

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

КУЧЕРЕНКО Дар'я Юріївна



УДК 543.06 + 577.15 + 543.553

**РОЗРОБКА ТА ОПТИМІЗАЦІЯ ГЛУТАМАТ-ЧУТЛИВОГО БІОСЕНСОРА
ДЛЯ ПОТРЕБ МЕДИЦИНИ ТА КОНТРОЛЮ ЯКОСТІ ХАРЧОВИХ
ПРОДУКТІВ**

03.00.20 – біотехнологія

АВТОРЕФЕРАТ

дисертації на здобуття наукового ступеня

кандидата біологічних наук

Київ – 2019

Дисертацією є рукопис.

Роботу виконано в лабораторії біомолекулярної електроніки відділу механізмів трансляції генетичної інформації Інституту молекулярної біології і генетики НАН України та на кафедрі молекулярної біотехнології та біоінформатики Інституту високих технологій Київського національного університету імені Тараса Шевченка (м. Київ).

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

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

кандидат біологічних наук, старший науковий співробітник
Дибкова Світлана Миколаївна,
Інститут біоколоїдної хімії ім. Ф. Д. Овчаренка НАНУ,
старший науковий співробітник відділу колоїдної технології природних систем.

Захист відбудеться «28» травня 2019 р. о 10³⁰ год. на засіданні спеціалізованої вченої ради Д 26.237.01 в Інституті молекулярної біології і генетики НАН України за адресою: 03143, Київ-143, вул. Академіка Заболотного, 150.

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

Автореферат розіслано «___» квітня 2019 року.

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



І.В. Крупська

ЗАГАЛЬНА ХАРАКТЕРИСТИКА РОБОТИ

Актуальність теми. Моніторинг концентрацій біологічно активних речовин, що характеризують певні патологічні стани живого організму, в біологічних зразках та в зразках харчових продуктів є актуальним завданням для сучасної клінічної біохімії та аналітичної біотехнології. До таких біологічно активних речовин належать ключові метаболіти, гормони, нейромедіатори, в тому числі глутамат (глутамінова кислота). Глутамат займає важливе місце в біохімічних шляхах та фізіологічних процесах людини та інших тварин. Глутамат є однією з амінокислот, які є будівельними блоками білків і порядок розташування яких в білках визначається ДНК-послідовністю. Крім того, важливою є роль глутамату як збуджуючого нейромедіатора в нервовій системі ссавців. Концентрація глутамату в біологічних рідинах людського організму може впливати на розвиток інфарктів, інсультів та різні невропатологічні стани (порушення транспорту глутамату є характерною рисою патогенезу майже всіх неврологічних захворювань) (Lv et al., 2018; Kaur et al., 2018). Постійне зростання числа пацієнтів з такими розладами становить глобальну і дотепер невирішену проблему сучасного суспільства.

Тривале підвищення позаклітинної концентрації глутамату призводить до розвитку глутаматної нейротоксичності та викликає неврологічні порушення внаслідок надмірної стимуляції рецепторів, і навіть зумовлює загибель нейронів (Marecz et al., 2016). Водночас певний рівень позаклітинного глутамату за відсутності стимулу є необхідним для тонічної активації пре- та постсинаптичних глутаматних рецепторів. Оскільки у синаптичній щілині досі не виявлено ферментів деградації глутамату, єдиним відомим шляхом швидкого видалення нейромедіатора з позаклітинної рідини є його захоплення високоафінними Na^+ -залежними глутаматними транспортерами, локалізованими у плазматичній мембрані нейронів і гліальних клітин. Беручи до уваги цей факт, очевидно, що реєстрація змін у кінетичних характеристиках процесу накопичення глутамату нервовими терміналами головного мозку є надзвичайно важливим фізіологічним показником. Визначення кінетичних характеристик процесу високоафінного Na^+ -залежного накопичення глутамату нервовими терміналами дасть можливість оцінити активність роботи глутаматних транспортерів та їх здатність підтримувати низький позаклітинний рівень глутамату.

Визначення глутамату займає важливе місце в клінічній біохімії при діагностиці захворювань, що пов'язані з різкими змінами рівня глутамату в організмі, зокрема неврологічних захворювань, а також хвороб печінки та серцево-судинної системи (Yang et al., 2018; Wang et al., 2018).

В невеликих кількостях глутамат міститься в багатьох продуктах харчування (Henry-Unaeze, 2017). Присутність в їжі глутамату надає їй «м'ясного» смаку, тому його часто застосовують в якості підсилювача смаку, додаючи до багатьох харчових продуктів, іноді навіть з метою фальсифікації.

Таким чином, область практичного застосування кількісного контролю концентрації глутамату неперервно збільшується. Через це актуальним є розвиток нових аналітичних методів, здатних точно, селективно і швидко визначати

концентрації глутамату під час біомедичних досліджень і контролю якості харчових продуктів (Moody et al., 2018).

Сучасні загальноприйняті методи високоточного визначення глутамату, такі як газова та рідинна хроматографія, спектрофотометрія, інші хімічні та фізичні методи, потребують наявності кваліфікованого персоналу та складного і дорогого обладнання (Defaix et al., 2018, Fontana, 2018). Ще одним недоліком наведених методів аналізу є необхідність у складній попередній підготовці проб, що призводить до великих затрат часу та коштів (Campos et al., 2015).

Тому сьогодні дуже актуальним є питання створення більш зручного, точного, швидкого, селективного та дешевого методу визначення вмісту глутамату в досліджуваних зразках (біологічних рідинах та продуктах харчування). Способом вирішення указаних вище проблем є використання нових біоаналітичних приладів – біосенсорів. Біосенсори завдяки своїй селективності, відсутності необхідності в пробопідготовці та високій швидкості аналізу можуть найкраще підходити для визначення концентрації глутамату.

Розробка методичних підходів використання глутамат-чутливого біосенсора для аналізу активного транспорту глутамату в нервових терміналях головного мозку дозволить широко використовувати цей сенсор у біомедичних, а також біотехнологічних дослідженнях.

Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами. Дисертаційна робота виконувалась на кафедрі молекулярної біотехнології та біоінформатики Інституту високих технологій Київського національного університету імені Тараса Шевченка (м. Київ) в рамках бюджетної теми (НДР № 16БФ07-03 «Комп'ютерне моделювання та експериментальні дослідження біологічних наноконструктивних комплексів») та в лабораторії біомолекулярної електроніки Інституту молекулярної біології і генетики НАН України в рамках конкурсних науково-дослідних проектів «Глутамат-чутливий біосенсор: оптимізація, дослідна експлуатація, розробка стратегії та методології аналізу процесів активного транспорту глутамату в нервових терміналях головного мозку та тромбоцитах як периферичній моделі пресинапси в нормі та за умов нейропатологій» комплексної науково-технічної програми НАН України «Сенсорні прилади для медико-екологічних та промислово-технологічних потреб: метрологічне забезпечення та дослідна експлуатація» (№ державної реєстрації 0113U002494, 2013-2017 рр.) і «Розроблення та оптимізація біосенсорної системи моніторингу нейромедіаторів для експрес діагностики та контролю ефективності лікування нейропатологій. Розділ 2. Розроблення, оптимізація та дослідна експлуатація біосенсорної смарт-системи моніторингу нейромедіаторів» цільової програми наукових досліджень НАН України «Розумні» сенсорні прилади нового покоління на основі сучасних матеріалів та технологій» (№ державної реєстрації 0118U005173, 2018-2022 рр.).

Мета і задачі дослідження. Мета дисертаційної роботи полягала в розробці ферментного електрохімічного глутамат-чутливого біосенсора та його адаптації для визначення глутамату в біологічних зразках і харчових продуктах.

Для досягнення вказаної мети були поставлені наступні завдання:

1. Дослідити умови формування біоселективного елемента на основі глутаматоксидази на поверхні фізичного перетворювача.

2. Розробити амперометричний глутамат-чутливий біосенсор на основі іммобілізованої глутаматоксидази, як біоселективного елемента, та дискового платинового електроду, як фізичного перетворювача. Створити лабораторний прототип глутаматного біосенсора, дослідити його аналітичні характеристики та оптимізувати умови функціонування.

3. Провести апробацію розробленого біосенсора при визначенні глутамату в біологічних зразках і розробити процедуру аналізу концентрацій глутамату в ізольованих нервових терміналях (синаптосомах).

4. Дослідити можливість вимірювання концентрацій глутамату в зразках харчових продуктів (соусах та приправах) за допомогою біосенсора та порівняти результати з традиційним спектрофотометричним методом.

Об'єкт дослідження: ферментативне окиснення глутамату в модельних і харчових зразках та зразках синаптосом, що супроводжується утворенням пероксиду водню.

Предмет дослідження: амперометричний ферментний біосенсор для аналізу глутамату в біологічних зразках та зразках харчових продуктів.

Методи дослідження: біохімічні та електрохімічні методи дослідження ферментативних реакцій, амперометричний метод, метод ковалентної іммобілізації ферменту, статистичний аналіз, спектрофотометричний метод, радіоізотопний метод.

Наукова новизна одержаних результатів. Біосенсори є перспективними приладами з низкою переваг, проте, на сьогоднішній день біосенсори практично не використовувались для визначення швидкості накопичення глутамату ізольованими нервовими терміналями.

В даній роботі розроблено електрохімічний біосенсор на основі іммобілізованої ГЛОД та платинового дискового електроду, який вперше було використано для визначення низьких мікромолярних концентрацій глутамату у зразках синаптосом; вперше досліджено процеси накопичення глутамату синаптосомами та визначено базовий рівень глутамату в ізольованих нервових терміналях; розроблено алгоритм біосенсорного аналізу вивільнення глутамату шляхом екзоцитозу та білками-транспортерами; проведено порівняльний аналіз біосенсорних досліджень та результатів традиційних аналітичних методів.

