

**КИЇВСЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ  
ІМЕНІ ТАРАСА ШЕВЧЕНКА**

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

Кваліфікаційна наукова  
праця на правах рукопису

**КУЧЕРЕНКО ДАР'Я ЮРІЇВНА**

УДК 543.06 + 577.15 + 543.553

**ДИСЕРТАЦІЯ**

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

03.00.20 – біотехнологія

Подається на здобуття наукового ступеня кандидата біологічних наук

Дисертація містить результати власних досліджень. Використання ідей, результатів і текстів інших авторів мають посилання на відповідне джерело  
\_\_\_\_\_ Кучеренко Д.Ю.

Науковий керівник: Солдаткін Олексій Петрович, доктор біологічних наук,  
професор, академік НАН України

Київ – 2019

## АНОТАЦІЯ

**Кучеренко Д.Ю. Розробка та оптимізація глутамат-чутливого біосенсора для потреб медицини та контролю якості харчових продуктів.** - Кваліфікаційна наукова праця на правах рукопису.

Дисертація на здобуття наукового ступеня кандидата біологічних наук за спеціальністю 03.00.20 «Біотехнологія». – Київський національний університет імені Тараса Шевченка, Інститут молекулярної біології і генетики НАН України, Київ, 2019.

Розробка нових швидких, простих і дешевих методів визначення концентрацій речовин у водних зразках є актуальною проблемою сьогодення. Біосенсори належать до нових перспективних аналітичних приладів, які характеризуються невеликим розміром вимірювальної установки, не потребують попередньої обробки проб, прості у використанні, дозволяють швидко вимірювати концентрацію речовини в розчині, мають низьку собівартість при масовому виробництві – і все це із забезпеченням необхідного рівня чутливості та селективності.

Глутамат у центральній нервовій системі ссавців є основним збуджуючим нейротрансмітером, який бере участь у здійсненні більшості функцій головного мозку, зокрема розпізнаванні, пам'яті, навчанні тощо. Порушення транспорту глутамату є характерною рисою патогенезу багатьох неврологічних захворювань. Число пацієнтів з такими розладами постійно зростає і становить глобальну проблему сучасного суспільства. Постійний контроль концентрації глутамату в біологічних зразках є необхідним для профілактики та лікування нейропатологій. Також в невеликих кількостях глутамат міститься в багатьох продуктах харчування. Присутність в їжі глутамату надає їй «м'ясного» смаку, тому глутамат часто застосовують як підсилювача смаку, додаючи його до багатьох продуктів харчування. Через це виникає необхідність в методах точного та швидкого визначення глутамату для потреб нейрофізіології і нейропатології, фундаментальної та клінічної медицини, фармацевтичної та харчової промисловості, а також в аналітичній біохімії та біотехнології. Тому

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

В роботі показано, що використання поліфенілендіамінової (ПФД) мембрани значно покращує селективність перетворювача. Для її утворення триелектродну систему з чистим робочим електродом занурювали у 5 мМ розчин *m*-фенілендіаміну, після чого отримували 10-12 циклічних вольтамперограм. Для перевірки ефективності ПФД мембрани перевіряли відгуки біосенсора на такі електрохімічно активні інтерференти: аскорбінова кислота, дофамін, сечова кислота, парацетамол (N-ацетил-*p*-амінофенол) та цистеїн, що є досить поширеними в біологічних зразках.

Підібрано та оптимізовано умови формування біоселективної мембрани на поверхні амперометричного платиного дискового електроду. Проведено дослідження декількох методів іммобілізації, а саме: адсорбції ферменту на силікаліті, іммобілізації глутаматоксидази в БСА мембрані в насичених парах глутарового альдегіду та з використанням розчину глутарового альдегіду. За результатами досліджень для подальшої роботи було обрано метод іммобілізації ферменту з використанням розчину глутарового альдегіду. Крім цього, було досліджено залежність роботи біосенсора від концентрації ферменту та глутарового альдегіду в біоселективній мембрані. Досліджували концентрації ферменту від 0,5 % до 6 %, а глутарового альдегіду від 0,2 % до 1 %. В результаті експериментів було обрано для роботи концентрацію ферменту 4 %, а глутарового альдегіду 0,4 %. Оптимальний час іммобілізації становив 30 хв.

Проведено дослідження впливу параметрів розчину на роботу біосенсора. Для перевірки впливу рН було використано «універсальний буфер» (що містив тріс-НСІ,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 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. Як показали результати,

найкращі відгуки біосенсора на глутамат спостерігались в діапазоні рН 7 – 9. Також було перевірено роботу біосенсора в залежності від іонної сили. Як джерело іонів було використано розчин NaCl для отримання концентрацій від 0 до 250 мМ. Значних змін відгуків біосенсора на додавання глутамату при різних концентраціях NaCl не спостерігалось. Крім цього, було показано, що відгуки на глутамат не змінюються в залежності від концентрації буферного розчину (вимірювання проводили в діапазоні від 5 до 200 мМ).

В роботі показано, що даний біосенсор характеризується гарною відтворюваністю відгуків та операційною стабільністю. Відносне середньоквадратичне відхилення відгуків на глутамат впродовж дня в середньому становило 5 %. Для перевірки операційної стабільності впродовж дня отримували 8-12 відгуків на зразки зі сталою концентрацією глутамата. До наступного використання біосенсор зберігали в сухому вигляді за температури +4°C. Через декілька днів, знову отримували відгуки біосенсора на ту ж концентрацію глутамату. Загальний термін дослідження операційної стабільності становив 11 діб.

Також було перевірено відтворюваність приготування біосенсора. Для цього готували декілька біосенсорів, після чого отримували відгуки на глутамат. Відносне стандартне відхилення відгуків дванадцяти біосенсорів на глутамат не перевищувало 12 %.

Перевірено відтворюваність відгуків на глутамат при зберіганні біосенсора в різних умовах. Найкращими умовами виявилось зберігання за температури -18 °C: падіння відгуків біосенсорів наприкінці зберігання (через 65 діб) становило не більше 30 %. Дані результати свідчать про можливість використання біосенсора після тривалого зберігання, звичайно, за умови його додаткового калібрування.

Оскільки, крім глутамату в досліджуваних зразках можуть бути присутні багато інших речовин, які теоретично можуть призвести до хибного позитивного відгуку біосенсора, тому було перевірено роботу біосенсора при наявності в робочій комірці речовин: сечовини, ЕДТА, глюкози, лимонної

кислоти, бензойної кислоти, азиду натрію,  $\alpha$ -кетоглутарату, NaCl, KCl та CaCl<sub>2</sub>. Ці речовини часто присутні у значних кількостях в біологічних зразках та харчових продуктах (зокрема, як консерванти та сполуки для корегування pH). Дані речовини не призводили до відгуків біосенсора у робочій комірці. Також була перевірена чутливість біосенсора до низки амінокислот. Невелика чутливість біосенсора спостерігалась лише до аспарагіну, аспарагінової кислоти, глутаміну та гістидину, але чутливість до глутамату була більшою в 50-100 разів. З результатів досліджень видно, що даний біосенсор характеризується високою селективністю до глутамату і є придатним для вимірювання зразків біологічних рідин та харчових продуктів.

Після розробки та оптимізації роботи амперометричного глутамат-чутливого біосенсора було розроблено методичний підхід для аналізу концентрацій глутамату у зразках ізольованих нервових терміналей (синапсом) головного мозку щурів. Було показано наявність базового сигналу у препараті за відсутності екзогенного глутамату, що свідчить про наявність ендogenous глутамату в зразках. В наших експериментах базовий позаклітинний рівень концентрації глутамату складав  $7,9 \pm 0,6$  мкМ. Було визначено початкову швидкість накопичення глутамату (за 1 хв) та рівень накопичення глутамату (за 10 хв) двома методами за допомогою біосенсора та радіоізотопного аналізу з використанням радіоактивно-міченого глутамату.

Запропоновано метод аналізу ефективності тонічного та стимульованого вивільнення глутамату з ізольованих нервових терміналей на основі глутамат-чутливого біосенсора і підтверджено отримані результати за допомогою декількох стандартних методів, а саме: спектрофлуориметричного методу на основі ГлДГ, радіоізотопного методу з використанням радіоактивно-міченого [<sup>14</sup>C]-глутамату та методу дослідження з використанням амінокислотного аналізатора.

Також за допомогою біосенсора було проведено вимірювання концентрацій глутамату в продуктах харчування, таких як соєві соуси та приправи. Для контролю отриманих результатів було використано традиційний

спектрофотометричний метод визначення глутамату. Після проведення досліджень було побудовано кореляційний графік та показано, що результати біосенсора добре корелювали із спектрофотометричним методом визначення ( $R^2 = 0,989$ ). Результати досліджень показали, що масова доля глутамату, яка містилась в соусах, виявилась значно нижчою, ніж в приправах. Крім цього, показано, що відносне стандартне відхилення відгуків біосенсора на харчовий зразок становило 2,7 %, при цьому ступінь розведення зразків не впливала на точність визначення концентрації глутамату.

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

#### **Список публікацій здобувача:**

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 синапсом 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 синапсом 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» (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 синапсосомах: 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., Кірдесілер 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).*

## 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. - Taras Shevchenko National University of Kyiv, Institute of Molecular Biology and Genetics of National Academy of Sciences of Ukraine, Kyiv, 2019.

At present, the development of new fast, simple and cheap methods of determination of the substance concentrations in water samples is an urgent challenge. Biosensors belong to novel promising analytical instruments, which are easy-to-use, low-cost in mass production, have miniature measuring unit, do not require sample pretreatment, and provide rapid analysis of the substrate in solution with sufficient level of sensitivity and selectivity.

Glutamate in the central nervous system of mammals is the main stimulant neurotransmitter involved in the implementation of most brain functions, in particular, recognition, memory, training, etc. Violation of glutamate transport is a trait of the pathogenesis of many neurological diseases. The number of patients with such disorders increases permanently and it is a global problem of modern society. Constant monitoring of the glutamate concentration in biological samples is necessary for the prevention and treatment of neuropathologies.

Glutamate in small quantities is found also in many foods. It imparts a "meat" flavour to foods, therefore is often used as an additive to amplify the taste. That is why, the accurate and rapid determination of glutamate is necessary in neurophysiology and neuropathology, fundamental and clinical medicine, pharmaceutical and food industries, in analytical biochemistry and biotechnology.

The presented thesis is devoted to the development of a glutamate-sensitive biosensor and its application in studying the glutamate transport processes in the isolated nerve terminals of rats and for measuring glutamate concentration in the food products. In the work, the conditions of the bioselective membrane formation on the surface of the amperometric platinum disk electrode were selected and optimized.

There were several immobilization methods under investigation, including the enzyme adsorption on silicalite, GluOx immobilization in the BSA membrane in saturated glutaraldehyde vapour and using a glutaraldehyde drop.

Taking into consideration the obtained results, the enzyme immobilization in a drop of glutaraldehyde was chosen for further work. Additionally, the dependence of the biosensor operation on the concentrations of enzyme and glutaraldehyde in the bioselective membrane was investigated. The concentrations of enzyme ranged from 0.5 % to 6 %, of glutaraldehyde - from 0.2 % to 1 %. As a result of experiments, the working concentrations were selected as follows: of the enzyme – 4 %, of glutaraldehyde - 0.4 %. The optimal time of immobilization was 30 min.

The polyphenylenediamine (PPD) membrane was shown to improve significantly the transducer selectivity. For its formation, the three-electrode system with a bare working electrode was submerged in the 5 mM solution of m-phenylenediamine; afterwards 10-12 cyclic voltamperograms were received. To test the effectiveness of PPD membranes, the biosensor responses to the electrochemically active interferents, commonly present in biological samples, were measured. The interferents in experiments were: ascorbic acid, dopamine, uric acid, paracetamol (N-acetyl-p-aminophenol) and cysteine.

An influence of the solution parameters on the biosensor work was studied. To establish an effect of pH, the "universal buffer" containing Tris-HCl,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , citric acid and sodium tetraborate in the concentrations of 10 mM, was used. Its buffer capacity is the same in a wide range of pH values. In the experiments, pH amounted from 5 to 10. The best responses of the biosensor to glutamate were observed in the pH range of 7-8.5. The effect of ionic strength was also under investigation. The NaCl solution in concentrations from 0 to 250 mM was used as a source of ions. No significant changes in the biosensor responses to glutamate were observed at different NaCl concentrations. Additionally, it was shown that the responses to glutamate do not change depending on the buffer concentration (the measurements were carried out in the range from 5 mM to 200 mM).

It was shown that the biosensor is characterized by good responses reproducibility and operational stability. The relative standard deviation of responses to glutamate over the working day averaged 5%. To check the operational stability, 8-12 responses to glutamate were measured during the day. Before the subsequent use, the biosensor was kept dry at + 4 °C. A few days later, the biosensor responses were again measured at the same glutamate concentration. The experiments on the biosensor operational stability lasted totally 11 days.

The reproducibility of biosensor preparation was also checked. Several different biosensors were prepared; their responses to glutamate were measured. The relative standard deviation of the responses of different newly prepared biosensors did not exceed 12%.

The biosensor storage under different conditions was evaluated. The best appeared to be the storage at -18 °C; a decrease in the response by the end of a storage period (65 days) did not exceed 30%. This indicates the possibility of using the biosensor after prolonged storage at the assumption of its additional calibration.

In real samples, alongside glutamate other substances can be present, which theoretically can be a reason of a false response. Therefore, the biosensor was tested in the presence of the following substances in the working cell: urea, EDTA, glucose, citric acid, benzoic acid, sodium azide,  $\alpha$ -ketoglutarate, NaCl, KCl and CaCl<sub>2</sub>. No changes in the biosensor response were revealed when these substances were present in the cell in concentration of 1 mM.

The biosensor sensitivity to a number of amino acids has been also tested. A low sensitivity to asparagine, aspartic acid, glutamine and histidine was observed, but the sensitivity to glutamate was 50-100 times higher. The results of the research show that this biosensor is characterized by high selectivity to glutamate and thus is suitable for measurements in real samples.

The methodological approach was elaborated for the analysis of glutamate concentration in the samples of isolated nerve terminals (synaptosomes) of the brain of rats. It was shown the presence of a base signal in the samples in the absence of exogenous glutamate, which indicates the presence of endogenous glutamate in the

samples. In our experiments, the base level of glutamate was  $7.9 \pm 0.6 \mu\text{M}$ . The initial rate of glutamate accumulation (during 1 min) and the level of glutamate accumulation (during 10 min) were determined using both the biosensor and radioisotope technique with radiolabeled glutamate.

The method of analysis of the efficiency of tonic and stimulated release of glutamate from isolated nerve terminals based on using the glutamate-sensitive biosensor was proposed; the obtained results were verified by a number of standard methods, including radioisotope technique using radiolabeled [ $^{14}\text{C}$ ]-glutamate, spectrofluorimetric method based on glutamate hydrogen degradation, and a method using an amino acid analyzer.

The glutamate concentrations in food products, such as soy sauces and seasonings, were also measured using a biosensor. As a control, the spectrophotometric method was used. The correlation graph proved good correspondence of the results obtained by both methods ( $R^2 = 0.989$ ). The mass fraction of glutamate in sauces was shown to be significantly lower than that in seasonings. Additionally, it was shown that the relative standard deviation of the biosensor response to the food sample was 2.7%, and the degree of samples dilution did not affect the accuracy of the determination of glutamate concentration.

*Key words:* glutamate, amperometric biosensor, glutamate oxidase, m-phenylenediamine, active glutamate accumulation, synaptosomes, glutamate transporter, food samples.

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

1. **Kucherenko D. Yu.**, Kucherenko I. S., Soldatkin O. O., Borisova T. A., Dzyadevych S. V., Soldatkin A. P. Development of amperometric biosensor for glutamate determination. *Sens. Electron. Microsyst. Technol.* 2015. Vol. 12, № 1. P. 79–88.
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.
3. **Kucherenko D. Yu.**, Kucherenko I. S., Siediuko D. V., Knyzhnykova D. V., Soldatkin O. O., Borysov A. A., Nazarova A. G., Krisanova N. V., Borisova T. O., Soldatkin A. P. Optimization of amperometric biosensor for evaluation of rate of glutamate uptake by isolated brain nerve terminals. *Sens. Electron. Microsyst. Technol.* 2016. Vol. 13, № 1. P. 98–113.
  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.
  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.
  6. **Kucherenko D. Yu.**, Soldatkin O. O., Soldatkin A. P. “Biosensor for the determination of glutamate in foodstuff: abstracts of the 7-th International research and practice conference “Sensor Electronics and Microsystem Technologies” (SEMST-7). Odessa, 2016. P. 71.
  7. **Kucherenko D. Yu.**, Kucherenko I. S., Soldatkin O. O., Dzyadevych S. V., Soldatkin A. P. Development of biosensor method for the determination of glutamate in biological samples for research and diagnostic purposes: abstracts of the conference “Transfer of the latest medical and dental technologies into Ukrainian health care”. Kyiv, 2017. P. 189.
  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, 2017. P. 248.

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, 2018. P. 290.
10. **Kucherenko D. Yu.**, Kucherenko I. S., Soldatkin O. O., Borisova T. A., Soldatkin A. P. Use of a biosensor to study the processes of transport of glutamate in synaptosomes: abstracts of the 8-th International research and practice conference “Sensor Electronics and Microsystem Technologies” (SEMST-8). Odessa, 2018. P. 123.
11. Kucherenko I. S., **Kucherenko D. Yu.**, Topolnikova Ya. V., Knyzhnykova D. V., Soldatkin O. O., Dzyadevych S. V., Soldatkin A. P. Biosensor array for simultaneous determination of glutamate, glucose, choline, acetylcholine, lactate and pyruvate in aqueous specimens: abstracts of the 8-th International research and practice conference “Sensor Electronics and Microsystem Technologies” (SEMST-8). Odessa, 2018. P. 122.
12. Soldatkin O. O., **Kucherenko D. Yu.**, Kucherenko I. S., Dzyadevych S. V., Soldatkin A. P., Borisova T. A., Borysov A. A., Krisanova N. V., Kasap B. O., Kirdeciler S. K., Akata Kurc B. Amperometric biosensor based on glutamate oxidase for the determination of glutamate concentration in solution. Ukrainian patent for invention № 113557 (2017).

## ЗМІСТ

<b>ПЕРЕЛІК УМОВНИХ СКОРОЧЕНЬ</b> .....	19
<b>ВСТУП</b> .....	20
<b>РОЗДІЛ 1. ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ</b> .....	27
<b>1.1. Роль глутамату в живому організмі</b> .....	27
<b>1.2. Роль глутамату як харчової добавки</b> .....	33
<b>1.3. Класичні методи визначення вмісту глутамату</b> .....	38
<b>1.4. Біосенсори для визначення вмісту глутамату</b> .....	41
<b>1.5. Висновки</b> .....	48
<b>РОЗДІЛ 2. МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ</b> .....	50
<b>2.1. Матеріали</b> .....	50
<b>2.2. Конструкція амперометричних перетворювачів</b> .....	52
<b>2.3. Методика модифікації поверхні електрода за допомогою поліфенілендіаміну</b> .....	53
<b>2.4. Формування біоселективних елементів</b> .....	53
<b>2.5. Методика амперометричних вимірювань</b> .....	55
<b>2.6. Методика біосенсорного визначення глутамату у зразках біологічних рідин та харчових продуктів</b> .....	57
<b>2.7. Методика спектрофотометричного визначення глутамату у зразках харчових продуктів з використанням ГЛОД</b> .....	59
<b>2.8. Методика виділення синапсом з мозку щурів</b> .....	60
<b>2.9. Визначення накопичення радіоактивно-міченого L-[<sup>14</sup>C]глутамату синаптосомами</b> .....	61
<b>2.10. Визначення вивільнення радіоактивно-міченого L-[<sup>14</sup>C]глутамату синаптосомами</b> .....	62
<b>2.11. Визначення концентрації глутамату спектрофлуориметричним методом з використанням ГлДГ</b> .....	62



2.12. Визначення концентрації глутамату за допомогою амінокислотного аналізатора .....	63
2.13. Статистичний аналіз даних .....	63
<b>РОЗДІЛ 3. РОЗРОБКА АМПЕРОМЕТРИЧНОГО ГЛУТАМАТ-ЧУТЛИВОГО БІОСЕНСОРА.....</b>	<b>64</b>
3.1. Принцип роботи біосенсора .....	64
3.2. Покращення селективності амперометричного перетворювача за допомогою ПФД мембрани .....	64
3.3. Підбір умов формування біоселективного елемента .....	67
3.4. Вплив рН буферу на роботу біосенсора .....	72
3.5. Вплив іонної сили буферу на роботу біосенсора .....	73
3.6. Вплив буферної ємності на роботу біосенсора.....	75
3.7. Дослідження аналітичних характеристик біосенсора .....	76
3.7.1. Відтворюваність відгуків біосенсора при визначенні глутамату... ..	77
3.7.2. Відтворюваність приготування біосенсора... ..	79
3.7.3. Операційна стабільність біосенсора.....	81
3.7.4. Стабільність біосенсора при зберіганні. ....	82
3.7.5. Селективність біосенсора.. ..	84
3.8. Підсумки.....	85
<b>РОЗДІЛ 4. РОЗРОБКА І ВИКОРИСТАННЯ МЕТОДИКИ БІОСЕНСОРНОГО ВИЗНАЧЕННЯ ВМІСТУ ГЛУТАМАТУ В ЗРАЗКАХ ІЗОЛЬОВАНИХ НЕРВОВИХ ТЕРМІНАЛЕЙ.....</b>	<b>89</b>
4.1. Дослідження накопичення глутамату синаптосомами .....	89
4.1.1. Аналіз швидкості захоплення та рівня накопичення глутамату в синаптосомах. ....	89
4.1.2. Вимірювання базового позаклітинного рівня концентрації глутамату у зразках синаптосом за допомогою біосенсора.....	91
4.1.3. Аналіз швидкості початкового захоплення та рівня накопичення глутамату синаптосомами за допомогою біосенсора.....	92
4.2. Дослідження вивільнення глутамату синаптосомами .....	94

4.2.1. Моніторинг вивільнення ендogenousного глутамату з нервових терміналей за допомогою глутамат-чутливого біосенсора. ....	94
4.2.2. Підтвердження результатів біосенсора із використанням методу, на основі радіоактивно-міченого глутамату. ....	97
4.2.3. Порівняння результатів дослідження вивільнення глутамату при біосенсорних вимірюваннях та при використанні радіоактивно-міченого глутамату.....	97
4.2.4. Підтвердження результатів біосенсора за допомогою спектрофлуориметричного методу визначення повної концентрації глутамату у зразках синапсом. ....	99
4.2.5. Підтвердження результатів біосенсорних вимірювань концентрації глутамату за допомогою амінокислотного аналізатора. ....	100
<b>4.3. Підсумки.....</b>	<b>102</b>
<b>РОЗДІЛ 5. ВИКОРИСТАННЯ ГЛУТАМАТ-ЧУТЛИВОГО БІОСЕНСОРА ДЛЯ ВИЗНАЧЕННЯ КОНЦЕНТРАЦІЙ ГЛУТАМАТУ В ПРОДУКТАХ ХАРЧУВАННЯ .....</b>	<b>105</b>
5.1. Визначення концентрацій глутамату в соусах та приправах за допомогою біосенсора та контрольного методу.....	105
5.2. Відтворюваність визначення глутамату в харчовому зразку.....	109
5.3. Перевірка можливості коректного визначення кінцевої концентрації глутамату при різних розведеннях зразків харчових продуктів.....	110
5.4. Підсумки.....	112
<b>РОЗДІЛ 6. АНАЛІЗ ТА УЗАГАЛЬНЕННЯ РЕЗУЛЬТАТІВ ДОСЛІДЖЕНЬ.....</b>	<b>113</b>
<b>ВИСНОВКИ.....</b>	<b>125</b>
<b>СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ.....</b>	<b>127</b>
<b>ДОДАТОК А .....</b>	<b>144</b>

**ПЕРЕЛІК УМОВНИХ СКОРОЧЕНЬ**

БСА – бичачий сироватковий альбумін

ГА – глутаровий альдегід

ГлДГ – глутаматдегідрогеназа

ГлОД – глутаматоксидаза

ДТТ – дитіотреїтол

ЕДТА – динатрієва сіль етилендіамінтетраоцтової кислоти

ЕМГК – натрієва сіль 3-(N-етил-3-метиланіліно)-2-гідроксипропансульфонової кислоти

НАД<sup>+</sup> – нікотинамідаденіндинуклеотид (окиснений)

НАДН – нікотинамідаденіндинуклеотид (відновлений)

ПФД – поліфенілендіамін

ЦВА – циклічна вольтамперограма

ЦНС – центральна нервова система

NEPES – 4-(2-гідроксиетил)піперазин-1-етансульфонова кислота

## ВСТУП

**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 належить 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 організму може впливати на розвиток інфарктів, інсультів та різні нейропатологічні стани (порушення транспорту глутамату є характерною рисою патогенезу майже всіх неврологічних захворювань) [1, 2]. 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 нейрологічні порушення внаслідок надмірної стимуляції рецепторів, і навіть зумовлює загибель нейронів [3]. 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  $\text{Na}^+$ -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  $\text{Na}^+$ -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 [4, 5].

В невеликих кількостях глутамат міститься в багатьох продуктах харчування [6]. Глутамат часто застосовують як підсилювач смаку, додаючи його 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 [7].

Сучасні загальноприйняті методи визначення концентрації глутамату, такі як газова та рідинна хроматографії, спектрофотометрія, різноманітні хімічні та фізичні методи, потребують наявності кваліфікованого персоналу та складного і коштовного обладнання [8, 9]. Ще одним недоліком наведених методів аналізу є необхідність у складній попередній підготовці проб, що призводить до великих затрат часу та коштів [10].

Тому сьогодні дуже актуальним є питання створення більш зручного, точного, швидкого, селективного та дешевого методу визначення вмісту глутамату в досліджуваних зразках. Способом вирішення указаних вище проблем є використання нових біоаналітичних приладів – біосенсорів. Біосенсори завдяки своїй селективності, відсутності необхідності в

пробопідготовці та високій швидкості аналізу доцільно використовувати 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 нанокмпозитних 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 пресинапса 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 вмісту глутамату в біологічних зразках і харчових продуктах.

Для досягнення вказаної мети були поставлені наступні завдання:

1. Дослідити умови формування біоселективного елементу на основі глутаматоксидази на поверхні фізичного перетворювача.
2. Розробити амперометричний глутамат-чутливий біосенсор на основі іммобілізованої глутаматоксидази, як біоселективного елементу, та дискового платинового електроду, як фізичного перетворювача. Створити лабораторний прототип глутамат-чутливого біосенсора, дослідити його аналітичні характеристики та оптимізувати умови функціонування.
3. Провести апробацію розробленого біосенсора при визначенні вмісту глутамату в біологічних зразках і розробити метод аналізу концентрацій глутамату в ізольованих нервових терміналях (синаптосомах).
4. Дослідити можливість вимірювання вмісту 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 зразках харчових продуктів та зразках синаптосом, що супроводжується утворенням пероксиду водню.

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

**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 використовували для визначення швидкості накопичення глутамату ізольованими нервовими терміналями.

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

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

Перевірено вміст глутамату в харчових продуктах, таких як соєві соуси та приправи, а також підтверджено отримані результати за допомогою спектрофотометричного методу.

**Практичне значення отриманих результатів.** Створено лабораторний прототип біосенсора на основі амперометричного дискового платиного перетворювача та іммобілізованої ГЛОД, призначеного для кількісного аналізу концентрацій глутамату в біологічних та зразках харчових продуктів.

