

НАЦІОНАЛЬНА АКАДЕМІЯ НАУК УКРАЇНИ
ІНСТИТУТ МОЛЕКУЛЯРНОЇ БІОЛОГІЇ І ГЕНЕТИКИ

ТОПОЛЬНІКОВА ЯРОСЛАВА ВІТАЛІЇВНА

УДК 543.553+577.15+543.06

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

03.00.20 – біотехнологія

АВТОРЕФЕРАТ
дисертації для здобуття наукового ступеня
кандидата біологічних наук

Київ – 2019

Дисертацією є рукопис.

Роботу виконано у лабораторії біомолекулярної електроніки відділу механізмів трансляції генетичної інформації Інституту молекулярної біології і генетики НАН України.

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

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

доктор біологічних наук, професор
Колибо Денис Володимирович
Інститут біохімії імені О.В. Паладіна НАНУ,
головний науковий співробітник
відділу молекулярної імунології.

Захист дисертації відбудеться 16 квітня 2019 року о 10³⁰ год, на засіданні спеціалізованої вченої ради Д 26.237.01 Інституту молекулярної біології і генетики НАН України, за адресою: 03143, м. Київ, вул. Заболотного 150.

З дисертацією можна ознайомитись у бібліотеці Інституту молекулярної біології і генетики НАН України за адресою: 03143, м. Київ, вул. Заболотного 150.

Автореферат розіслано «__»_____ 2019 року

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



І.В.Крупська

ЗАГАЛЬНА ХАРАКТЕРИСТИКА РОБОТИ

Обґрунтування вибору теми дослідження. Піруват та лактат є одними з ключових молекул у метаболічних процесах. Визначення концентрацій лактату, пірувату та їх співвідношення використовується в клінічній діагностиці. Підвищена концентрація пірувату спостерігається у випадках дефіциту вітаміну В1, респіраторного алкалозу, отруєння миш'яком і ртуттю, та патологіях печінки. Підвищена концентрація лактату виникає при тканинній гіпоксії, розладах печінки, нирок, цукровому діабеті, тощо. Також вимірювання лактату використовується в відділеннях реанімації та інтенсивної терапії для оцінки тяжкості стану пацієнта, прогнозу імовірності шоків станів та смертності. 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 (Bhat et al., 2016).

Тоді як тривалий моніторинг лактату застосовується в клінічній практиці, моніторинг пірувату не впроваджено. Це пов'язано з такими труднощами: оскільки концентрація пірувату в крові є низькою, можуть виникнути проблеми з селективністю методу, оскільки концентрація електроактивних інтерферентів достатньо висока.

На сьогодні для оцінки концентрації лактату та пірувату використовуються такі методи як високоефективна рідинна хроматографія, ЯМР-спектроскопія, ензиматична спектрофотометрія та флуориметрія. Однак ці методи потребують тривалої попередньої обробки проби біоматеріалу, а також наявності кваліфікованого персоналу та складного і дорогого обладнання. Їхня альтернатива - біосенсорні методи є високоточними, та селективними, при цьому потребують незначних об'ємів зразків біологічних рідин для аналізу, час отримання результату зазвичай не перевищує 30 хв; також існують системи, які працюють в режимі реального часу. Біосенсорні системи прості у використанні та портативні, що є перспективним для їх використання у клінічних умовах.

Створено різноманітні лабораторні прототипи та комерційні моделі біосенсорів для вимірювання лактату, а також лабораторні прототипи біосенсорів для вимірювання пірувату, як в харчових продуктах, так і в біологічних матеріалах. Однак важливою є можливість одночасного визначення концентрацій лактату та пірувату, оскільки вона дає змогу більш комплексно оцінити стан пацієнта у кризовому стані, розрізнити причини виникнення лактатацидозу та дослідити динаміку розвитку патології при почергових вимірюваннях.

Тому актуальною є розробка біосенсорної системи для одночасної оцінки концентрацій лактату та пірувату у сироватці крові.

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 і завдання дослідження: 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, дослідження 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 концентрацій лактату та пірувату: універсалізація виготовлення біосенсорів, вивчення перехресного впливу субстратів та кофакторів, встановлення аналітичних характеристик.

4. Аналіз концентрацій лактату та пірувату в реальних біологічних зразках сироватки крові за допомогою розробленої біосенсорної системи і контроль визначення концентрацій 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 біосенсори для визначення концентрацій лактату та пірувату та біосенсорна система для одночасного визначення даних субстратів.

Методи дослідження. В роботі використовували методи амперометричної детекції 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 фенілєндіаміну 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 одночасного 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, 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 вимірювання 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., проф. 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»; на Молодіжному форумі новітніх технологій у медицині», Київ, 17-18 травня 2017; на конференції молодих учених Інституту молекулярної біології та генетики НАН України, Київ, 6-9 червня 2017 (Conference of Young Scientists Institute of Molecular Biology and Genetics NAS of Ukraine», Kyiv, 2017); на XVI Міжнародній науковій конференції «Шевченківська весна: досягнення біологічної науки / BioScience Advances», Київ, 24-27 квітня 2018; на XVIII 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, що входять до переліку, затвердженого Міністерством освіти і науки України, 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.

ОСНОВНИЙ ЗМІСТ РОБОТИ

Матеріали і методи дослідження. В роботі використовували ензими: лактатоксидазу (ЛОД) із *Pedococcus sp.* (КФ 1.1.3.2) з активністю 35 од. акт. мг⁻¹ (Sigma–Aldrich Chimie, Німеччина) та піруватоксидазу (ПОД) з *Aerococcus sp.* (КФ 1.2.3.3) з активністю 54 од. акт. мг⁻¹ 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 додаткової мембрани використовувався м-фенілендіамін, (Sigma–Aldrich Chimie, США). Як робочий буферний розчин використовували HEPES-NaOH (Sigma–Aldrich Chimie, США) та фосфатний буферний розчин (KH₂PO₄-NaOH) вітчизняного виробництва. Як додаткові компоненти робочого буферного розчину використовувався тіамініпрофосфат (ТПФ) виробництва «Biofarma», Україна (ліофілізат для приготування розчинів для ін'єкцій), та Mg(NO₃)₂ (Sigma–Aldrich Chimie, Німеччина). Інші неорганічні сполуки, що використовувалися в роботі, були вітчизняного виробництва та мали ступінь чистоти «хч» та «чда».

Для виготовлення мультибіосенсорного масиву використовували також наступні ензими: глутаматоксидаза (ГЛОД, ЕС 1.4.3.11) з *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 Chimie (США).

Зразки сироватки крові людини були люб'язно надані Інститутом ендокринології та обміну речовин ім. В.П. Комісаренка Національної академії медичних наук України.

У роботі використовували амперометричні біосенсиори на основі платинових дискових електродів. Біоселективні елементи біосенсорів отримували шляхом іммобілізації ензимів і допоміжних речовин на поверхню амперометричних перетворювачів. Вихідний розчин для приготування лактат-чутливого біосенсора містив ЛОД, БСА і гліцерол в фосфатному буферному розчині, рН 6,5. Вихідний розчин для приготування піруват-чутливого біосенсора містив ПОД, БСА і гліцерол в фосфатному буферному розчині, рН 6,5. Після кожної іммобілізації біосенсиори відмивали в робочому буферному розчині від незв'язаних компонентів біоселективної мембрани.

З метою іммобілізації ензимів шляхом поперечного зшивання вихідні розчини, що містили ензими, змішували з водним розчином глутарового альдегіду. Отриману суміш наносили на робочі поверхні перетворювачів та висушували на повітрі.

При іммобілізації ензимів шляхом адсорбції на поверхні силікалітних мікрочастинок, використовували вихідну суспензію силікаліту у дистильованій воді. Мікрочастинки силікаліту були синтезовані штучно (Kucherenko et al., 2012). Невеликий об'єм суспензії силікаліту наносили на чутливу частину електрода, після чого перетворювач нагрівали до 100°C впродовж 5 хв. у термостаті. Потім на чутливу область наносили розчин ензиму та очікували 15 хв. для адсорбції ензиму на силікаліті.

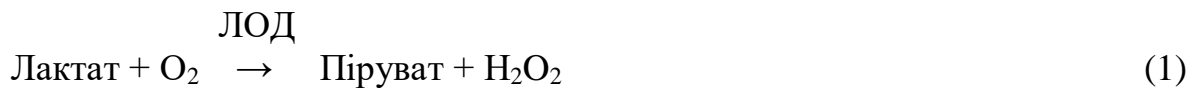
Для іммобілізації шляхом інкапсуляції ензиму в PVA-SbQ, вихідний розчин, що містив ензими, змішували з водним розчином мономеру PVA-SbQ у пропорції 1:1. Одразу після цього суміш наносили на чутливу поверхню перетворювача і опромінювали її ультрафіолетом при довжині хвилі 365 нм протягом 20 хв. за допомогою УФ лампи КФ-4М для формування біоселективних мембран.