Вперше показано можливість створення глутамат-чутливого амперометричного біосенсора на основі глутаматоксидази, адсорбованої на мікрочастинках силікаліту, та платинового дискового електроду (патент України № 113557, 2017).

Перевірено вміст глутамату в харчових продуктах, таких як соєві соуси та приправи, а також показано кореляцію результатів з результатами, отриманими за допомогою традиційного спектрофотометричного методу.

Практичне значення одержаних результатів. Створено лабораторний зразок біосенсора на основі амперометричного дискового платинового перетворювача та іммобілізованої ГЛОД, призначеного для кількісного аналізу концентрацій глутамату в біологічних та харчових зразках.

Розроблено новий метод створення біоселективних елементів біосенсора на основі глутаматоксидази, адсорбованої на мікрочастинках силікаліту. Цей підхід може бути використаний при створенні біосенсорів різної специфічності.

Розроблено методику біосенсорного аналізу процесів накопичення та вивільнення глутамату в ізольованих нервових терміналях, яка може бути використана для нейрохімічних досліджень, наприклад, для дослідження патологічних станів, які супроводжуються порушенням роботи глутаматних транспортних систем.

Також показано, що розроблений біосенсор може використовуватись для контролю вмісту глутамату у харчових продуктах.

Особистий внесок здобувача. Дисертантом разом з науковим керівником сформульовано мету та завдання роботи, підготовлено план проведення досліджень і підібрано методи для досягнення мети та виконання поставлених завдань та самостійно виконано описані в дисертації експерименти. Автором самостійно проаналізовано наукову літературу за темою дослідження та підготовлено огляд літератури. Разом із співавторами було здійснено підготовку до друку статей у профільних наукових журналах, патенту та тез доповідей.

Дисертантом самостійно розроблено лабораторний прототип амперометричного біосенсора, досліджено та вдосконалено його основні аналітичні характеристики, проведено вимірювання глутамату в продуктах харчування. Дослідження, пов'язані з аналізом транспортних процесів в ізольованих нервових терміналях, проведені у співробітництві з відділом нейрохімії Інституту біохімії ім. О.В. Палладіна НАН України, очолюваним д.б.н., проф. Т.О. Борисовою.

Обговорення та аналіз результатів дослідження проведено з науковим керівником, академіком НАН України О.П. Солдаткіним, с.н.с. О.О. Солдаткіним та н.с. І.С. Кучеренком, яким здобувач висловлює щире подяку.

Апробація результатів дисертації. Результати досліджень були представлені на 7-ій Міжнародній науково-технічній конференції «Сенсорна електроніка та мікросистемні технології» (СЕМСТ-7) (Одеса, Україна, 2016); на конференції «Трансфер новітніх медичних та стоматологічних технологій в охорону здоров'я України» (Київ, Україна, 2017); 42nd FEBS Congress «From molecules to cells and back» (Єрусалим, Ізраїль, 2017); «Third annual BTRP Ukraine regional one health research symposium» (Київ, Україна, 2018); 8-ій Міжнародній науково-технічній конференції «Сенсорна електроніка та мікросистемні технології» (СЕМСТ-8) (Одеса, Україна, 2018).

Публікації. Матеріали дисертації опубліковано у 5 наукових статтях у фахових наукових журналах та тезах 6 доповідей на наукових конференціях, отримано 1 патент України на винахід.

Структура та обсяг дисертації. Дисертація складається зі вступу, огляду літератури, матеріалів та методів досліджень, результатів досліджень та їх обговорення, аналізу та узагальнення результатів досліджень, висновків, списку використаних джерел, який охоплює 144 найменування. Роботу викладено на 147 сторінках машинописного тексту та проілюстровано 39 рисунками та 6 таблицями.

ОСНОВНИЙ ЗМІСТ РОБОТИ

Матеріали та методи дослідження. При розробці біосенсорів було використано наступні препарати та реактиви: фермент глутаматоксидазу (ГЛОД, КФ 1.4.3.11) із *Streptomyces sp.* (рекомбінантну) з активністю 7 од.акт.мг⁻¹ фірми Yamasa Corporation (Токіо, Японія); бичачий сироватковий альбумін (БСА, фракція V) фірми Sigma-Aldrich Chemie (США); гліцерол фірми Merck (США); HEPES фірми Sigma-Aldrich Chemie (США); *m*-фенілендіамін фірми Sigma-Aldrich Chemie (США); 25 % водний розчин глутарового альдегіду (ГА) фірми Sigma-Aldrich Chemie (США); амінокислоти, використані для перевірки селективності біосенсора були виготовлені фірмою SERVA (Німеччина); глюкозу фірми Хелікон (РФ). Для спектрофотометричного визначення концентрацій глутамату в харчових зразках було використано 4-аміноантипірин і натрієву сіль 3-(*N*-етил-3-метиланіліно)-2-гідроксипропансульфонової кислоти фірми Sigma-Aldrich Chemie (США) та пероксидазу хрому (КФ 1.11.1.7) з активністю 150 од.акт.мг⁻¹ фірми Sigma-Aldrich Chemie (США). Для спектрофлуориметричних вимірювань використовували глутаматдегідрогеназу (КФ 1.4.1.3) з печінки бика з активністю 40 од.акт.мг⁻¹ та нікотинамідаденіндинуклеотид (НАД⁺) тієї ж фірми. В якості субстрату використовувався L-глутамат натрію фірми Sigma-Aldrich Chemie (США). *N*-метил-D-глюкамін було отримано від фірми Sigma-Aldrich Chemie (США). Високорозгалуджений неіонний полімер Ficoll 400, L-[¹⁴C]глутамат (0,1 мкСі/мл) та сцинтиляційна рідина ACS були виготовлені фірмою Amersham (Великобританія). Інші неорганічні сполуки, що використовувалися в роботі, були вітчизняного виробництва та мали ступінь чистоти „х.ч.“ та „ч.д.а.“. При підборі умов іммобілізації було використано 2,5 % суспензію силікаліту в 20 мМ HEPES, рН 6,5, яка була люб'язно надана колегами з Близькосхідного технічного університету (м. Анкара, Туреччина). Зразки синапсом з нервової системи щурів для досліджень на вміст глутамату були люб'язно надані Інститутом біохімії ім. О.В.Палладіна НАН України. Соеві соуси та сухі приправи були куплені в супермаркетах м. Київ.

В роботі, як амперометричні перетворювачі використовували платинові дискові електроди, які виготовляли в Інституті молекулярної біології і генетики НАН України (рис. 1). На амперометричні перетворювачі перед іммобілізацією ферментів наносили полімерну мембрану на основі поліфенілендіаміну (ПФД), яка практично усувала вплив інтерферуючих речовин на роботу біосенсора.

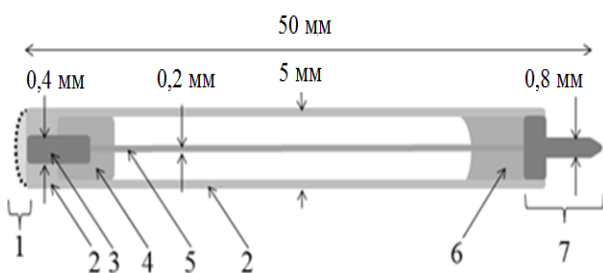


Рис. 1. Схема амперометричного біосенсора: 1 – біоселективна мембрана, 2 – скляний капіляр, 3 – платиновий дріт, 4 – сплав Вуда, 5 – внутрішній провідник (срібний чи мідний дріт), 6 – епоксидна смола, 7 – контактна площадка

Біоселективні елементи біосенсорів отримували шляхом ковалентної іммобілізації ферменту і допоміжних речовин на поверхню амперометричного

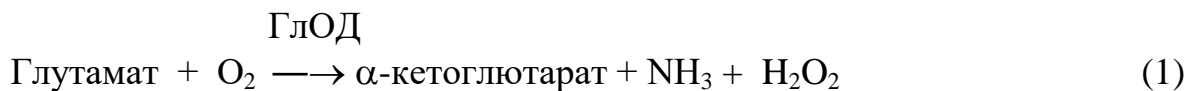
перетворювача. Вихідний розчин містив 8 % (тут і далі – масова частка) ГЛОД, 4 % БСА у 100 мМ фосфатному буфері, рН 6,5, з 10 % гліцеролом. Цей розчин змішували з 0,8 % водним розчином глутарового альдегіду (зшиваючого агенту) у пропорції 1:1. Одразу після цього суміш наносили на поверхні перетворювачів та висушували протягом 30 хв за кімнатної температури.

В роботі було використано триелектродну схему амперометричного аналізу. Робочі амперометричні електроди, допоміжний платиновий електрод та Ag/AgCl електрод порівняння підключали до потенціостату PalmSens (Palm Instruments BV, Нідерланди). Як робочий буфер використовували 25 мМ HEPES з рН 7,4.

Вимірювання глутамату біосенсором проводили за допомогою двох підходів – з використанням калібрувального графіка або методу стандартних додавань.

Результати та їх обговорення.

Розробка амперометричного глутамат-чутливого біосенсора. В основі роботи амперометричного біосенсора для визначення глутамату лежить ферментативна реакція (1), що протікає в біоселективній мембрані. В результаті реакції відбувається окиснення глутамату і утворення електрохімічно-активного пероксиду водню. При прикладанні позитивного потенціалу на електроді відбувається реакція розкладу пероксиду водню (2), в результаті якої утворюються електрони, що безпосередньо реєструються амперометричним перетворювачем:



Першим етапом роботи було покращення селективності амперометричного перетворювача за допомогою ПФД мембрани. Після цього було проведено підбір та оптимізацію умов формування біоселективного елемента на поверхні перетворювача. Для порівняння результатів отримання біоселективних елементів застосовували декілька методів іммобілізації, а саме: адсорбція ГЛОД на силікаліті, іммобілізація ГЛОД в БСА мембрані з використанням парів та розчину ГА. В результаті досліджень для подальшої роботи було вибрано метод іммобілізації ферменту в БСА мембрані з використанням розчину ГА. Також було підібрано оптимальні вихідні концентрації компонентів розчину для формування біоселективної мембрани: ГЛОД (4%), ГА (0,4%) та тривалість іммобілізації (30 хв).