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 методичний підхід для непрямого аналізу концентрації глутамату у зразках синапсом. Визначення проводили в супернатанті до і після руйнування синапсом різними методами. Досліджено процеси транспорту (накопичення та вивільнення) глутамату в ізольованих нервових терміналях головного мозку щурів за допомогою розробленого біосенсора. Даний методичний підхід може бути використаний 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. У процесі написання даної роботи 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 на наукових конференціях.

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 щирю подяку.

**Апробація матеріалів дисертації.** Результати досліджень були представлені на 7-мій 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-мій

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.

## РОЗДІЛ 1

### ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ

#### 1.1. Роль глутамату в живому організмі

Глутамат (іонізована форма глутамінової кислоти) є амінокислотою, радикал якої містить додаткову карбоксильну групу (рис. 1.1). Глутамат відіграє важливу роль в життєдіяльності організму людини і інших ссавців. Зокрема, глутамат виконує структурну роль в складі білків і займає важливе місце в азотистому обміні. Він є замінною амінокислотою і виступає донором аміногрупи для біосинтезу інших амінокислот, глутатіону, поліамінів, сечовини та інших сполук. В клітинах глутамат може перетворюватись на глутамін, який, в свою чергу, використовується для синтезу аміноцукрів, глікопротеїнів, нуклеотидів тощо. Крім того, глутамат є дуже важливим для функціонування центральної нервової системи (ЦНС) ссавців, оскільки він є основним збуджуючим нейромедіатором і залучений до багатьох мозкових процесів. Цікаво, що глутамат є попередником для синтезу головного гальмівного нейромедіатора –  $\gamma$ -аміномасляної кислоти. Таким чином, ролі глутамату в організмі є дуже різноманітними [11].

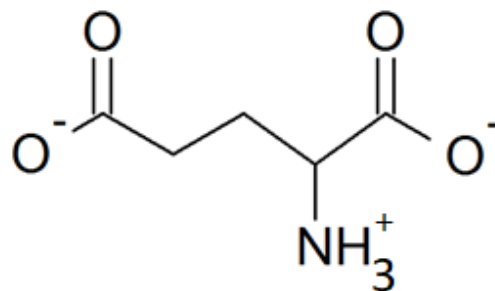


Рис. 1.1. Молекула глутамінової кислоти в іонізованій формі

Під час передачі нервового імпульсу глутамат виділяється у синаптичну щілину шляхом екзоцитозу. У стані спокою концентрація глутамату у синаптичній щілині підтримується на низькому рівні ( $<1$  мкМ) для запобігання випадковій активації нейронів завдяки роботі білків-транспортів, які містяться в плазматичній мембрані нейронів та гліальних клітин і повертають глутамат назад в цитоплазму клітин. Ці білки-транспортери функціонують за рахунок електрохімічного градієнту іонів натрію та калію [12].

Встановлено, що глутамат в ЦНС зазвичай не синтезується нейронами і не проникає через гематоенцефалічний бар'єр, хоча рівень глутамату в плазмі є більшим, аніж в спинномозковій рідині та міжклітинному просторі. Впродовж перших кількох діб після народження організму гематоенцефалічний бар'єр ще не повністю сформований, але вже через тиждень життя глутамат практично не поступає з крові до мозку, як було показано в дослідях на щурах із використанням радіоактивно-міченого глутамату [13]. Основна частина глутамату синтезується в астроцитах – допоміжних клітинах ЦНС, які постачають глутамат нейронам разом з іншими речовинами [14]. Концентрація глутамату в цитоплазмі нейронів становить близько 5 мМ, в той час як астроцити містять дещо менше глутамату – 2-3 мМ. Нижчу концентрацію глутамату в астроцитах пояснюють наявністю в них ферменту глутамінсинтетази, який перетворює глутамат на глутамін з використанням аміаку та енергії АТФ [15].

Спрощено, роль астроцитів у метаболізмі глутамату полягає в наступному: астроцити синтезують глутамат в циклі трикарбонових кислот, перетворюють його на глутамін за допомогою глутамінсинтетази, і вивільняють в позаклітинне середовище. Нейрони поглинають глутамін, перетворюють його на глутамат і використовують як нейромедіатор, вивільняючи його в синаптичну щілину при передачі нервового імпульсу. Астроцити тісно асоційовані з синапсами, які використовують глутамат як нейромедіатор, і після синаптичної передачі нервового імпульсу вивільнений глутамат захоплюється

астроцитами, перетворюється на глутамін і знову повертається до нейронів разом з заново синтезованим глутаміном [16]. Крім того, астроцити використовують глутамін як носій надлишкового азоту і транспортують надлишок глутаміну в кров, звідки він утилізується видільною системою організму [17]. За певних умов астроцити здатні виділяти глутамат в позаклітинне середовище, причому показана можливість транспорту глутамату шляхом екзоцитозу і прямого виділення з цитоплазми за рахунок транспортерів та аніонних каналів; втім, це явище до кінця не досліджено. Іншою недослідженою проблемою, пов'язаною з астроцитами, є наявність в їх плазматичних мембранах функціональних рецепторів глутамату [18]. Значення даних рецепторів для виконання астроцитами своїх функцій (накопичення іонів калію та обміну метаболітів) є незрозумілим.

Слід підкреслити важливу роль астроцитів в припиненні передачі нервового імпульсу і попередженню токсичного впливу глутамату на нейрони – саме завдяки астроцитам вивільнений з пресинаптичної мембрани глутамат швидко видаляється з міжклітинного простору, не дифундує далеко від синапсу і не призводить до надмірної активації нейронів. Існує припущення, що астроцити більш сильно взаємодіють з великими за розмірами синапсами, з яких відбувається вивільнення глутамату в міжклітинне середовище, в той час як невеликі щільні синапси характеризуються мінімальним вивільненням глутамату і тому не оточені щільно астроцитами [16].

Позаклітинні концентрації глутамату залишаються достовірно не відомими через обмеження існуючих методів визначення глутамату. За допомогою мікродіалітичних методів позаклітинну концентрацію глутамату визначили як 1-2 мкМ, але, ймовірно, реальна концентрація є значно нижчою, оскільки діаметр мікродіалітичного зонду становить 200-500 мкМ, а міжклітинна відстань – 0,1-0,2 мкМ. З цієї причини глутамат може накопичуватись у просторі, який оточує зонд, і не викачуватись глутаматними транспортерами [19]. Встановлено, що глутаматні транспортери в постсинаптичній мембрані

можуть зменшувати позаклітинну концентрацію глутамату після передачі нервового імпульсу, причому за декілька мілісекунд [20].

Концентрація глутамату в спинномозковій рідині становить приблизно 1 мкМ за нормальних умов і змінюється при патологічних станах, таких, як дефекти у гематоенцефалічному бар'єрі, психологічні порушення і фізичне пошкодження клітин при інсультах, травмах голови, тощо [21, 22].

За патологічних умов, таких як ушкодження нейронів при ішемії, гіпоксії, гіпоглікемії, травмах голови, тощо, спостерігається збільшення позаклітинної концентрації глутамату. В цьому випадку вивільнення глутамату з нейронів відбувається не шляхом екзоцитозу, а внаслідок роботи білків-транспортів у зворотному режимі. Постійно збільшена позаклітинна концентрація глутамату є одним з чинників ексайтотоксичності (патологічного процесу в нервовій системі внаслідок надмірної активації збуджуючих рецепторів глутамату). Механізм ексайтотоксичності полягає в наступному: надмірна активація рецепторів глутамату призводить до збільшення внутрішньоклітинної концентрації іонів кальцію, що, в свою чергу, запускає процеси клітинної деградації – активацію протеаз, ліпаз, синтетази оксиду азоту, тощо, які ушкоджують клітину аж до її загибелі [23]. Незважаючи на проведені дослідження, залишається невідомим, чи доступний глутамат, який знаходиться в цитозолі нейрона, до захоплення в везикули і вивільнення шляхом екзоцитозу за нормальних умов, або ж везикулярний і цитозольний глутамат не пов'язані безпосередньо і використовуються клітиною окремо.

Також відомо, що відбувається спонтанне, нестимульоване, вивільнення глутамату з нейронів і за нормальних умов. Механізмами такого вивільнення є дифузія, спонтанний екзоцитоз та непатологічна робота білків-транспортів у зворотному режимі. Спонтанне вивільнення глутамату є важливим для нормального функціонування нейронів [24, 25].

В нервовій системі існує три групи (8 типів) метаботропних рецепторів глутамату та три типи іонотропних рецепторів. Ці рецептори присутні по всій центральній нервовій системі у мембранах нейронів та гліальних клітин.

Найбільша кількість рецепторів знайдена в гіпоталамусі, гіпокампі та мигдалевидному тілі, де вони контролюють метаболічні та інші несвідомі процеси [26]. Крім того, рецептори глутамату знайдені у серці (серцевих нервових терміналях, гангліях, провідних волокнах та деяких кардіоміоцитах), острівках Лангерганса у підшлунковій залозі, статевих органах, а також в інших частинах тіла [27, 28]. Функція периферичних рецепторів глутамату залишається погано дослідженою. Деякі з цих рецепторів було клоновано і секвеновано, і з'ясувалося, що ці рецептори є ідентичними до рецепторів у нервовій системі [29]. Проте кардинальні відмінності між нейронами і іншими клітинами організму вказують на те, що механізм дії периферичних рецепторів глутамату має бути іншим, аніж рецепторів у ЦНС. Зокрема, швидкі токи іонів, які супроводжують збудження нейронів, є малоімовірними в інших клітинах, в той час як довготривалі ефекти – зміни мембранного потенціалу, концентрації кальцію в цитозолі, і зміни в роботі систем вторинних посередників є більш ймовірними.

Рецептори глутамату є важливим компонентом нервової системи хордових тварин. Але цим їх значення не обмежується. Крім хордових, за останні 20 років рецептори глутамату виявлені в великій кількості організмів [29]. Іонотропні рецептори глутамату знайдені в однодольних та дводольних рослин, черв'як, молюсків і комах. Щонайменше 45 варіантів примітивних рецепторів глутамату знайдено в бактерій, які, як передбачається, і послужили еволюційною основою для частини більш складних рецепторів глутамату в багатоклітинних організмів [30]. Функції більшості даних рецепторів не досліджено. Рецептори глутамату в рослин були відкриті в 1998 році [31]. Це відкриття рецепторів в організмах без нервової системи викликало великий інтерес в дослідників, але їх функції до цих пір остаточно не встановлені. До 2012 року стало відомо, що рецептори рослин є значно менш селективними до глутамату, ніж схожі на них рецептори ссавців, і здатні активуватись кількома амінокислотами, виступаючи відносно неселективними сенсорами амінокислот

[32]. Вважається, що дані рецептори можуть брати участь в роботі рослинної імунної системи.

Суттєвою проблемою для досліджень ролі глутамату поза ЦНС є участь глутамату в проміжних метаболічних шляхах (синтез інших амінокислот, енергетичний обмін, тощо) і присутність у мілімолярних концентраціях в цитозолі клітин більшості типів [14].

Нещодавно було показано, що зміни у позаклітинній концентрації глутамату за терапевтичної гіпотермії (примусового зниження температури тіла для зменшення наслідків ішемічного ушкодження тканин) можуть бути індивідуальними для різних пацієнтів, оскільки патологічна робота білків-транспортерів глутамату корелює з розміром ушкодженої ділянки мозку, яка є різною (за площею ураження) для кожного випадку інсульту чи травми голови [33]. Відповідно, визначення концентрації глутамату в цьому випадку може бути корисним для оцінки індивідуального впливу гіпотермії і переходу до персоналізованої медицини (а саме, до вибору таких режимів терапевтичної гіпотермії, які були б оптимальними для кожного окремого пацієнта з урахуванням його індивідуальних фізіологічних особливостей).

Як було показано при ішемічній хворобі та інших патологіях, надмірна позаклітинна концентрація глутамату у мозку призводить до збільшення рівня глутамату в плазмі крові [34–37].

Глутамат входить до складу деяких фармацевтичних препаратів (таблеток з глутаміновою кислотою, факовіту та глутаргіну) завдяки тому, що він має здатність сенсibiliзувати смакові рецептори і стимулювати діяльність мозку.

Визначення вмісту глутамату займає важливе місце в клінічній біохімії при діагностиці захворювань, що пов'язані з різкими змінами рівня глутамату в організмі, зокрема хвороб печінки та серцево-судинної системи [38, 39]. Також в клінічних лабораторіях глутамат використовують під час визначення активності деяких амінотрансфераз.

Таким чином, область практичного застосування методів визначення концентрацій глутамату неперервно збільшується. Через це виникає потреба в



створенні методів точного, швидкого і простого детектування вмісту глутамату для потреб нейрофізіології, фундаментальної та клінічної медицини, фармацевтичної та харчової промисловості, а також в аналітичній біохімії та біотехнології [38–40].

## 1.2. Роль глутамату як харчової добавки

Слід відзначити важливу роль глутамату як харчової добавки. Найчастіше глутамат додають у формі глутамату натрію, який відомий під кодом E621. В невеликих (а інколи і у великих) кількостях глутамат натрію міститься в багатьох продуктах харчування [41, 42]. Втім, також використовуються чиста глутамінова кислота (E620), глутамат калію (E622), глутамат кальцію (E623), глутамат амонію (E624) і глутамат магнію (E625). Глутамат застосовують як підсилювач смаку інших компонентів, хоча смак самого глутамату не відчувається, а присутність його в їжі надає їй «м'ясного» смаку. Глутамат натрію продукують у промислових масштабах шляхом обробки і ферментації патоки, цукрової тростини та буряку.

В Україні не існує чітких нормативів вмісту глутамату в більшості харчових продуктів. Так, згідно з Санітарними правилами і нормами по застосуванню харчових добавок (наказ Міністерства охорони здоров'я України від 23.07.96 № 222) дозволялося додавати глутамат натрію і інші солі глутамінової кислоти в продукти за технологічної необхідності в необхідній кількості. Регламентується лише використання глутамату в м'ясних продуктах, які виробляються згідно з Державними стандартами України (ДСТУ). Так, згідно з ДСТУ 4529:2006 «Ковбаси варені з м'яса птиці та м'яса кролів» та ДСТУ 4436:2005 «Ковбаси варені, сосиски, сардельки, хліби м'ясні», масова частка глутамату натрію (за умови його використання) повинна бути не більше ніж 10000 мг/кг, тобто <1%.

Вважається, що за добу людина отримує з їжею від 0,3 до 1 г глутамату натрію [43]. У чутливих до глутамату людей може розвиватися так званий

«синдром китайського ресторану» [38]. Цей синдром було вперше описано близько 40 років тому; симптоми включають в себе жар на потиличній стороні шиї, загальну слабкість і прискорене серцебиття, які розвиваються приблизно через 20 хв після споживання їжі, багатой на глутамат натрію [44]. Пізніше можуть розвиватися запаморочення, втрата свідомості та інші симптоми. Назва синдрому пов'язана з розповсюдженістю глутамату натрію у китайській кухні. Втім, глутамат широко використовується і в японській та інших азіатських кухнях. Згідно з дослідженням, типова порція їжі в китайському ресторані містить від 10 до 1500 мг глутамату натрію на 100 г продукту [45]. Сто грам сухого супу містять від 0 до 480 мг даної добавки, італійського твердого сиру пармезану – 1200 мг, а соуси та приправи – від 20 до 1900 мг. Таким чином, звичайна європейська їжа може містити такі самі кількості глутамату, як і китайська.

На тваринах та людях було показано гонадотоксичний ефект глутамату. Додавання глутамату у дозі 2 мг/г тіла щурам під час різноманітних періодів життя призводило до збільшеної кількості клітин на стадії профазі I мейозу серед сперматоцитів у порівнянні з контрольною групою, та іншим патологічним змінам [46]. Автори стверджують, що глутамат збільшує ймовірність скорочення матки, ймовірно, стимулюючи чутливість до окситоцину, та пригнічує жіночу репродуктивну функцію у щурів, ймовірно, погіршуючи функції яєчників та матки. В іншому дослідженні на щурах було показано, що споживання глутамату може негативно впливати на кількість сперматозоїдів у спермі, морфологію і гістологію яєчників [47].

Надмірне вживання глутамату натрію збільшує ймовірність розвитку ожиріння, як було показано у масштабному дослідженні з впливу дієти на здоров'я населення [48]. У дослідженні брало участь 10 095 здорових дорослих людей у віці від 18 до 65 років в період з 1991 до 2006 року. Причини збільшення ймовірності ожиріння до кінця не досліджено; дані, отримані на щурах, свідчать, що споживання глутамату у кількості 2-4 г на кг маси тіла зменшує активність ферментів, які розщеплюють жири у жировій тканині, а

також зменшує секрецію інсуліну [49]. Негативний вплив глутамату в останньому випадку зменшувався при додаванні аргініну або аланіну до води, яку пили піддослідні щурі.

Існують дані, що хронічне споживання глутамату призводить до оксидативного стресу й ушкодження нирок [50]. Механізми цього явища досліджені не до кінця; передбачається, що важливу роль в ньому відіграють  $\alpha$ -кетоглутаратдегідрогеназа, рецептори глутамату та антипортер цистеїн-глутамат.

Негативна дія глутамату на організм може зменшуватись за рахунок інших компонентів їжі. Крім вищезгаданих аргініну та аланіну, захисний ефект було виявлено в куркуміну (компонент куркуми) [51]. У щурів, яких годували глутаматом та куркуміном, виявився менший рівень запалення в гіпокампі, про що свідчила зменшена активність ацетилхолінестерази, нижча концентрація фактору некрозу пухлин  $\alpha$  і нижчі рівні експресії двох рецепторів глутамату у порівнянні з контрольною групою, якій куркумін не давали.

В 1990 році було зроблено припущення, що глутамат може викликати мігрені та генералізовану вазомоторну реакцію, яка супроводжується пульсуючою біллю у висках та в передній частині голови [52]. Втім, достовірного підтвердження це припущення не знайшло.

В 1997 році канадські вчені провели дослідження впливу споживання глутамату на самопочуття людини [53]. Оскільки це було одне з небагатьох досліджень за участю людей, слід зупинитися на ньому детальніше. Було відібрано 61 добровольців, які стверджували, що вживання глутамату натрію призводить до погіршення їх самопочуття. Добровольцям давали вжити 5 г даної речовини або плацебо. З'ясувалося, що:

- 18 людей не відреагували ні на глутамат натрію, ні на плацебо;
- 6 людей відреагували на обидві речовини;
- 15 людей відреагували тільки на плацебо;

- 22 людини (36%) мали погіршення самопочуття лише після вживання глутамату.

Потім суб'єктам, які мали негативну реакцію на вживання саме глутамату, продовжили давати у випадковій послідовності плацебо та різні наважки глутамату – від 1,25 г до 5 г, для визначення критичної дози. Більшість з них демонструвало погіршення самопочуття після вживання 2,5 г глутамату. Найчастішими симптомами були головна біль, погані відчуття у м'язах, поколювання, оніміння, загальна слабкість і почервоніння лиця. Автори дослідження прийшли до висновку, що реакція на вживання глутамату спостерігається не внаслідок звичайної алергічної реакції за участю антитіл IgE. Втім, іншого механізму вони не запропонували.

Крім негативних ефектів, надлишкове вживання глутамату може мати і позитивні наслідки. Так, нещодавно було показано, що вживання глутамату призводить до збільшення рівня гемоглобіну у дорослих чоловіків та хворих на анемію [54]. В дослідженні взяло участь 1197 чоловіків та жінок впродовж 5 років. Збільшення рівня гемоглобіну корелювало з кількістю спожитого глутамату. Автори припускають, що біохімічний механізм цього явища відрізняється у різних груп людей. Цікаво, що при надлишковому годуванні глутамату щурам виявили різну ступінь ожиріння у самців і самок, що свідчить про різний вплив глутамату на метаболічні шляхи у різних статей [55].

Слід відзначити, що глутамат практично завжди присутній в їжі навіть без штучного додавання, так само як і інші амінокислоти. Наприклад, концентрація глутамату у рисових зернах становить 163 мг/кг, або 31% від загального вмісту вільних амінокислот [56].

Таким чином, існують дані про різноманітний негативний вплив постійного надлишкового споживання глутамату на організм. Проте більшість досліджень проводилась на щурах, і тому їх неможливо прямо екстраполювати на людей. В дослідженнях же на людях негативний ефект (ожиріння та ін.) міг викликатись не безпосередньо глутаматом, а збільшеним споживанням глутамат-збагаченої їжі і відповідно більшою калорійністю раціону. Крім того,

в більшості випадків глютамат натрію використовується для покращення смаку жирної, смаженої або пересоленої їжі, тому в зазвичай виокремити вплив на організм саме глютаму є практично неможливим. Більше того, постійне споживання жирної, жареної та пересоленої їжі, ймовірно, матиме значно гірші наслідки для організму саме за рахунок жиру, солі й інших компонентів, а вплив глютаму натрію буде незначним відносно них. Випадків індивідуальної гіперчутливості до глютаму натрію не було зафіксовано [45].

Залишаються нез'ясованими можливі фізіологічні шляхи впливу глютаму на організм. Глютамат з крові не може проникати в мозок через непроникний для глютаму гематоенцефалічний бар'єр. В периферичних тканинах ссавців знайдено низку глютаматних транспортних систем, завдяки яким концентрація глютаму в крові підтримується в межах 30-80 мкМ [57, 58]. Ці системи виявлені в печінці, підшлунковій залозі, різних відділах травної системи, нирках тощо, і швидко зменшують надлишкову концентрацію глютаму в крові. Таким чином, за сучасними уявленнями, споживання їжі з великим вмістом глютаму натрію не призведе до стійкого збільшення концентрації глютаму в крові і не вплине на нервову систему здорового організму. З іншого боку, навіть нетривале збільшення концентрації глютаму може призвести до активації глютаматних рецепторів в багатьох фізіологічно важливих органах, що матиме невідомі наслідки. Також залишається відкритим питання про можливу адаптацію організму (наприклад, збільшенням кількості глютаматних транспортерів) до дієти з високим вмістом глютаму.

Напівлетальна доза (LD50) глютаму натрію для щурів та мишей становить 15 – 18 грам на кілограм ваги тварини [59]. Отриманий з їжею глютамат швидко метаболізується в клітинах тонкого кишківника та печінки, перетворюючись на інші амінокислоти та вуглеводи [60]. Європейське агенство з безпеки харчових продуктів (European Food Safety Authority) в 2017 році встановило допустиму добову норму вживання солей глютаму (сумарно) в 30 мг на кілограм маси тіла [61].

Наразі глутамат натрію вважається відносно безпечним компонентом і його вміст у харчових продуктах зазвичай не регулюється [62]. Проте, зважаючи на поширене використання глутамату натрію як харчової добавки, існує необхідність у додаткових дослідженнях впливу надмірних концентрацій глутамату на організм людини. Також необхідно контролювати вміст глутамату в харчових продуктах для людей, які мають ризик розвитку психічних хвороб (Альцгеймера, Паркінсона, шизофренії, депресій), захворювання печінки або індивідуальну чутливість до підвищених концентрацій глутамату в їжі [63].

### 1.3. Класичні методи визначення вмісту глутамату

Класичними методами визначення вмісту глутамату у водних зразках є:

1) Спектрофотометричний метод – базується на проведенні кольорової реакції, зазвичай каталізованої ферментом, внаслідок чого утворюється забарвлений продукт. Кількість забарвленого продукту є пропорційною концентрації глутамату. Набори для спектрофотометрії випускають кілька фірм, наприклад американські компанії Sigma-Aldrich (код продукту MAK004-1KT) та Megazyme (код продукту K-GLUT). Перша фірма не наводить деталей ферментативної реакції, а друга фірма вказує, що використовується двоферментна реакція: ГлДГ окиснює глутамат і відновлює НАД<sup>+</sup> до НАДН, а діафораза окиснює НАДН і відновлює індикаторну сполуку, яка стає забарвленою і реєструється при довжині хвилі 492 нм. Вартість одного набору в Sigma-Aldrich (станом на червень 2018 р.) становила 526 євро, і його було достатньо для 100 вимірювань. Вартість одного набору в Megazyme (станом на ту ж дату) була 113 євро, і його було достатньо для проведення від 60 до 700 аналізів (залежно від типу використаного приладу). Мінімальна межа визначення концентрації глутамату в першого набору була 2 нМ, а в другого набору – 1,2 мкМ.

2) Флуориметричний метод – базується на використанні ГлДГ, яка окиснює глутамат і відновлює НАД<sup>+</sup> до НАДН [64]. Останній флуоресцює під

дією ультрафіолету, і рівень флуоресценції вимірюється флуорометром. Межа визначення глутамату в наведеній роботі становила 1 мкМ, але, ймовірно, вона залежить від чутливості використаного флуорометра.

3) Високоєфективна рідинна хроматографія (ВЕРХ), у поєднанні з попередніми методами. Також можливе комбінування ВЕРХ з мас-спектрометрією [8].

Існуючі методи визначення концентрації глутамату є безумовно точними та чутливими, проте вони потребують наявності кваліфікованого персоналу та складного і коштовного обладнання, що збільшує вартість аналізу [38, 40, 65]. Іншими недоліками є часта необхідність в досить складній попередній підготовці проб для аналізу і непридатність для моніторингу змін концентрації глутамату в режимі реального часу, що є дуже важливим для медико-біологічних досліджень. З цих причин, використання традиційних методів визначення глутамату є досить обмеженим в наукових дослідженнях та клінічній діагностиці [66].

Позаклітинна концентрація глутамату у ЦНС зазвичай оцінюється за допомогою метода мікродіалізу: мікроскопічний зонд імплантується в досліджувану частину мозку і збирає діалізат, який може відбиратися порційно і аналізуватися за допомогою ВЕРХ, або ж діалізат прокачується через проточну комірку і глутамат детектується в режимі реального часу за допомогою глутамат-чутливого амперометричного біосенсора [67, 68].

Крім описаних традиційних методів визначення концентрацій глутамату у водних зразках існує низка описаних в літературі методів, які були розроблені, але не набули значного поширення.

Наприклад, відомий біоломінесцентний метод для визначення глутамату, який базується на триферментному каскаді реакцій (рис. 1.2) [69]. ГлДГ окиснює глутамат і утворює НАДН. Флавінмононуклеотидредуктаза відновлює флавінаденінмононуклеотид (ФМН) до ФМНН<sub>2</sub>, окиснюючи НАДН. Люцифераза окиснює ФМНН<sub>2</sub> і генерує фотони, які і реєструються приладом. Цей метод був спочатку розроблений для визначення глутамату у очищених

зразках, але згодом його було адаптовано для зразків з живими клітинами (у культурах) та шматочків мозку. Однією з переваг метода є можливість визначення концентрації глутамату у зразку в режимі реального часу.