Для забезпечення селективності амперометричних перетворювачів до пероксиду водню у присутності електроактивних інтерферентів застосовувалось нанесення поліфенілендіамінових мембран шляхом електрохімічного осадження на поверхні електрода.

Для спектрофотометричного визначення концентрацій лактату та пірувату застосовувались кольорові реакції. У кювету додавали: натрієву сіль 3-(N-етил-3-метиланіліно)-2-гідроксипропансульфонової кислоти (ЕМГК), 4-аміноантипирин, пероксидазу хрону, НЕРЕС, рН 7,4, та аліквоту сироватки крові. Кольорову реакцію запускали додаванням ЛОД або ПОД. При окисленні субстратів утворювався пероксид водню, який в присутності пероксидази реагував з ЕМГК з утворенням фіолетової сполуки. Інтенсивність забарвлення була пропорційна концентрації субстрату у пробі. Вимірювання абсорбції (інтенсивності поглинання світла розчином) розчину проводилось при довжині хвилі 555 нм спектрофотометром Bio Mate 5 (Thermo Electron Corporation, США). Абсорбцію аналізованого зразку порівнювали з попередньо отриманими калібрувальними кривими.

Результати та їх обговорення.

Розробка лактат-чутливого монобіосенсора. В основі роботи амперометричного лактат-чутливого біосенсора лежить ензиматична реакція (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 (2), в результаті якої утворюються вільні електрони. Вони забезпечують посилення струму (пропорційне концентрації лактату), яке безпосередньо реєструється біосенсором:



Для проведення експериментів, біосенсор поміщали до вимірювальної комірки 2 мл, заповненої 10 мМ НЕРЕС, рН 7,4, та витримували декілька хвилин для отримання стабільної базової лінії. Потім додавали аліквоту розчину лактату, отримували сигнал. На рис. 1 приведено типовий вигляд біосенсорних сигналів на додавання у вимірювальну комірку з біосенсором різних концентрацій лактату.

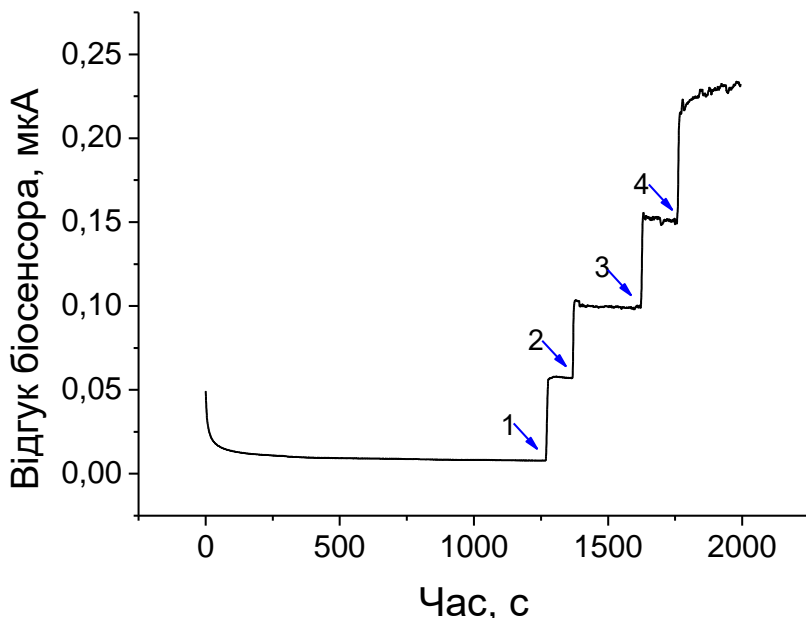


Рис. 1. Реальний вигляд відгуків лактат-чутливого біосенсора на послідовне додавання різних концентрацій лактату. Концентрації лактату у вимірювальній комірці: 0,3 мМ (1), 0,3 мМ (2), 0,4 мМ (3), 1 мМ (4). Вимірювання проводили у 25 мМ НЕРЕС, рН 7,4, за постійного потенціалу +0,6 В відносно Ag/AgCl електрода порівняння

Для створення біосенсора для визначення лактату, в ролі чутливого елемента нами було обрано ензим – ЛОД. Першим етапом нашої роботи став підбір оптимальних параметрів іммобілізації ензиму. Було проведено порівняння відгуків на лактат біосенсорів, створених при іммобілізації з використанням різних концентрацій ГА. Як виявилось, оптимальною концентрацією ГА є 1%, тому саме

цю концентрацію ми використовували надалі. Далі було підібрано концентрацію ЛОД в складі біоселективного елементу біосенсора.

Було досліджено аналітичні характеристики біосенсора. Мінімальна межа вимірювання лактату становила 3 мкМ. Лінійний діапазон роботи був від 5 мкМ до 350 мкМ, чутливість до лактату становила 204 нА/мМ. Лінійна ділянка калібрувальної кривої біосенсора описується рівнянням $I=204 \cdot C + 1,88$ ($R^2=0,989$), де I – сила струму після виходу відгуку на плато (нА), C – концентрація пірвату (мМ). Типова калібрувальна крива лактат-чутливого біосенсора наведена на рис. 2.

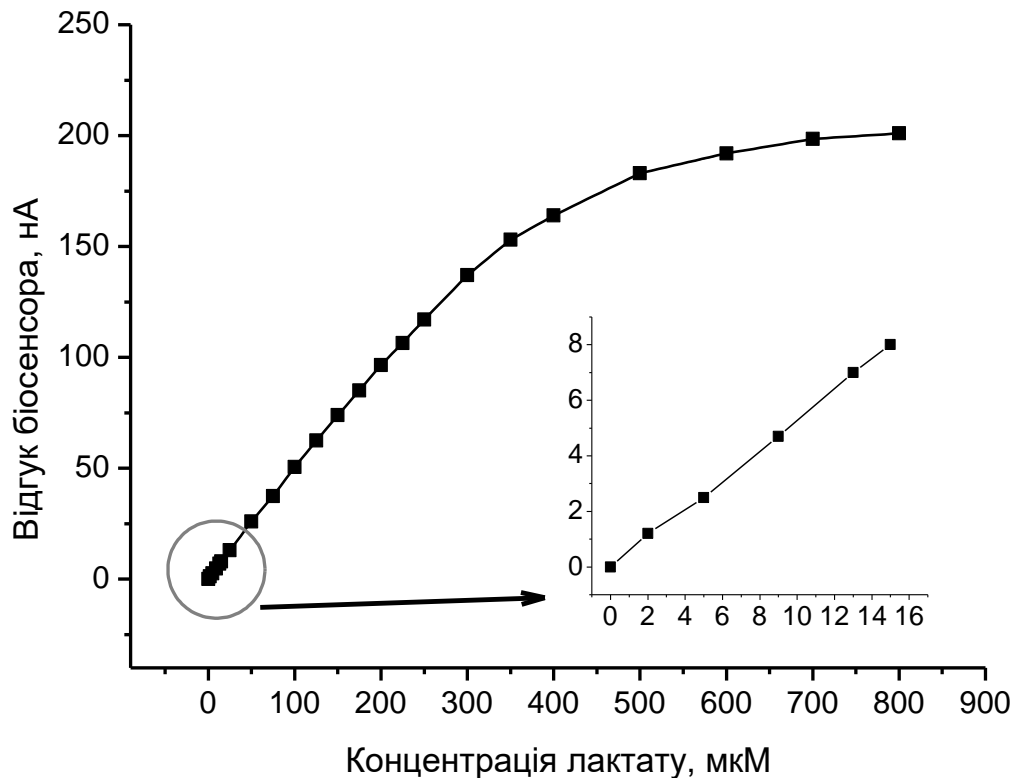


Рис. 2. Залежність величини відгуку біосенсора на основі ЛОД від концентрації лактату. Вимірювання проводили у 10 мМ НЕРЕС, рН 7,4, за постійного потенціалу +0,6 В відносно Ag/AgCl електрода порівняння

Відтворюваність відгуків біосенсора є одним з основних показників якості його роботи. Особливо це важливо при вимірюванні малих концентрацій. Тому нами було досліджено відтворюваність відгуків біосенсорів впродовж кількох годин безперервної роботи. 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 використання протягом тривалого часу. Тому наступним етапом нашої роботи стала перевірка стабільності відгуків біосенсора при його зберіганні протягом тривалого часу, а також вибір оптимальних умов зберігання. Для цього біосенсори на основі ЛОД було вирішено зберігати в різних умовах. Перевірка активності проводилась

протягом 30 днів з моменту створення біосенсорів, з періодичністю в 3-4 дні. Було встановлено, що оптимальними умовами для зберігання біосенсорів на основі ЛОД є -18°C в сухому стані.

Оскільки кров та інші біологічні розчини містять високу концентрацію білків, було перевірено вплив концентрації БСА на відгуки біосенсора (рис. 3).