Було досліджено вплив параметрів розчину на роботу біосенсора. Для дослідження впливу рН буферу на роботу амперометричного біосенсора було використано «універсальний» буфер (що містив тріс-НСІ, КН₂РО₄, лимонну кислоту та тетраборат натрію в концентраціях 10 мМ), який має однакову буферну ємність у широкому діапазоні значень рН.

Дослідження проводили у діапазоні рН від 5 до 10. Результати дослідження наведено на рис. 2. Найкращі відгуки біосенсора спостерігались в діапазоні рН 7 – 9.

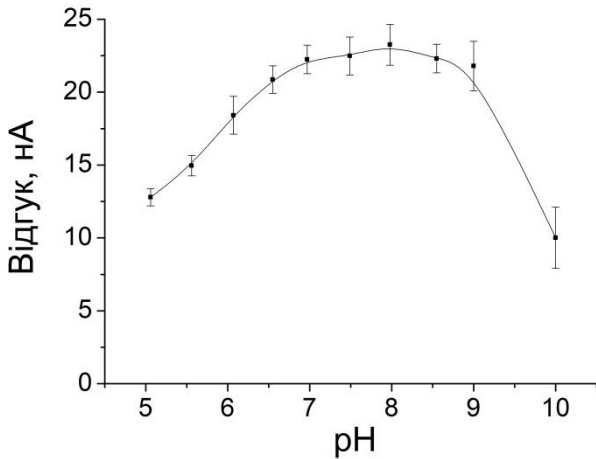


Рис. 2. Залежність величини відгуків біосенсора від рН «універсального» буферного розчину. Концентрація глутамату – 100 мкМ. Вимірювання проводили за постійного потенціалу +0,6 В відносно Ag/AgCl електрода порівняння

Для дослідження впливу іонної сили на відгуки біосенсора в якості джерела іонів було використано 3,3 М розчин NaCl. Отримували відгуки біосенсора на 100 мкМ концентрацію глутамату. Як бачимо з рис. 3, значних змін відгуків біосенсора на глутамат, при наявності в робочій комірці різних концентрацій NaCl, не спостерігалось, що є типовим для амперометричних біосенсорів. Це свідчить про можливість використання даного біосенсора в біологічних розчинах, що характеризуються різною іонною силою.

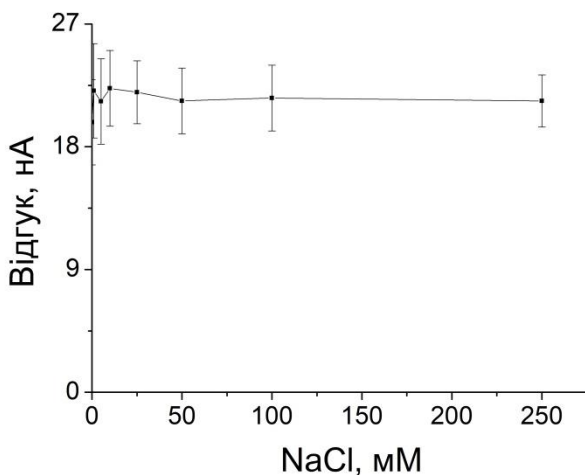


Рис. 3. Залежність величини відгуків біосенсора від іонної сили розчину. Концентрація глутамату – 100 мкМ. Вимірювання проводили у 25 мМ HEPES буфері, рН 7,4, за постійного потенціалу +0,6 В відносно Ag/AgCl електрода порівняння

Концентрація буферу, а, відповідно, і буферна ємність, також може впливати на роботу біосенсора. Тому було досліджено також вплив концентрації буферу на величину відгуків біосенсора. На рис. 4 показано, що величини відгуків біосенсора практично не змінювались зі збільшенням концентрації буферу. Це дає можливість використовувати розроблений біосенсор для визначення глутамату в біологічних зразках, що можуть характеризуватися різними буферними ємностями.

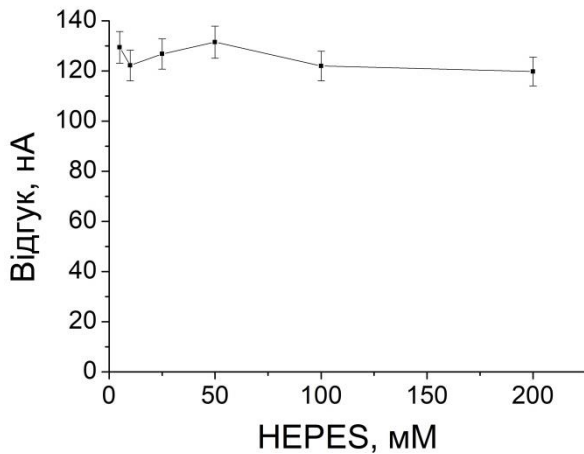


Рис. 4. Залежність величини відгуків біосенсора від концентрації HEPES буферу. Концентрація глутамату – 0,7 мМ. Вимірювання проводили при рН 7,4, за постійного потенціалу +0,6 В відносно Ag/AgCl електрода порівняння

Було досліджено відтворюваність відгуків біосенсорів впродовж декількох годин безперервної роботи. Результати дослідження відтворюваності відгуків біосенсора на глутамат представлено на рис. 5. Помітного падіння відгуків за 12 вимірювань не відбувалось; відносне середньоквадратичне відхилення відгуків на глутамат в середньому становило не більше 5 %.

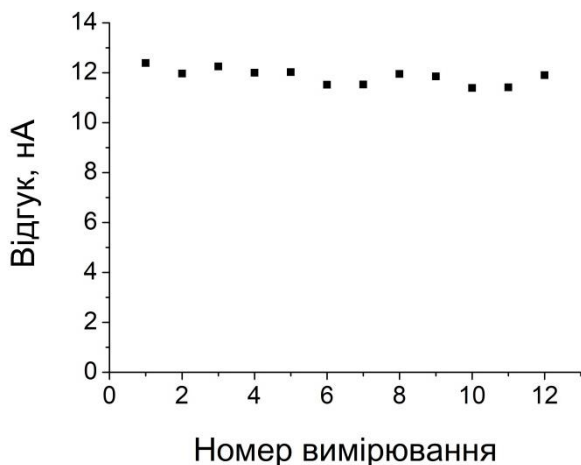


Рис. 5. Відтворюваність відгуків біосенсора на 50 мкМ глутамат впродовж 12 вимірювань. Вимірювання проводили у 25 мМ HEPES буфері, рН 7,4, за постійного потенціалу +0,6 В відносно Ag/AgCl електрода порівняння

При масовому виробництві біосенсорів відтворюваність приготування біоселективного елементу є також дуже важливою характеристикою. Її досліджували шляхом створення різних глутаматних біосенсорів та отримували калібрувальні криві для визначення нейромедіатора (рис. 6).

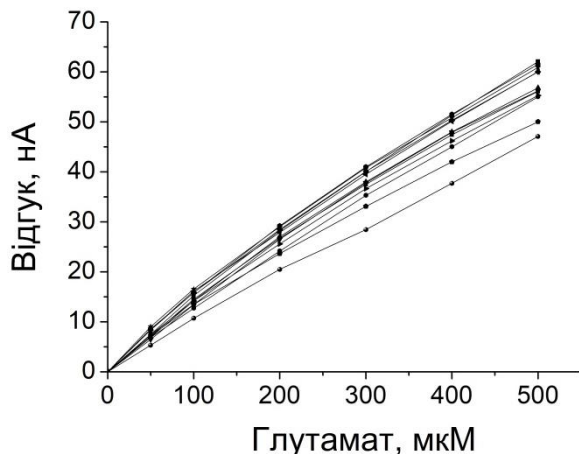


Рис. 6. Калібрувальні графіки, отримані за допомогою різних глутамат-чутливих біосенсорів. Вимірювання проводили у 25 мМ HEPES буфері, рН 7,4, за постійного потенціалу +0,6 В відносно Ag/AgCl електрода порівняння

Відносне стандартне відхилення відгуків різних біосенсорів на глутамат не перевищувало 12 % (рис. 7). Калібрувальні криві для визначення глутамату всіх біосенсорів мали подібну форму і однаковий лінійний діапазон.

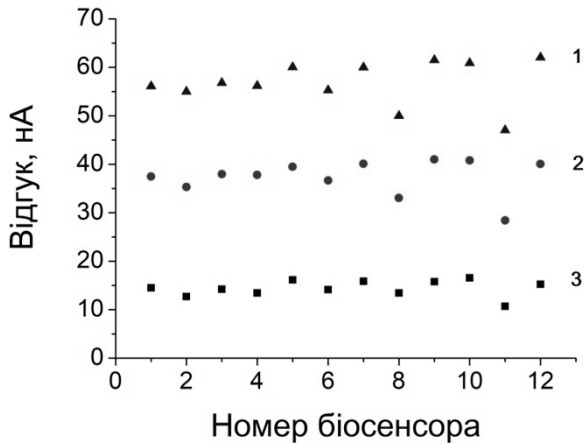


Рис. 7. Відгуки на додавання глутамату, отримані різними біосенсорами. Вимірювання проводили у 25 мМ НЕРЕС буфері, рН 7,4, за постійного потенціалу +0,6 В відносно Ag/AgCl електрода порівняння. Концентрації глутамату: 500 мкМ (1), 300 мкМ (2), 100 мкМ (3)

Можливість довготривалого використання біосенсора для проведення великої кількості вимірювань є дуже важливою характеристикою. Тому метою наступного етапу роботи була перевірка стабільності розробленого біосенсора. Для цього впродовж дня отримували 8-12 відгуків біосенсора на 50 мкМ глутамат. До наступного використання біосенсор зберігали в сухому вигляді за температури -18°C . Далі, через кілька діб, знову протягом кількох годин отримували відгуки біосенсора на ті самі концентрації глутамату. Як видно з рис. 8, відгуки залишались стабільними протягом всього періоду вимірювань.