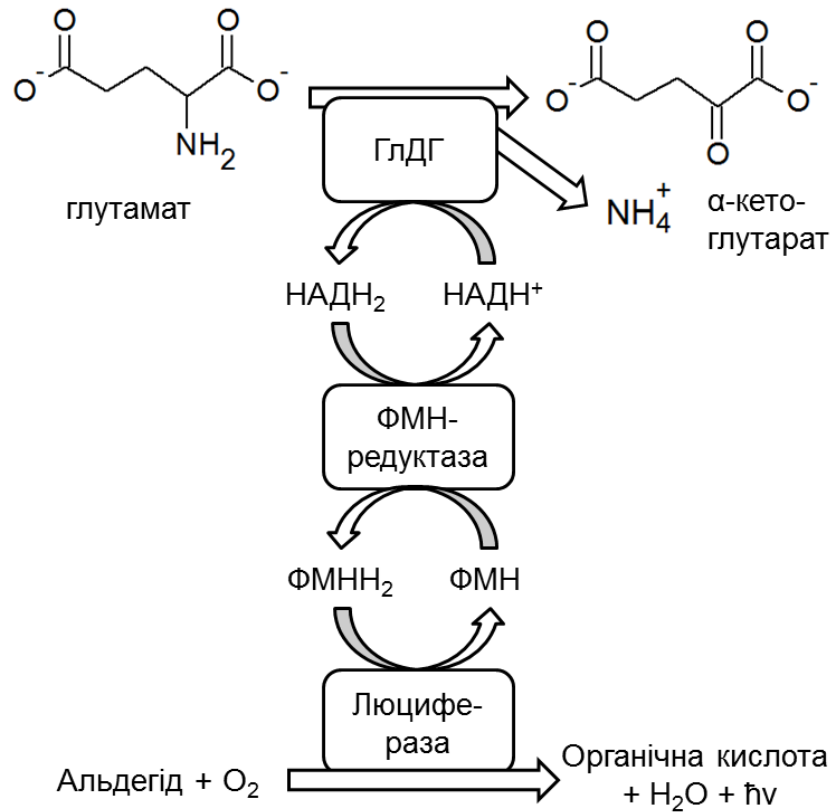


Рис. 1.2. Схема ферментативних реакцій, які лежать в основі люмінесцентного методу визначення глутамату

Подібно до попереднього методу, було запропоновано хемолюмінесцентне визначення глутамату за участі люмінолу і фериціаніду калію і застосуванням люмінофотометра [70].

Нещодавно було описано метод визначення глутамату в харчових продуктах на основі тонкошарової хроматографії [71]. Мінімальна межа визначення глутамату натрію складала 0,7 нг, а лінійний діапазон – від 400 до 1000 нг. Було успішно визначено вміст глутамату у супах, бульйонних кубиках та приправах.



Запропоновано метод для одночасного визначення глутамату і всіх інших вільних амінокислот у харчових продуктах за допомогою іоно-обмінної хроматографії у комбінації з мас-спектрометрією високої роздільної здатності [72]. Мінімальна межа визначення глутамату була 0,5 нг/мл. За допомогою даного методу було визначено концентрації всіх вільних амінокислот у молоці, свіжих і консервованих томатах та томатній пасті.

В нейрохімічних дослідженнях позаклітинна концентрація глутамату зазвичай вимірюється за допомогою методики мікродіалізу у комбінації з ВЕРХ. Втім, тривалість одного аналізу складає щонайменше декілька хвилин, що не дає змоги вимірювати швидкі зміни концентрації глутамату. Для покращення роздільної здатності у часі використовують системи з більш швидким методом визначення, аніж ВЕРХ. Зокрема, популярними є ферментні методи [67]. У проточній комірці для флуоресцентного ферментного аналізу діалізат змішують з ГлДГ та НАД<sup>+</sup>. ГлДГ відновлює НАД<sup>+</sup> пропорційно концентрації глутамату, і концентрація НАДН вимірюється за допомогою флуорометрії. При іншому підході використовують ГлОД і реєструють утворений нею пероксид водню за допомогою амперометрії. Втім, навіть з такими модифікаціями метод мікродіалізу має обмежене часове розділення, оскільки для детекції необхідно мати відносно великий об'єм вимірювальної комірки [73].

Способом вирішення указаних вище проблем є використання нових біоаналітичних приладів - біосенсорів.

#### **1.4. Біосенсори для визначення вмісту глутамату**

Інтерес до розробки біосенсорів обумовлений низкою їхніх потенційних переваг у порівнянні з загальноприйнятими методами: простотою використання, можливістю їхньої мініатюризації, експресністю аналізу, низькою собівартістю за умов масового виробництва – і все це із забезпеченням необхідного рівня чутливості та селективності. Електрохімічні біосенсори для

визначення глутамату є експресними, більш зручними та дешевшими аналітичними приладами у порівнянні з традиційним обладнанням [74]. В більшості випадків біосенсиори є портативними і можуть використовуватись персоналом після мінімального навчання. Крім того, біосенсиори можуть бути мініатюризовані для імплантації у живі тканини, чого складно досягти іншими методами [75]. Біосенсиори здатні визначати концентрації глутамату в режимі реального часу, чого важко досягти традиційними методами, такими як хроматографія або спектрофотометрія.

На даний час в літературі описано низку електрохімічних біосенсорів для визначення глутамату. Вони базуються на ферментах глутаматоксидазі (ГЛОД) або глутаматдегідрогеназі (ГЛДГ). Обидва ферменти окиснюють глутамат до кетоглутарату, проте ГЛОД також утворює пероксид водню і потребує наявності кисню у розчині, в той час як ГЛДГ відновлює кофактор нікотинамідаденіндинуклеотид ( $\text{NAD}^+$ ). Відповідно, біосенсиори на основі ГЛОД детектують зазвичай пероксид водню, а біосенсиори на основі ГЛДГ – НАДН.

Узагальнені дані про аналітичні характеристики електрохімічних біосенсорів на основі ГЛОД наведено в табл. 1.1, а біосенсорів на основі ГЛДГ – в табл. 1.2.

Біосенсиори на основі обох ферментів були придатні для ефективного визначення вмісту глутамату у зразках біологічних рідин та харчових продуктів. Втім, ГЛДГ потребує додавання  $\text{NAD}^+$  (який коштує відносно дорого) до робочого буфера або іммобілізацію даного кофактора разом з ферментом. Це робить біосенсиори на основі ГЛДГ більш складними у порівнянні з біосенсорами на основі ГЛОД. Крім того, стабільність ГЛОД є значно кращою [76–79]. З іншого боку, залежність роботи ГЛОД від концентрації кисню не є суттєвою проблемою через наявність достатньої кількості кисню у зразках. З цих причин в даній дисертаційній роботі було використано саме ГЛОД для створення біосенсора.

Таблиця 1.1

**Порівняння характеристик описаних в літературі глутамат-чутливих біосенсорів на основі ГЛОД**

№	Мінімальна межа визначення глутамату, мкМ	Лінійний діапазон визначення глутамату, мкМ	Зберігання біосенсора	Джерело
1	0,0001	0,02-400	60 діб	[80]
2	0,0002	3-500	4 тижні з щоденним використанням	[76]
3	0,05	0,05-100	100% залишкової активності через 5 місяців	[77]
4	0,27	0-100	Немає даних	[81]
5	0,594	5-50	75% залишкової активності після 70 вимірювань	[82]
6	1,01	100-5000	90% залишкової активності через 2 тижні	[83]
7	1,6	5-500	4 місяці	[84]
8	5	5-500	Немає даних	[85]
9	14	200-800	98% залишкової активності через 2 тижні	[86]
10	Немає даних	Немає даних	84% залишкової активності через 1,5 місяці	[87]

**Порівняння характеристик описаних в літературі глутамат-чутливих біосенсорів на основі ГлДГ**

№	Мінімальна межа визначення глутамату, мкМ	Лінійний діапазон визначення глутамату, мкМ	Зберігання біосенсора	Джерело
1	0,057	0,1-20 та 20-500	80,5% залишкової активності через 2 тижні	[79]
2	0,1	0,5-400	93% залишкової активності через 2 тижні	[88]
3	1,5	12,5-150	Немає даних	[89]
4	2	25-100	Немає даних	[90]
5	3	7,5-105	100% залишкової активності через 2 тижні	[91]
6	100	400-10000	60% залишкової активності через 10 діб	[92]
7	100	0,2-250	85% залишкової активності через 4 тижні	[93]

Амперометричний біосенсор на основі платинового мікроелектрода (довжина – 0,2 мм, діаметр – 25 мкм) з іммобілізованою ГлОД є найбільш близьким за будовою до розробленого в даній дисертаційній роботі біосенсора [85]. ГлОД було іммобілізовано шляхом поперечного зшивання з БСА з біфункціональним агентом – глутаровим альдегідом. Тривалість відгуку біосенсора була 25-40 сек., а мінімальна межа визначення глутамату – 5 мкМ.

Крім того, було розроблено амперометричний глутамат-чутливий біосенсор на основі ГлОД, іммобілізованої у композитній мембрані з

багатошарових вуглецевих нанотрубок, золотих наночастинок та хітозану на поверхні золотого електроду [84]. Лінійний діапазон визначення цільового аналіту складав від 5 до 500 мкМ, а мінімальна межа визначення – 1,6 мкМ. Також відомий інший ферментний біосенсор, що містить в складі біоселективного елементу вуглецеві нанотрубки, але як фермент використана ГлДГ [79]. Даний біосенсор вирізняється тим, що вуглецеві нанотрубки були розміщені вертикально на поверхні кремнієвого субстрату за допомогою модифікованого методу хімічного осадження. Як методика детекції була використана диференційна імпульсна вольтамперометрія (різновид амперометрії). Калібрувальний графік біосенсора мав дві лінійні ділянки: від 0,1 до 20 мкМ та від 20 до 300 мкМ, а мінімальна межа визначення глутамату становила 57 нМ.

Для нейрохімічних досліджень було розроблено низку мікроелектродів, які було апробовано при аналізі зразків. Зокрема, мікроелектроди було використано для вимірювання вивільнення глутамату з фоторецепторів під час світлової стимуляції (*in vitro*) [94], стимульованого хлоридом калію вивільнення глутамату з нейронів і наступного поглинання (*in vivo*) [95–97], стимульованого хлоридом калію вивільнення глутамату *in vitro* з культивованих нейронів [98] і шматочків гіпокампу [99].

Запропоновано оптичний біосенсор у форматі тест-смужок для аналізу глутамату в харчових зразках [100]. Унікальність конструкції цього біосенсора полягає в одночасній іммобілізації декількох чутливих агентів (один індикаторний барвник, 3,3',5,5'-тетраметилбензидин і два ферменти – ГлОД і пероксидаза хрому) за допомогою складної мембранної системи без ковалентного приєднання чутливих компонентів.

Для визначення глутамату створено різні системи на основі проточно-інжекційного аналізу, наприклад, що використовують ферментний електрод на основі ГлОД та полііонного комплексу як детектора [101] та твердотільний електрод на основі непластифікованого хітозана [102]. Також багатоканальна біосенсорна система була створена для визначення декількох компонентів

досліджуваного зразка (в тому числі і глутамату) в динаміці при моніторингу процесу отримання харчових продуктів [103].

Селективний біосенсор для визначення глутамату в приправах був розроблений шляхом введення ГлОД в гідрогель полі(карбамоїл)сульфонату. Суміш була нанесена на поверхню товстоплівкового платиногового електроду [83].

Найнижча мінімальна межа визначення глутамату (0,1 нМ) була досягнута за допомогою біосенсора, що був виготовлений шляхом ковалентно іммобілізованої ГлОД на золотий електрод, модифікований поліаніліном і наночастинками поліпіролу [80].

Практично всі вищеописані біосенсори є амперометричними. Дуже рідко зустрічаються інші типи глутамат-чутливих біосенсорів, наприклад, описано біосенсор на основі детекції споживання кисню волоконно-оптичним датчиком, який фіксує зміни люмінесценції спеціально нанесеного шару, який чутливий до концентрації кисню [41].

Крім ферментних біосенсорів, слід згадати сенсор на основі масиву вертикально розташованих нанодротів [104]. Були перевірені два типи нанодротів – нікелеві та платинізовані нікелеві. Використовувався амперометричний метод детекції, верхня межа визначення глутамату для обох типів становила 8 мМ, а нижня – 68 мкМ для нікелевих нанодротів і 83 мкМ для платинізованих нікелевих нанодротів. Було показано, що сенсор на основі нанодротів має значно кращі аналітичні характеристики у порівнянні з планарним нікелевим сенсором. Крім того, використання нікелевих нанодротів показало кращі результати у порівнянні з золотими нанодротоми та платинізованими золотими нанодротоми.

Єдиний відомий афінний біосенсор для визначення глутамату було описано в роботі [105]. Рецепторним елементом виступав невеликий пептид, який селективно зв'язував глутамат. Перетворювачем слугував графітовий електрод. Біосенсор демонстрував швидкий час відгуку (10 с), проте лінійний діапазон знаходився в зоні високих концентрацій глутамату – від 1 до 10 мМ.

В літературі описано біосенсори та біосенсорні системи для визначення глутамату в наступних зразках:

- 1) в продуктах харчування і фармацевтичних препаратах [39, 40];
- 2) в культурах клітин [106];
- 3) в сироватці крові та сечі [38, 40];
- 4) в мікродіалізатах при нейрофізіологічних дослідженнях [107, 108];
- 5) для контролю за ферментацією в харчовій промисловості [103, 109].

Всі наведені вище біосенсори є лабораторними розробками. Втім, відомі і комерційні біосенсори для визначення глутамату. Зокрема, американська компанія Nova Biomedical випустила серію аналізаторів «BioProfile», спеціалізованих на визначенні параметрів середовища при культивуванні клітин ссавців. Згідно з офіційним сайтом компанії (<http://www.novabio.us>), найпростіший аналізатор «BioProfile Basic 2» здатен визначати концентрації глюкози і лактату. Найскладніший аналізатор «BioProfile 400», крім вищезазначених речовин, визначає концентрацію глутамату, глутаміну, іонів амонію, натрію, калію, гідрокарбонатів, рН розчину, парціальний тиск кисню і вуглекислого газу, осмолярність, насиченість повітрям і вуглекислим газом. Діапазон визначення глутамату всіма системами складає від 0,2 до 6,0 мМ, похибка вимірювання – 5%. Система складається з окремих модулів, і визначення глутамату, глутаміну, глюкози і лактату проводиться за допомогою амперометричних біосенсорів на основі платинових електродів з іммобілізованими ферментами. Більшість інших параметрів аналізується за допомогою потенціометричних іон-селективних електродів, які містять відповідні іон-селективні мембрани, що змінюють потенціал при зв'язуванні цільової речовини. Слід відзначити, що аналізатори є повністю автоматичними і містять блок для розміщення 40 дослідних пробірок. Заявлена тривалість аналізу 40 зразків – 80 хв. Слід відмітити, що дана серія аналізаторів є досить розвинутою, але з іншого боку – вузькоспеціалізованою і непридатною для нейрохімічних досліджень, в першу чергу через невідповідний діапазон визначення глутамату (низька чутливість).

Нами було виявлено інформацію лише про один комерційний біосенсор для визначення глутамату в харчових продуктах. Американська компанія Yellow Springs Instruments розробила мультибіосенсорну систему YSI 2900, яка призначена для визначення глутамату, глюкози, цукрози, лактози, лактату, галактози, холіну, етанолу та крохмалю в харчових продуктах. Система базується на ферментних біосенсорах і може автоматично проводити послідовний аналіз до 96 зразків. Зокрема, глутамат-чутливий біосенсор містить платиновий робочий електрод з іммобілізованою ГЛОД. Лінійний діапазон визначення глутамату становив від 0,1 до 10 мМ. Перед проведенням вимірювання біосенсор необхідно калібрувати шляхом додавання 5 мМ стандартного розчину глутамату, і раз на день необхідно перевіряти лінійний діапазон біосенсора додаванням 10 мМ стандартного розчину глутамату. Для проведення аналізу достатньо 25 мкл зразка. За даними виробника, колір, густина, рН та присутність сполук-відновників практично не впливала на результати вимірювань. Слід відзначити, що компанія продовжує вдосконалювати цю систему, що свідчить про ринковий інтерес до неї – так, ще кілька років тому компанія пропонувала більш просту систему YSI 2700, яка була придатна для автоматичного аналізу 24 зразків, і також могла визначати глутамін (ймовірно, від визначення глутаміну в подальшому відмовились) [110].

## **1.5. Висновки**

Глутамат відіграє важливу роль в організмі ссавців, в тому числі людини, зокрема, виступає як складова частина білків та збуджуючий нейромедіатор в ЦНС. Визначення глутамату є необхідним для нейрохімічних досліджень при вивченні глутаматергічних нейронів, а також для дослідження ролі глутамату поза нервовою системою, зокрема в тромбоцитах.

В харчовій промисловості глутамат натрію та інші солі глутамінової кислоти широко застосовуються як харчові добавки під кодами E620-E625. Ряд



досліджень свідчать про можливий негативний ефект від споживання їжі, багатой на глутамату, та необхідність контролю його концентрації.

Традиційними методами визначення глутамату є ВЕРХ, спектрофотометрія та флуорометрія. Вони є чутливими (мінімальна межа визначення концентрації глутамату для різних методів становить від 2 нМ до 1,2 мкМ) і селективними, проте потребують складного і дорогого обладнання і можуть дуже обмежено застосовуватись для визначення концентрацій глутамату в режимі реального часу та *in vivo*. Як альтернативи пропонуються електрохімічні біосенсиори на основі іммобілізованих ферментів.

На даний час розроблено низку біосенсорів на основі ферментів ГЛОД та ГЛДГ, які в більшості випадків базуються на амперометричному методі вимірювання. Показано, що використання ГЛОД для конструювання біосенсорів є перспективнішим (через кращу стабільність при зберіганні і відсутність необхідності додавати НАД<sup>+</sup> до робочого буфера), тому в даній дисертаційній роботі буде використано саме такий біосенсор.

Таким чином, розробка і адаптація глутамат-чутливих біосенсорів для аналізу біологічних і зразків харчових продуктів є перспективним для спрощення процедури аналізу та зменшення її вартості, що призведе до більш широкого застосування біосенсорів у нейрохімічних дослідженнях та у контролі якості харчових продуктів.

## РОЗДІЛ 2

### МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ

#### 2.1. Матеріали

При розробці біосенсорів було використано наступні препарати та реактиви:

- фермент ГЛОД (КФ 1.4.3.11) із *Streptomyces sp.* (рекомбінантну) з активністю 7 од. акт. мг<sup>-1</sup> 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);
- додаткові речовини для покращення зберігання біосенсорів: дитіотреїтол (ДТТ), динатрієву сіль етилендіамінтетраоцтової кислоти (ЕДТА) та азид натрію (NaN<sub>3</sub>) фірми Sigma-Aldrich Chemie (США).

Для спектрофотометричного визначення концентрацій глутамату в харчових зразках було використано 4-аміноантипирин і натрієву сіль 3-(N-етил-

3-метиланіліно)-2-гідроксипропансульфонової кислоти (ЕМГК) фірми Sigma-Aldrich Chemie (США).

Для спектрофотометричних вимірювань концентрацій глутамату в зразках харчових продуктів використовували пероксидазу хрону (КФ 1.11.1.7) з активністю 150 од. акт. мг<sup>-1</sup> фірми Sigma-Aldrich Chemie (США). Для спектрофлуориметричних вимірювань використовували ГлДГ (КФ 1.4.1.3) з печінки бика з активністю 40 од. акт. мг<sup>-1</sup> та нікотинамідаденіндинуклеотид (НАД<sup>+</sup>) тієї ж фірми. Як субстрат 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-[<sup>14</sup>C]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.». Всі речовини використовували без додаткової очистки.

При підборі умов іммобілізації було використано 2,5 % суспензію цеоліту (а саме, силікаліту) в 20 мМ НЕРЕС, рН 6,5, яка була люб'язно надана колегами з Близькосхідного технічного університету (м. Анкара, Туреччина). Синтез і характеристику силікаліту було проведено в роботі [111]. Середній розмір отриманих мікрочастинок силікаліту складав 500 нм. Площа поверхні мікрочастинок була 282 м<sup>2</sup>/г, а розмір пор – близько 0,5 нм. Через це, передбачалася гарна адсорбція ферментів на поверхні кристалів силікаліту, але не в порах.

Зразки синапсом з центральної 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. Києва (Україна).

## 2.2. Конструкція амперометричних перетворювачів

В роботі, як амперометричні перетворювачі використовували платинові дискові електроди, які виготовляли в Інституті молекулярної біології і генетики НАН України (рис. 2.1).

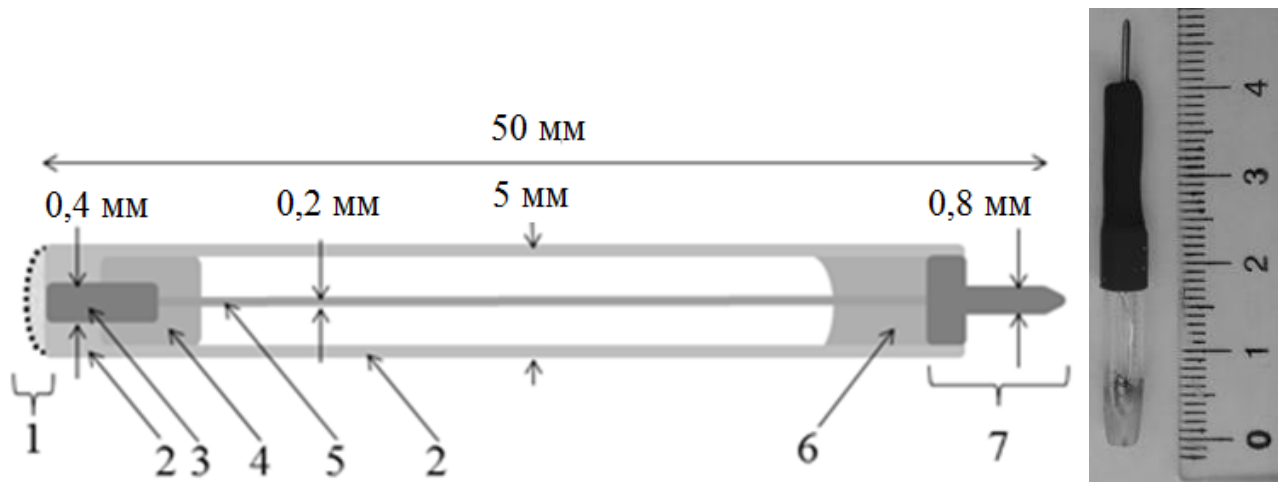


Рис. 2.1. Схема (зліва) та зовнішній вигляд (справа) амперометричного біосенсора: 1 – біоселективна мембрана, 2 – скляний капіляр, 3 – платиновий дріт, 4 – сплав Вуда, 5 – внутрішній провідник (срібний чи мідний дріт), 6 – епоксидна смола, 7 – контактна площадка

Для виготовлення перетворювача, платиновий дріт діаметром 0,4 мм і довжиною 3 мм запаювали в кінцевій частині скляного капіляра із зовнішнім діаметром 3,5 мм. Відкритий торець дроту виступав робочою поверхнею перетворювача. Платиновий дріт за допомогою легкоплавкого сплаву Вуда з'єднували з провідником, розміщеним всередині капіляра. На другому кінці провідника приєднували контактну площадку для підключення до вимірювальної установки. Робочу поверхню електродів отримували шліфуванням із використанням порошку оксиду алюмінію (розмір частинок 0,1 та 0,05 мкм) та обробляли спиртом перед іммобілізацією біоселективного елементу. Перетворювачі використовували багаторазово при розробці

біосенсорів і періодично їх чутливу поверхню поновлювали за допомогою такого ж шліфування.

### **2.3. Методика модифікації поверхні електрода за допомогою поліфенілендіаміну**

Для формування поліфенілендіамінової (ПФД) мембрани триелектродну систему з чистим робочим електродом занурювали у розчин *m*-фенілендіаміну, після чого отримували 8-10 циклічних вольтамперограм. *m*-фенілендіамін (у концентрації 5 мМ) був розчинений у 10 мМ калій-фосфатному буфері, рН 7,4. Перед кожним експериментом готували новий розчин фенілендіаміну, оскільки фенілендіамін у розчині досить швидко окиснюється і через певний час якість утворених мембран погіршується. Параметри циклічних вольтамперограм були наступними: початковий потенціал – 0 В, кінцевий потенціал +0,9 В, швидкість зміни потенціалу 20 мВ на секунду, крок зміни потенціалу 5 мВ. Під час проведення електрополімеризації перемішування розчину не проводилося. Після цього, перетворювачі промивали дистильованою водою, висушували на повітрі і поверх ПФД мембрани іммобілізували біомембрану на основі ферменту ГлОД.

### **2.4. Формування біоселективних елементів**

Біоселективні елементи біосенсорів отримували шляхом поперечної зшивки ферменту і допоміжних речовин на поверхні амперометричного перетворювача з попередньо нанесеною ПФД-мембраною (рис. 2.2).

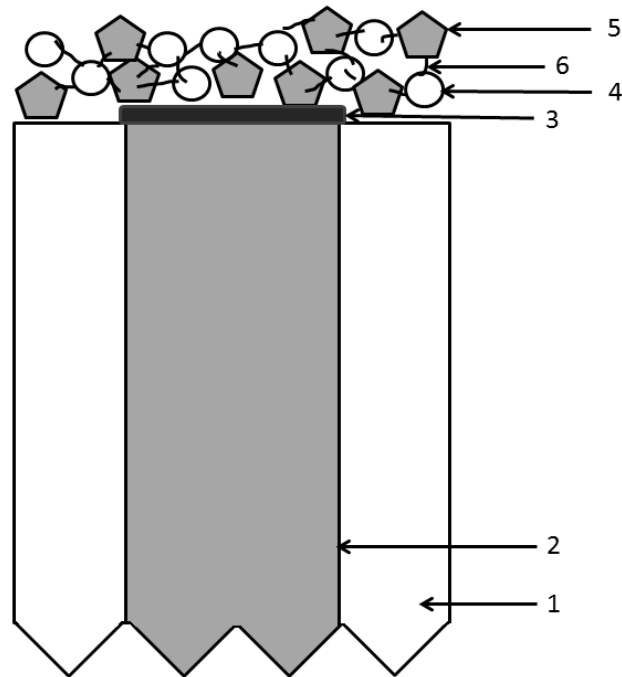


Рис. 2.2. Імобілізація ферменту і допоміжних речовин на поверхні амперометричного перетворювача: 1 – скляний капіляр, 2 – платиновий дріт, 3 – ПФД мембрана, 4 – БСА, 5 – ГЛОД, 6 – ГА

Вихідний розчин містив 8 % (тут і далі – масова частка) ГЛОД, 4 % БСА у 100 мМ фосфатному буфері, рН 6,5, 10 % гліцеролу. Гліцерол додавали, щоб стабілізувати фермент впродовж його іммобілізації, запобігти передчасному висиханню і поліпшити адгезію мембрани до поверхні перетворювача. БСА виконував роль носія, а також стабілізував фермент і запобігав втраті його активності як при зберіганні вихідного розчину, так і під час іммобілізації. Перед нанесенням на поверхню перетворювачів цей розчин змішували з 0,8 % водним розчином глутарового альдегіду (зшиваючого агенту) у пропорції 1:1. Одразу після цього суміш наносили на робочі поверхні перетворювачів та висушували впродовж 30 хв на повітрі за кімнатної температури. Впродовж даного часу глутаровий альдегід утворював ковалентні зв'язки між аміногрупами, наявними в ГЛОД та БСА, і таким чином формувалася нерозчинна ферментна мембрана, яка закріплювалася на поверхні електроду

шляхом адсорбції. Приблизний об'єм розчину, нанесеного на чутливу область одного електроду, становив 0,15 мкл.

Після іммобілізації біосенсиори відмивали в робочому буферному розчині від незв'язаних компонентів біоселективної мембрани та надлишку глутарового альдегіду впродовж 10-15 хв.

## 2.5. Методика амперометричних вимірювань

В роботі було використано триелектродну схему амперометричного аналізу. Схематичне зображення амперометричної установки показано на рис. 2.3.