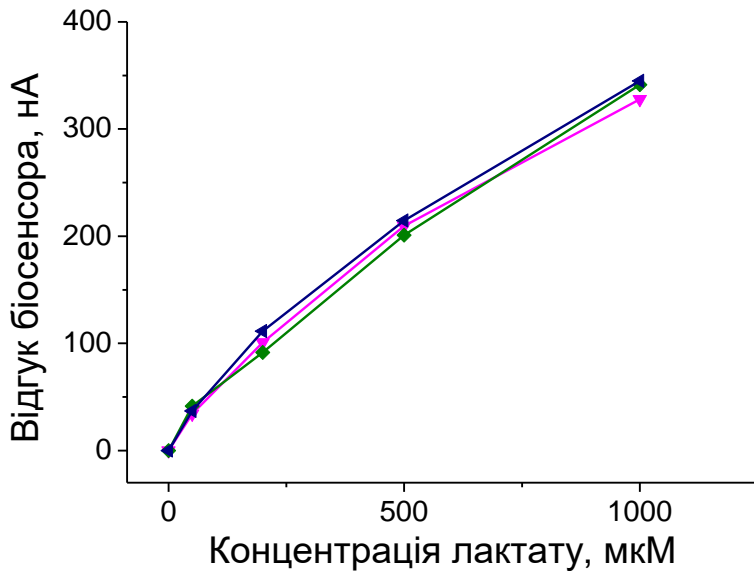


Рис. 3. Відгук лактат-чутливого біосенсора без (—◆—) та у присутності 0,85% БСА (—▼—), 0,4% БСА (—■—) в аналізованому робочому буферному розчині. Вимірювання проводили у 10 мМ HEPES, pH 7,4, за постійного потенціалу $+0,6$ В відносно Ag/AgCl електрода порівняння

Було показано, що наявність перевірених концентрацій білка не призводить до зміни характеристик біосенсора, що свідчить про можливість його застосування для визначення концентрацій лактату у біологічних зразках. Більші концентрації БСА не перевіряли, оскільки біосенсор призначений для роботи з розведеною сироваткою крові.

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

В основі роботи амперометричного піруват-чутливого біосенсора лежить ферментативна реакція (3), яка відбувається в біоселективній мембрані. Як і у випадку біосенсора для вимірювання лактату, утворений в реакції пероксид водню окиснюється на електроді (реакція (2)), спричинюючи зміну струму. Типовий вигляд відгуку біосенсора на додавання пірувату у вимірювальну комірку наведено на рис. 4.

ПОД



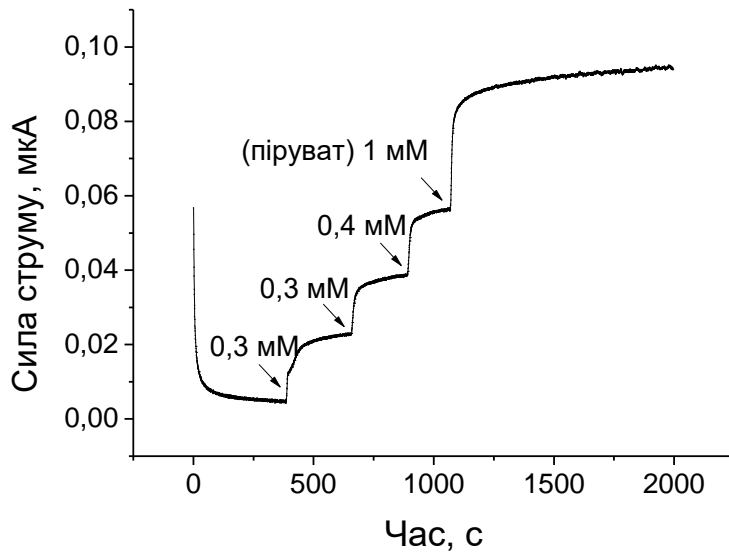


Рис. 4. Типові відгуки біосенсора на основі ПОД, іммобілізованої за допомогою інкапсуляції ензиму в PVA SbQ, на додавання різних концентрацій пірувату у вимірювальну комірку. Вимірювання проводили у 25 мМ HEPES, pH 7,4, за постійного потенціалу +0,6 В відносно Ag/AgCl електрода порівняння

Для максимального збереження активності ПОД було перевірено наступні методи іммобілізації: поперечне зшивання молекул ензиму глутаровим альдегідом, адсорбція на поверхні силікалітних частинок, інкапсуляція в шарі PVA-SbQ. Для порівняння методів було побудовано типові калібрувальні криві біосенсорів на основі ПОД, іммобілізованої різними методами. Найбільшу чутливість до пірувату показали біосенсори на основі фотополімеризації в PVA-SbQ та на основі іммобілізації поперечним зшиванням ГА. Біосенсори створені з використанням методу інкапсуляції ензиму в PVA-SbQ показали високу чутливість, широкий лінійний діапазон порівняно з іншими методами іммобілізації, та виявили високу стабільність при роботі (табл. 1). Тому для створення біоселективного елемента на основі ПОД в подальшому було використано іммобілізацію в PVA-SbQ.

Таблиця 1

Порівняння характеристик біосенсорів на основі ПОД, іммобілізованої за допомогою різних методів

Аналітичні характеристики біосенсора	Метод іммобілізації		
	Зшивання ГА	Адсорбція на силікаліті	Фотополімеризація 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 вимірювання, %	55,4	11,7	6,2

Як відомо, реакція окиснення пірувату до ацетилфосфату та пероксиду водню відбувається у присутності таких речовин як іони фосфорної кислоти (фосфат-іони), тіамінпірофосфат (ТПФ) та двовалентний катіон Mg^{2+} . Тому нами було досліджено вплив концентрації ТПФ на відгук сигналу біосенсора на піруват (рис. 5, *а*). З отриманих даних видно, що відгук досягав максимального значення при збільшенні концентрації ТПФ до 500 мкМ, тому ми обрали цю концентрацію для подальшої роботи. Далі біосенсори на основі ПОД були протестовані за різних концентрацій іонів магнію в діапазоні від 20 мкМ до 2500 мкМ (Рис. 5, *б*). Найбільший відгук на піруват спостерігався при концентрації магнію ≥ 120 мкМ.

Величина відгуків біосенсорів також залежить від концентрації фосфатів, що є субстратами для ферментативної реакції за участі ПОД. Тому було досліджено роботу біосенсора на основі ПОД в робочому буферному розчині HEPES різної концентрації іонів фосфорної кислоти (1 – 100 мМ). Найкращий відгук біосенсора спостерігався у робочому буферному розчині з 20 мМ фосфатів, тому ця концентрація використовувалась надалі.

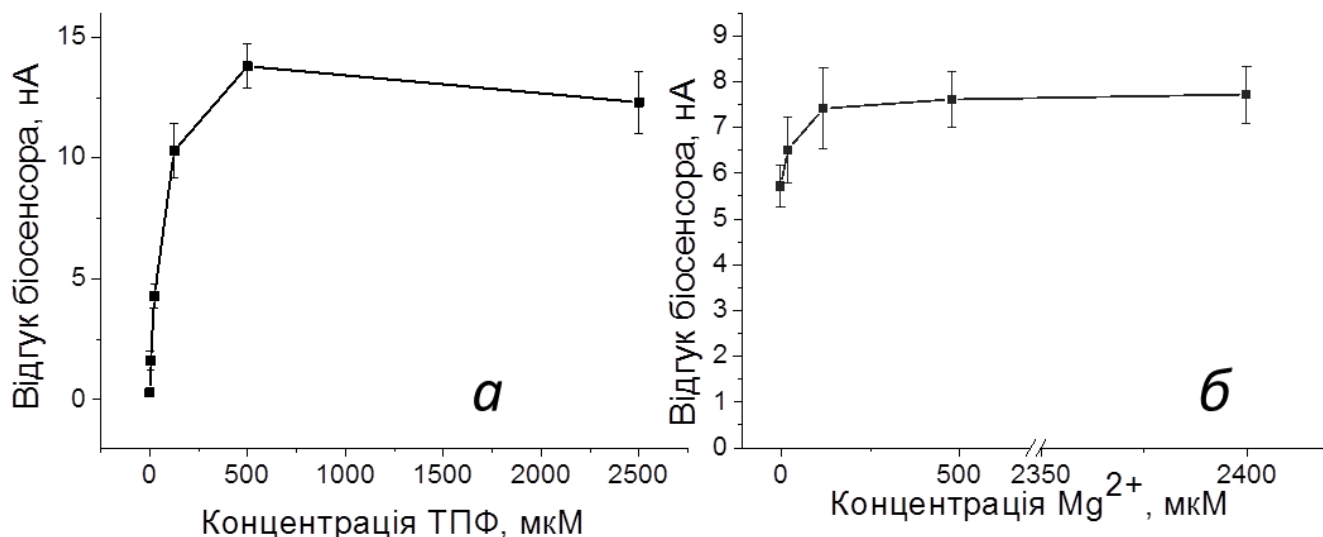


Рис. 5. Залежність величини відгуків піруват-чутливого біосенсора від концентрації ТПФ (*а*) (концентрація пірувату – 5 мМ, магнію – 120 мкМ) та концентрації іонів магнію (*б*) (концентрація пірувату – 5 мМ, ТПФ – 0,5 мМ). Вимірювання проводили у 10 мМ HEPES, рН 7,4, за постійного потенціалу +0,6 В відносно Ag/AgCl електрода порівняння

Було визначено основні аналітичні характеристики біосенсора. Типова калібрувальна крива для визначення пірувату наведена на рис. 6. Мінімальна межа вимірювання пірувату становила 5 мкМ. Лінійний діапазон роботи складав від 0,01 мМ до 5 мМ, чутливість до пірувату становила 31 нА/мМ.