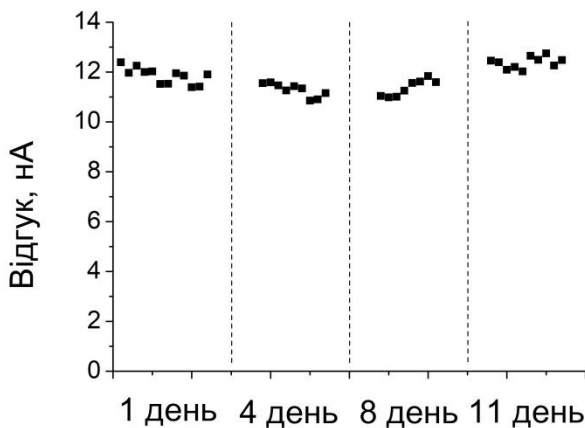


Рис. 8. Стабільність відгуків біосенсора впродовж декількох днів. Концентрація глутамату – 50 мкМ. Вимірювання проводили у 25 мМ НЕРЕС буфері, рН 7,4, за постійного потенціалу +0,6 В відносно Ag/AgCl електрода порівняння

Також було перевірено зміну величини відгуків на глутамат при зберіганні біосенсора в різних умовах протягом тривалого часу (рис. 9). Біосенсори зберігали у сухому вигляді та зануреними чутливими ділянками в буферний розчин при різних температурах: $+25^{\circ}\text{C}$, $+4^{\circ}\text{C}$ і -18°C (в останньому випадку – лише в сухому вигляді). Найгірше біосенсори зберігались за температури $+25^{\circ}\text{C}$ – вже через 2 тижні відгуки біосенсорів на глутамат були практично відсутніми. Значно кращі результати були отримані при зберіганні біосенсорів в сухому стані при $+4^{\circ}\text{C}$ – через 2 місяці зберігання їхні відгуки зменшились приблизно до 40% від початкових значень. Зберігання біосенсора в буферному розчині при $+4^{\circ}\text{C}$ виявилось

нестабільним, його чутливість до глутамату змінювалась через взаємодію біоселективної мембрани з компонентами розчину, тому результати не наведено на графіку. Найкращим виявилось зберігання за температури $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$ – падіння відгуків біосенсорів наприкінці зберігання становило не більше 30 %. Дані результати свідчать про можливість використання біосенсора після тривалого зберігання, але за умови його додаткового калібрування.

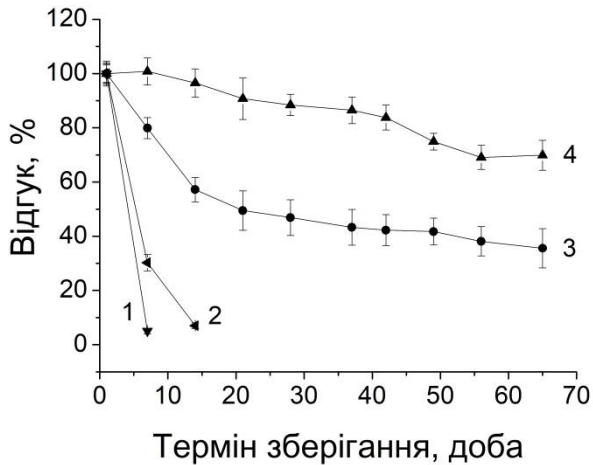


Рис. 9. Дослідження впливу наступних умов зберігання біосенсора на величину його сенсорного відгуку: $+25\text{ }^{\circ}\text{C}$ в сухому стані (1), $+25\text{ }^{\circ}\text{C}$ в буфері HEPES (2), $+4\text{ }^{\circ}\text{C}$ в сухому стані (3) та $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$ в сухому стані (4). Концентрація глутамату – 100 мкМ. Вимірювання проводили у 25 мМ HEPES буфері, рН 7,4, за постійного потенціалу $+0,6\text{ В}$ відносно Ag/AgCl електрода порівняння

Далі було перевірено вплив потенційних інтерферуючих речовин, чи токсичних речовин-інгібіторів які можуть бути присутні в реальних зразках, на роботу біосенсора. Виявилось, що сечовина, ЕДТА, глюкоза, лимонна кислота, бензойна кислота, азид натрію, α -кетоглутарат, NaCl, KCl та CaCl₂ не призводили до відгуків біосенсора при концентрації даних речовин у робочій комірці 1 мМ. Також була перевірена чутливість біосенсора до різних амінокислот, як можливих інтерферентів (рис. 10). Біосенсор не реагував на більшість з них. Невелика чутливість біосенсора спостерігалась до деяких з них, але чутливість до глутамату була більшою в 50-100 разів, тому присутність навіть високих концентрацій цих амінокислот у зразку не призведе до значної похибки у вимірюваннях.

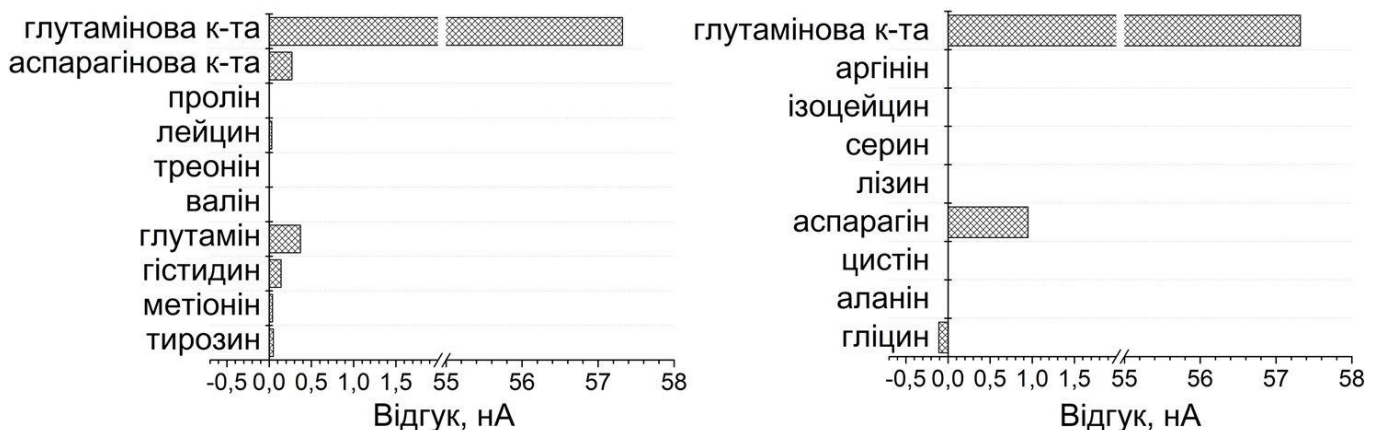


Рис. 10. Відгук біосенсора на додавання різних амінокислот. Концентрація всіх амінокислот – 1 мМ. Вимірювання проводили у 25 мМ HEPES буфері, рН 7,4, за постійного потенціалу $+0,6\text{ В}$ відносно Ag/AgCl електрода порівняння

Враховуючи досліджені оптимальні умови роботи глутаматного біосенсора були побудовані калібрувальні графіки для визначення глутамату. Калібрувальний графік біосенсора для визначення глутамату наведений на рис. 11. Лінійна ділянка даного калібрувального графіка описується рівнянням $I = 210 * C \pm 0,3$ ($R^2 = 0,999$), де I – сила струму після виходу відгуку на плато (steady-state response) (нА), C – концентрація глутамату (мМ). При використанні 25 мМ HEPES буферу, рН 7,4, мінімальна межа визначення глутамату становила 2 – 4 мкМ. Лінійний діапазон роботи біосенсора був від 5 мкМ до 700 мкМ, чутливість до глутамату становила 180 – 210 нА/мМ.

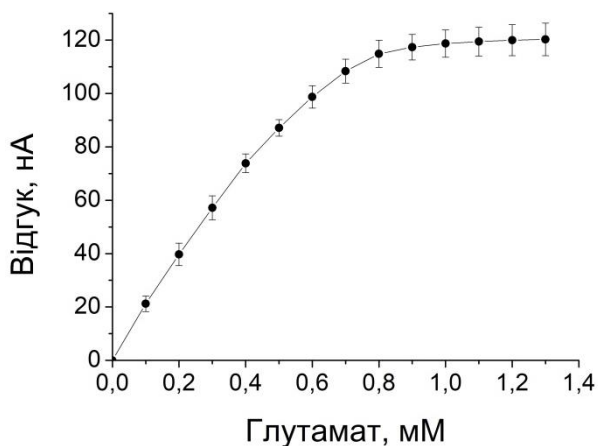


Рис. 11. Калібрувальний графік глутамат-чутливого біосенсора. Вимірювання проводили у 25 мМ HEPES буфері, рН 7,4, за постійного потенціалу +0,6 В відносно Ag/AgCl електрода порівняння

Розробка і використання методики біосенсорного визначення вмісту глутамату в зразках ізольованих нервових терміналей. Запропонований в даній роботі метод на основі глутамат-чутливого біосенсора є альтернативою в першу чергу використанню радіоізотопного методу з радіоактивно-міченим глутаматом. Для того, щоб коректно порівняти ці два методи, проводили паралельні дослідження акумуляції глутамату обома методами.