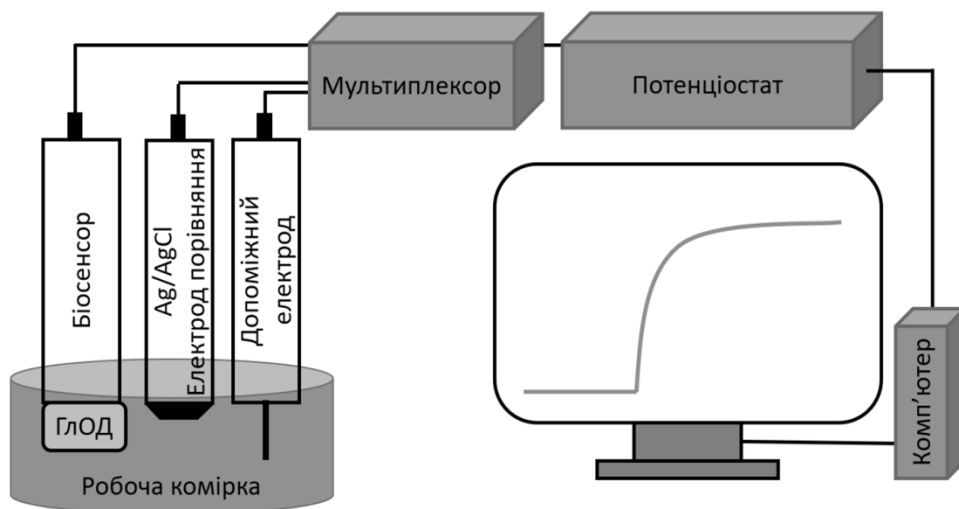


Рис. 2.3. Схематичне зображення амперометричної установки

Робочі амперометричні електроди, допоміжний платиновий електрод та Ag/AgCl електрод порівняння (рис. 2.4) підключали до потенціостату PalmSens (Palm Instruments BV, Нідерланди).

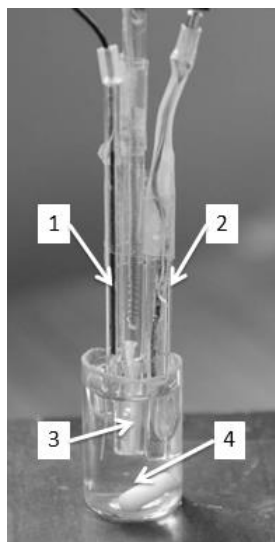


Рис. 2.4. Реальний вигляд робочої комірки з електродами: 1 – допоміжний електрод, 2 – робочий електрод, 3 – електрод порівняння, 4 – робоча комірка

Потенціостат контролювали за допомогою персонального комп'ютера і програми, яка йшла в комплекті з приладом. Також для всіх біосенсорних вимірювань використовували 8-ми канальний пристрій CH-8 multiplexer (того ж виробника), що підключали до PalmSens, і, який дозволяв отримувати сигнали одночасно з декількох робочих електродів (зазвичай були підключені 2 – 3 робочі електроди для статистики).

Виміри проводили за кімнатної температури у відкритій вимірювальній комірці об'ємом 3,5 мл при постійному перемішуванні та при постійному робочому потенціалі +0,6 В відносно Ag/AgCl електрода порівняння, що відповідає анодному окисненню пероксиду водню [112].

Як робочий буфер використовували 25 мМ HEPES з рН 7,4. Для дослідження оптимального значення рН для роботи біосенсора було використано «універсальний буфер», який має схожу буферну ємність в широкому діапазоні рН. Даний буфер складався з суміші речовин (трис-НСl,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , лимонну кислоту та тетраборат натрію), кожна – в концентрації 10 мМ. Готували набір буферних розчинів такого складу, величину рН яких доводили до різних значень за допомогою гідроксиду натрію чи соляної кислоти. Після цього отримували відгуки біосенсора на додавання глютамату в



буферних розчинах з різним значенням рН і визначали, в яких випадках відгуки були найбільшими.

Для отримання відгуків біосенсора додавали до робочої комірки необхідні аліквоти концентрованих розчинів глутамату (50 мМ та 500 мМ). Усі дослідження проводили у трьох повторностях. Дані, наведені в таблицях та на рисунках, є середнім значенням трьох незалежних експериментів  $\pm$  середньоквадратичне відхилення, які були розраховані за допомогою програми OriginLab OriginPro 8.5.

Шум базової лінії біосенсора визначався як середньоквадратичне відхилення величини сигналу біосенсора впродовж 30 секунд перед додаванням зразка або модельного розчину глутамату. Мінімальна межа визначення глутамату вимірювалась як концентрація глутамату, що дає відгук в три рази більший за величину шуму базової лінії (рис. 2.5).

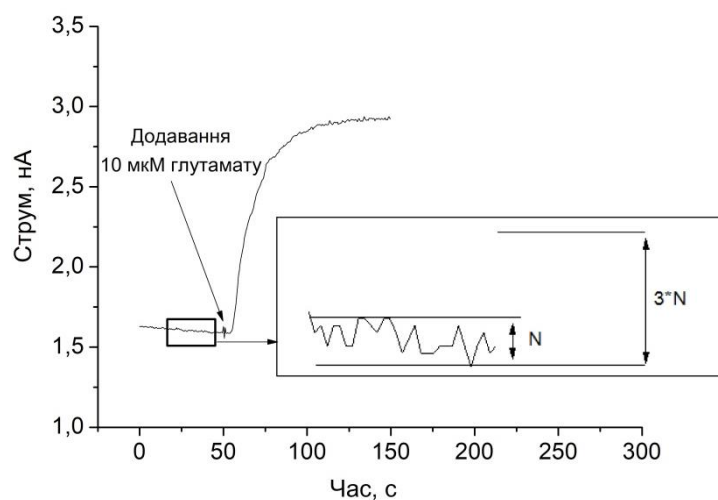


Рис. 2.5. Типовий відгук біосенсора, що використовувався при обрахунку мінімальної межі визначення.  $N$  – шум базової лінії

## 2.6. Методика біосенсорного визначення глутамату у зразках біологічних рідин та харчових продуктів

Розрахунок концентрації глутамату у досліджуваних зразках на основі біосенсорних вимірювань проводили з використанням калібрувального графіка або методу стандартних додавань (рис. 2.6).

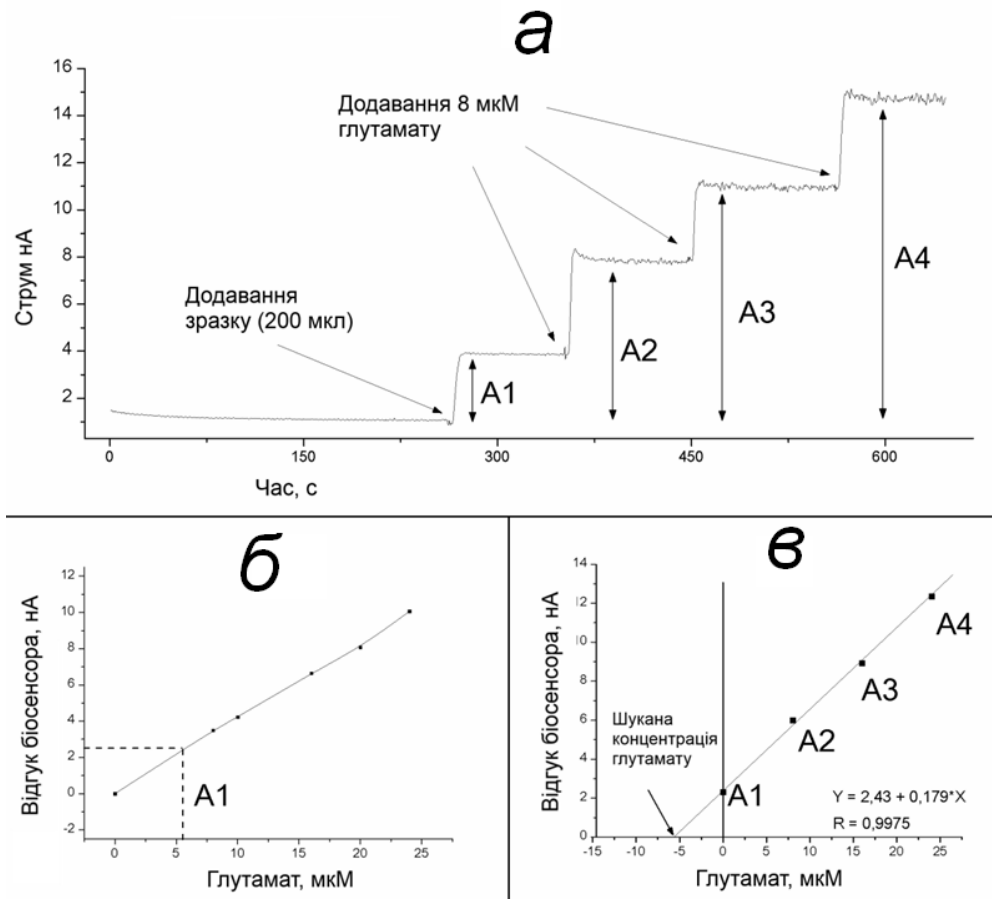


Рис. 2.6. **а**: відгуки біосенсора на додавання зразка (A1) та трьох наступних додавань модельного розчину чистого глутамату (A2-A4). **б**: калібрувальний графік для визначення глутамату. **в**: графік для визначення невідомої концентрації глутамату з використанням методу стандартних додавань

У випадку використання калібрувального графіка, концентрацію глутамату визначали шляхом порівняння відгуку біосенсора на додавання зразка з попередньо отриманим калібрувальним графіком (рис. 2.6, б). У разі стандартних додавань, після додавання зразка і отримання відгуку біосенсора, до робочої комірки додавали ще три рази модельний розчин глутамату (без відмивки між відгуками). Таким чином отримували чотири послідовні відгуки у вигляді сходинок (рис. 2.6, а). На основі отриманих даних будували графік наступним чином: на осі абсцис відкладали концентрацію глутамату у розчині, на осі ординат – відгук біосенсора в нА, причому невідому концентрацію

глутамату (яка викликала перший відгук біосенсора) прирівнювали до нуля. Лінійна екстраполяція даного графіка перетинає вісь абсцис у точці, яка відповідає концентрації аналізованої речовини в досліджуваному зразку (з від'ємним знаком) (рис. 2.6, в).

## **2.7. Методика спектрофотометричного визначення глутамату у зразках харчових продуктів з використанням ГЛОД**

Спектрофотометричні вимірювання проводили у одноразових пластикових кюветах об'ємом 1 мл. Склад розчину в кюветі був наступний: 25 мМ НЕРЕС, рН 7,4, з 0,3 мМ ЕМГК, 0,1 мМ 4-аміноантипірину, 1,8 од. акт. пероксидази хрону і аліквотою зразка з глутаматом (соусу, приправи чи модельного розчину). Запуск реакції відбувався після додавання до кювети 0,112 од. акт. ГЛОД. В процесі реакції, ГЛОД окиснювала глутамат з утворенням пероксиду водню. Пероксидаза хрону в присутності пероксиду водню утворювала забарвлений продукт шляхом окиснення ЕМГК та 4-аміноантипірину. Інтенсивність забарвлення розчину (оптичне поглинання розчином світла) була пропорційна концентрації пероксиду водню, а відтак, і концентрації глутамату. Реакцію проводили впродовж 8 хв (час інкубації був підібраний попередньо і 8 хв було достатньо для досягнення максимального забарвлення розчину).

Інтенсивність оптичного поглинання світла розчином вимірювали за допомогою спектрофотометра Thermo Electron Corporation Bio Mate 5. Довжина хвилі світла, при якій проводили дослідження, становила 555 нм і була підібрана експериментально – саме тут спостерігався найбільший пік поглинання світла продуктом реакції. Перед додаванням ГЛОД визначали базове оптичне поглинання світла кожним розчином, яку згодом віднімали від значення оптичного поглинання після реакції (в більшості випадків базове

оптичне поглинання було незначним, крім декількох найбільш забарвлених соусів).

Для отримання калібрувального графіка проводили послідовне додавання у кювету модельного розчину глутамату по 20 мкМ з інтервалом в 8 хв та фіксацією значення оптичного поглинання (всього робили 6 додавань з кінцевою концентрацією глутамату в кюветі 120 мкМ). Після цього будували калібрувальний графік залежності оптичного поглинання від концентрації глутамату і, шляхом порівняння величини оптичного поглинання зразків з даним графіком, визначали концентрації глутамату у соусах та приправах.

Також концентрації глутамату у пробі визначали за методом стандартних додавань. Для цього після проведення реакції і вимірювання оптичного поглинання розчину з харчовим зразком у цю ж кювету декілька разів додавали модельний розчин глутамату, і через 8 хв після кожної добавки повторно визначали оптичне поглинання проби. За співвідношенням між величинами оптичного поглинання зразка до і після додавання 20 мкМ глутамату визначали вихідну (невідому) концентрацію глутамату в кюветі.

## **2.8. Методика виділення синапсом з мозку щурів**

Експерименти на тваринах (щурах-самцях лінії Вістар, 100-120г, з віварію ННЦ «Інститут кардіології імені М.Д. Стражеско» НАМН України) проводили у відповідності до європейських принципів і міжнародного законодавства. Тварини знаходились в приміщеннях для тварин Інституту біохімії ім. Палладіна НАН України, м. Київ. Їх розміщували в тихому приміщенні з температурою (22-23 °С) і були забезпечені водою та сухим харчуванням. Усі процедури проводили згідно керівництв Інституту біохімії ім. Палладіна та Європейської конвенції про захист хребетних тварин, що використовуються в експериментальних та інших наукових цілях [113].

Після декапітації щурів головний мозок швидко видаляли та відділяли великі півкулі, які повільно гомогенізували у скляному гомогенізаторі Поттера

у 5 мМ HEPES-NaOH, рН 7,4, з 320 мМ цукрозою та 0,2 мМ ЕДТА. Маніпуляції проводили при 4°C. Після цього гомогенат центрифугували двома методами (диференційне центрифугування та центрифугування в градієнті щільності фіколу (Ficoll-400) за методом Cotman [114]), після чого отримували препарат синапсом. Синаптосоми знаходились у стандартному сольовому розчині (20 мМ HEPES, рН 7,4, з додаванням 126 мМ NaCl, 5 мМ KCl, 2 мМ MgCl<sub>2</sub>, 1 мМ NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 10 мМ глюкози); ця суспензія була насичена киснем. Ca<sup>2+</sup>-вмісне середовище містило додатково 2 мМ CaCl<sub>2</sub>. Зразки синапсом використовували в дослідах впродовж 2-4 годин після виділення, а отримані після експериментів зразки заморожували у морозильній камері для подальших біосенсорних та контрольних вимірювань. Концентрацію білка у зразках вимірювали за традиційною методикою [115].

## **2.9. Визначення накопичення радіоактивно-міченого L-[<sup>14</sup>C]глутамату синаптосомами**

Перед експериментами, зразок (125 мкл суспензії синапсом, 0,2 мг білка/мл) преінкубували впродовж 10 хв при 37 °С, після чого додавали 10 мкМ L-глутамат у суміші з 420 нМ радіоактивно-міченим L-[<sup>14</sup>C]глутаматом, та інкубували 1-10 хв при 37 °С. Після цього, оцінювали накопичення глутамату двома методами. За першим, зразки фільтрували через фільтри Whatman GF/C, фільтри двічі швидко промивали охолодженим буфером. Радіоактивність фільтрів визначали за допомогою стандартних рідинних сцинтиляційних методик. За другим методом, зразки центрифугували 20 с при 10000 g та досліджували накопичення радіоактивно-міченого глутамату у аліквотах супернатанту (100 мкл) та осаду у сцинтиляційній рідині ACS (1,5 мл) фірми Amersham (Великобританія) на сцинтиляційному лічильнику.

## **2.10. Визначення вивільнення радіоактивно-міченого L-[<sup>14</sup>C]глутамату синапсосомами**

Суспензію синапсосом розводили стандартним сольовим розчином до концентрації білка 1 мг/мл і 10 хв преінкубували при 37 °С. Після цього зразки синапсосом об'ємом 250 мкл навантажували 500 нМ радіоактивно-міченим L-[<sup>14</sup>C]глутаматом, передінкубували 10 хв при 37 °С у кальцій-вмісному або безкальцієвому середовищі і стимулювали вивільнення глутамату добавкою 35 мМ КСІ. Очікували фіксовані проміжки часу, після чого фільтрували зразки через фільтри Whatman GF/C. Радіоактивність фільтрів визначали за допомогою стандартних рідинних сцинтиляційних методик. Тонічне вивільнення глутамату з синапсосом визначали аналогічно, але без додавання стимулюючих речовин. Для біосенсорних експериментів досліджувані зразки центрифугували замість фільтрації, після чого надосадову рідину заморожували і зберігали до визначення в ній концентрації глутамату за допомогою біосенсора.

## **2.11. Визначення концентрації глутамату спектрофлуориметричним методом з використанням ГлДГ**

Як контрольний метод визначення глутамату застосовували спектрофлуориметричний метод з використанням ГлДГ. Як і для біосенсорних експериментів, визначення глутамату проводили у надосадовій рідині, отриманій після центрифугування синапсосом впродовж 20 с при 10000 g. Зразки синапсосом додавали до термостатованої кювети з постійним перемішуванням, що містила ГлДГ (20 од. акт. мл<sup>-1</sup>) та НАД<sup>+</sup> (1 мМ). ГлДГ проводила окиснення глутамату, наявного в зразку, що супроводжувалось утворенням НАДН. Інтенсивність флуоресценції останнього визначали за допомогою спектрофлуориметра Hitachi MPF-4 (Японія) при довжині хвилі збудження 340 нм та хвилі випромінювання 460 нм. Після виходу сигналу на

плато до кювети додавали модельний розчин глутамату для калібрування активності ГЛДГ (аналогічно біосенсорному методу стандартних додавань).

Для оцінки неспецифічного зростання чи зменшення флуоресцентного сигналу використовували стандартні контролі [101, 102].

## **2.12. Визначення концентрації глутамату за допомогою амінокислотного аналізатора**

Іншим контрольним методом визначення глутамату був аналіз зразків за допомогою амінокислотного аналізатора Т-339 компанії Mikrotechna Praha (Чехія). Як і для біосенсорних експериментів та спектрофлуориметрії, визначення глутамату проводили у надосадовій рідині, отриманій після центрифугування синапсом впродовж 20 с при 10000 g, яку пропускали через іонообмінну хроматографічну колонку в складі приладу (тобто фактично метод базувався на іонообмінній хроматографії).

## **2.13. Статистичний аналіз даних**

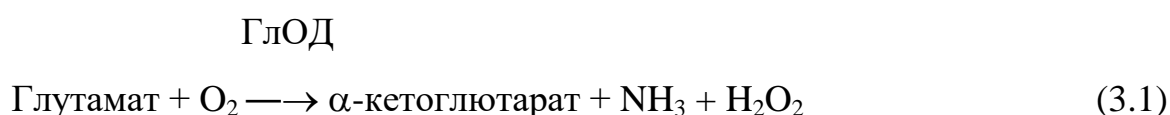
Результати представлені як середньо квадратичне значення  $\pm$  квадратична похибка середнього значення за результатами  $n$  незалежних експериментів. Різницю між двома групами оцінювали з використанням t-тесту Стьюдента. Різниця вважалася статистично достовірною, коли  $P \leq 0,05$ .

## РОЗДІЛ 3

### РОЗРОБКА АМПЕРОМЕТРИЧНОГО ГЛУТАМАТ-ЧУТЛИВОГО БІОСЕНСОРА

#### 3.1. Принцип роботи біосенсора

В основі роботи амперометричного біосенсора для визначення глутамату лежить ферментативна реакція (3.1), 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 (3.2), в результаті якої утворюються електрони, що безпосередньо реєструються амперометричним перетворювачем:



#### 3.2. Покращення селективності амперометричного перетворювача за допомогою ПФД мембрани

В даній роботі розробляли безмедіаторний біосенсор з відносно високим робочим потенціалом (+0,6 В відносно Ag/AgCl електрода порівняння), через що на поверхні електроду можливе окиснення деяких електроактивних сполук,



які можуть бути присутніми в досліджуваних зразках. Одним з напрямків для запобігання окиснення інтерферуючих речовин є нанесення додаткових напівпроникних мембран, які селективно пропускають до електрода цільову речовину (в нашому випадку – пероксид водню) [118]. Як відомо, з-поміж широкого класу окси- та аміноароматичних речовин, які здатні до електрополімеризації, в біосенсорах найчастіше використовують ізомери фенілендіаміну [119–124]. Найкращою селективністю характеризуються перетворювачі, модифіковані полімерною плівкою на основі *m*-фенілендіаміну, який було використано нами як мономер для створення додаткової мембрани на поверхні платинового електрода за методикою, описаною в [119]. Ця мембрана утворює пори, які пропускають пероксид водню до поверхні електрода, але їх розмір є недостатнім для проходження більших за розміром молекул.

Для формування ПФД мембрани використовували електрополімеризацію фенілендіаміну при циклічній вольтамперометрії (рис. 3.1). Умови проведення вольтамперометрії наведено в розділі 2.3.

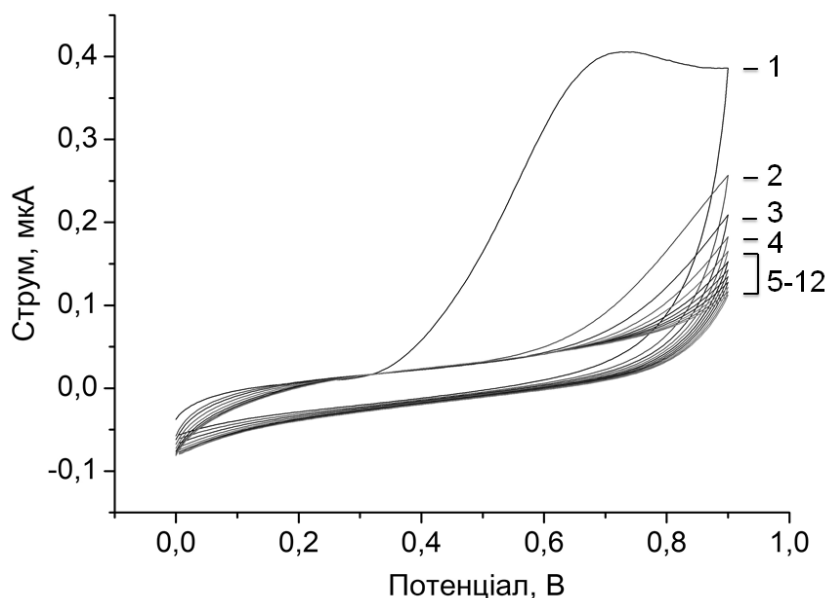


Рис. 3.1. Циклічні вольтамперограми, отримані при формуванні поліфенілендіамінової мембрани на дисковому платиновому електроді

Як видно з рис. 3.1, найбільша сила струму внаслідок окиснення фенілендіаміну спостерігалась при першому циклі, в той час як останні вольтамперограми майже не відрізнялися одна від одної, що свідчить про закінчення формування ПФД шару на поверхні робочого електроду. Форма отриманих циклічних вольтамперограм цілком співпадала з вольтамперограмами, наведеними в першоджерелі [119].

Для перевірки ефективності модифікованого перетворювача було досліджено його чутливість до інтерферентів до та після нанесення ПФД мембрани. Інтерферуючими речовинами виступали аскорбінова кислота, дофамін, сечова кислота, парацетамол (N-ацетил-*p*-амінофенол) та цистеїн. Дані речовини є досить поширеними в біологічних зразках і можуть окислюватись, коли до амперометричного перетворювача прикладається потенціал +0,6 В. До нанесення ПФД мембрани перетворювач досить сильно реагував на дані речовини, що спотворювало результати вимірювання концентрації глутамату в зразках біологічних рідин та харчових продуктів. Втім, після нанесення ПФД мембрани на перетворювач, відгуки на інтерференти зменшились на 90 – 100 %, при цьому чутливість перетворювача до пероксиду водню зменшилась лише на приблизно 20 % (рис. 3.2). Також під час експериментів було виявлено, що при нанесенні ПФД мембрани на перетворювач, покращується відтворюваність відгуків біосенсора на глутамат.

Оскільки ефективність ПФД мембрани може зменшуватись з часом внаслідок поступового руйнування мембрани, було порівняно відгуки на аскорбінову кислоту до та після зберігання біосенсора в сухому вигляді при -18 °С (одночасно з дослідженням стабільності біоселективного елементу при зберіганні).

Таким чином, мембрана працювала ефективно і в подальшому використовувалась при розробці глутамату-чутливих біосенсорів.

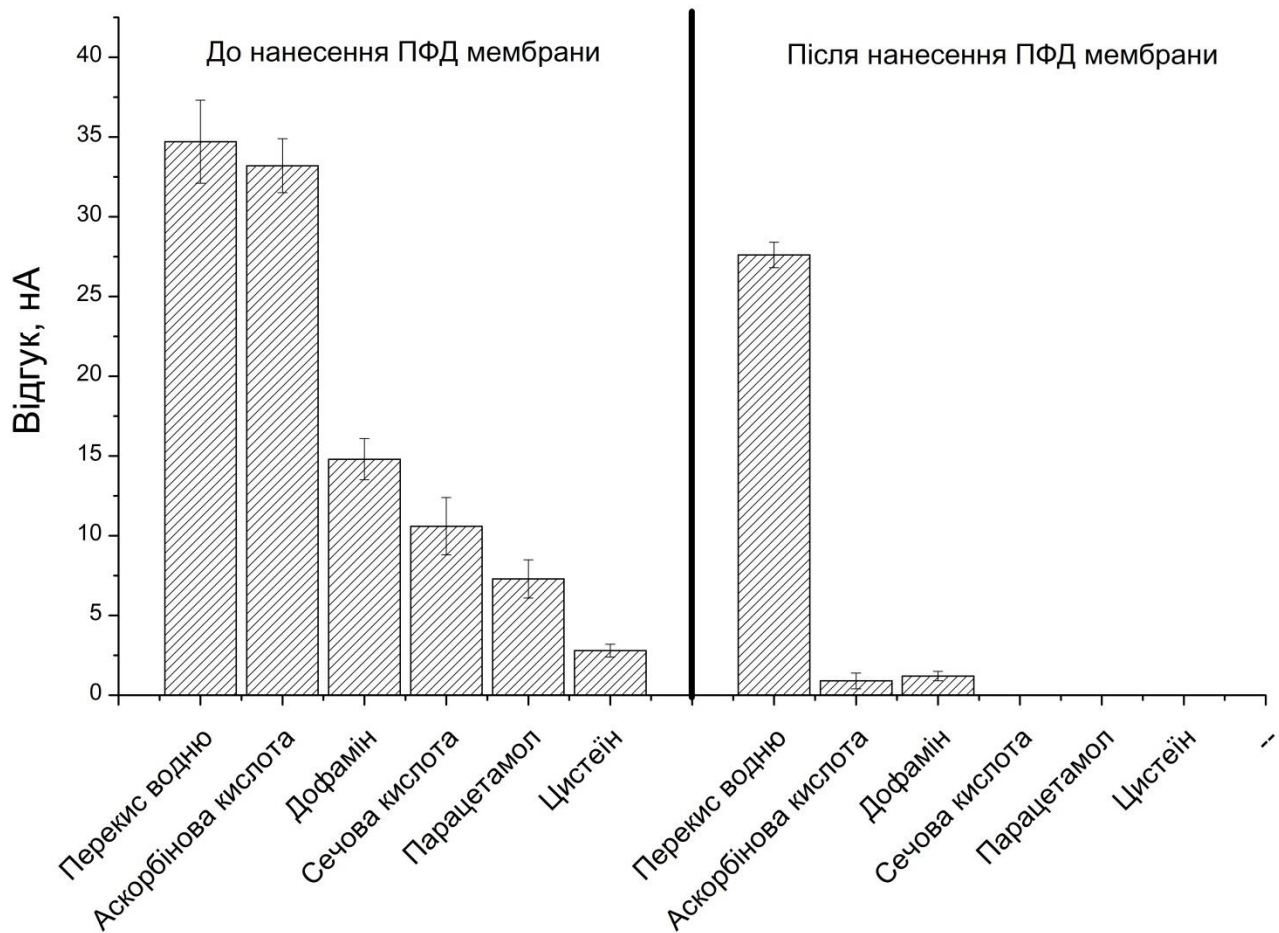


Рис. 3.2. Селективність амперометричного перетворювача до та після нанесення ПФД мембрани. Концентрація перексиду водню складала 50 мкМ, аскорбінової кислоти – 500 мкМ, дофаміну – 20 мкМ, сечової кислоти – 100 мкМ, парацетамолу – 100 мкМ, цистеїну – 100 мкМ (ці концентрації відповідають можливому вмісту даних речовин в зразках). Вимірювання проводили у 25 мМ НЕРЕС буфері, рН 7,4, за постійного потенціалу +0,6 В відносно Ag/AgCl електрода порівняння

### 3.3. Підбір умов формування біоселективного елементу

Дуже важливим фактором, що безпосередньо впливає на аналітичні характеристики біосенсора, є методика формування біоселективного елементу. Тому наступним етапом роботи був підбір та оптимізація умов формування

біоселективного елементу на поверхні перетворювача з попередньо нанесеною ПФД-мембраною.