Наступним етапом нашої роботи стала перевірка відтворюваності відгуків біосенсорів впродовж декількох годин безперервної роботи. Помітного падіння відгуків не відбувалось; відносне середньоквадратичне відхилення відгуків на піруват становило 3,7 %. При перевірці операційної стабільності було показано, що

за 14 діб використання біосенсора його відгуки впали на 18%, що свідчить про можливість його використання при додатковому калібруванні.

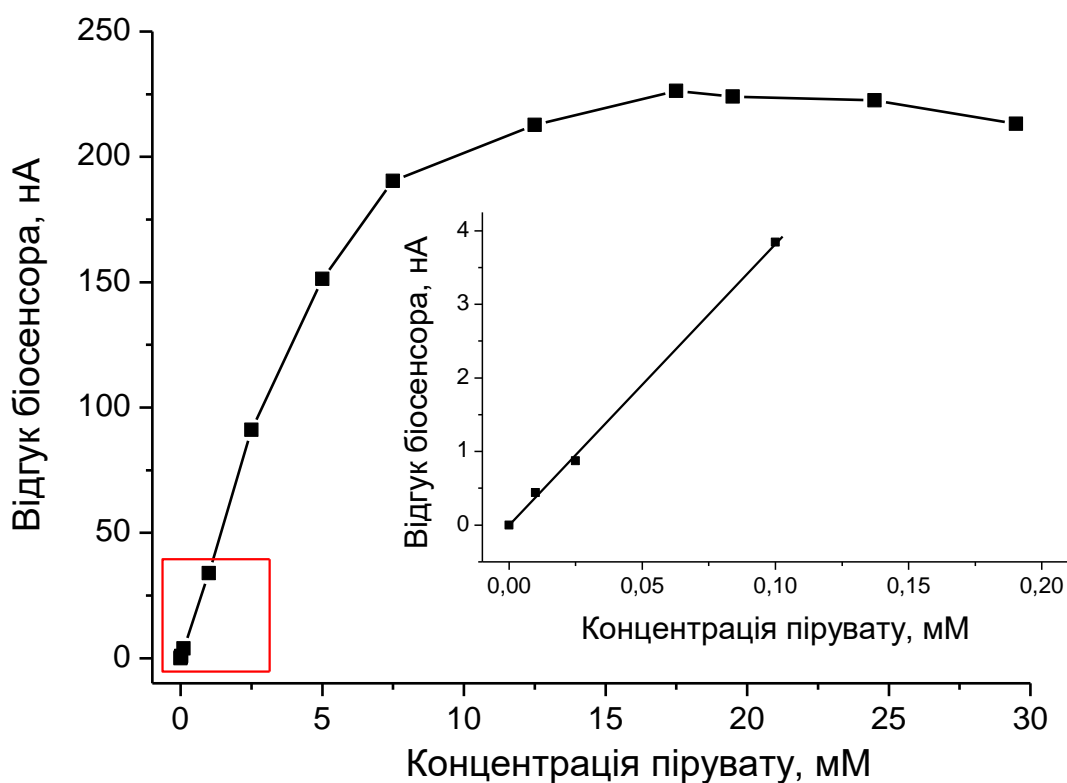


Рис. 6. Залежність величини відгуку піруват-чутливого біосенсора від концентрації пірувату. Концентрація магнію – 120 мкМ, ТПФ – 0,5 мМ, фосфат-іонів – 20 мМ. Вимірювання проводили у 10 мМ НЕРЕС, рН 7,4, за постійного потенціалу +0,6 В відносно Ag/AgCl електрода порівняння

Поєднання монобіосенсорів у систему для одночасної роботи. При розробці біосенсорної системи спершу було доцільним уніфікувати умови іммобілізації обох ензимів, які використовуються в біосенсорах. Оскільки ЛОД більш стабільна і менш вибаглива до умов іммобілізації ніж ПОД, вибір оптимальних умов іммобілізації проводився для ПОД, після чого було перевірено роботу ЛОД у вибраних умовах.

Як було встановлено в попередній частині роботи, ПОД показала найкращі результати при іммобілізації в PVA-SbQ. При використанні даного методу для іммобілізації ЛОД з'ясувалося, що чутливість біосенсора зменшилася несуттєво у порівнянні з біосенсором на основі ЛОД, іммобілізованою ГА, крім того спостерігалось розширення діапазону визначення лактату – верхня межа лінійної ділянки калібрувальної кривої становила 1 мМ, а насичення спостерігалось при концентраціях лактату більше 3 мМ (рис. 7). Ймовірно, це пояснюється гіршою дифузією лактату у плівці з полімеру, аніж у БСА мембрані. Тому для іммобілізації в однакових умовах нами було обрано іммобілізацію ензимів у PVA-SbQ.

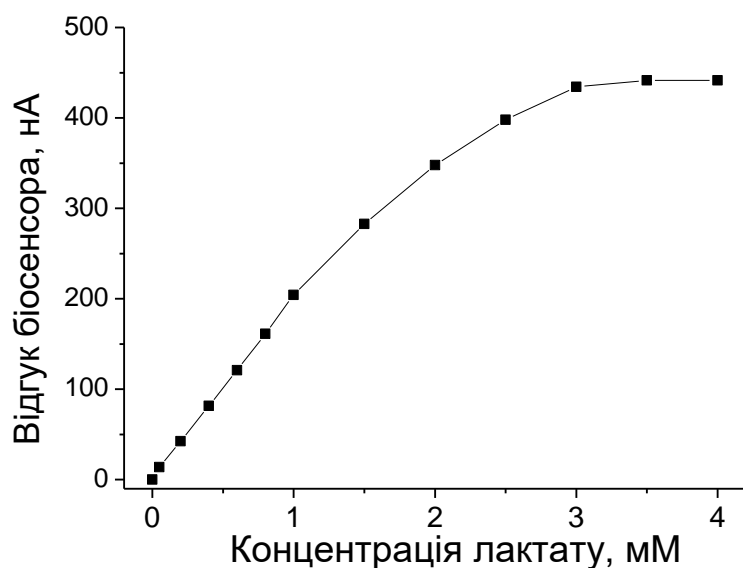


Рис. 7. Залежність величини відгуку лактат-чутливого біосенсора на основі ЛОД, іммобілізованого методом інкапсуляції ензиму у фотополімерну мембрану на основі PVA-SbQ, від концентрації лактату. Вимірювання проводили у 10 мМ HEPES, рН 7,4, за постійного потенціалу +0,6 В відносно Ag/AgCl електрода порівняння

Реальні відгуки біосенсорної системи на внесення субстратів різної концентрації показано на рис. 8.