Було визначено початкову швидкість захоплення глутамату (за 1 хв) та рівень накопичення глутамату (за 10 хв) за допомогою біосенсора або радіоізотопним методом з використанням L-[^{14}C]глутамату. При розрахунках вихідний відгук біосенсора при додаванні аліквот супернатанту синапсом, отриманий одразу після ініціації захоплення шляхом додавання 10 мкМ глутамату, було прийнято за 100 %. При роботі з радіоактивно-міченим глутаматом радіоактивність в аліквотах супернатанту синапсом одразу після додавання суміші радіоактивно-міченого та звичайного глутамату було прийнято за 100 %. Рис. 12а показує залишкову концентрацію глутамату у супернатанті через 1 хв після ініціації захоплення додаванням суміші радіоактивно-міченого та звичайного глутамату. Відповідно, початкова швидкість захоплення глутамату синапсом становила 21 ± 5 % від вихідного значення при використанні біосенсора і розрахунків за калібрувальною кривою, 22 ± 5 % при використанні біосенсора і методу стандартних додавань та 25 ± 5 % при використанні радіоактивно-міченого глутамату. Рис. 12б показує зменшення концентрації глутамату у супернатанті через 10 хв після ініціації захоплення додаванням суміші радіоактивно-міченого та звичайного глутамату. Рівень накопичення глутамату синапсом за 10 хв становив 42 ± 4 % від

вихідної концентрації глутамату за даними біосенсора та калібрувальної кривої, 44 ± 4 % при використанні біосенсора і методу стандартних додавань і 47 ± 4 % при використанні радіоактивно-міченого глутамату.

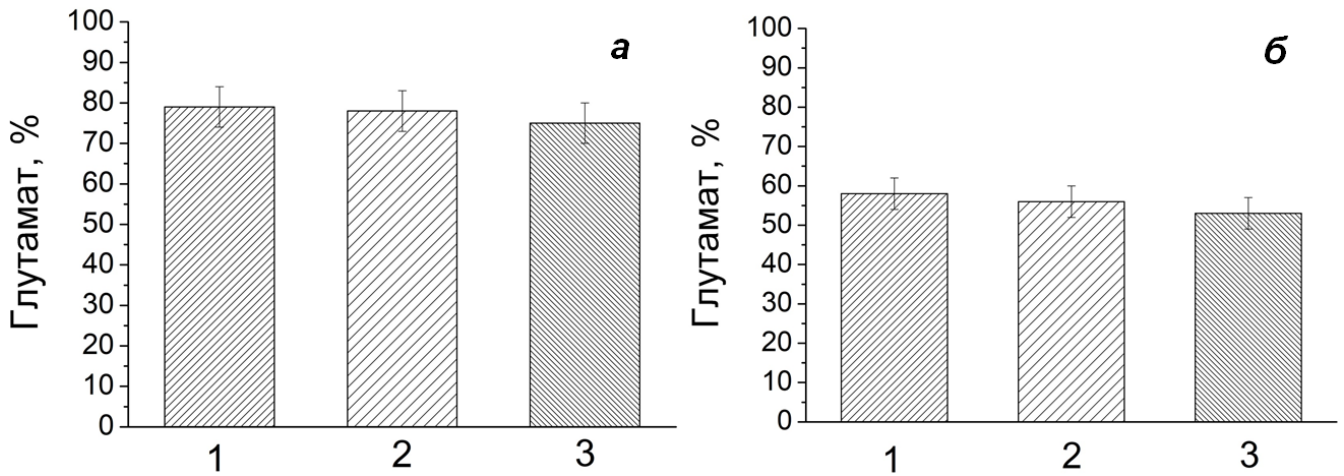


Рис. 12. Концентрація глутамату у супернатанті через 1 хв (а) і через 10 хв (б) після початку захоплення глутамату синапсосомами, виражена у % від початкової концентрації глутамату. Значення були отримані за допомогою глутамат-чутливого біосенсора і розрахунків за калібрувальним графіком (1), біосенсора і методу стандартних додавань (2) та радіоізотопного методу (3)

Таким чином, значення початкової швидкості захоплення глутамату і його накопичення за 10 хв нервовими терміналами, які були виміряні біосенсором та методом на основі радіоактивно-міченого глутамату були практично однаковими (різниця не перевищувала 10 %), що показує коректність запропонованого біосенсорного підходу та його конкурентну здатність.

Також, використовуючи розроблений біосенсор, досліджували вивільнення глутамату з нервових терміналей шляхом екзоцитозу, яке вираховувалось як різниця між вивільненням глутамату в присутності та за відсутності іонів кальцію в середовищі протягом 6 хв.

Як показано на рис. 13, вивільнення ендogenous глутамату з нервових терміналей шляхом екзоцитозу, виміряне біосенсором, становило $7,5 \pm 1,0$ мкМ. Показник вивільнення глутамату з нервових терміналей шляхом екзоцитозу, при їх стимуляції деполяризацією плазматичної мембрани, є дуже важливим фізіологічним параметром. Він відображає ефективність роботи системи екзоцитозного транспорту на пресинаптичному рівні.

Вивільнення глутамату білками-транспортерами (рис. 13) було стимульовано шляхом деполяризації плазматичної мембрани синапсом у середовищі без іонів кальцію і становило $8,0 \pm 1,8$ мкМ. Даний механізм є головним способом вивільнення глутамату в умовах нестачі енергії, гіпоксії, ішемії, і викликає збільшення позаклітинної концентрації глутамату, призводячи до нейротоксичності та загибелі клітин.

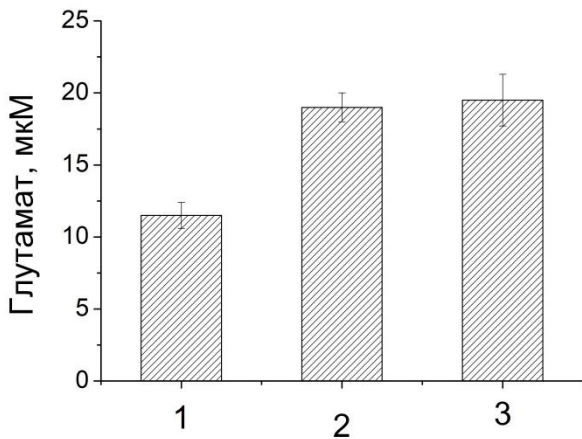


Рис. 13. Позаклітинна концентрація глутамату у зразках синапсосом, яка спостерігається без стимуляції синапсосом (1), концентрація глутамату після стимульованого вивільнення ендогенного глутамату із нервових терміналей шляхом екзоцитозу (2) та білками-транспортерами (3). Значення отримані глутамат-чутливим біосенсором із використанням методу стандартних додавань

Результати оцінки вивільнення глутамату зазвичай виражаються як відсоток від повної концентрації глутамату у зразку синапсосом. Для біосенсорної оцінки концентрації вивільненого глутамату із синапсосом, ми використали три підходи до руйнування нервових терміналей та мембранних компартментів всередині них, а саме: заморожування при $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ протягом 2,5 год, нагрівання при $+70\text{ }^{\circ}\text{C}$ протягом 1 год, та багаторазова ультразвукова обробка (22 кГц, 5 разів по 1 хв). Як показано на рис. 14, концентрація вільного глутамату у навколишньому буфері, виміряна біосенсором, становила $18,0 \pm 1,0$ мкМ після заморозки синапсосом; $25,5 \pm 2,0$ мкМ після нагрівання та $60,0 \pm 5,0$ мкМ після ультразвукової обробки. Таким чином найефективнішим методом руйнування мембран синапсосом є багаторазова ультразвукова обробка.

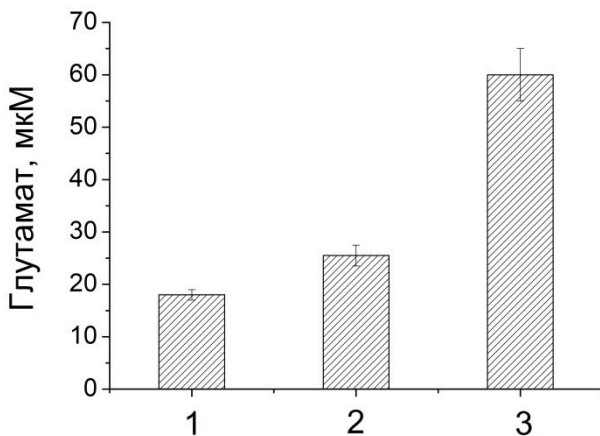


Рис. 14. Концентрація вільного глутамату у зразках синапсосом, які були зруйновані шляхом заморозки (1), нагрівання (2) та ультразвукової обробки (3). Значення отримані глутамат-чутливим біосенсором із використанням методу стандартних додавань

Вивільнення глутамату з синапсосом, отримане на основі біосенсорних вимірювань було перераховане у відсоток від повної концентрації глутамату в зразку синапсосом. При розрахунках ми використовували повну концентрацію глутамату, отриману при руйнуванні синапсосом ультразвуком. З'ясувалося, що шляхом екзоцитозу було вивільнено $12,5 \pm 1,3\%$ від повної концентрації глутамату, що у 1,8 разів більше, ніж було виміряно методом на основі радіоактивно-міченого глутамату ($7 \pm 1\%$). Вивільнення глутамату білками-транспортерами становило

13,0 ± 1,4 % від повної концентрації глутамату у синапсосомах, що співпадає з методом на основі радіоактивно-міченого глутамату (12,0 ± 1,5 %).