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. Для дослідження методу іммобілізації шляхом адсорбції на силікаліті спочатку формували шар силікаліту на поверхні дискового платиного перетворювача. Було використано 2,5 % суспензію силікаліту в 20 мМ НЕРЕС, рН 6,5. На робочу поверхню перетворювача наносили 0,15 мкл розчину, після чого його нагрівали впродовж 60-90 с до температури 150 °С. Дана величина температури не чинить впливу на силікаліт і на робочі характеристики перетворювача. Після цього перетворювач охолоджували до кімнатної температури та на його робочу поверхню наносили 0,15 мкл 4% розчину ГЛОД та висушували на повітрі впродовж 5 хв. Для іммобілізації не використовували більш ніяких допоміжних речовин. Далі, біосенсор відмивали від незв'язаного ферменту впродовж 10 хв та проводили вимірювання.

Іншою методикою, що використовувалась в експерименті, була іммобілізація ГЛОД в БСА мембрані в насичених парах глутарового альдегіду. У цьому випадку, для створення біоселективної мембрани використовували розчин 4% ГЛОД (з додаванням 5 % розчину БСА та 10 % гліцеролу). На поверхню електрода наносили 0,15 мкл розчину, після чого впродовж 30 хв тримали в насичених парах ГА і потім висушували 15 хв при кімнатній температурі. Далі перетворювач занурювали в робочий буфер на 20 хв для відмивання від незв'язаних компонентів мембрани та надлишку ГА.

Для приготування біоселективних елементів за допомогою іммобілізації в БСА мембрані за допомогою розчину ГА використовували також 4 % розчин ГЛОД (з додаванням 5 % розчину БСА та 10 % гліцеролу), але перед нанесенням на поверхню електроду його змішували з 2 % водним розчином ГА у пропорції 1:1. Відразу після цього суміш наносили на поверхню амперометричного перетворювача (0,15 мкл) та висушували впродовж 30 хв

при кімнатній температурі. Після висихання мембран біосенсор занурювали у робочий буфер на 20 хв для відмивання від надлишку ГА.

Порівнювали важливі для роботи біосенсора характеристики: чутливість біосенсора, час повного відгуку, лінійний діапазон роботи біосенсора та відтворюваність відгуків. Результати іммобілізації ферменту в БСА мембрані з використанням розчину ГА виявились кращими, ніж результати іммобілізації ферменту за допомогою інших методик, тому для подальшої роботи було вибрано саме цей метод іммобілізації.

Під час іммобілізації ферменту на поверхні амперометричного перетворювача ГА утворює ковалентні зв'язки з ферментом та допоміжними речовинами (БСА); внаслідок цього процесу активність ферменту може змінюватися в залежності від концентрації ГА та часу іммобілізації. Тому для оптимізації роботи біосенсора далі було проведено підбір концентрації ГлОД, ГА та тривалості іммобілізації.

**Підбір концентрації ГлОД.** Для проведення цього експерименту було приготовлено вихідний розчин з концентрацією ГлОД 8 % (з додаванням 4 % розчину БСА та 10 % гліцеролу як допоміжних речовин), який змішували із 0,8 % розчином ГА та розчином БСА з гліцеролом у пропорції потрібній для отримання необхідної концентрації ГлОД та проводили іммобілізацію впродовж 30 хв. Внаслідок цього, масова частка ГлОД у біоселективному елементі складала від 0,5 % до 6 % (на початку іммобілізації) (рис. 3.3).

Результати експерименту показали, що відгуки біосенсора були майже однаковими при концентраціях від 1 до 4 % і знижувались при концентраціях нижче 1 %, тому що кількість ферменту була недостатньою для ефективного каталізу. Збільшення концентрації ГлОД до 6 % призводило до незначного, статистично недостовірного зменшення чутливості біосенсора до глутамату. Крім того, мінімальна межа визначення глутамату зменшувалась при збільшенні концентрації ГлОД і найменше значення спостерігалось при концентрації ГлОД 4 %. Тому для подальших експериментів використовували ГлОД у концентрації 4%.

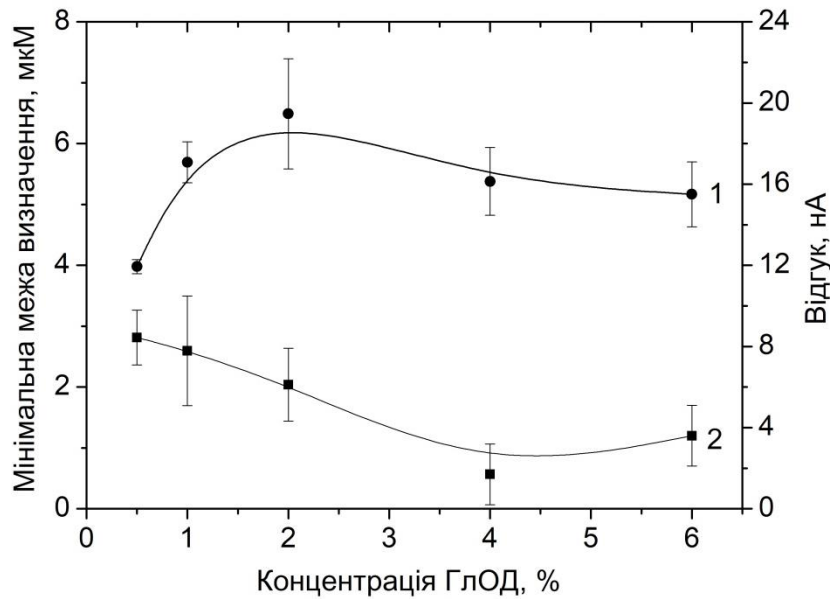


Рис. 3.3. Залежність відгуків біосенсора та мінімальної межі визначення глутамату від концентрації ГЛОД у мембрані. Концентрація глутамату – 100 мкМ. Вимірювання проводили у 25 мМ НЕРЕС буфері, рН 7,4, за постійного потенціалу +0,6 В відносно Ag/AgCl електрода порівняння. 1 – відгук біосенсора, 2 – мінімальна межа визначення

**Підбір концентрації ГА.** Для підбору оптимальної концентрації ГА виготовляли біоселективні елементи з масовою часткою ГА 1 %, 0,4 % та 0,2 %. Відгуки при додаванні 100 мкМ глутамату були дуже маленькими ( $2 \pm 0,5$  нА) за концентрації ГА в мембрані 1 % і достатніми для роботи за концентрації ГА 0,4 % та 0,2 % ( $15 \pm 2$  нА та  $21 \pm 3$  нА, відповідно). Це пояснюється тим, що при іммобілізації з великою концентрацією ГА активність ГЛОД втрачалась швидше. Проте, з іншого боку, за малої концентрації ГА (0,2 %) спостерігалось поступове зменшення відгуків біосенсора під час багаторазового використання (в середньому кожен наступний відгук був на 8% меншим за попередній), обумовлене слабшим зв'язуванням ферменту та поступовим його вимиванням з біоселективного елементу. Тому для подальшої роботи було вирішено використовувати концентрацію ГА 0,4 % при іммобілізації біоселективного

елементу біосенсору, за якої величина відгуків біосенсора була достатньою для ефективної і стабільної роботи.

**Підбір часу іммобілізації.** Також було перевірено роботу біосенсора в залежності від тривалості іммобілізації біоселективного елемента (від 20 до 40 хвилин). Слід відзначити, що після іммобілізації ферменту впродовж 20 хв спостерігалось поступове зменшення відгуків біосенсора впродовж роботи, обумовлене нестійкою іммобілізацією ферменту і швидким вимиванням його в робочий буфер. На рис. 3.4 показано залежність відгуків біосенсора та мінімальної межі вимірювання глутамату від часу іммобілізації ферменту. Як бачимо, найвищі відгуки біосенсора на глутамат та найменша мінімальна межа визначення спостерігались при іммобілізації впродовж 30 хв, тому саме цей час іммобілізації і використовувався для подальших експериментів.

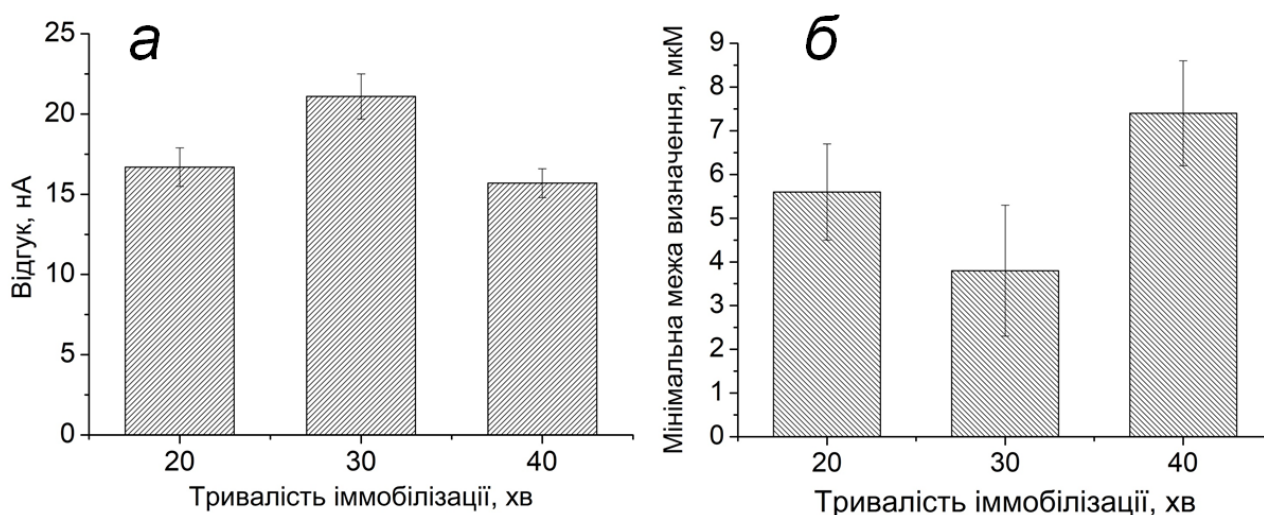


Рис. 3.4. Залежність величини відгуків біосенсора (а) та мінімальної межі визначення глутамату (б) від тривалості іммобілізації ферменту. Концентрація глутамату – 100 мкМ. Вимірювання проводили у 25 мМ НЕРЕС буфері, рН 7,4, за постійного потенціалу +0,6 В відносно Ag/AgCl електрода порівняння

Таким чином, в результаті підбору умов іммобілізації ферменту на поверхні робочого перетворювача з нанесеною ПФД-мембраною були вибрані наступні оптимальні умови: концентрація ферменту – 4 %, концентрація глутарового альдегіду – 0,4 % та тривалість іммобілізації – 30 хв. На рис. 3.5

зображено типовий відгук біосенсора на додавання 20 мкМ глутамату до робочої комірки.

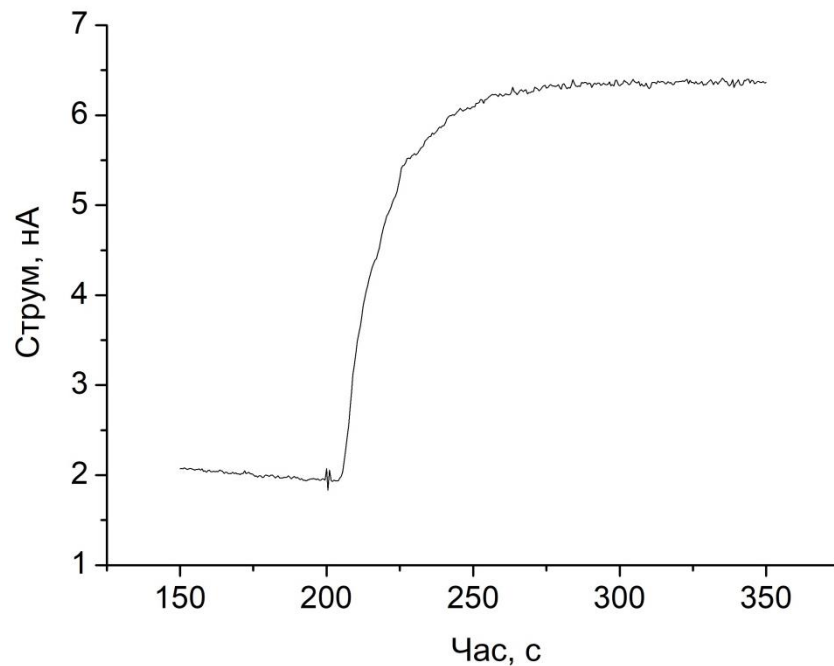


Рис. 3.5. Типовий відгук біосенсора на додавання 20 мкМ глутамату до робочої комірки (додавання проведено після 200 с після початку дослідження). Вимірювання проводили у 25 мМ HEPES буфері, рН 7,4, за постійного потенціалу +0,6 В відносно Ag/AgCl електрода порівняння

Як видно з рисунка, біосенсор починає реагувати одразу після додавання глутамату і максимальний відгук спостерігається вже через одну хвилину.

### 3.4. Вплив рН буферу на роботу біосенсора

Внаслідок іммобілізації ферменту може змінюватись рН оптимум його роботи. Тому було проведено дослідження впливу рН буферу на роботу розробленого амперометричного біосенсора для визначення глутамату. Для проведення експерименту було використано «універсальний буфер» (що містив тріс-НСІ,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 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. 3.6.

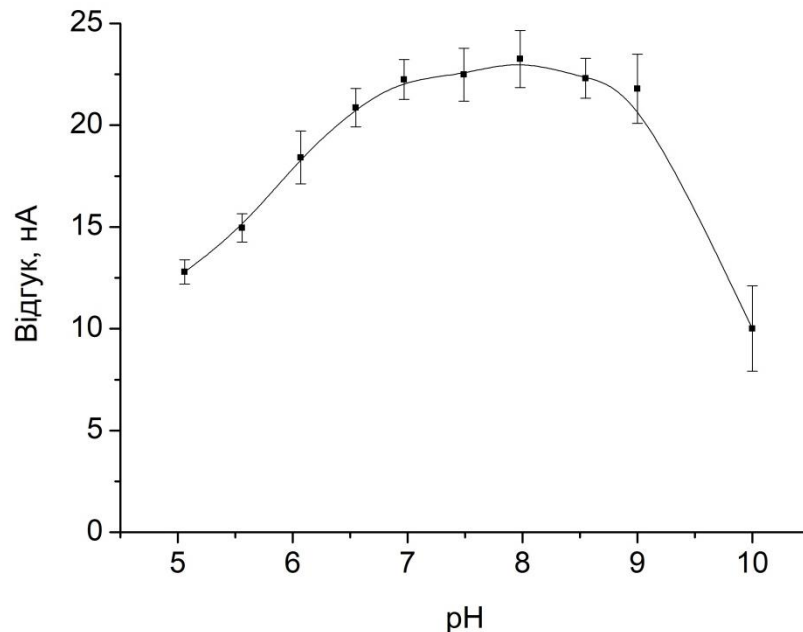


Рис. 3.6. Залежність величини відгуків біосенсора від рН «універсального» буферного розчину. Концентрація глутамату – 100 мкМ. Вимірювання проводили за постійного потенціалу +0,6 В відносно Ag/AgCl електрода порівняння

Як бачимо з рисунка, найкращі відгуки біосенсора спостерігались в діапазоні рН 7 – 9. Для подальшої роботи використовували рН крові (7,4).

### 3.5. Вплив іонної сили буферу на роботу біосенсора

Як відомо, робота кожного біосенсора залежить як від його власних характеристик, так і від властивостей розчину, в якому виконують вимірювання. Біологічні зразки, крім наявності в них різних електроактивних сполук, можуть характеризуватися значною іонною силою. Наприклад, присутніми можуть бути іони металів, що є в будь-яких клітинах та біологічних рідинах:  $K^+$ ,  $Na^+$ ,  $Mg^{2+}$  та ін., а також іони органічних та неорганічних кислот. Іонна сила розчину змінюється також залежно від концентрації буферного

розчину. Тому було вирішено дослідити роботу біосенсора в залежності від різних значень іонної сили. Результати дослідження представлено на рис. 3.7.

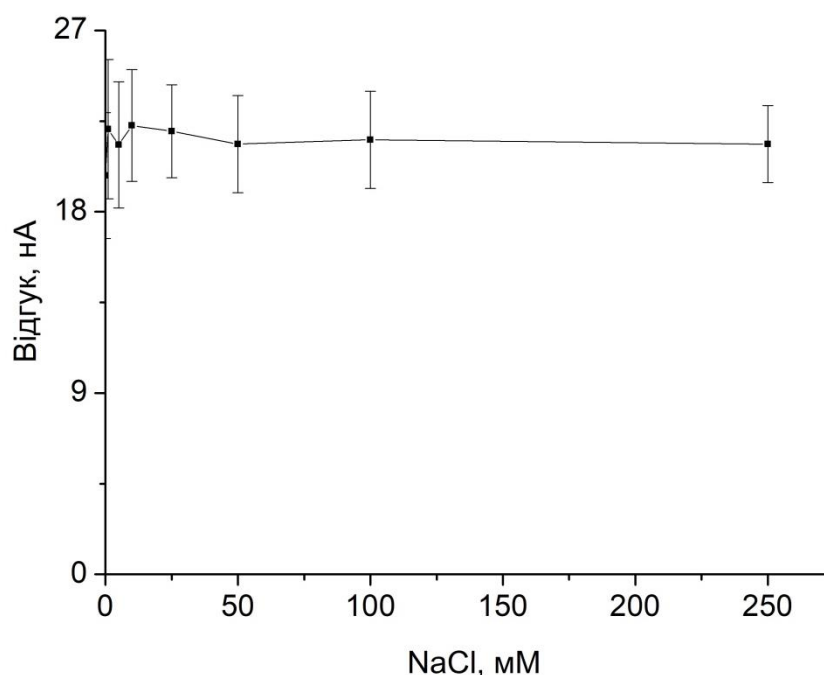


Рис. 3.7. Залежність величини відгуків біосенсора від іонної сили розчину. Концентрація глутамату – 100 мкМ. Вимірювання проводили у 25 мМ HEPES буфері, рН 7,4, за постійного потенціалу +0,6 В відносно Ag/AgCl електрода порівняння

Як джерело іонів було використано 3,3 М розчин NaCl, необхідні об'єми якого додавали до робочої комірки, щоб отримати в робочому буфері кінцеві концентрації до 250 мМ. Отримували відгуки біосенсора на 100 мкМ концентрацію глутамату і відмивали біосенсор робочим буфером для подальших вимірювань.

Як бачимо, 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 з різною іонною силою.

### 3.6. Вплив буферної ємності на роботу біосенсора

Концентрація буферних компонентів, а, відповідно, і буферна ємність, також може впливати на роботу біосенсора. Тому було вирішено дослідити також вплив концентрації буферних компонентів на величину відгуків біосенсора. Було отримано відгуки біосенсора при концентраціях HEPES від 5 до 200 мМ.

На рис. 3.8 наведено результати перевірки залежності відгуків розробленого біосенсора для визначення глутамату від концентрації робочого буферного розчину.

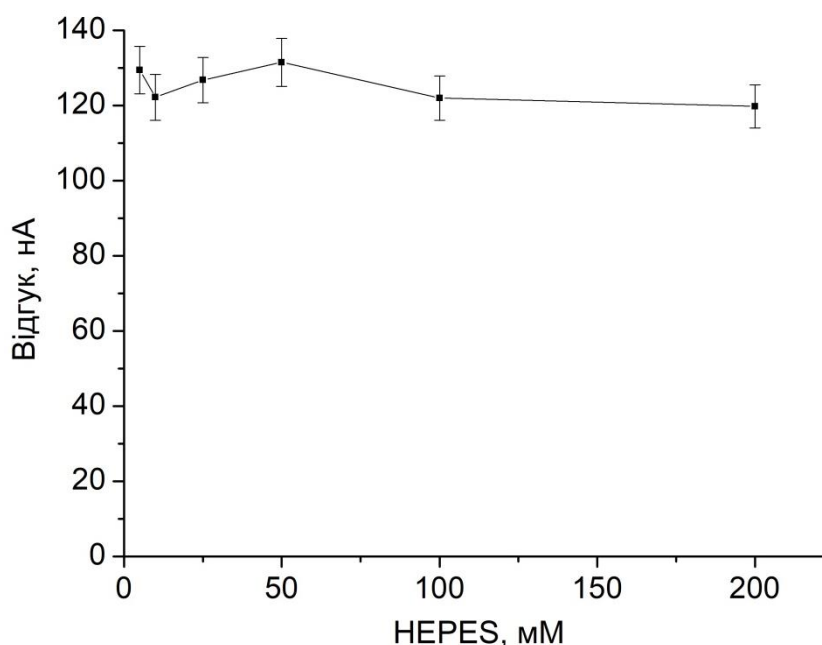


Рис. 3.8. Залежність величини відгуків біосенсора від концентрації HEPES буферу. Концентрація глутамату – 0,7 мМ. Вимірювання проводили при рН 7,4, за постійного потенціалу +0,6 В відносно Ag/AgCl електрода порівняння

Як бачимо, величини відгуків біосенсора практично не змінювались зі збільшенням концентрації HEPES. Це дає можливість використовувати розроблений біосенсор для визначення глутамату в біологічних зразках з різними буферними ємностями.

### 3.7. Дослідження аналітичних характеристик біосенсора

При використанні 25 мМ НЕРЕС буферу, рН 7,4, мінімальна межа визначення глутамату становила 2 – 4 мкМ. Вона несуттєво змінювалась в залежності від конкретного біосенсора та зростала в процесі використання. Лінійний діапазон роботи біосенсора був від 5 до 700 мкМ, чутливість до глутамату становила 180-210 нА/мМ.

Калібрувальний графік біосенсора для визначення глутамату наведена на рис. 3.9. Лінійна ділянка даного калібрувального графіка описується рівнянням  $I = 210 \cdot C \pm 0,3$  ( $R^2 = 0,999$ ), де  $I$  – сила струму після виходу відгуку на плато (steady-state response) (нА),  $C$  – концентрація глутамату (мМ).

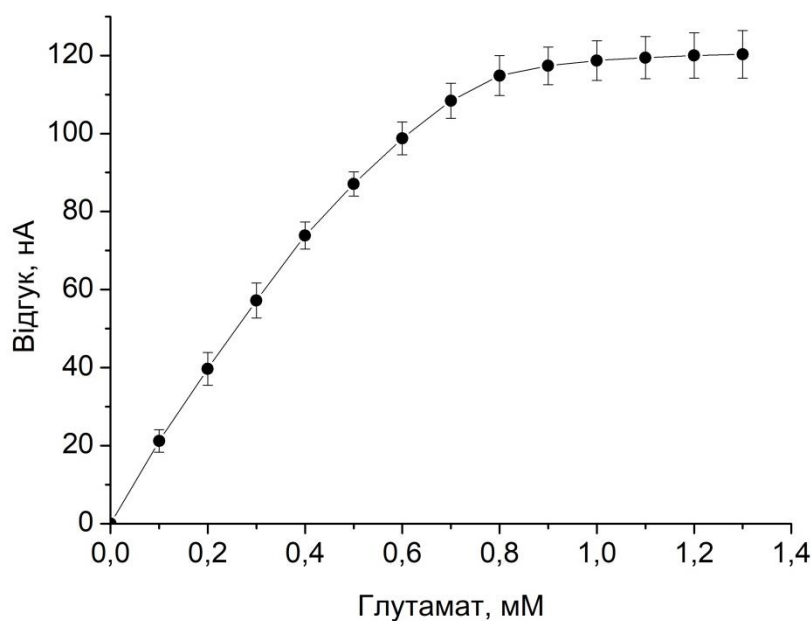


Рис. 3.9. Калібрувальний графік глутамат-чутливого біосенсора. Вимірювання проводили у 25 мМ НЕРЕС буфері, рН 7,4, за постійного потенціалу +0,6 В відносно Ag/AgCl електрода порівняння

На рис. 3.10. зображена ділянка калібрувального графіка для низьких концентрацій глутамату.

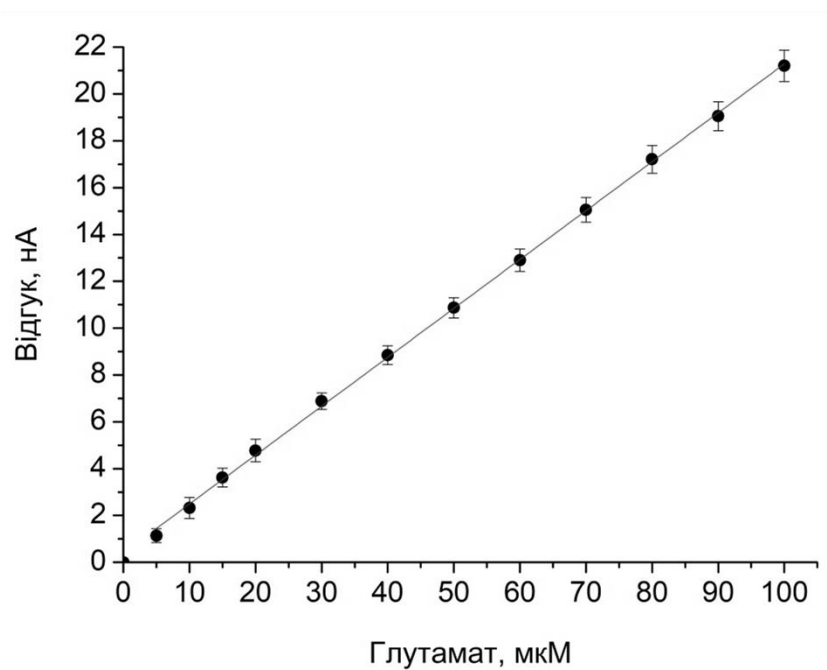


Рис. 3.10. Ділянка калібрувального графіка біосенсора для визначення низьких концентрацій глутамату. Вимірювання проводили у 25 мМ HEPES буфері, рН 7,4, за постійного потенціалу +0,6 В відносно Ag/AgCl електрода порівняння

### 3.7.1. Відтворюваність відгуків біосенсора при визначенні глутамату.

Відтворюваність відгуків біосенсора є одним з основних показників якості його роботи. Для того, щоб мати змогу досить точно вимірювати концентрацію глутамату в розчині, відгуки біосенсора повинні бути практично однаковими. Тим більш це дуже важливо, коли потрібно вимірювати малі концентрації.