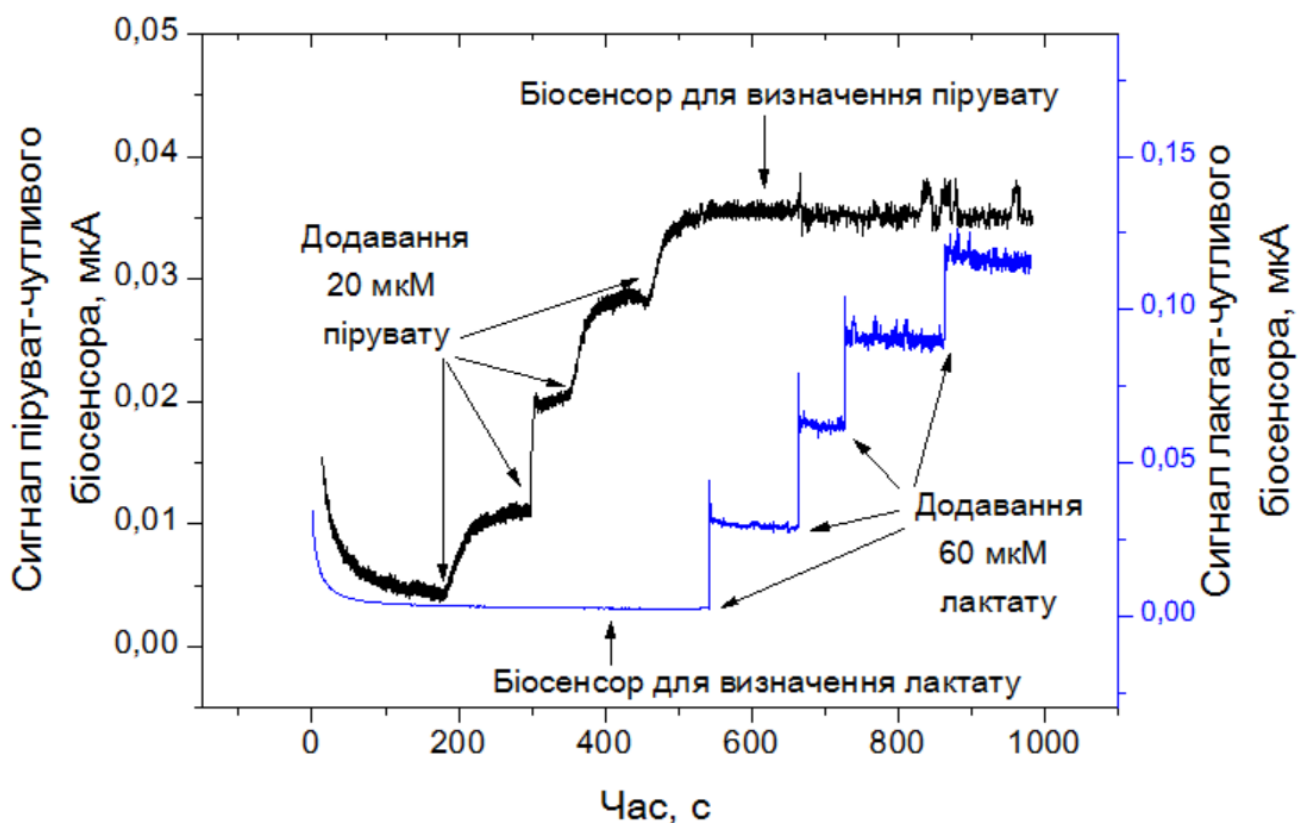


Рис. 8. Реальний вигляд відгуків біосенсорної системи на додавання різних концентрацій лактату та пірувату при їх одночасному вимірюванні. Вимірювання проводили у 10 мМ HEPES, рН 7,4, за постійного потенціалу +0,6 В відносно Ag/AgCl електрода порівняння

Як відомо з літератури, робота біосенсора може залежати як від його власних характеристик, так і від характеристики робочого розчину, зокрема, рН, буферної ємності та іонної сили. Тому нами було встановлено оптимальне значення рН робочого буферного розчину для роботи ЛОД і ПОД у іммобілізованому стані (рис. 9).

Оптимальний рН для ПОД склав від 7,1 до 8,1. Оптимальний діапазон значень рН для ЛОД починався від 7,0, досягаючи піку близько 7,7. Але оскільки біосенсорна система призначалась для вимірювання сироватки крові, було вирішено надалі працювати з буферним розчином, рН 7,4, який відповідає фізіологічному.

Також було показано, що відгуки біосенсорної системи практично не залежать від концентрації буферного розчину при концентраціях більше 4 мМ. Також значної розбіжності відгуків при варіації концентрації NaCl від 1 мМ до 50 мМ (що відповідає 3-х і більше кратному розведенню сироватки крові) не спостерігалось. Це свідчить про можливість використання біосенсорної системи для аналізу біологічних рідин, що характеризуються варіабельною іонною силою та буферною ємністю.

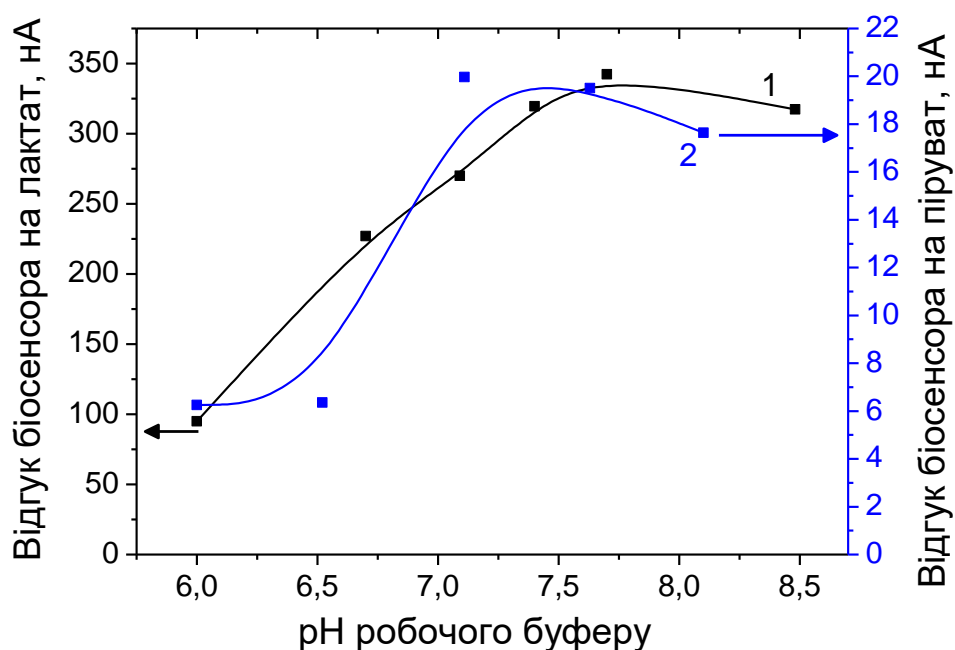


Рис. 9. Криві залежності відгуків біосенсорної системи на додавання 1 мМ лактату (1) та 1 мМ пірувату (2) від рН розчину.

Вимірювання проводили у 50 мМ універсальному буферному розчині, з додаванням 120 мкМ Mg^{2+} , 500 мкМ ТПФ

Як відомо з літератури, ПОД не проявляє субстратної специфічності до лактату, а ЛОД – до пірувату. Тим не менш, оскільки біоселективні елементи біосенсорної системи повинні працювати одночасно в одному і тому ж середовищі та за однакових умов, нами було додатково досліджено перехресний вплив субстратів на роботу монобіосенсорів.

Було показано, що на відгук піруват-чутливого біосенсора не демонструє достовірного впливу наявності лактату у вимірювальній комірці (рис. 10, а). Аналогічно, наявність пірувату не впливає на роботу лактат-чутливого біосенсора (рис. 10, б).

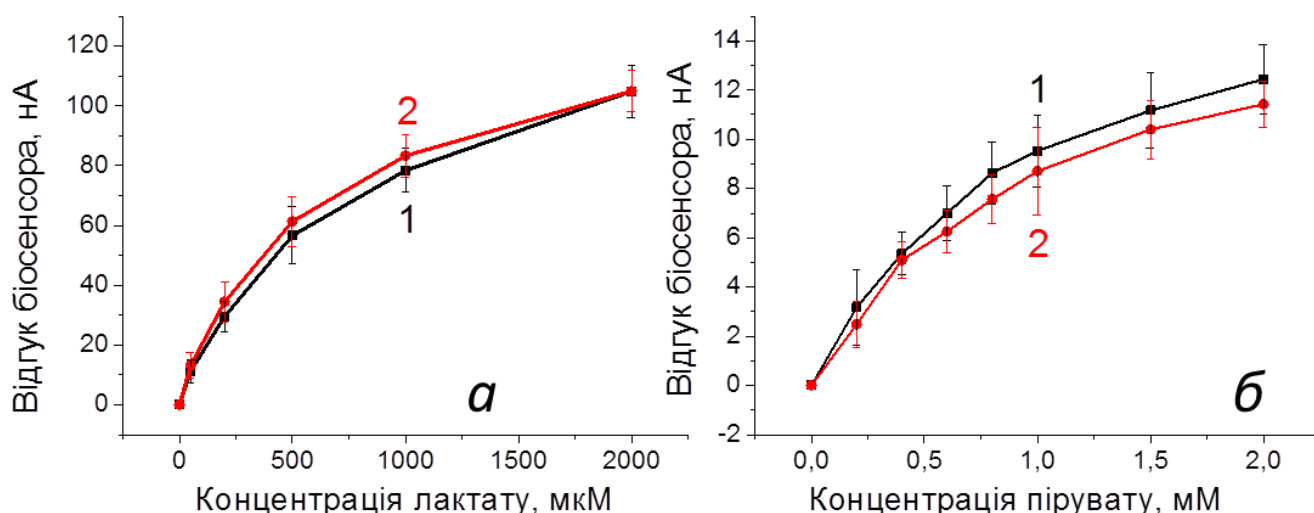


Рис. 10. Калібрувальні криві біосенсорів на основі ЛОД (А) та ПОД (Б) для вимірювання концентрації лактату та пірувату, у відсутності (1) та у присутності (2) протилежного субстрату у вимірювальній комірці. Вимірювання проводили у 25 мМ HEPES , pH 7,4, за постійного потенціалу +0,6 В відносно Ag/AgCl електрода порівняння

Крім того, оскільки піруват-чутливий біосенсор потребує застосування додаткових субстратів та кофакторів, а саме фосфат-іонів, іонів магнію та тіамінпірофосфату, було також перевірено їхній вплив на монобіосенсор для визначення лактату. Було показано, що наявність у робочому буферному розчині кофакторів ПОД не впливає на відгуки біосенсора для визначення лактату. Отже, оскільки перехресний вплив субстратів та кофакторів монобіосенсорів відсутній, біосенсори можуть працювати в складі системи в однакових умовах та єдиному буферному розчині.

