiminase, urease, creatinine deiminase, ammonium