За допомогою спектрофлуориметричного методу на основі глутаматдегідрогеназної реакції було визначено концентрації глутамату у зразках синапсосом (рис. 15). Згідно з результатами, позаклітинна концентрація глутамату становила 15 ± 1 мкМ, а вивільнення глутамату з синапсосом у кальцій-вмісному середовищі становило 15,0 ± 0,9 мкМ. Концентрація глутамату у зразках синапсосом складала 30 ± 2 мкМ (при заморожуванні) та 60 ± 5 мкМ (при ультразвуковій обробці). Вимірювання проводили в аліквотах (50 мкл) надосадової рідини після осадження синапсосом (0,4 мг/мл білка), доданих до буферного розчину з реакційною сумішшю у кюветі об'ємом 1 мл.

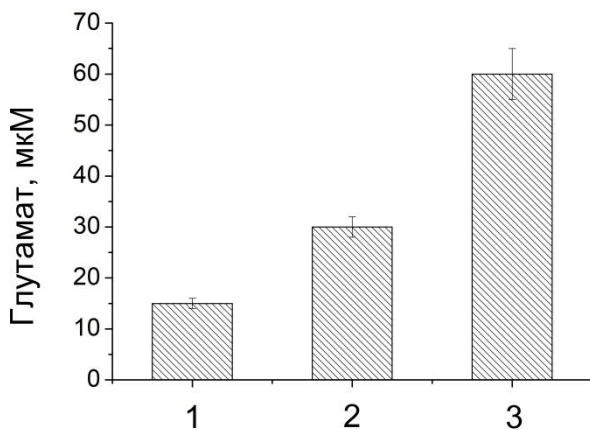


Рис. 15. Результати спектрофлуориметричного визначення концентрацій глутамату у зразках синапсосом: позаклітинний рівень глутамату до індукції його вивільнення (1), позаклітинний рівень глутамату через 6 хв після індукції його вивільнення (2), повний вміст глутамату у зразку (3) після ультразвукової обробки

Ще одним традиційним методом для контролю визначення концентрацій глутамату було використання амінокислотного аналізатора. Позаклітинна концентрація глутамату у зразках синапсосом становила 12,0 ± 1,0 мкМ, вивільнення глутамату в кальцій-вмісному середовищі (сумарне вивільнення шляхом екзоцитозу та білками-транспортерами) становило 14,0 ± 1,0 мкМ, а повна концентрація глутамату у зразку становила 63,0 ± 4,0 мкМ (рис. 16). Ці дані практично повністю співпадають з результатами біосенсорних вимірювань.

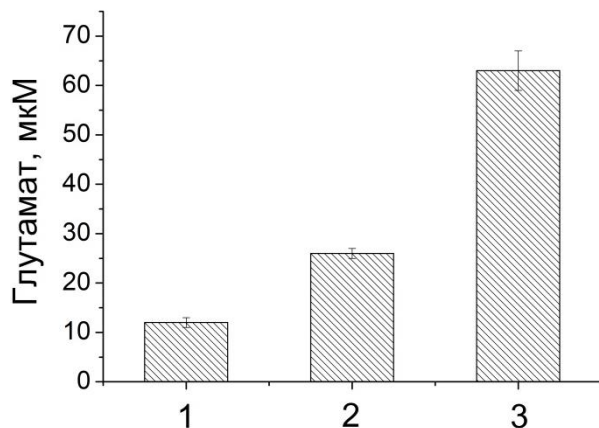


Рис. 16. Результати визначення концентрацій глутамату у зразках синапсосом за допомогою амінокислотного аналізатора: позаклітинний рівень глутамату до індукції його вивільнення (1), позаклітинний рівень глутамату через 6 хв після індукції його вивільнення (2), повна концентрація глутамату в зразку (3) після ультразвукової обробки

Узагальнені результати визначення концентрацій глутамату у зразках синаптосом, отриманих за допомогою різних методів, наведені в табл. 1.

Таблиця 1

**Порівняння результатів вимірювання глутамату,
отриманих за допомогою різних методів**

Вимірюваний параметр	Біосенсор	Радіоізотопний метод	Спектрофлуориметрія	Амінокислотний аналізатор
Базова позаклітинна концентрація глутамату, мкМ	$7,9 \pm 0,6$	Немає даних	$2,3 \pm 0,3$	$2,8 \pm 0,3$
Концентрація глутамату у супернатанті через 1 хв після початку захоплення, %	78 ± 5	75 ± 5	Немає даних	Немає даних
Концентрація глутамату у супернатанті через 10 хв після початку захоплення, %	56 ± 4	53 ± 4	Немає даних	Немає даних
Вивільнення глутамату шляхом екзоцитозу, % від повної концентрації глутамату	$12,5 \pm 1,3$	7 ± 1	Немає даних	Немає даних
Вивільнення глутамату білками-транспортерами, % від повної концентрації глутамату	$13,0 \pm 1,4$	$12,0 \pm 1,5$	Немає даних	Немає даних
Концентрація вільного глутамату у зразках після ультразвукової обробки, мкМ	$50,0 \pm 5,0$	Немає даних	60 ± 5	$63,0 \pm 4,0$

Використання глутамат-чутливого біосенсора для визначення концентрацій глутамату в продуктах харчування. Після дослідження основних аналітичних характеристик біосенсора було проведено визначення концентрацій глутамату в соусах і приправах, які було куплено у супермаркетах м. Києва.

Соєві соуси перед вимірюванням глутамату розводили дистильованою водою в 10 разів для зменшення концентрації глутамату. Далі в вимірювальну комірку біосенсора добавляли аліквоти цього розчину. Приправи розчиняли в гарячій дистильованій воді, масова доля приправи у розчині становила 1%. Після охолодження, розчини приправ проціджували через фільтрувальний папір для очищення від залишків сушених овочів та інших нерозчинних компонентів.

Для контролю було використано спектрофотометричний метод визначення глутамату. Результати, отримані біосенсором, та контрольним методом, наведені в табл. 2 та табл. 3.

Таблиця 2

Концентрації глутамату в соусах, визначені за допомогою біосенсора та спектрофотометричного методу визначення

Вимірювані зразки	Біосенсор, масова доля (%)		Спектрофотометрія, масова доля (%)	
	Калібрувальний графік	Стандартні додавання	Калібрувальний графік	Стандартні додавання
Соєвий соус № 1	0,49 ± 0,03	0,52 ± 0,01	0,54 ± 0,04	0,68 ± 0,04
Соєвий соус № 2	0,36 ± 0,01	0,45 ± 0,01	0,39 ± 0,02	0,46 ± 0,02
Соєвий соус № 3	1,08 ± 0,05	1,23 ± 0,05	1,41 ± 0,09	1,57 ± 0,08
Соєвий соус № 4	1,74 ± 0,06	2,11 ± 0,11	2,32 ± 0,19	2,45 ± 0,21
Соєвий соус № 5	1,17 ± 0,06	1,27 ± 0,09	1,14 ± 0,07	1,13 ± 0,08
Соєвий соус № 6	1,92 ± 0,08	2,45 ± 0,21	2,39 ± 0,15	2,22 ± 0,19

Метод стандартних додавань зазвичай є більш точним, оскільки він враховує вплив компонентів реального зразку на чутливість біосенсора до глутамату, але для його використання зазвичай необхідно проводити попереднє вимірювання концентрації глутамату за калібрувальною кривою для того, щоб підібрати таке розведення зразку, при якому і відгук на зразок, і три послідовні відгуки на модельний розчин глутамату лежать в межах лінійного діапазону біосенсора.

Таблиця 3

Концентрації глутамату в приправах, визначені за допомогою біосенсора та спектрофотометричного методу визначення

Вимірювані зразки	Біосенсор, масова доля (%)		Спектрофотометрія, масова доля (%)	
	Калібрувальна крива	Стандартні додавання	Калібрувальна крива	Стандартні додавання
Приправа № 1	5,39 ± 0,31	5,64 ± 0,42	5,31 ± 0,41	6,65 ± 0,51
Приправа № 2	9,68 ± 0,82	9,73 ± 0,71	9,16 ± 0,83	10,18 ± 0,82
Приправа № 3	5,62 ± 0,37	5,56 ± 0,32	5,17 ± 0,34	6,33 ± 0,39
Приправа № 4	4,61 ± 0,33	4,57 ± 0,19	4,16 ± 0,22	4,74 ± 0,22

За отриманими результатами було побудовано кореляційний графік (рис. 17). Як видно, результати біосенсорного методу добре корелювали із спектрофотометричним методом вимірювання ($R^2 = 0,989$), окремі результати добре розподілені вздовж теоретичних прямих у всьому діапазоні концентрацій глутамату.

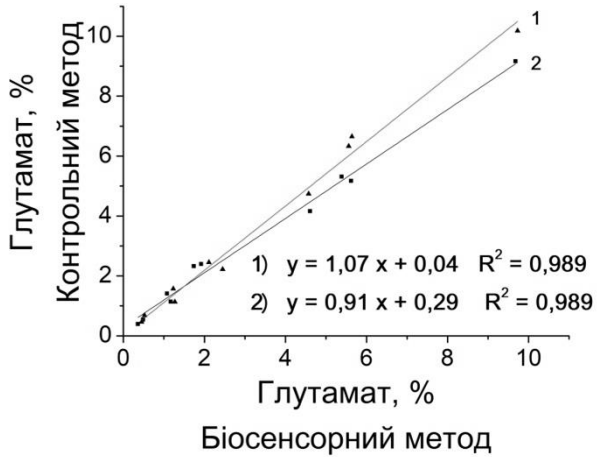


Рис. 17. Кореляція між концентраціями глутамату у зразках харчових продуктів, виміряними біосенсорним та спектрофотометричним методом з використанням: стандартних додавань (1), калібрувального графіка (2)

Для дослідження точності роботи біосенсора також було перевірено відтворюваність біосенсорного визначення глутамату в одному зразку (рис. 18). Сумарне розведення вихідного зразку було 500 разів. Відносне стандартне відхилення відгуків біосенсора становило 2,7 %, і падіння відгуків не відбувалось. Це свідчить про високу точність і стабільність роботи біосенсора з реальними зразками.