Після розробки та оптимізації роботи біосенсорної системи було визначено її основні аналітичні характеристики (табл. 2).

Таблиця 2

Основні аналітичні характеристики біосенсорної системи для вимірювання лактату та пірувату

Аналітична характеристика	Визначення пірувату	Визначення лактату
Мінімальна межа визначення, мкМ	5	5
Лінійний діапазон, мкМ	10 - 5000	5 - 1000
Відносна середньоквадратична похибка вимірювання відгуків, %	6,2	5,0
Час аналізу, хв.	5	5
Стабільність при зберіганні, дні	14	14

Для визначення стану пацієнта за різних патологій важливими показниками є не лише лактат та піруват, а також значний інтерес має визначення концентрації деяких нейротрансмітерів та метаболітів. Глутамат та ацетилхолін є найважливішими збуджуючими нейротрансмітерами у нервовій системі. Холін є попередником у синтезі ацетилхоліну, тому при нестачі холіну виникає ряд нервових розладів. Визначення концентрації глюкози, глутамату та лактату є важливим для розуміння динаміки енергетичного балансу мозку. Одночасний моніторинг глюкози, лактату та глутамату є корисним для досліджень енергетичних процесів та комунікації нейронів у мозку. Таким чином, при одночасному аналізі цих показників у спинномозковій рідині можна отримати більш комплексну картину стану нейропроцесів у пацієнта.

Тому було здійснено перевірку можливості роботи розробленої біосенсорної системи як компонента більш складного мультибіосенсорного масиву для вимірювання глюкози, лактату, пірувату, холіну, ацетилхоліну та глутамату. Шість біосенсорів, допоміжний платиновий електрод та хлорсрібний електрод порівняння були під'єднані до потенціостату. Вимірювання проводили за кімнатної температури у відкритій вимірювальній комірці при прикладеному потенціалі +0,6 В відносно електрода порівняння. Типові калібрувальні криві біосенсорів для визначення субстратів наведені на рис. 11.

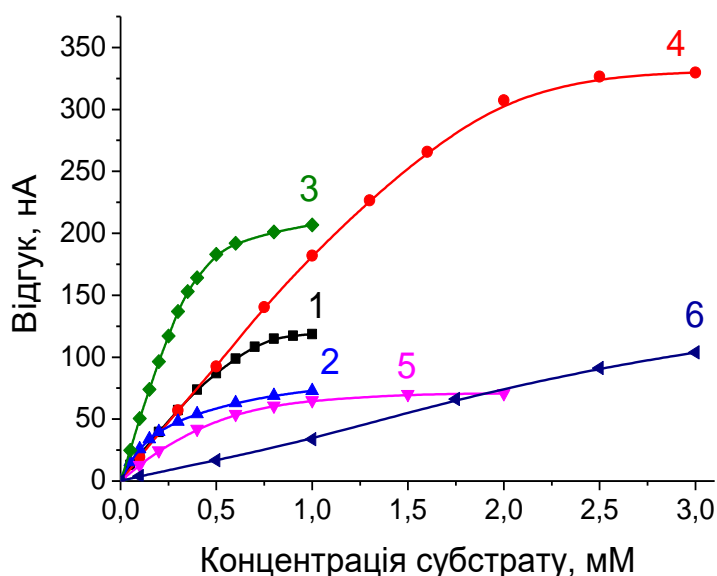


Рис.11. Калібрувальні криві масиву біосенсорів для визначення: глутамату (1), холіну (2), лактату (3), глюкози (4), ацетилхоліну (5) та пірувату (6). Вимірювання проводили у 25 мМ HEPES, pH 7,4, за постійного потенціалу +0,6 В відносно Ag/AgCl електрода порівняння

Всі біосенсори характеризувалися високою відтворюваністю відгуків; відносне середньоквадратичне відхилення відгуків в середньому не перевищувало 5 %. Це свідчить про можливість ефективного використання масиву біосенсорів для проведення багаторазових вимірювань.

Використання розробленої біосенсорної системи для одночасного визначення концентрації лактату та пірувату у зразках сироватки крові. Розроблену біосенсорну систему планується використовувати для визначення концентрацій лактату та пірувату, та їх співвідношення в біологічних рідинах, зокрема сироватці крові, для медичної діагностики. У клінічній практиці використовується визначення

концентрацій лактату, пірувату та ЛПВ для визначення рівня лактатацидозу пацієнтів, а також для розрізнення типів і причин лактатацидозу. Також використання даних показників дозволяє передбачити такі зміни у стані пацієнта, як ймовірність настання поліорганної недостатності, колапсу, коми та клінічної смерті.

Тому ми адаптували розроблену біосенсорну систему для вимірювання лактату та пірувату у реальних зразках сироватки крові людини. Для зменшення впливу компонентів зразку потрібно проводити розведення зразку. Також розведення зразку дозволяє зменшити концентрацію лактату, щоб напевно потрапити в лінійну ділянку калібрувальної кривої біосенсора. Розведення відбувається безпосередньо у робочій комірці, попередня обробка проби не потрібна.

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 надійного попадання концентрації пірувату та лактату в межі лінійного діапазону роботи біосенсорної системи

Очікувалось, що під час послідовних вимірювань сироватки крові може відбуватися осадження речовин реального зразку на поверхні біоселективної мембрани біосенсорів, що призведе до поступового зменшення чутливості біосенсорів. Було оцінено відтворюваність відгуків біосенсорної системи при роботі з сироваткою крові (рис. 12). Відносне середньоквадратичне відхилення відгуків на лактат становило 5 %, а на піруват – 9,3 %. Це свідчить про достатньо високу точність біосенсорної системи і можливість її практичного використання для багаторазового вимірювання реальних зразків.

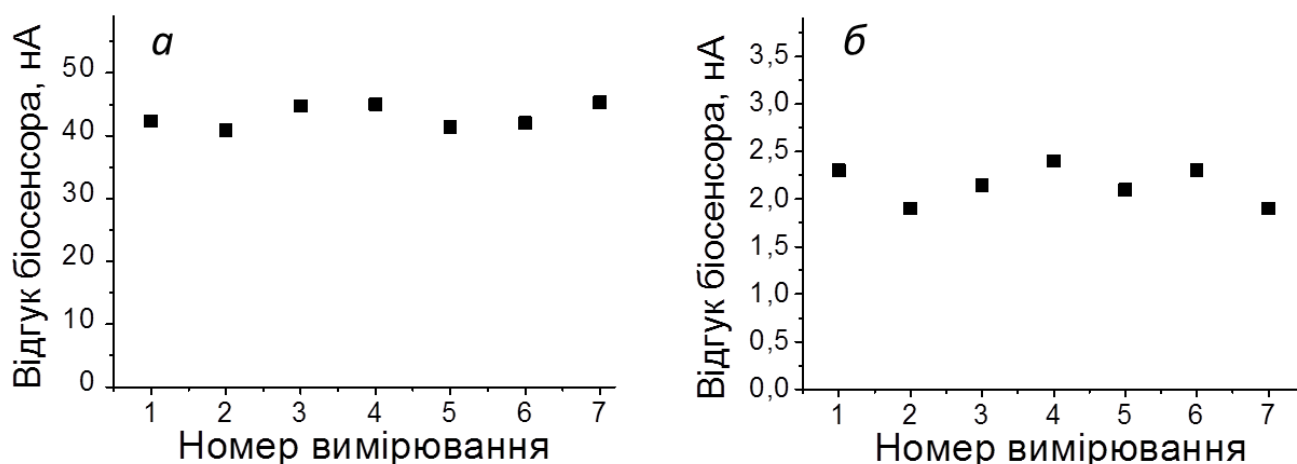


Рис. 12. Відтворюваність відгуків лактат-чутливого біосенсора (а) та піруват-чутливого біосенсора (б) при проведенні послідовних вимірювань сироватки крові

Для аналізу реальних зразків сироватки крові нами було запропоновано схему аналізу концентрацій лактату та пірувату у венозній крові людини, наведену на рис.13.