Тому було досліджено відтворюваність відгуків біосенсора впродовж декількох годин безперервної роботи. Одне вимірювання глутамату займало 3 – 5 хв, проміжок між вимірюваннями складав близько 10 хв; за цей час біосенсори відмивали від субстрату, кілька разів змінюючи робочий буферний розчин.

Результати дослідження відтворюваності відгуків біосенсорів на глутамат представлено на рис. 3.11.

Помітної зміни величини відгуків за 12 вимірювань не відбувалось; відносне середньоквадратичне відхилення відгуків на глутамат в середньому становило не більше 5 %.

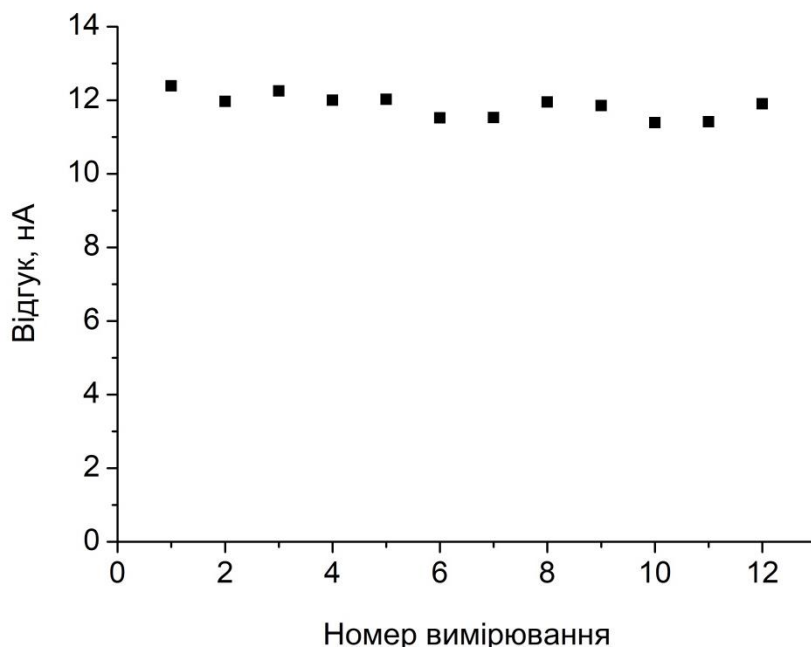


Рис. 3.11. Відтворюваність відгуків біосенсора на 50 мкМ глутамат впродовж 12 вимірювань. Вимірювання проводили у 25 мМ HEPES буфері, рН 7,4, за постійного потенціалу +0,6 В відносно Ag/AgCl електрода порівняння

Також з отриманих даних було пораховано, наскільки змінюється мінімальна межа визначення глутамату при роботі біосенсора впродовж дня (рис. 3.12).

Найменша мінімальна межа визначення спостерігалась на початку роботи біосенсора (одразу після іммобілізації ферменту), а під час безперервної роботи біосенсора мінімальна межа визначення дещо збільшувалась, однак підвищення було несуттєвим. Зокрема, найбільшою межа визначення була під час 3, 4, 9, 10, 12 і 13 вимірювань. Дані зміни пов'язані зі збільшенням рівня шуму сигналу біосенсора впродовж роботи.

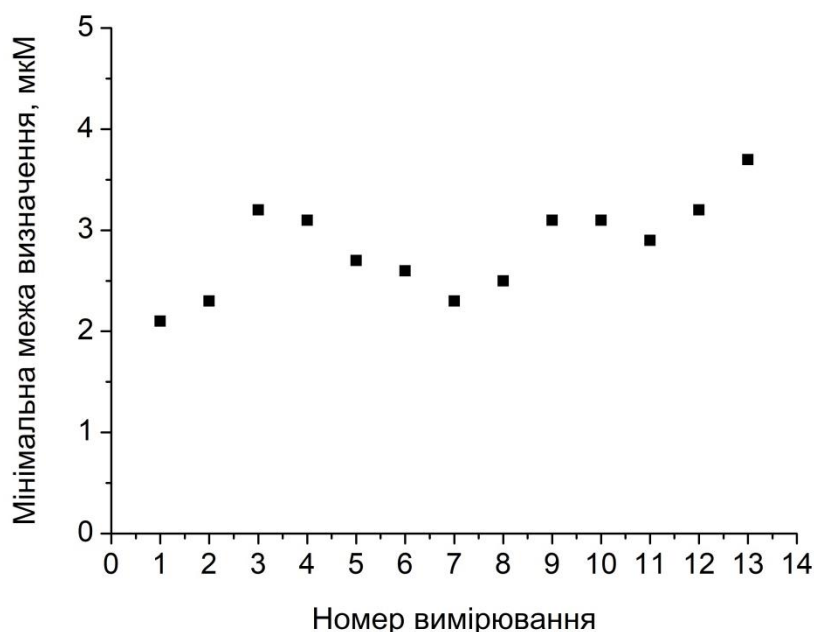


Рис. 3.12. Зміна мінімальної межі визначення глутамат-чутливого біосенсора впродовж кількох годин роботи. Концентрація глутамату при проведенні вимірювань становила 50 мкМ. Вимірювання проводили у 25 мМ HEPES буфері, рН 7,4, за постійного потенціалу +0,6 В відносно Ag/AgCl електрода порівняння

**3.7.2. Відтворюваність приготування біосенсора.** При масовому виробництві біосенсорів відтворюваність їх приготування є також дуже важливою характеристикою. Її досліджували шляхом створення дванадцяти глутамат-чутливих біосенсорів, після чого отримували відгуки біосенсорів на зразки глутамату різних концентрацій.

Величини цих відгуків для трьох концентрацій (100, 300 та 500 мкМ) наведені на рис. 3.13. Відносне стандартне відхилення відгуків різних біосенсорів на глутамат не перевищувало 12 %, що є допустимим.

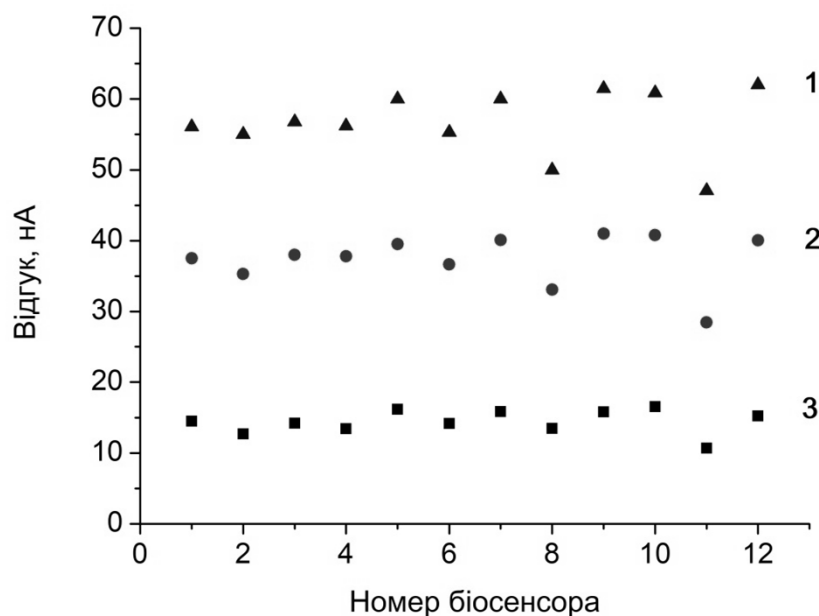


Рис. 3.13. Відгуки на додавання глутамату, отримані різними біосенсорами. Вимірювання проводили у 25 мМ HEPES буфері, рН 7,4, за постійного потенціалу +0,6 В відносно Ag/AgCl електрода порівняння. Концентрації глутамату: 500 мкМ (1), 300 мкМ (2), 100 мкМ (3)

Калібрувальні графіки для визначення глутамату у діапазоні від 50 до 500 мкМ всіх 12 біосенсорів, представлені на рис. 3.14, мали подібну форму. Оскільки перетворювачі мали розбіжність у чутливості до пероксиду водню (близько 20%), для більш точної оцінки відтворюваності виготовлення біоселективної мембрани на даному рисунку відгуки різних біосенсорів було нормалізовано – чутливість одного біосенсора було прийнято за стандартну, а відгуки кожного наступного біосенсора були помножені на відношення чутливості першого біосенсора (до пероксиду водню) до чутливості даного біосенсора. Таким чином отримували калібрувальні графіки, які біосенсори мали б за умови однакової чутливості до пероксиду водню. Оскільки кожен біосенсор перед використанням калібрують, то те, що величина відгуків на глутамат різних біосенсорів дещо відрізнялася, не становило проблеми.



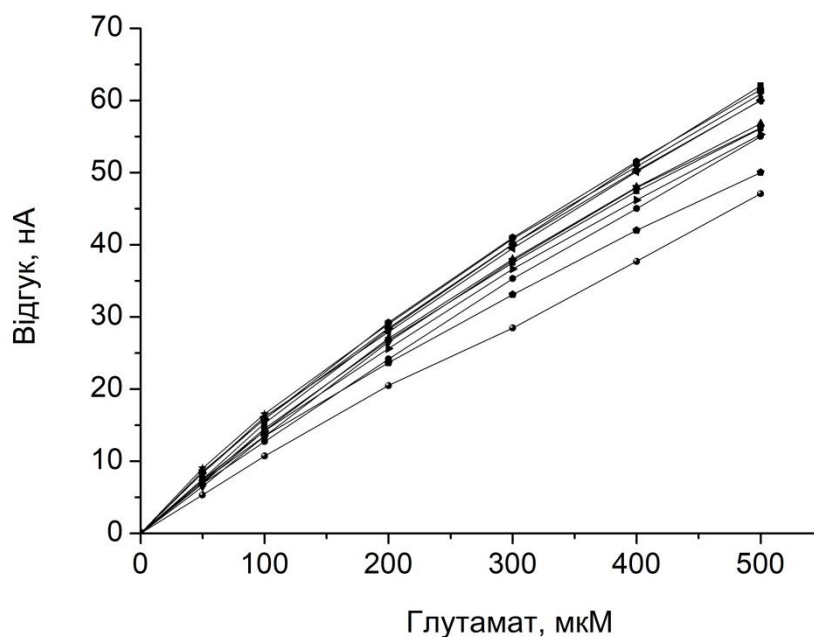


Рис. 3.14. Калібрувальні графіки, отримані за допомогою різних глутамат-чутливих біосенсорів. Вимірювання проводили у 25 мМ HEPES буфері, рН 7,4, за постійного потенціалу +0,6 В відносно Ag/AgCl електрода порівняння

**3.7.3. Операційна стабільність біосенсора.** Можливість довготривалого використання біосенсора для проведення великої кількості вимірювань є дуже важливою характеристикою. Часто трапляється так, що через певний час роботи біосенсора компоненти біоселективної мембрани можуть інактивуватися чи вимиватися. Причиною такого вимивання може бути дифузія компонентів мембрани, що погано зв'язані з мембраною. Це призводить до певного падіння відгуків біосенсорів в процесі роботи, а, відповідно, до зменшення чутливості біосенсора.

Тому метою наступного етапу роботи була перевірка операційної стабільності розробленого біосенсора на основі ГЛОД. Для цього впродовж дня отримували 8-12 відгуків на 50 мкМ глутамат. До наступного використання біосенсор зберігали в сухому вигляді за температури  $-18^{\circ}\text{C}$ . Далі, через кілька днів, знову впродовж кількох годин отримували відгуки біосенсора на ті самі концентрації глутамату. Сумарний термін перевірки стабільності роботи біосенсора становив 11 днів. Результати дослідження представлено на рис. 3.15.

Як видно з рисунку, відгуки залишались стабільними впродовж всього періоду вимірювань.

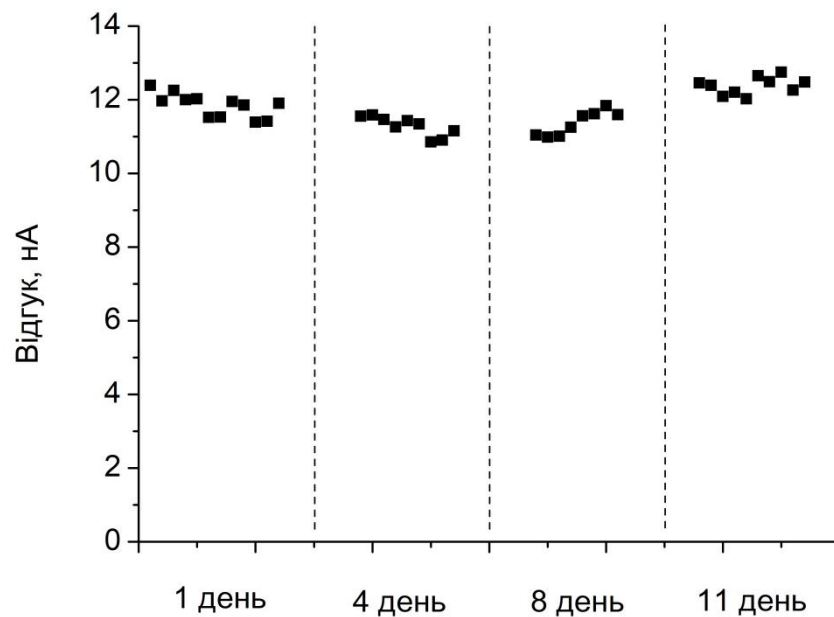


Рис. 3.15. Стабільність відгуків біосенсора впродовж декількох днів. Концентрація глутамату – 50 мкМ. Вимірювання проводили у 25 мМ НЕРЕС буфері, рН 7,4, за постійного потенціалу +0,6 В відносно Ag/AgCl електрода порівняння

**3.7.4. Стабільність біосенсора при зберіганні.** З метою підбору оптимальних умов зберігання розробленого біосенсора, було проведено вимірювання відгуків на глутамат при зберіганні біосенсора в різних умовах. Сумарний термін зберігання становив 65 днів. Результати дослідження зображено на рис. 3.16.

Біосенсори зберігали у сухому вигляді та зануреними чутливими ділянками в буферний розчин (25 мМ НЕРЕС, рН 7,4) при різних температурах: +25 °С, +4 °С і -18 °С (в останньому випадку – лише в сухому вигляді).

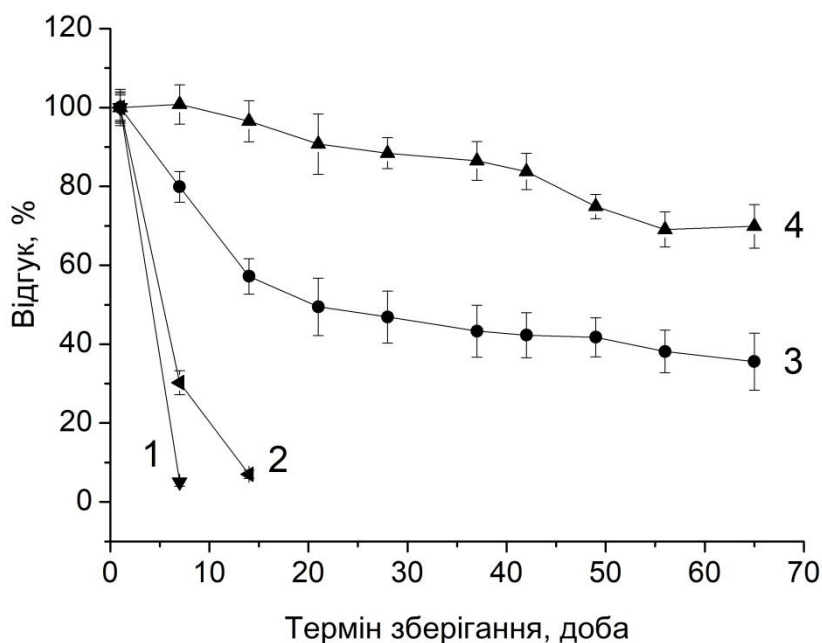


Рис. 3.16. Дослідження впливу наступних умов зберігання біосенсора на величину його сенсорного відгуку: +25 °С в сухому стані (1), +25 °С в буфері НЕРЕС (2), +4 °С в сухому стані (3) та -18 °С в сухому стані (4). Концентрація глутамату – 100 мкМ. Вимірювання проводили у 25 мМ НЕРЕС буфері, рН 7,4, за постійного потенціалу +0,6 В відносно Ag/AgCl електрода порівняння

Для покращення відгуків на глутамат при зберіганні біосенсора в буферному розчині, до буфера було додано: 1 мМ ДТТ, 1 мМ ЕДТА та 0,1%  $\text{NaN}_3$ , оскільки було отримано гарні результати відгуків при зберіганні інших біосенсорів в буфері з такими речовинами-добавками [125].

Найгірше біосенсори зберігались за температури +25 °С – вже через 2 тижні відгуки біосенсорів на глутамат були практично відсутніми. Значно кращі результати були отримані при зберіганні біосенсорів в сухому стані при +4 °С – через 2 місяці зберігання їхні відгуки зменшились приблизно до 40% від початкових значень. На жаль, відгуки біосенсора при зберіганні в буферному розчині при +4 °С виявились нестабільними, тому на графіку ці результати не наведено. Найкращим виявилось зберігання за температури -18 °С – 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.

**3.7.5. Селективність біосенсора.** Глутамат-чутливий біосенсор призначений для визначення глутамату в зразках центральної нервової системи та в деяких харчових продуктах. Крім глутамату в даних зразках можуть бути присутні такі речовини, що окиснюються при прикладенні потенціалу і можуть давати хибний позитивний відгук (аскорбінова кислота, цистеїн, сечова кислота та ін.). Їх вплив ми нівелювали використанням ПФД мембрани. Але зразки, наприклад, біологічних рідин можуть містити і інші інтерференти. Наші подальші дослідження показали, що сечовина, ЕДТА, глюкоза, лимонна кислота, бензойна кислота, азид натрію,  $\alpha$ -кетоглутарат, NaCl, KCl та CaCl<sub>2</sub> не призводили до відгуків біосенсора при концентрації даних речовин у робочій комірці 1 мМ. Також присутність даних речовин не впливала на величину відгуку біосенсора на глутамат.

Також була перевірена чутливість розробленого біосенсора до різних амінокислот (рис. 3.17).

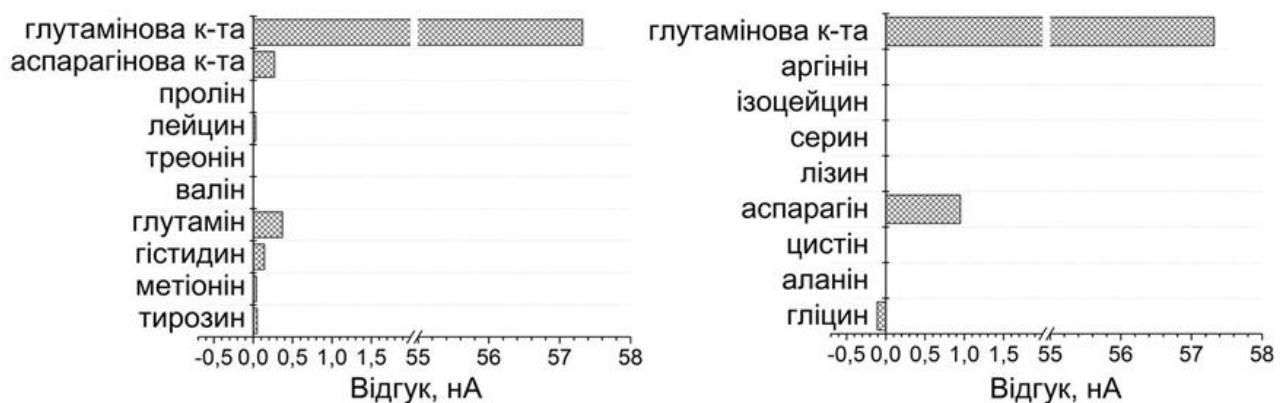


Рис. 3.17. Відгук біосенсора на додавання різних амінокислот. Концентрація всіх амінокислот – 1 мМ. Вимірювання проводили у 25 мМ НЕРЕС буфері, рН 7,4, за постійного потенціалу +0,6 В відносно Ag/AgCl електрода порівняння

Біосенсор не реагував на більшість амінокислот. Невелика чутливість біосенсора спостерігалась до аспарагіну, аспарагінової кислоти, глутаміну та гістидину, але чутливість до глутамату була більшою в 50-100 разів, тому присутність навіть високих концентрацій амінокислот у зразку не призведе до значної похибки у вимірюваннях. Наприклад, концентрація аспарагіну має перевищувати концентрацію глутамату в 20 разів для того, щоб призвести до похибки в вимірюваннях. Проте зазвичай концентрація аспарагіну не є більшою за концентрацію глутамату. Наприклад, за даними сайту американської діагностичної лабораторії «Quest Diagnostics» ([www.questdiagnostics.com](http://www.questdiagnostics.com)), середня концентрація глутамату в плазмі крові дорослих людей становить 53,5 мкМ, а аспарагіну – 47,5 мкМ. Отримані результати чутливості розробленого біосенсора до амінокислот співпадають з даними, отриманими іншою групою дослідників при розробці іншого біосенсора на основі ГЛОД [83]. Чутливість біосенсора до деяких амінокислот можна пояснити не ідеальною селективністю ГЛОД до глутамату та присутністю слідових кількостей інших ферментів, що залишились після очищення ГЛОД, таких як оксидаза L-амінокислот.

З результатів вимірювань видно, що біосенсор на основі ГЛОД характеризується високою селективністю до глутамату і придатний для вимірювання зразків біологічних рідин та харчових продуктів.

### **3.8. Підсумки**

Покращено селективність перетворювача за допомогою нанесення поліфенілєндіамінової мембрани та перевірено її ефективність.

Проведено підбір та оптимізацію умов іммобілізації ферменту на поверхні робочого перетворювача (досліджено залежність роботи біосенсора від концентрації ферменту, глутарового альдегіду та тривалості іммобілізації).

Досліджено вплив параметрів розчину (рН, іонна сила, буферна ємність) на роботу біосенсора. Показано, що найкращі відгуки біосенсора спостерігали в

діапазоні рН 7 – 9. Величина буферної ємності та іонної сили не впливала на величину відгуку біосенсора.

Мінімальна межа визначення глутамату становила 2 – 4 мкМ. Вона несуттєво змінювалась в залежності від конкретного біосенсора та зростала в процесі використання. Лінійний діапазон роботи біосенсора був від 5 мкМ до 700 мкМ, чутливість до глутамату становила 180 – 210 нА/мМ.

Розроблений біосенсор продемонстрував добру відтворюваність відгуків та операційну стабільність. Відносне середньоквадратичне відхилення відгуків на глутамат впродовж дня в середньому становило 5 %. Також було перевірено відтворюваність приготування біосенсора. Відносне стандартне відхилення відгуків різних біосенсорів на глутамат становило 12 %, що є допустимим. Калібрувальні графіки для визначення глутамату всіх біосенсорів мали подібну форму і однаковий лінійний діапазон.

Проведено вимірювання відгуків на глутамат при зберіганні біосенсора в різних умовах. Найбільш прогнозованим виявилось зберігання за температури - 18 °С, оскільки в даному випадку чутливість біосенсора до глутамату зменшувалась приблизно з однаковою швидкістю, а падіння відгуків наприкінці зберігання становило 30 %. Результати свідчать про можливість використання біосенсора після тривалого зберігання, але за умови його повторного калібрування.

Також було вивчено чутливість біосенсора до різних речовин, в тому числі амінокислот, та показано, що біосенсор є високоселективним до глутамату.

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

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.

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.
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 терміналями мозку. *Sens. Electron. Microsyst. Technol.* 2016. Т. 13, № 1. С. 98–113.
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.
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.
6. 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.
7. 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., Кірдесілер 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.



## РОЗДІЛ 4

### РОЗРОБКА І ВИКОРИСТАННЯ МЕТОДИКИ БІОСЕНСОРНОГО ВИЗНАЧЕННЯ ВМІСТУ ГЛУТАМАТУ В ЗРАЗКАХ ІЗОЛЬОВАНИХ НЕРВОВИХ ТЕРМІНАЛЕЙ

#### 4.1. Дослідження накопичення глутамату синаптосомами

**4.1.1. Аналіз швидкості захоплення та рівня накопичення глутамату в синаптосомах.** Швидкість початкового захоплення та рівень накопичення глутамату нервовими терміналами є дуже важливими фізіологічними параметрами і їх визначення є актуальним завданням для медичних та нейрохімічних досліджень. Визначення цих параметрів дозволяє оцінити активність глутаматних транспортерів та їх здатність підтримувати низький позаклітинний рівень глутамату.

Ми використовували ізольовані нервові термінали (синаптосоми), очищені з кори головного мозку щурів, які зберігають всі властивості інтактних нервових терміналей, такі як здатність підтримувати мембранний потенціал, вивільняти та захоплювати нейротрансмітери. З цих причин синаптосоми є гарними модельними об'єктами для біологічних досліджень.

У нейрохімічних дослідженнях вимірювання кінетичних характеристик захоплення глутамату синаптосомами зазвичай проводиться із використанням радіоактивно-міченого глутамату [126–128]. 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, ми проводили паралельні дослідження акумуляції глутамату обома методами (рис. 4.1).

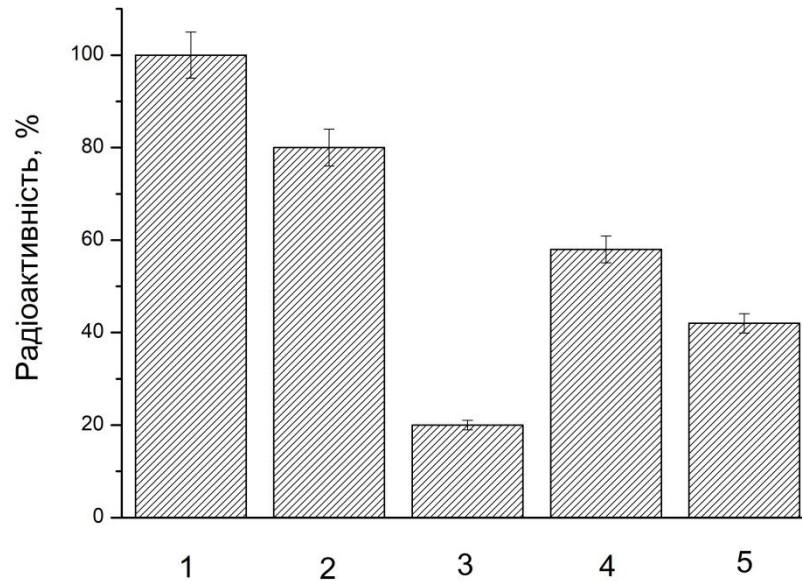


Рис. 4.1. Розподіл радіоактивного матеріалу у супернатанті та осаді після захоплення глутамату синаптосомами впродовж 1 та 10 хв у порівнянні з повною радіоактивністю зразку. Повна радіоактивність зразків синаптосом (1), радіоактивність супернатанту (2) та осаду (3) після захоплення глутамату синаптосомами впродовж 1 хвилини, радіоактивність супернатанту (4) та осаду (5) після захоплення глутамату впродовж 10 хвилин

У випадку використання радіоактивно-міченого глутамату зразки синаптосом (125 мкл суспензії, 0,2 мг/мл білка) були попередньо інкубовані у стандартному сольовому розчині при 37 °C впродовж 10 хвилин. Захоплення ініціювали додаванням 10 мкМ глутамату з 420 нМ радіоактивно-міченого L-[<sup>14</sup>C]глутамату, інкубували впродовж різного часу (1 чи 10 хвилин) при 37 °C, після чого швидко осаджували в мікроцентрифугі (20 с при 10000·g). Швидкість початкового захоплення глутамату синаптосомами розраховували як різницю між повною радіоактивністю зразків синаптосом та радіоактивністю супернатанту після інкубації синаптосом з радіоактивно-міченим глутаматом впродовж 1 хв. Рівень накопичення глутамату синаптосомами розраховували як різницю між повною радіоактивністю зразків синаптосом та радіоактивністю супернатанту після інкубації синаптосом з радіоактивно-міченим глутаматом впродовж 10 хв. Неспецифічне зв'язування нейротрансмітеру було оцінено в

зразках, які осаджувалися одразу після додавання радіоактивно-міченого глутамату.