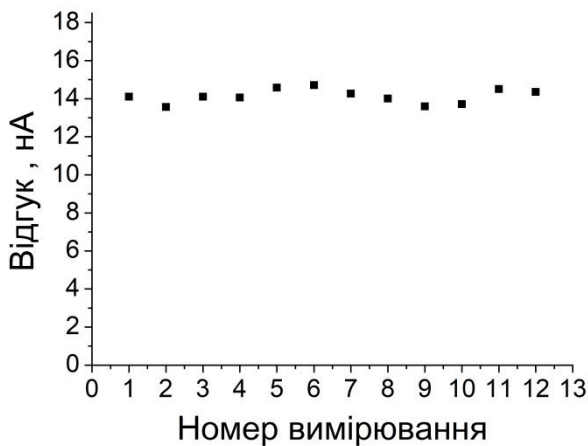


Рис. 18. Відтворюваність відгуку біосенсора при визначенні глутамату в одному із зразків соусу. Вимірювання проводили у 25 мМ НЕРЕС буфері, рН 7,4, за постійного потенціалу +0,6 В відносно Ag/AgCl електрода порівняння

Кожен біосенсор має певний лінійний діапазон вимірювання і щоб правильно визначити концентрацію аналіту в реальному зразку, потрібно, щоб його концентрація в робочій комірці потрапляла в лінійний діапазон вимірювання. У випадку визначення глутамату в харчових зразках в більшості випадків необхідно робити значне розведення через високу концентрацію глутамату в зразках. Було вирішено перевірити, чи впливає величина розведення зразку на визначення кінцевої концентрації глутамату в соусі. Для цього додавали різні об'єми соусу в робочу комірку і визначали концентрацію у вихідному зразку. Результати дослідження наведено у табл. 4. Як можна бачити, відгуки біосенсора лінійно залежать від об'єму зразку, і, відповідно, концентрації глутамату у вихідному соусі,

визначені при різних розведеннях, практично однакові. Це свідчить про можливість використання різних розведень зразків. Головною умовою точних вимірювань є потрапляння концентрації глутамату в межі лінійного діапазону роботи біосенсора.

Таблиця 4

Дослідження визначення концентрації глутамату за допомогою біосенсора при різних розведеннях соуса

Розведення зразку, рази	Об'єм зразку, доданий до роботи комірки, мкл	Відгук біосенсора, нА	Концентрація глутамату в соусі, мМ
2917	1,2	8,6 ± 0,5	166,1 ± 10,9
1522	2,3	15,2 ± 0,9	167,4 ± 10,7
1000	3,5	23,6 ± 1,5	168,7 ± 6,9
700	5	29,1 ± 1,8	165,1 ± 2,4

ВИСНОВКИ

Розроблено амперометричний глутамат-чутливий біосенсор на основі іммобілізованої глутаматоксидази та платинового дискового електроду, створено його лабораторний прототип, оптимізовано роботу та досліджено робочі характеристики. Визначено вміст глутамату в зразках синаптосом та харчових продуктах за допомогою розробленого біосенсора.

- 1) Оптимізовано процес створення біоселективного елемента на основі глутаматоксидази на поверхні фізичного перетворювача. Показано, що оптимальними умовами є: концентрація ферменту – 4 %, концентрація глутарового альдегіду – 0,4 % та тривалість іммобілізації – 30 хв. за кімнатної температури.
- 2) Створено лабораторний прототип амперометричного глутамат-чутливого біосенсора, оптимізовано умови його роботи та досліджено аналітичні характеристики, такі як чутливість аналізу (180-210 нА/мМ), відтворюваність відгуків (відносне середньоквадратичне відхилення відгуків на глутамат становило ≤ 5 %), висока селективність і стабільність відгуків на глутамат (операційна та при зберіганні біосенсора в різних умовах), відтворюваність приготування біосенсора.
- 3) Розроблено методичний підхід для аналізу концентрацій глутамату у зразках синаптосом. Визначення проводили в супернатанті до і після руйнування синаптосом різними методами.
- 4) Досліджено особливості транспорту глутамату в ізольованих нервових терміналях головного мозку щурів за допомогою розробленого біосенсора.

Визначено швидкість поглинання глутамату синапсосомами та рівень його накопичення в синапсосомах, а також тонічне та стимульоване вивільнення глутамату з синапсосом за допомогою розробленого біосенсора та порівняно з традиційними методами аналізу. Розбіжність між результатами різних методів в більшості випадків не перевищувала 10%.

- 5) За допомогою розробленого біосенсора проведено визначення концентрацій глутамату у соусах і приправах та порівняно з результатами спектрофотометричного методу. Коефіцієнт кореляції (R^2) склав 0,989.

ПЕРЕЛІК НАУКОВИХ ПРАЦЬ, ОПУБЛІКОВАНИХ ЗА ТЕМОЮ ДИСЕРТАЦІЇ

1. **Кучеренко Д. Ю.**, Кучеренко І. С., Солдаткін О. О., Борисова Т. А., Дзядевич С. В., Солдаткін О. П. Розробка амперометричного біосенсора для визначення глутамату. *Sens. Electron. Microsyst. Technol.* 2015. Т. 12, № 1. С. 79–88. (Особистий внесок здобувача – аналіз літературних джерел, експериментальні дослідження, аналіз результатів, підготовка роботи до публікації).

2. Soldatkin O., Nazarova A., Krisanova N., Borysov A., **Kucherenko D.**, Kucherenko I., Pozdnyakova N., Soldatkin A., Borisova T. Monitoring of the velocity of high-affinity glutamate uptake by isolated brain nerve terminals using amperometric glutamate biosensor. *Talanta.* 2015. Vol. 135. P. 67–74. (Особистий внесок здобувача – розробка процедури і проведення експериментів з визначення концентрацій глутамату у зразках синапсосом за допомогою біосенсора, аналіз і узагальнення результатів).

3. **Кучеренко Д. Ю.**, Кучеренко І. С., Седюко Д. В., Книжникова Д. В., Солдаткін О. О., Борисов А. А., Назарова А. Г., Крисанова Н. В., Борисова Т. О., Солдаткін О. П. Оптимізація амперометричного біосенсора для оцінки швидкості накопичення глутамату ізольованими нервовими терміналами мозку. *Sens. Electron. Microsyst. Technol.* 2016. Т. 13, № 1. С. 98–113. (Особистий внесок здобувача – аналіз літературних джерел, дослідження характеристик і оптимізація роботи біосенсора, аналіз результатів, підготовка роботи до публікації).

4. Borisova T., **Kucherenko D.**, Soldatkin O., Kucherenko I., Pastukhov A., Nazarova A., Galkin M., Borysov A., Krisanova N., Soldatkin A., El'skaya A. An amperometric glutamate biosensor for monitoring glutamate release from brain nerve terminals and in blood plasma. *Analytica Chimica Acta.* 2018. Vol. 1022. P. 113–123. (Особистий внесок здобувача – аналіз літературних джерел, розробка методики вимірювання і проведення експериментів з визначення концентрацій глутамату у зразках синапсосом за допомогою біосенсора, аналіз результатів, підготовка роботи до публікації).

5. **Kucherenko D. Y.**, Kucherenko I. S., Soldatkin O. O., Soldatkin A. P. Application of glutamate-sensitive biosensor for analysis of foodstuff. *Biotechnologia Acta.* 2018. Vol. 11, № 4. P. 57–67. (Особистий внесок здобувача – аналіз літературних джерел, розробка методики вимірювання і проведення експериментів з визначення концентрацій глутамату у зразках харчових продуктів за допомогою біосенсора, аналіз результатів, підготовка роботи до публікації).

6. **Кучеренко Д. Ю.**, Солдаткін О. О., Солдаткін О. П. Біосенсор для визначення глутамату в продуктах харчування: тези 7-мої Міжнародної науково-

технічної конференції «Сенсорна електроніка та мікросистемні технології» (СЕМСТ-7) (Одеса, 30 травня – 3 червня 2016 р.). Одеса, 2016. С. 71. *(Особистий внесок здобувача – розробка методики вимірювання і проведення експериментів з визначення концентрацій глутамату у зразках харчових продуктів за допомогою біосенсора, аналіз результатів, написання тексту тез).*

7. **Кучеренко Д. Ю.**, Кучеренко І. С., Солдаткін О. О., Дзядевич С. В., Солдаткін О. П. Розробка біосенсорного методу визначення глутамату у біологічних зразках для дослідницьких та діагностичних цілей: тези конференції «Трансфер новітніх медичних та стоматологічних технологій в охорону здоров'я України» (Київ, 27 квітня 2017 р.). Київ, 2017. С. 189. *(Особистий внесок здобувача – дослідження характеристик і оптимізація роботи біосенсора, аналіз результатів, написання тексту тез).*

8. Kucherenko I., Soldatkin O., **Kucherenko D.**, Nazarova A., Krisanova N., Borisova T., Soldatkin A. Development of a method for studying of the glutamate transport in isolated nerve terminals using an electrochemical biosensor: 42nd FEBS Congress “From molecules to cells and back” (Jerusalem, 10 – 14 September 2017). Jerusalem, Israel, 2017. P. 248. *(Особистий внесок здобувача – розробка методики вимірювання і проведення експериментів з визначення концентрацій глутамату у зразках синапсом за допомогою біосенсора, аналіз результатів).*

9. Kucherenko I., **Kucherenko D.**, Soldatkin O., Soldatkin A. Development and application of an electrochemical biosensor for the determination of glutamate concentration in food products: third annual BTRP Ukraine regional one health research symposium (Kyiv, 16 – 20 April 2018). Kyiv, 2018. P. 290. *(Особистий внесок здобувача – розробка методики вимірювання і проведення експериментів з визначення концентрацій глутамату у зразках харчових продуктів за допомогою біосенсора, аналіз результатів).*