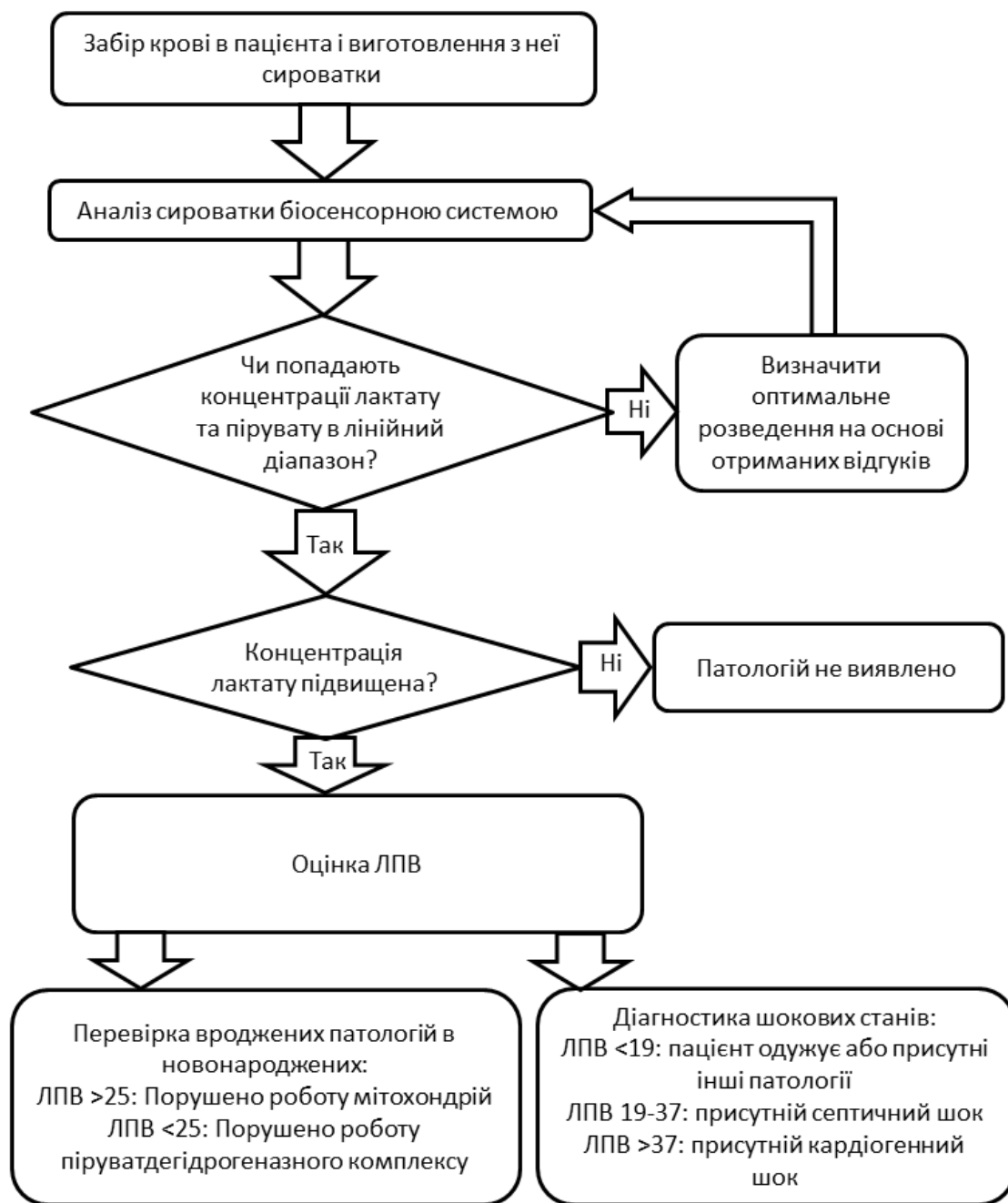


Рис. 13. Схема аналізу концентрацій лактату та пірувату у венозній крові людей.

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

Після вимірювання показників лактату та пірувату визначається, чи потрапляють ці значення в лінійний діапазон роботи біосенсорів. Якщо ж значення занадто великі проводиться додаткове розведення проби та повторне вимірювання.

Далі показники лактату та пірувату у венозній крові людини передбачається оцінювати за таким алгоритмом. Визначається рівень лактату, за цим показником робиться висновок про наявність чи відсутність лактатацидозу у пацієнта. Якщо рівень лактату суттєво підвищений відносно норми, наступним важливим

показником є ЛПВ, яке вказує на можливу причину виникнення лактатацидозу. 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 ЛПВ можливо 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 (на схемі не наведено).

Після оптимізації процедури вимірювання було проведено визначення концентрації лактату та пірувату у семи зразках сироватки крові людей. Біосенсорні вимірювання проводили із використанням калібрувальних кривих, в той час як контрольним методом виступав спектрофотометричний метод визначення лактату та пірувату (табл. 3).

Таблиця 3

Результати визначення концентрацій лактату та пірувату в сироватці 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		
					1	2,7 ± 0,7
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

Примітки: * - Визначення проводили на 4 різних біосенсорах. ** Б - Біосенсор. *** СФ - Спектрофотометрія.

Також були побудовані кореляційні графіки (рис. 14). 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 високим показником і свідчить про співвідносність результатів біосенсорної системи та контрольного метода. Таким

чином, біосенсорну систему можна використовувати для визначення концентрацій лактату, пірувату і їх співвідношення у сироватці крові.

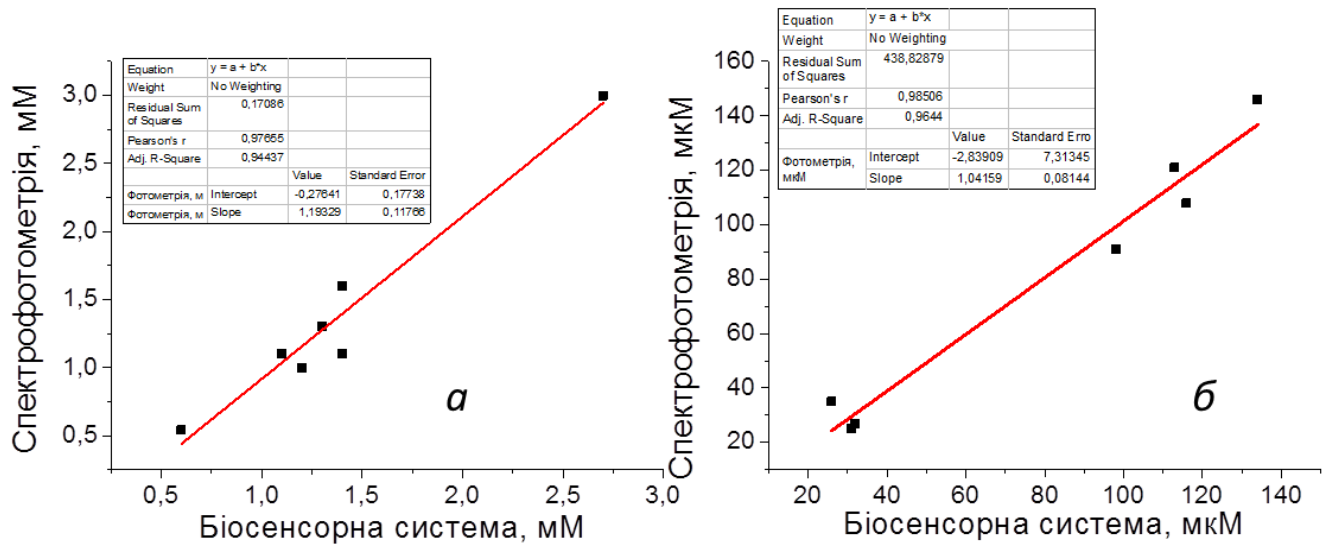


Рис. 14. Кореляція між результатами визначення концентрацій лактату (а) та пірувату (б) в сироватці крові за допомогою біосенсора та спектрофотометричного метода

Доцільно порівняти отримані результати з літературними даними. Зокрема, в роботі (Mintun et al., 2004) в 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. ЛПВ становило $8,9 \pm 3,2$. В іншій роботі досліджували концентрації лактату і ЛПВ у 60 пацієнтів з шоківим станом і лактатацидозом (Levy et al., 2000). У випадку септичного шоку, концентрації лактату становили від 4,6 мМ до 12,2 мМ, а ЛПВ – від 19 до 37. В пацієнтів, які одужували, концентрація лактату зменшилась до $2,8 \pm 0,4$ мМ, а ЛПВ зменшилось до 14 ± 1 після 24 годин. У випадку кардіогенного шоку, концентрація лактату складала 4 ± 1 мМ, а ЛПВ – 40 ± 6 .

В іншій роботі були встановлені ЛПВ в 110 дітей з гострою печінковою недостатністю, які становили від 2,8 до 170,0, а середнє значення складало 22,5 (Feldman et al., 2017). Таким чином, наші результати вимірювань концентрацій лактату та пірувату і їх співвідношення, наведені в табл. 3, є цілком співставними з літературними даними.