Як показано на рис. 4.1, після інкубації впродовж 1 хв, супернатант містив  $80,0 \pm 5,0$  % від повної кількості радіоактивного глутамату, який було додано до зразка, в той час як осад містив  $20,0 \pm 5,0$  %. При збільшенні часу інкубації до 10 хвилин супернатант містив  $58,0 \pm 5,0$  % радіоактивного матеріалу, а осад –  $42,0 \pm 5,0$  %.

**4.1.2. Вимірювання базового позаклітинного рівня концентрації глутамату у зразках синапсом за допомогою біосенсора.** На початку роботи було визначено відсутність відгуку біосенсора в стандартному сольовому розчині. Перед тим, як розпочати експерименти по захопленню глутамату синапсами, вимірювали відгук глутамат-чутливого біосенсора на додавання супернатанту із зразків синапсом, отриманого одразу після попередньої інкубації холодних синапсом при  $37$  °C впродовж 10 хвилин. Цей відгук відображає базовий позаклітинний рівень концентрації глутамату, який потрібно брати до уваги при розрахунках швидкості захоплення та рівня накопичення глутамату синапсами. Ця величина може бути різною у різних зразках синапсом і залежить від функціонального стану нервових терміналей. Слід відмітити, що стандартний метод вимірювання швидкості накопичення глутамату за допомогою радіоактивної мітки не бере до уваги базового рівня глутамату. Оцінка базового позаклітинного рівня концентрації глутамату за допомогою біосенсора, а також аналіз інших вимірювань з використанням зразків синапсом проводили, використовуючи два методи обчислення: за калібрувальним графіком та стандартними додаваннями (див. «Матеріали та методи досліджень»). Середній базовий позаклітинний рівень концентрації глутамату було визначено обома підходами як  $7,9 \pm 0,6$  мкМ при концентрації білка у зразку синапсом  $0,4$  мг/мл.

Також базовий позаклітинний рівень концентрації глутамату було визначено за допомогою спектрофлуориметричного методу на основі ГлДГ, а

також амінокислотного аналізатора. У випадку спектрофлуориметричного дослідження, концентрація глутамату складала  $2,3 \pm 0,3$  мкМ при концентрації білка  $0,5$  мг/мл. При використанні амінокислотного аналізатора базовий рівень глутамату було визначено як  $2,8 \pm 0,3$  мкМ при концентрації білка  $2$  мг/мл. Дані стандартних методів є дещо нижчими, ніж результати біосенсора. Причиною цього може бути неповна селективність або чистота ГлОД, що може призводити до неспецифічних відгуків і збільшених результатів біосенсора. Одним із потенційних субстратів ГлОД є глутамін, тому за допомогою амінокислотного аналізатора була визначена концентрація цієї амінокислоти у зразках, яка становила  $0,4 \pm 0,03$  мкМ при концентрації білка у синаптосомах  $2$  мг/мл.

**4.1.3. Аналіз швидкості початкового захоплення та рівня накопичення глутамату синаптосомами за допомогою біосенсора.** 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-[ $^{14}\text{C}$ ]глутамату. При розрахунках вихідний відгук біосенсора при додаванні аліквот супернатанту синаптосом, отриманий одразу після ініціації захоплення шляхом додавання  $10$  мкМ глутамату, було прийнято за  $100\%$ . При роботі з радіоактивно-міченим глутаматом радіоактивність в аліквотах супернатанту синаптосом одразу після додавання суміші радіоактивно-міченого та звичайного глутамату було прийнято за  $100\%$ . Рис. 4.2 (а) показує залишкову концентрацію глутамату у супернатанті через  $1$  хв після ініціації захоплення додаванням суміші радіоактивно-міченого та звичайного глутамату. Відповідно, початкова швидкість захоплення глутамату синаптосомами становила  $21 \pm 5\%$  від вихідного значення при використанні біосенсора і розрахунків за калібрувальним графіком,  $22 \pm 5\%$  при використанні біосенсора і методу стандартних додавань та  $25 \pm 5\%$  при використанні радіоактивно-міченого глутамату.

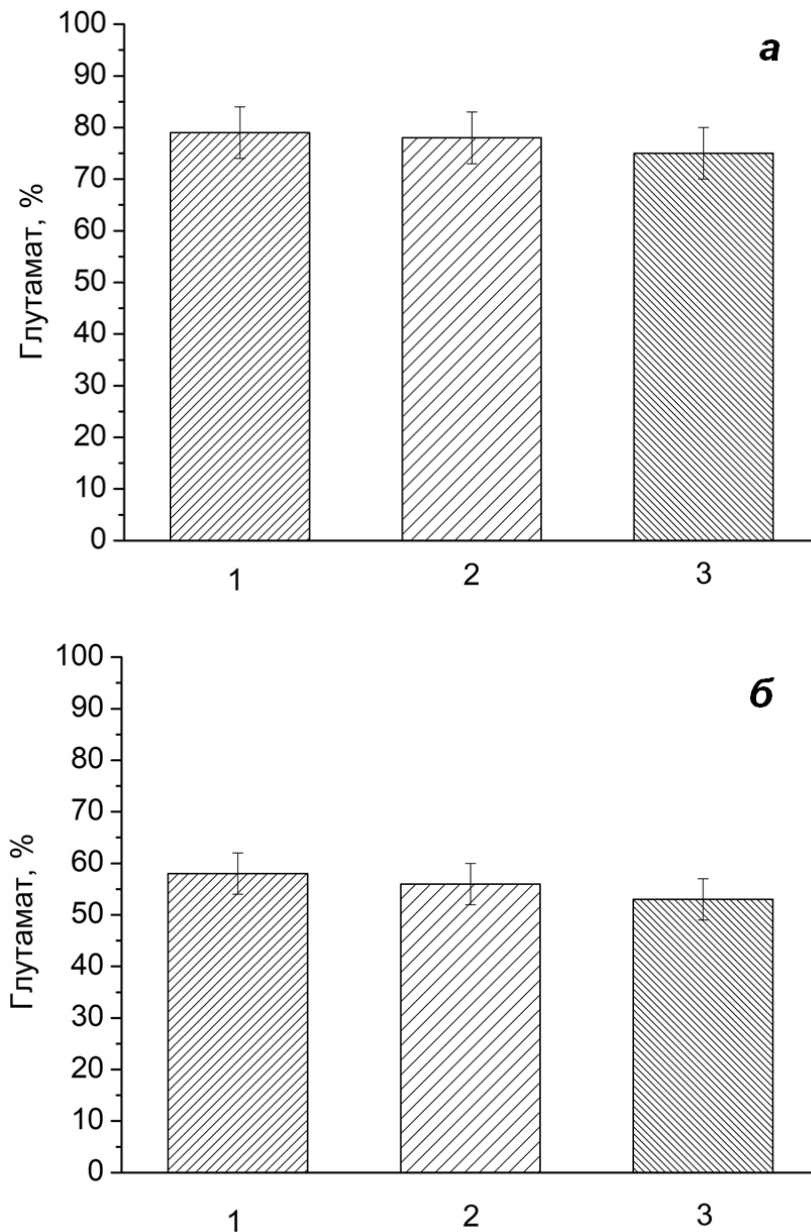


Рис. 4.2. Концентрація глутамату у супернатанті через 1 хв (**а**) і через 10 хв (**б**) після початку захоплення глутамату синаптосомами, виражена у % від початкової концентрації глутамату. Значення були отримані за допомогою глутамат-чутливого біосенсора і розрахунків за калібрувальним графіком (1), біосенсора і методу стандартних додавань (2) та радіоізотопного методу (3)

Рис. 4.2 (**б**) показує зменшення концентрації глутамату у супернатанті через 10 хв після ініціації захоплення додаванням суміші радіоактивно-міченого та звичайного глутамату. Рівень накопичення глутамату синаптосомами за 10 хв становив  $42 \pm 4$  % від вихідної концентрації глутамату

за даними біосенсора та калібрувального графіка,  $44 \pm 4$  % при використанні біосенсора і методу стандартних додавань і  $47 \pm 4$  % при використанні радіоактивно-міченого глутамату.

Таким чином, значення початкової швидкості захоплення глутамату та рівня його накопичення за 10 хв синаптосомами, які були виміряні біосенсором та радіоізотопним методом, були практично однаковими, що показує коректність запропонованого біосенсорного підходу.

## **4.2. Дослідження вивільнення глутамату синаптосомами**

**4.2.1. Моніторинг вивільнення ендogenous глутамату з нервових терміналей за допомогою глутамат-чутливого біосенсора.** В експериментах використовували нервові терміналі (синаптосоми), які були ізольовані з кори головного мозку щурів. Синаптосоми зберігали всі характеристики інтактних нервових терміналей, такі як здатність зберігати потенціал плазматичної мембрани та здатність вивільняти та захоплювати нейромедіатори при деполяризації. З синаптосомами проводили два типи експериментів: експерименти без стимуляції для оцінки змін у позаклітинній концентрації глутамату та експерименти зі стимуляцією для оцінки вивільнення глутамату шляхом екзоцитозу та білками-транспортерами. Для біосенсорних експериментів 100-200 мкл розчину супернатанту (отриманого після центрифугування синаптосом) додавали до робочої комірки і реєстрували відгуки біосенсора. Після цього аліквоти модельного розчину глутамату додавали в цю ж комірку і отримували ще три відгуки біосенсора. Концентрація глутамату у зразках синаптосом розраховувалась відповідно до пропорційної залежності між величиною відгуків біосенсора та концентрацією глутамату у робочій комірці.

Зміна позаклітинної концентрації глутамату в зразках синаптосом впродовж 30 хв, отримана за допомогою біосенсора, наведена на рис. 4.3. Позаклітинна концентрація глутамату у зразках синаптосом зменшилась з

$11,5 \pm 0,9$  до  $7,9 \pm 0,9$  мкМ в залежності від часу інкубації, що відображає не просто відсутність суттєвого тонічного вивільнення глутамату, а навіть певне захоплення глутамату синапсами. Ці дані свідчать про здатність синапсом зберігати динамічний баланс між вивільненням та захопленням глутамату. Такий тривалий моніторинг позаклітинного рівня глутамату у зразках синапсом без стимуляції може бути корисним для оцінки енергетичного та функціонального стану синапсом. Також з рис. 4.3 в зв'язку з тим, що синапсами здатні підтримувати сталий позаклітинний рівень глутамату, можна зробити висновок, що вони були коректно отриманими.

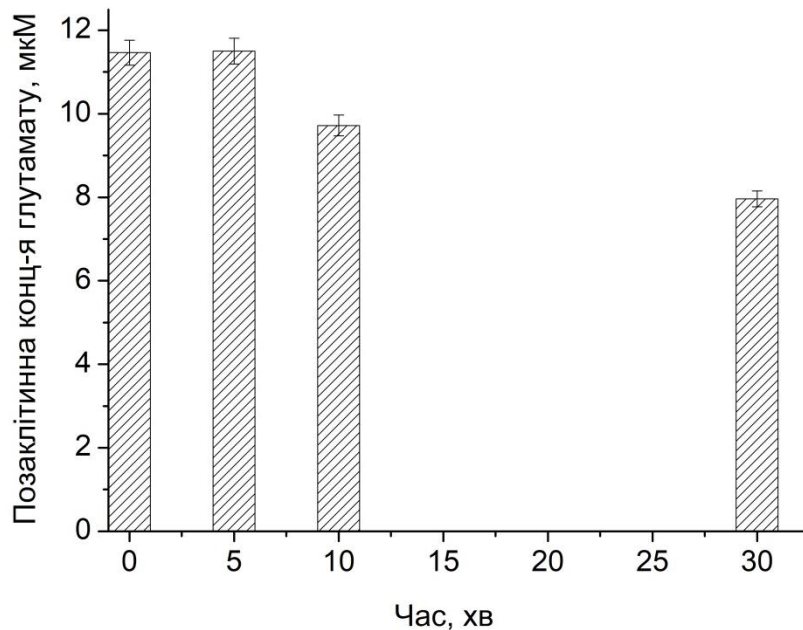


Рис. 4.3. Зміна позаклітинної концентрації глутамату в зразках синапсом впродовж 30 хв, отримана за допомогою біосенсора. Значення отримані із використанням методу стандартних додавань

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 шляхом екзоцитозу враховувалось як різниця між вивільненням глутамату в присутності та за відсутності іонів кальцію в середовищі впродовж

6 хв. Як показано на рис. 4.4, вивільнення ендogenous глутамату з нервових терміналей шляхом екзоцитозу (об'єм зразка складав 1 мл, концентрація білка - 0,4 мг/мл), виміряне біосенсором, становило  $7,5 \pm 1,0$  мкМ.

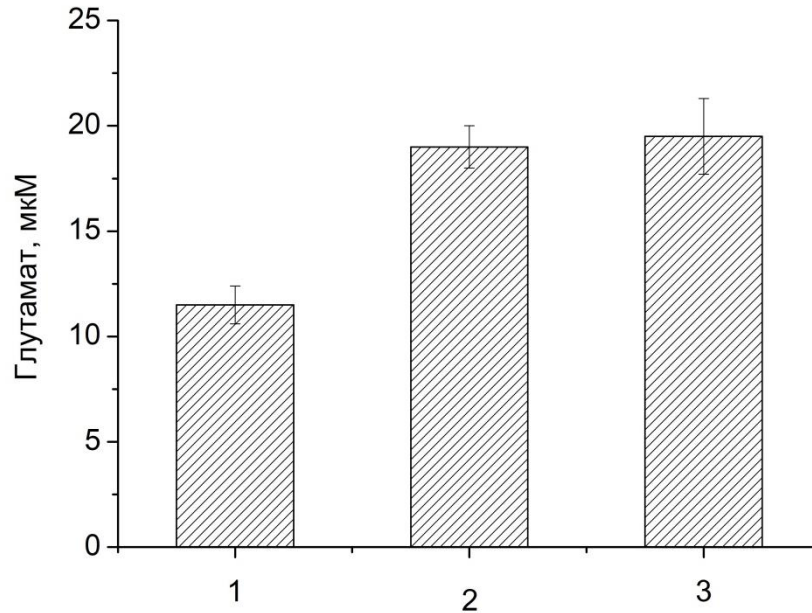


Рис. 4.4. Позаклітинна концентрація глутамату у зразках синаптосом, яка спостерігається без стимуляції синаптосом (1), концентрація глутамату після стимульованого вивільнення ендogenous глутамату із нервових терміналей шляхом екзоцитозу (2) та білками-транспортерами (3). Значення отримані глутамат-чутливим біосенсором із використанням методу стандартних додавань

Вивільнення глутамату білками-транспортерами (рис. 4.4) було стимульовано шляхом деполяризації плазматичної мембрани синаптосом у середовищі без іонів кальцію і становило  $8,0 \pm 1,8$  мкМ (об'єм зразка становив 1 мл, концентрація білка 0,4 мг/мл). 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.



**4.2.2. Підтвердження результатів біосенсора із використанням методу, на основі радіоактивно-міченого глутамату.** У нейрофізіологічних дослідженнях, кінетика вивільнення глутамату з нервових терміналей вимірюється в основному за допомогою радіоізотопного методу з використанням радіоактивно-міченого L-[<sup>14</sup>C]глутамату [126]. Спершу синаптосоми інкубують з радіоактивно-міченим глутаматом, проводять експерименти з вивільнення глутамату (час вивільнення становив 6 хв), після чого зразок центрифугують і визначають радіоактивність в осаді та надосадовій рідині за допомогою сцинтиляційного методу (як описано у розділі «Матеріали та методи досліджень»). В наших експериментах, швидкість вивільнення радіоактивно-міченого глутамату з нервових терміналей визначалася на основі зменшення радіоактивності осаду та збільшення радіоактивності надосадової рідини. Як з'ясувалося, позаклітинна концентрація радіоактивно-міченого глутамату становила від 12 до 20 % від повної концентрації радіоактивно-міченого глутамату у зразку синаптосом. Вивільнення радіоактивно-міченого глутамату шляхом екзоцитозу становило  $7 \pm 1$  % від повної концентрації, а вивільнення білками-транспортерами -  $12,0 \pm 1,5$  %.

**4.2.3. Порівняння результатів дослідження вивільнення глутамату при біосенсорних вимірюваннях та при використанні радіоактивно-міченого глутамату.** Як було описано раніше, результати оцінки вивільнення радіоактивно-міченого глутамату зазвичай виражаються як відсоток від повної концентрації радіоактивно-міченого глутамату у зразку синаптосом. В цьому контексті постає питання, як зруйнувати синаптосоми та синаптичні везикули всередині них для того, щоб виміряти вихідну концентрацію глутамату у синаптосомах біосенсором. Використання детергентів для розчинення мембран та інших агресивних підходів [129–131] є неприйнятним для подальших біосенсорних вимірювань.

Для біосенсорної оцінки концентрації вивільненого глутамату із синаптосом, ми використали три підходи до руйнування нервових терміналей та мембранних компартментів всередині них, а саме: заморожування при  $-20$  °C

впродовж 2,5 год, нагрівання при  $+70\text{ }^{\circ}\text{C}$  впродовж 1 год, та багаторазова ультразвукова обробка (22 кГц, 5 разів по 1 хв). Як показано на рис. 4.5, концентрація вільного глутамату у навколишньому буфері, виміряна біосенсором, становила  $18,0 \pm 1,0$  мкМ після заморозки синапсом;  $25,5 \pm 2,0$  мкМ після нагрівання та  $60,0 \pm 5,0$  мкМ після ультразвукової обробки. Таким чином найефективнішим методом руйнування мембран синапсом є багаторазова ультразвукова обробка.

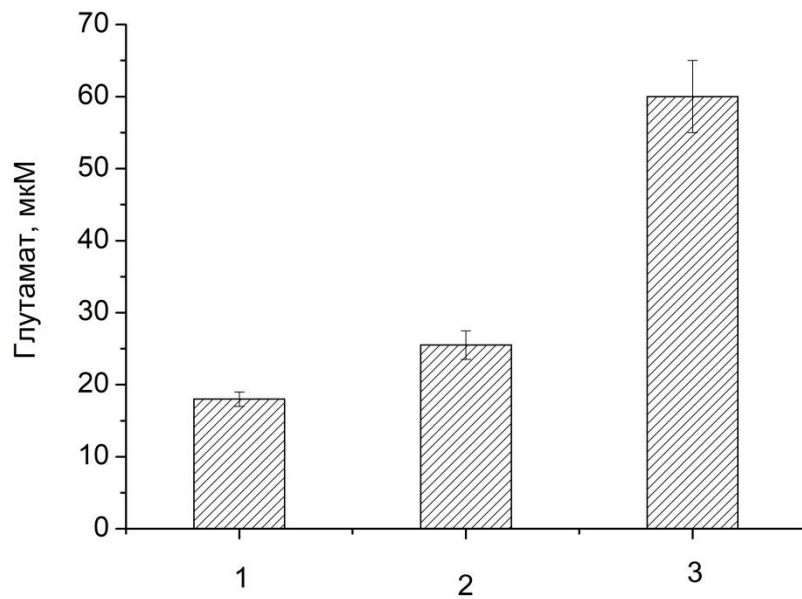


Рис. 4.5. Концентрація вільного глутамату у зразках синапсом, які були зруйновані шляхом заморозки (1), нагрівання (2) та ультразвукової обробки (3). Значення отримані глутамат-чутливим біосенсором із використанням методу стандартних додавань

Вивільнення глутамату з синапсом, отримане на основі біосенсорних вимірювань було перераховане у відсоток від повної концентрації глутамату (концентрації вільного глутамату) в зразку синапсом. При розрахунках ми використовували повну концентрацію глутамату, отриману при руйнуванні синапсом ультразвуком. З'ясувалося, що шляхом екзоцитозу було вивільнено 12,5 % 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  $13,0 \pm 1,4$  % від повної концентрації глутамату у синаптосамах, що співпадає з методом на основі радіоактивно-міченого глутамату ( $12,0 \pm 1,5$  %).

Таким чином, результати вимірювання вивільнення глутамату білками-транспортерами були практично однакові при біосенсорних вимірюваннях та при використанні радіоактивно-міченого глутамату, проте у випадку вивільнення глутамату шляхом екзоцитозу виявилась суттєва різниця між результатами біосенсора та контрольного метода. Це буде пояснено у розділі «Аналіз та узагальнення результатів досліджень».

**4.2.4. Підтвердження результатів біосенсора за допомогою спектрофлуориметричного методу визначення повної концентрації глутамату у зразках синаптосом.** За допомогою спектрофлуориметричного методу з використанням ГлДГ було визначено концентрації глутамату у зразках синаптосом. Згідно з цими результатами, позаклітинна концентрація глутамату становила  $15 \pm 1$  мкМ, а вивільнення глутамату з синаптосом у кальцій-вмісному середовищі становило  $15,0 \pm 0,9$  мкМ (рис. 4.6). Повна концентрація глутамату у зразках синаптосом складала  $30 \pm 2$  мкМ (при заморожуванні) та  $60 \pm 5$  мкМ (при ультразвуковій обробці). Вимірювання проводили в аліквотах (50 мкл) надосадової рідини після осадження синаптосом (0,4 мг/мл білка), доданих до буферного розчину з реакційною сумішшю у кюветі об'ємом 1 мл. Концентрація глутамату визначалась за зміною флуоресценції НАДН (довжина хвилі збудження – 340 нм, довжина хвилі випромінювання – 460 нм).

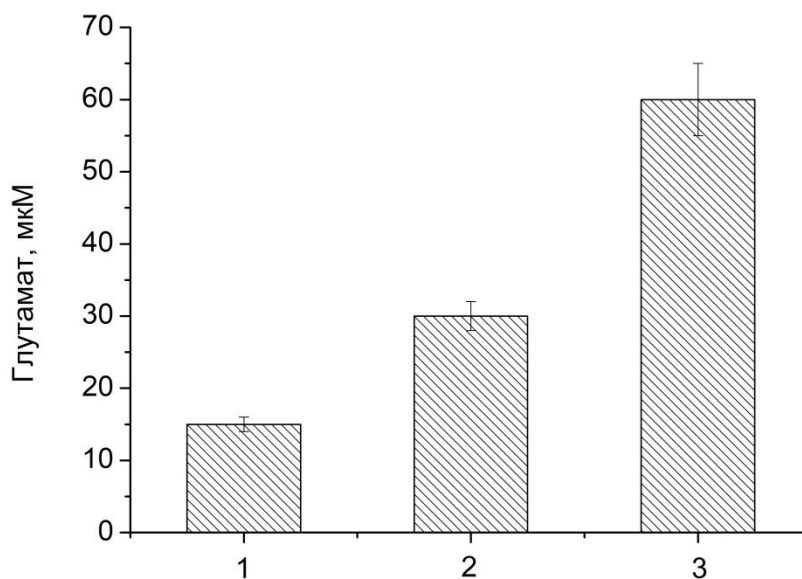


Рис. 4.6. Результати спектрофлуориметричного визначення концентрацій глутамату у зразках синапсом: позаклітинний рівень глутамату до індукції його вивільнення (1), позаклітинний рівень глутамату через 6 хв після індукції його вивільнення (2), повний вміст глутамату в зразку (3) після ультразвукової обробки

Як видно, результати спектрофлуориметричного методу співпадають з результатами, отриманими за допомогою біосенсора і також підтверджують ефективність ультразвукової обробки для руйнування мембран синапсом з метою вивільнення глутамату.

**4.2.5. Підтвердження результатів біосенсорних вимірювань концентрації глутамату за допомогою амінокислотного аналізатора.** Іншим традиційним методом для контролю визначення концентрацій глутамату було використання амінокислотного аналізатора. Згідно з процедурою підготовки проб для нього, перед вимірюваннями було розведено зразки синапсом в 2 рази з використанням 3% сульфосаліцилової кислоти. Позаклітинна концентрація глутамату у зразках синапсом (об'єм 1 мл, концентрація білка 0,4 мг/мл) становила  $12,0 \pm 1,0$  мкМ, вивільнення глутамату в кальцій-вмісному

середовищі (сумарне вивільнення шляхом екзоцитозу та білками-транспортерами) становило  $14,0 \pm 1,0$  мкМ, а повна концентрація глутамату у зразку становила  $63,0 \pm 4,0$  мкМ (рис. 4.7).

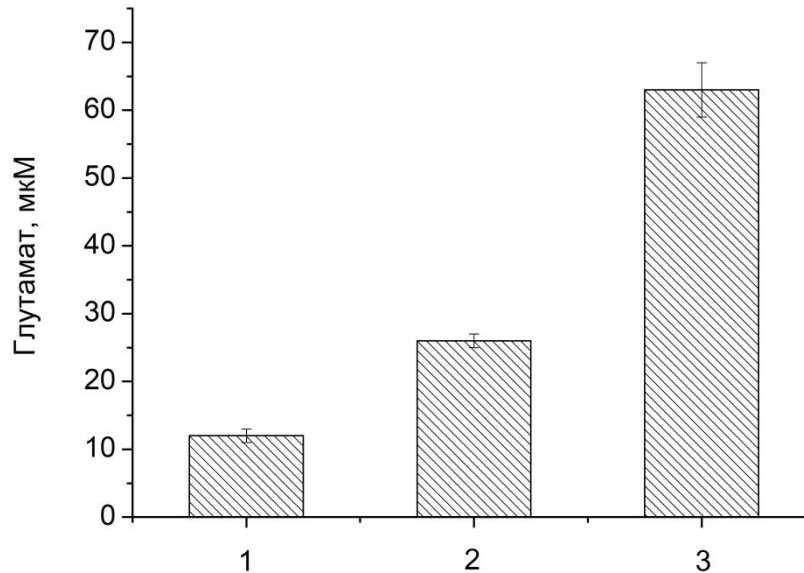


Рис. 4.7. Результати визначення концентрацій глутамату у зразках синаптосом за допомогою амінокислотного аналізатора: позаклітинний рівень глутамату до індукції його вивільнення (1), позаклітинний рівень глутамату через 6 хв після індукції його вивільнення (2), повна концентрація глутамату в зразку (3) після ультразвукової обробки

Ці дані практично повністю співпадають з результатами біосенсорних вимірювань, що черговий раз підтверджує адекватність результатів роботи біосенсора.

Узагальнені результати визначення концентрацій глутамату у зразках синаптосом, отриманих за допомогою різних методів, наведені в табл. 4.1.

Таблиця 4.1

**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, %	$78 \pm 5$	$75 \pm 5$	Немає даних	Немає даних
Концентрація глутамату у супернатанті через 10 хв після початку захоплення, %	$56 \pm 4$	$53 \pm 4$	Немає даних	Немає даних
Вивільнення глутамату шляхом екзоцитозу, % від повної концентрації глутамату	$12,5 \pm 1,3$	$7 \pm 1$	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	$60 \pm 5$	$63,0 \pm 4,0$

### 4.3. Підсумки

Розроблено методичний підхід для аналізу концентрації глутамату у зразках синапсом. З використанням глутамат-чутливого біосенсора показано наявність глутамату в позаклітинному середовищі у препараті синапсом

головного мозку щурів за відсутності екзогенного глутамату, що свідчить про наявність базового позаклітинного рівня концентрації глутамату в зразках. В наших експериментах базовий позаклітинний рівень глутамату складав від 7,9 до 11,5 мкМ.