10. **Кучеренко Д. Ю.**, Кучеренко І. С., Солдаткін О. О., Борисова Т. О., Солдаткін О. П. Використання біосенсора для дослідження процесів транспорту глутамату у синапсах: тези 8-мої Міжнародної науково-технічної конференції «Сенсорна електроніка та мікросистемні технології» (СЕМСТ-8) (Одеса, 28 травня – 1 червня 2018 р.). Одеса, 2018. С. 123. *(Особистий внесок здобувача – проведення експериментів з визначення концентрацій глутамату у зразках синапсом за допомогою біосенсора, аналіз результатів, написання тексту тез).*

11. 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-мої Міжнародної науково-технічної конференції «Сенсорна електроніка та мікросистемні технології» (СЕМСТ-8) (Одеса, 28 травня – 1 червня 2018 р.). Одеса, 2018. С. 122. *(Особистий внесок здобувача – експериментальні дослідження з розробки біосенсорів для визначення глутамату та глюкози, аналіз результатів).*

12. Солдаткін О. О., **Кучеренко Д. Ю.**, Кучеренко І. С., Дзядевич С. В., Солдаткін О. П., Борисова Т. О., Борисов А. А., Крисанова Н. В., Касап Б. О., Кірдісілер С. К., Аката Курч Б. Амперометричний біосенсор на основі глутаматоксидази для визначення концентрації глутамату у розчині: патент України на винахід № 113557; заявл. 12.09.2016 ; опубл. 10.02.2017, Бюл. №3. 8 с. *(Особистий внесок здобувача – аналіз літературних джерел, дослідження аналітичних характеристик біосенсора).*

АНОТАЦІЯ

Кучеренко Д.Ю. Розробка та оптимізація глутамат-чутливого біосенсора для потреб медицини та контролю якості харчових продуктів. – Рукопис.

Дисертація на здобуття наукового ступеня кандидата біологічних наук за спеціальністю 03.00.20 – біотехнологія. – Інститут молекулярної біології і генетики НАН України, Київ, 2019.

Дисертаційна робота присвячена розробці амперометричного глутамат-чутливого біосенсора, створенню його лабораторного прототипу, а також його використанню для дослідження процесів транспорту глутамату в ізольованих нервових терміналях мозку щурів та для вимірювання вмісту глутамату в продуктах харчування.

Досліджено та оптимізовано аналітичні характеристики біосенсора. Вивчено вплив параметрів робочого буферу (рН, іонної сили, буферної ємності) та умов зберігання на функціонування біосенсора. Після розробки та оптимізації роботи біосенсора було розроблено методичний підхід для аналізу концентрацій глутамату у зразках синапсом головного мозку щурів. Було визначено швидкість захоплення та рівень накопичення глутамату за допомогою біосенсора та з використанням радіоактивно-міченого глутамату. Запропоновано метод аналізу ефективності вивільнення глутамату з синапсом на основі даного біосенсора і підтверджено результати за допомогою декількох стандартних методів.

Також за допомогою біосенсора було проведено вимірювання концентрацій глутамату в продуктах харчування, таких як соєві соуси та приправи. В якості контрольного методу було використано спектрофотометричний метод визначення глутамату. Коефіцієнт кореляції складав: $R^2 = 0,989$.

Ключові слова: глутамат, амперометричний біосенсор, глутаматоксидаза, *m*-фенілендіамін, активне накопичення глутамату, синапсоми, зразки харчових продуктів.

АННОТАЦИЯ

Кучеренко Д.Ю. Разработка и оптимизация глутамат-чувствительного биосенсора для нужд медицины и контроля качества пищевых продуктов. – Рукопись.

Диссертация на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.00.20 – биотехнология. – Институт молекулярной биологии и генетики НАН Украины, Киев, 2019.

Глутамат является основным возбуждающим нейротрансмиттером, который участвует в осуществлении большинства функций головного мозга, в частности распознавании, памяти, обучении и т.д. Нарушение процессов транспорта глутамата является характерной чертой патогенеза многих неврологических заболеваний. Контроль концентрации глутамата в биологических образцах необходим для профилактики и лечения невропатологий. Также в некотором количестве глутамат

содержится во многих продуктах питания. Присутствие в пище глутамата придает ей «мясного» вкуса, поэтому глутамат часто применяют в качестве усилителя вкуса, добавляя его ко многим продуктам питания. Поэтому возникает необходимость в методах точного и быстрого определения глутамата для нужд нейрофизиологии и невропатологии, фундаментальной и клинической медицины, фармацевтической и пищевой промышленности, а также в аналитической биохимии и биотехнологии.

Современные общепринятые методы определения глутамата, такие как газовая и жидкостная хроматографии, спектрофотометрия требуют наличия квалифицированного персонала и сложного и дорогостоящего оборудования. Еще одним недостатком приведенных методов анализа является необходимость в сложной предварительной подготовке проб.

Биосенсоры принадлежат к новым перспективным аналитическим приборам, которые имеют небольшой размер измерительной установки, не требуют предварительной обработки проб, просты в использовании, позволяют быстро измерять концентрацию вещества в растворе и имеют низкую себестоимость при массовом производстве. Поэтому они являются хорошей альтернативой стандартным методам анализа.

Поэтому данная диссертационная работа посвящена разработке глутамат-чувствительного биосенсора, созданию его лабораторного прототипа, а также его использованию для исследования процессов транспорта глутамата в изолированных нервных терминалях мозга крыс и для измерения содержания глутамата в продуктах питания.

В процессе выполнения работы были подобраны и оптимизированы условия иммобилизации фермента на поверхность электрода. Показано, что использование полифенилендиаминовой мембраны значительно улучшает селективность преобразователя.

Исследовано влияние параметров раствора на работу биосенсора. Лучшие отклики биосенсора на глутамат наблюдались в диапазоне рН 7 - 9. Кроме этого, было показано, что отклики на глутамат не меняются в зависимости от концентрации буфера и ионной силы.

Показано, что биосенсор характеризуется хорошей воспроизводимостью откликов и операционной стабильностью. Относительное стандартное отклонение откликов на глутамат в течение дня в среднем составило 5%. Также проверено воспроизводимость приготовления биосенсора. Относительное стандартное отклонение откликов различных биосенсоров на глутамат не превышало 12 %.

Проверено хранение биосенсора при различных условиях. Лучшие и наиболее прогнозируемые результаты хранения биосенсора наблюдались при температуре -18 °С, при которой падение откликов в конце эксперимента (65 суток) составило 30 %.

Было проверено работу биосенсора при наличии в рабочей ячейке следующих веществ, которые могут присутствовать в биологических и пищевых образцах: мочевины, ЭДТА, глюкозы, лимонной кислоты, бензойной кислоты, азида натрия, α -кетоглутарата, NaCl, KCl и CaCl₂. Данные вещества не приводили к откликам биосенсора при концентрации 1 мМ в рабочей ячейке. Также была проверена

чувствительность биосенсора к ряду аминокислот. Из результатов исследований видно, что данный биосенсор характеризуется высокой селективностью к глутамату и пригоден для измерения реальных образцов.

После разработки и оптимизации работы амперометрического глутамат-чувствительного биосенсора был разработан методический подход для анализа концентраций глутамата в образцах изолированных нервных терминалей (синапсом) головного мозга крыс. Было определено начальную скорость захвата и уровень накопления глутамата с помощью биосенсора и радиоактивно меченого глутамата.

Предложен метод анализа эффективности высвобождения глутамата из синапсом на основе глутамат-чувствительного биосенсора и подтверждены результаты с помощью нескольких стандартных методов.

Также с помощью биосенсора было проведено измерение концентраций глутамата в продуктах питания, таких как соевые соусы и приправы. В качестве контрольного метода был использован спектрофотометрический метод определения глутамата. Коэффициент корреляции составлял: $R^2 = 0,989$.

Ключевые слова: глутамат, амперометрический биосенсор, глутаматоксидаза, *m*-фенилендиамин, активное накопление глутамата, синапсомы, пищевые образцы.

SUMMARY

Kucherenko D.Yu. **Development and optimization of a glutamate-sensitive biosensor for the needs of medicine and food quality control. – Manuscript.**

Thesis for a Philosophy Doctor (PhD) degree in Biology, specialty 03.00.20 - biotechnology. – Institute of Molecular Biology and Genetics of National Academy of Sciences of Ukraine, Kyiv, 2019.

The dissertation is devoted to the development of amperometric glutamate-sensitive biosensor and to the creation of their laboratory prototype, as well as its use for the study of glutamate transport processes in isolated rat nerve terminals and for measuring glutamate content in food products.

The basic analytical characteristics of the biosensor have been investigated and optimized. The effect of parameters of the working buffer (pH, ionic strength, buffer capacity) and different storage conditions on the functioning of the biosensor has been studied. After developing and optimizing the biosensor's work, a methodological approach was developed for analyzing the concentrations of glutamate in samples of isolated nerve terminals of rat brain. The initial rate of capture and the level of glutamate accumulation were determined with the use of a biosensor and radio-labeled glutamate. A method for analyzing the efficiency of glutamate release from synaptosomes based on a glutamate-sensitive biosensor is proposed and results are confirmed using several standard methods.

Measurements of glutamate concentrations in food products, such as soy sauces and seasonings, were also carried out using the biosensor. A spectrophotometric method for

the glutamate determination was used as a control method. The correlation coefficient was: $R^2 = 0,989$.

Keywords: glutamate, amperometric biosensor, glutamate oxidase, *m*-phenylenediamine, active accumulation of glutamate, synaptosomes, food samples.