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).

ПЕРЕЛІК НАУКОВИХ РОБІТ, ОПУБЛІКОВАНИХ ЗА ТЕМОЮ ДИСЕРТАЦІЇ

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 з розробки лактат-чутливого амперометричного біосенсора, 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 експериментальних досліджень з оптимізації умов іммобілізації піруватоксидази, аналіз результатів.

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.

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, 87-97.

Особистий внесок здобувача: аналіз літературних джерел, проведення досліджень з розробки і оптимізації процедури біосенсорного визначення лактату та пірувату у сироватці крові.

6. Kucherenko I.S., Topolnikova Ya.V., Soldatkin O.O.. Advances in the biosensors for lactate and pyruvate detection for medical applications: A review. Trends in Analytical Chemistry. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2018.11.004>.

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.

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 конференції «Трансфер новітніх медичних та стоматологічних технологій в охорону здоров'я України», 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 XI Annual Conference of Young Scientists Institute of Molecular Biology and Genetics of NAS of Ukraine, Kyiv, 23-24 May 2017, P. 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 пірвіноградної 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. 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, 15-16 May 2018, P. 160.

Особистий внесок здобувача: проведення експериментів з розробки біосенсорної системи на основі лактат-чутливого та піруват-чутливого біосенсорів.

13. 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 двох елементів біосенсорного масиву – біосенсорів для визначення концентрацій лактату та пірувату.

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 концентрацій лактату та пірувату та їхнього співвідношення в сироватці крові з метою застосування для клінічної діагностики.

Розроблено лактат- і піруват-чутливі монобіосенсори та біосенсорну систему для одночасного визначення лактату і пірувату, створено їхні діючі лабораторні прототипи. Підбрано оптимальний метод іммобілізації ензимів, склад робочого буферного розчину. Досліджено основні аналітичні характеристики біосенсорної системи. Вивчено вплив параметрів буферного розчину (рН, іонна сила, буферна ємність) на роботу біосенсорної системи. Досліджено відтворюваність та операційну стабільність, а також стабільність системи при зберіганні. Показано відсутність перехресного впливу субстратів та кофакторів монобіосенсорів при їх одночасній роботі. Розроблену біосенсорну систему апробовано у складі мультибіосенсора для вимірювання лактату, пірувату, глюкози, глутамату, холіну та ацетилхоліну.

За допомогою розробленої системи проведено вимірювання вмісту лактату та пірувату у реальних зразках сироватки крові. Показано високу кореляцію отриманих даних з контрольним методом вимірювання – спектрофотометрією. Отриманий

лабораторний прототип біосенсорної системи може бути використаний як основа для випуску промислових економічно вигідних приладів для клінічної діагностики.

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

АННОТАЦІЯ

Топольникова Я.В. Разработка биосенсорной системы для одновременного определения концентраций лактата и пирувата в биологических жидкостях для клинической диагностики.

Диссертация на соискание ученой степени кандидата биологических наук (доктора философии) за специальностью 03.00.20 – биотехнология. – Институт молекулярной биологии и генетики НАН Украины, Киев, 2019.

Диссертация посвящена разработке биосенсорной системы для определения лактата и пирувата в сыворотке крови и других биологических жидкостях, с целью применения в клинической диагностике. Показатели лактата, а также соотношение лактата к пирувату в венозной крови пациентов с политравмой являются диагностическим критерием для оценки тяжести состояния пациента, а также дальнейшего прогноза.

Вначале нами было разработано монобиосенсоры для определения лактата и пирувата. В роли биоселективных элементов использовали ферменты лактатоксидаза и пируватоксидаза, иммобилизованные на поверхности амперометрических преобразователей. Как преобразователи использовали платиновые дисковые электроды. Были подобраны оптимальные методы и условия иммобилизации ферментов, проведено сравнительный анализ трех методик: иммобилизация путем поперечной сшивки глутаровым альдегидом, фотополимеризация в слое полимера PVA-SbQ а также адсорбция на поверхности силикалита. Как оптимальный метод для изготовления биосенсорной системы было выбрано фотополимеризацию ферментов в слое PVA-SbQ.

Для защиты биосенсоров от электроактивных веществ в сыворотке крови, применена дополнительная мембрана на основе полифенилендиамина.

Поскольку работа пируватоксидазы зависит от наличия кофакторов (тиаминпирофосфата, ионов магния) и присутствия ионов фосфорной кислоты, были определены их оптимальные концентрации которые составили: 20 мМ фосфат-ионов, 500 мкМ тиаминпирофосфата, 120 мкМ Mg^{2+} .

Также было исследовано влияние параметров буферного раствора на работу монобиосенсоров. Показано отсутствие существенных изменений откликов при изменении ионной силы и буферной емкости. Оптимальный диапазон pH для работы лактат-чувствительного биосенсора составил 7,3-7,7, пируват-чувствительного - от 7,1 до 7,5. Поскольку колебания pH крови живого человека при любых патологических состояниях не выходят за границы 7,35-7,45, биосенсорная система пригодна к измерениям сыворотки крови как в норме так и в патологии.

Разработанные биосенсоры характеризовались хорошей воспроизводимостью откликов в течении нескольких часов непрерывной работы, с погрешностью

измерения не больше 6,2%, а также при хранении в течении двух недель. Оптимальный способ хранения биосенсоров при -18°C в сухом состоянии.

После оптимизации конструкции монобиосенсоров и выбора оптимального режима работы были проанализованы основные аналитические характеристики монобиосенсоров при одновременной работе. Линейный диапазон монобиосенсора для определения лактата составляет от 5 мкМ до 1000 мкМ, нижняя граница определения лактата – 5 мкМ, чувствительность к лактату – 204 нА/мМ. Линейный диапазон монобиосенсора для определения пирувата – от 10 мкМ до 5 мМ, граница определения – 5 мкМ, чувствительность к пирувату – 31 нА/мМ.

Следующим этапом стало объединение монобиосенсоров в систему для одновременного измерения лактата и пирувата. Для одновременного функционирования двух монобиосенсоров был применен дополнительный модуль к потенциостату – восьмиканальный мультиплексор. Проведено исследование перекрестного влияния субстратов и кофакторов монобиосенсоров при одновременной работе, показано отсутствие чувствительности к противоположным субстратам, а также отсутствие влияния кофакторов пируватоксидазы на монобиосенсор для измерения лактата. Показана возможность работы разработанной системы в составе мультибиосенсора для измерения лактата, пирувата, глюкозы, глутамата, холина и ацетилхолина.

Разработанной биосенсорной системой проведено измерение концентраций лактата и пирувата в реальных образцах сыворотки крови. Установлена оптимальная степень разведения образцов в рабочей ячейке, воспроизводимость откликов на сыворотку на протяжении нескольких часов непрерывной работы. Показана высокая корреляция полученных результатов измерения лактата и пирувата в сыворотке с помощью биосенсорной системы и контрольного метода анализа. Так, для измерений лактата корреляция составляла 0,945, для пирувата - 0,980.

Полученные экспериментальные результаты свидетельствуют о возможности использования биосенсорной системы для одновременного определения концентраций лактата и пирувата и вычисления соотношения лактата и пирувата в сыворотке крови. Это может быть полезным в клинической диагностике для определения уровня лактатацидоза в крови человека с политравмой, а также другими патологическими состояниями.

Ключевые слова: биосенсорная система, лактат, пируват, амперометрический биосенсор, диагностика лактатацидоза, медицинская диагностика.

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 Philosophy doctor (PhD) in Biology 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 concentrations of lactate and pyruvate and their ratio in blood serum for use in clinical diagnosis.

The lactate- and pyruvate-sensitive monobiosensors and the biosensor system for simultaneous determination of lactate and pyruvate were created, their working laboratory prototypes were elaborated. The method of enzymes immobilization was optimized, as well as a composition of the working buffer solution. The key analytical characteristics of the biosensor system were investigated. The effect of parameters of a buffer solution (pH, ionic strength, buffer capacity) on the work of the biosensor system was studied. The response reproducibility and operational stability were evaluated along with the stability during storage. It was shown that there was no cross-influence of the substrates and cofactors of monobiosensors at their simultaneous operation as the parts of a single system. The developed biosensor system was tested as a component of the multibiosensor for monitoring lactate, pyruvate, glucose, glutamate, choline and acetylcholine.

The developed system was used for measurement of lactate and pyruvate concentrations in real samples of blood serum. It is shown a high correlation of the obtained data with the results of control spectrophotometric method. The obtained laboratory prototype of the biosensor system can be used as a basis for elaboration of commercial devices for clinical diagnosis.

Keywords: biosensor system, lactate, pyruvate, amperometric transducer, biosensor, diagnosis of lactic acidosis, medical diagnostics.