Було визначено початкову швидкість захоплення глутамату (за 1 хв) та рівень накопичення глутамату (за 10 хв) за допомогою біосенсора та радіоізотопного методу. Початкова швидкість захоплення глутамату синапсосомами становила близько 21 – 22 % від вихідного значення при використанні біосенсора та 25 % при використанні радіоактивно-міченого глутамату. Накопичення глутамату синапсосомами за 10 хв становило 42 – 44 % від вихідної концентрації глутамату за даними біосенсора і 47 % при використанні радіоактивно-міченого глутамату.

Запропоновано метод аналізу ефективності тонічного та стимульованого вивільнення глутамату з ізольованих нервових терміналей на основі глутамат-чутливого біосенсора і підтверджено отримані результати за допомогою радіоізотопного методу з використанням радіоактивно-міченого глутамату, спектрофлуориметричного методу на основі ГлДГ та амінокислотного аналізатора. За даними біосенсора концентрація глутамату, вивільненого шляхом екзоцитозу становило  $7,5 \pm 1,0$  мкМ, а вивільненого білками-транспортерами –  $8,0 \pm 1,8$  мкМ; повна концентрація глутамату у зразках синапсосом після їх руйнування ультразвуком складала 60 мкМ.

Розроблений біосенсор потенційно можна використовувати у клінічній практиці та нейрохімічних дослідженнях для аналізу процесів транспорту глутамату і концентрації глутамату у зразках нервових тканин та рідин.

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

1. 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.

2. 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.
3. 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.
4. 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.
5. 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.
6. Кучеренко Д. Ю., Кучеренко І. С., Солдаткін О. О., Борисова Т. О., Солдаткін О. П. Використання біосенсора для дослідження процесів транспорту глутамату у синапсосомах: 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.



## РОЗДІЛ 5

### **ВИКОРИСТАННЯ ГЛУТАМАТ-ЧУТЛИВОГО БІОСЕНСОРА ДЛЯ ВИЗНАЧЕННЯ КОНЦЕНТРАЦІЙ ГЛУТАМАТУ В ПРОДУКТАХ ХАРЧУВАННЯ**

#### **5.1. Визначення концентрацій глутамату в соусах та приправах за допомогою біосенсора та контрольного методу**

Коректне визначення вмісту речовин у зразках є важливим підтвердженням можливості практичного використання біосенсора. Тому після дослідження основних аналітичних характеристик розробленого глутамат-чутливого біосенсора було проведено визначення концентрацій глутамату у соусах і приправах, які було куплено у супермаркетах м. Києва. Соеві 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.

Процедура вимірювання полягала в наступному: після приготування біосенсор калібрували, після чого до комірки додавали аліквоту розчину соуса або приправи, отримували відгук і після цього додавали 3 рази відому концентрацію глутамату (без відмивання біосенсора між додаваннями). Після цього біосенсор відмивали робочим буферним розчином впродовж 5 хвилин і використовували для наступних вимірювань. Всього було використано 6 соусів та 4 приправи.

Розрахунок концентрації глутамату у досліджуваних зразках на основі біосенсорних вимірювань проводили за допомогою двох підходів – з використанням калібрувального графіка та методу стандартних додавань (їх опис наведено в розділі «Матеріали та методи досліджень»).

Для контролю було використано спектрофотометричний метод визначення глутамату. Калібрувальний графік, який використовували для визначення глутамату за допомогою спектрофотометрії, зображено на рис. 5.1.

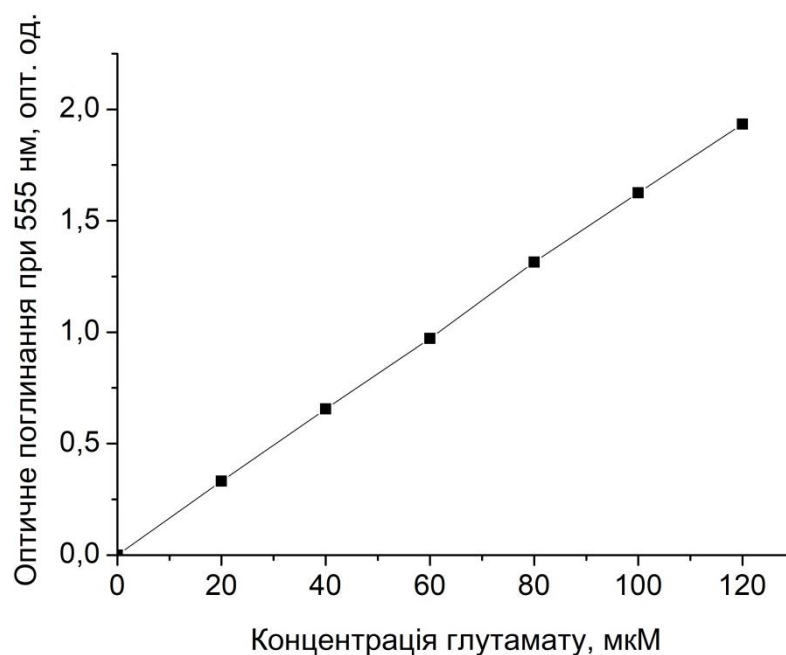


Рис. 5.1. Калібрувальний графік для визначення глутамату, отриманий за допомогою спектрофотометрії

Також було перевірено чи змінюється оптичне поглинання розчину глутамату в присутності соусів та приправ при вимірюванні за допомогою спектрофотометрії (рис. 5.2). Для цього спочатку проводили спектрофотометричне визначення глутамату в зразках, і після закінчення реакції до кювети додавали модельний розчин глутамату, що призводило до другої реакції. Результати дослідження показали, що наявність в розчині соусів та приправ суттєво не впливає на величину оптичного поглинання при визначенні модельного розчину глутамату, що свідчить про практичну

відсутність впливу компонентів зразка (матричних ефектів) на чутливість методу до глутамату при аналізі зразків харчових продуктів.

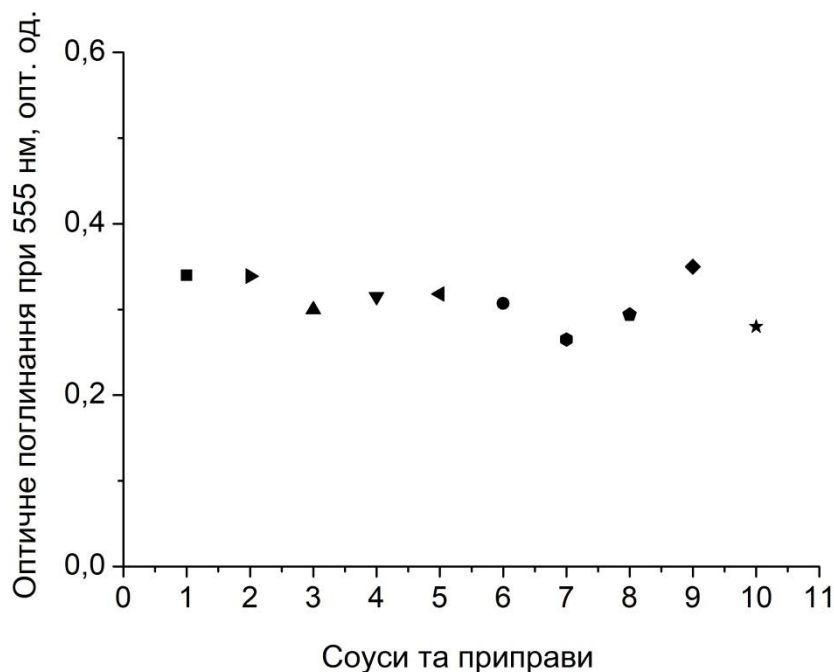


Рис. 5.2. Величини оптичного поглинання при проведенні спектрофотометричного визначення 20 мкМ глутамату за його додавання до розчинів різних соусів (№1-6) та приправ (№7-10)

Результати, отримані біосенсором та спектрофотометричним методом, наведені в табл. 5.1 та табл. 5.2. Метод стандартних додавань теоретично є більш точним, оскільки він враховує вплив компонентів досліджуваного зразка на чутливість біосенсора до субстрату, але для його використання зазвичай необхідно проводити попереднє вимірювання концентрації глутамату за калібрувальним графіком для того, щоб підібрати таке розведення зразка, при якому і відгук на зразок, і три послідовні відгуки на модельний розчин глутамату лежать в межах лінійного діапазону біосенсора.

Таблиця 5.1

**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

За отриманими результатами було побудовано кореляційний графік (рис. 5.3).

Таблиця 5.2

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

Вимірювані зразки	Біосенсор, масова доля (%)		Спектрофотометрія, масова доля (%)	
	Калібрувальний графік	Стандартні додавання	Калібрувальний графік	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

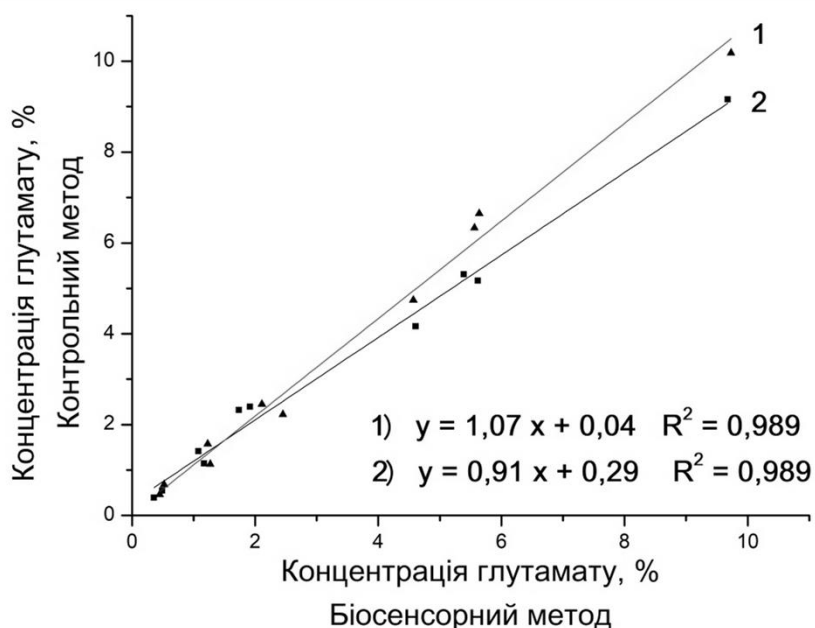


Рис. 5.3. Кореляція між концентраціями глутамату у зразках харчових продуктів, виміряними біосенсорним та спектрофотометричним методом з використанням: стандартних додавань (1), калібрувального графіка (2)

Як видно, результати отримані за допомогою біосенсора добре корелювали із спектрофотометричним методом вимірювання ( $R^2 = 0,989$ ), окремі точки добре розподілені вздовж теоретичних прямих у всьому діапазоні концентрацій глутамату.

## 5.2. Відтворюваність визначення глутамату в харчовому зразку

Для дослідження точності роботи біосенсора також було перевірено відтворюваність біосенсорного визначення глутамату в одному зразку. Для цього, аліквоту розведеного в 10 разів соусу додавали 12 разів до робочої комірки біосенсора (з відмиванням між додаваннями), і відгуки біосенсора аналізували (рис. 5.4).

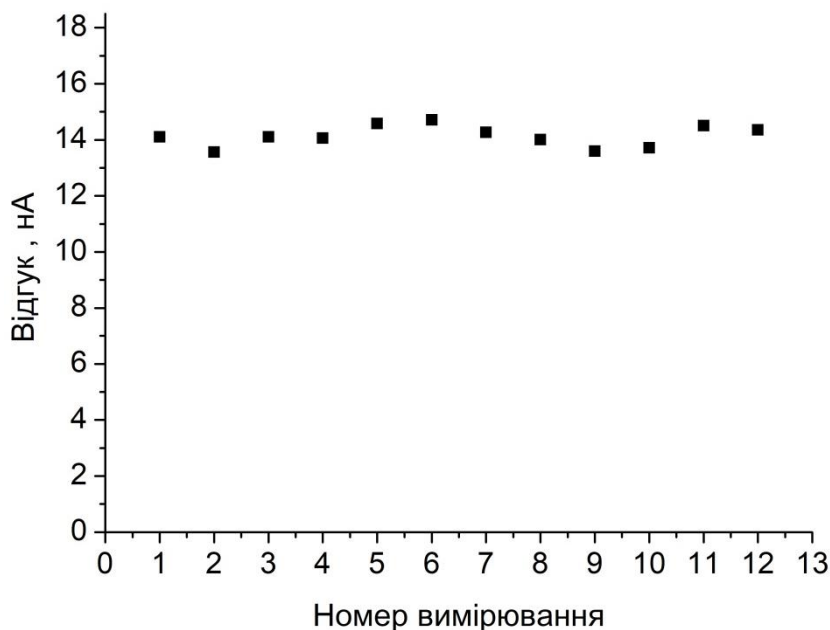


Рис. 5.4. Відтворюваність відгуку біосенсора при визначенні глутамату в одному із зразків соусу. Вимірювання проводили у 25 мМ HEPES буфері, рН 7,4, за постійного потенціалу +0,6 В відносно Ag/AgCl електрода порівняння

Розведення зразка в комірці становило 50 разів, таким чином, сумарне розведення вихідного зразка було 500 разів. Відносне стандартне відхилення відгуків біосенсора становило 2,7 %, і суттєвої зміни відгуків не відбувалось. Це свідчить про високу точність і стабільність роботи біосенсора із зразками харчових продуктів. Втім, для забезпечення високої точності визначення концентрацій глутамату, після деякої кількості вимірювань зразків необхідно робити повторне калібрування біосенсора.

### **5.3. Перевірка можливості коректного визначення кінцевої концентрації глутамату при різних розведеннях зразків харчових продуктів**

Кожен біосенсор має певний лінійний діапазон вимірювання і, щоб правильно визначити концентрацію аналіту в досліджуваному зразку, потрібно, щоб його концентрація в робочій комірці потрапляла в лінійний діапазон

вимірювання. У випадку визначення глутамату в зразках харчових продуктів в більшості випадків необхідно робити значне розведення через високу концентрацію глутамату в зразках. Використання різних розведень могло вплинути на визначення концентрації глутамату в вихідному соусі, тому було вирішено перевірити, чи впливає величина розведення зразка на визначення кінцевої концентрації глутамату в соусі. Для цього соус перед внесенням до електрохімічної комірки додатково не розбавляли, а просто додавали різні об'єми соусу в робочу комірку і визначали концентрацію у вихідному зразку. Було перевірено чотири різних розведення. Оскільки соус заздалегідь не розбавляли, то додавали малі об'єми зразка, щоб потрапити в лінійний діапазон. Результати дослідження наведено у табл. 5.3.

Таблиця 5.3

**Дослідження визначення концентрації глутамату за допомогою біосенсора при різних розведеннях соуса**

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

Як можна бачити, відгуки біосенсора лінійно залежать від об'єму зразка, і, відповідно, кінцеві 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 біосенсора.

#### 5.4. Підсумки

В даному розділі було використано амперометричний глутамат-чутливий біосенсор для вимірювання концентрацій глутамату в продуктах харчування.

Було проведено визначення концентрацій глутамату у соусах і приправах за допомогою біосенсора та спектрофотометричного методу та показано гарну кореляцію результатів обох експериментальних методів та обох розрахункових підходів.

Результати дослідження показали, що наявність в розчині соусів та приправ суттєво не впливає на величину оптичного поглинання при визначенні концентрації глутамату за допомогою спектрофотометрії, що свідчить про відсутність суттєвих матричних ефектів.

Показано, що відносне стандартне відхилення відгуків біосенсора на харчовий зразок становило 2,7 %, а розведення зразків не впливало на визначення концентрації глутамату.

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

1. 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.
2. 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.
3. 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.



## РОЗДІЛ 6

### АНАЛІЗ ТА УЗАГАЛЬНЕННЯ РЕЗУЛЬТАТІВ ДОСЛІДЖЕНЬ

Глутамат є важливою амінокислотою, яка залучена до ключових метаболічних шляхів в організмі людини і інших хребетних. Також глутамат є найважливішим збуджуючим нейромедіатором в ЦНС. Тому визначення концентрацій глутамату є актуальною задачею в нейрохімічних та інших біохімічних дослідженнях. Традиційні методи аналізу глутамату, такі, як ВЕРХ, спектрофлуориметрія та спектрофотометрія, мають ряд недоліків, таких як висока вартість обладнання і його великий розмір, потреба в кваліфікованому персоналі, обмеженість для досліджень концентрації глутамату в режимі реального часу. Перспективною альтернативою даним методам виступають електрохімічні біосенсиори, а саме амперометричні біосенсиори на основі ферментів, які позбавлені, повністю або частково, вказаних недоліків. Тому розробка амперометричного біосенсора для визначення глутамату була задачею першої частини даної дисертаційної роботи.

В результаті експериментальних досліджень було розроблено амперометричний біосенсор для визначення концентрацій глутамату у водних, зокрема в біологічних, зразках. Для створення біосенсора використовувався фермент ГлОД, іммобілізований на поверхні платинового дискового електроду поперечною зшивкою глутаровим альдегідом з молекулами БСА.

На рис. 6.1 показано етапи приготування лабораторного зразка біосенсора. Перший етап займав близько 5 хв, другий етап – 25 хв, і третій етап – 35 хв. Таким чином, виготовлення біосенсора тривало близько однієї години. При виготовленні декількох біосенсорів даний час не повністю сумувався: так, можливо очистити один за одним декілька перетворювачів і провести одночасну іммобілізацію біологічної мембрани, після чого провести одночасне

відмивання всіх біосенсорів в одній кюветі. Таким чином, виготовляти декілька біосенсорів значно швидше (у перерахунку на один біосенсор), аніж один біосенсор.

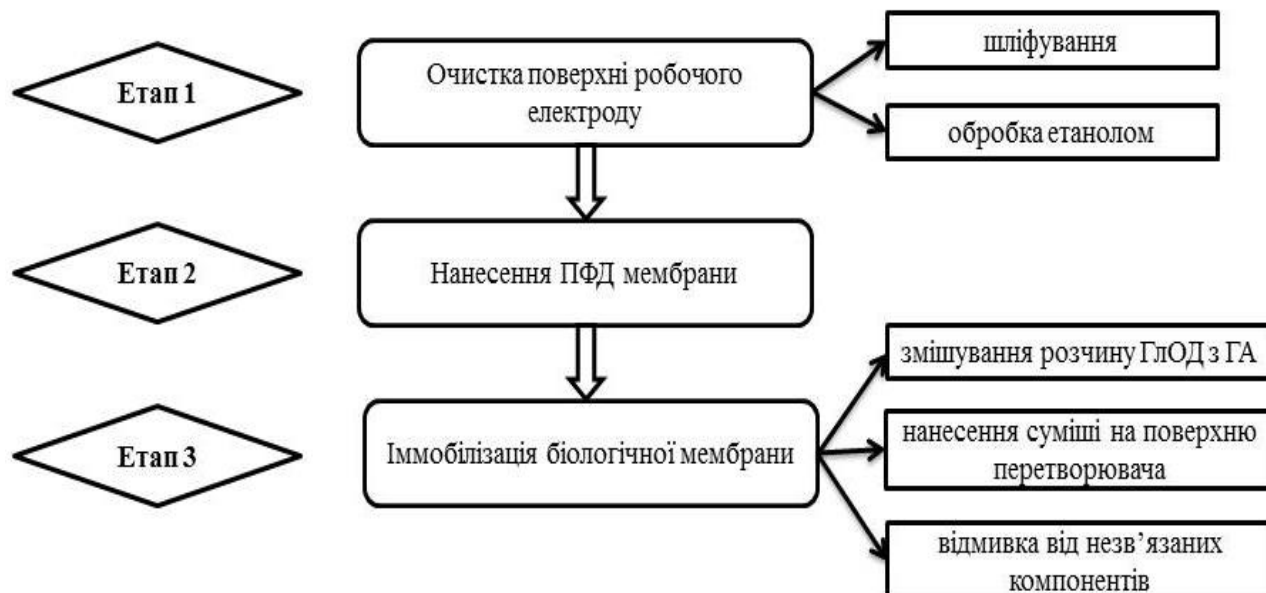


Рис. 6.1. Послідовність приготування лабораторної моделі біосенсора

На рис. 6.2. наведено основні етапи розробки біосенсора, які були виконані в даній роботі. Як видно, всю роботу можна розділити на вісім етапів, кожен з яких в свою чергу складається з 2-4 підетапів. Проведені етапи практично повністю описують стандартний цикл розробки біосенсора, від оптимізації характеристик перетворювача до визначення речовин у зразках. Це підтверджує цілісність та завершеність даної роботи.

В роботі було проведено перевірку ефективності напівпроникної мембрани на основі фенілендіаміну і показано, що вона запобігає окисненню інтерферуючих електроактивних речовин на поверхні перетворювача. Деякі важливі етапи виготовлення біоселективної мембрани біосенсора було оптимізовано для покращення характеристик біосенсора.

Було підібрано оптимальну концентрацію ферменту (4 %) та глутарового альдегіду (0,4 %) у біомембрані, а також тривалість іммобілізації (30 хв).

Було показано, що лінійна частина калібрувального графіка біосенсора дає можливість визначати концентрації глутамату в таких зразках, як, наприклад, синаптосоми (7-60 мкМ).

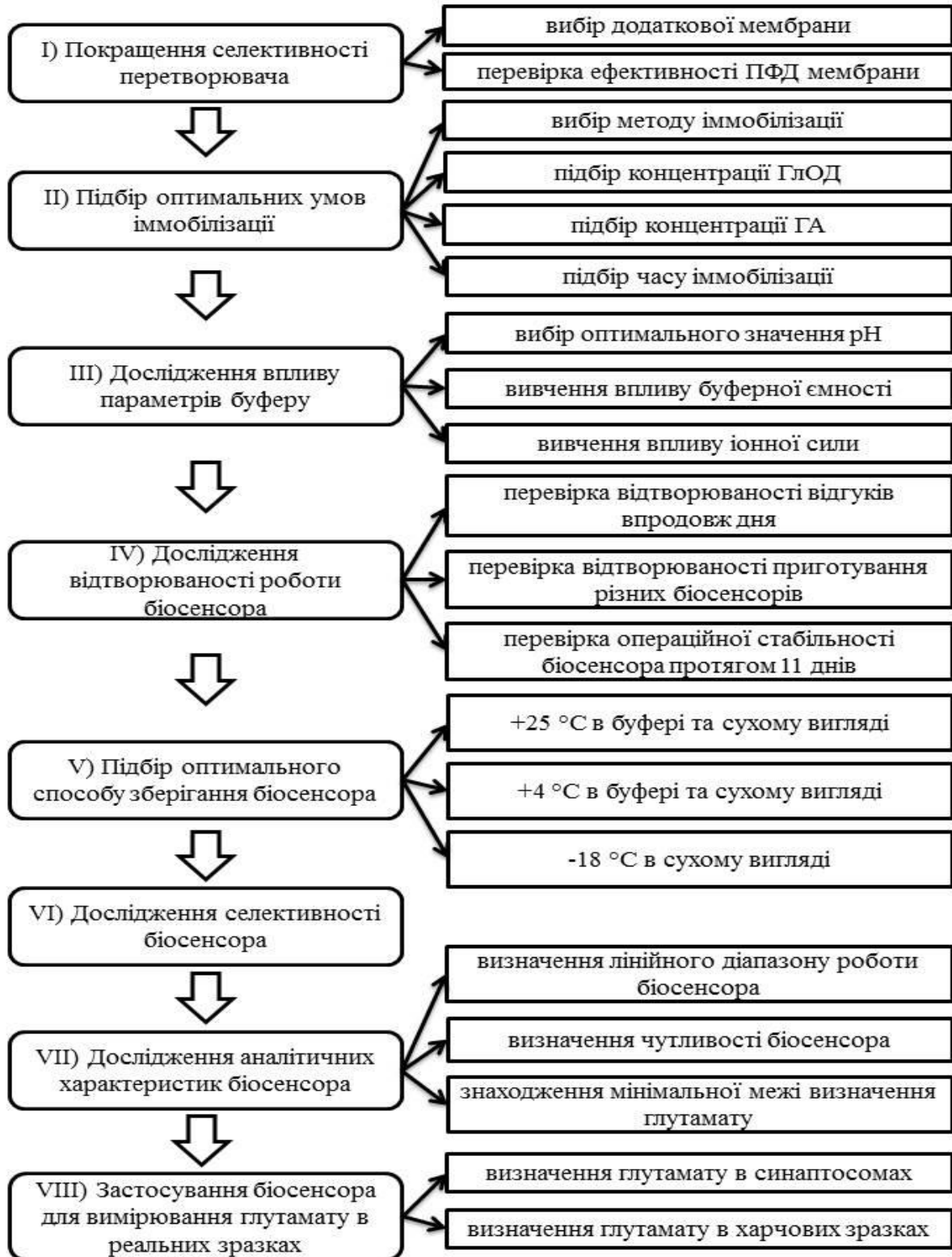


Рис. 6.2. Етапи розробки біосенсора для визначення глутамату

Встановлено оптимальний діапазон значень рН для роботи біосенсора, який становив від 7 до 9. Показано відсутність залежності величини сигналів біосенсора від іонної сили та буферної ємності робочого буферу. Досліджено основні аналітичні характеристики розробленого біосенсора, зокрема селективність, стабільність, чутливість (в середньому 195 нА/мМ), мінімальну межу (3 мкМ) та лінійний діапазон визначення глутамату (від 5 до 700 мкМ). Найбільш стабільним біосенсор був при зберіганні у морозильній камері при -18 °С, в цьому випадку біосенсор міг зберігатись більше ніж 2 місяці, але потребував повторного калібрування перед вимірюванням.

Аналітичні методи, такі як високоефективна рідинна хроматографія у поєднанні з мас-спектрометрією [132] та варіанти їх поєднання, наприклад, з мікродіалізом, здатні визначати глутамат за фізіологічних умов [133], проте не здатні вимірювати динамічну зміну концентрації глутамату тому, що мають обмежену часову роздільну здатність [66, 134]. Кількісне визначення динаміки транспорту нейротрансмітерів обмежене відсутністю достатніх засобів для їх прямого моніторингу за фізіологічних умов [66]. Методи визначення нейротрансмітерів у режимі реального часу, зокрема для оцінки концентрацій нейромедіаторів у культурах нейронів та інших середовищах, є необхідними. Електрохімічні мікроелектроди не мають деяких з цих обмежень і можуть успішно використовуватись для визначення концентрацій глутамату у *in vitro* культурах клітин і зрізах гіпокампу (шляхом розміщення мікроелектродів максимально близько до клітин) та *in vivo* у щурах (шляхом імплантації мікроелектродів у головний мозок щурів через штучний отвір у черепі) [97, 134–136].

У літературі можна знайти приклади використання амперометричних біосенсорів для визначення нейромедіаторів (глутамату, серотоніну, оксиду азоту тощо) [137, 138]. Втім, недоліком згаданих біосенсорів є відносно низька чутливість, надто високий шум або дрейф сигналу, низьке співвідношення сигнал/шум, які роблять складним швидко визначення концентрацій нейромедіаторів під час синаптичної передачі [66].

Розроблений в даній роботі біосенсор має низький рівень шуму (в межах 0,1 нА) і практично відсутній дрейф сигналу. Це дозволило опрацювати методику для дослідження транспорту глутамату в ізольованих нервових терміналях.

В порівнянні з класичними аналітичними методами визначення глутамату (спектрофотометрією, різноманітними типами хроматографії та методами на основі радіоактивно-мічених міток) розроблений в даній роботі метод аналізу вивільнення глутамату на основі глутамат-чутливого біосенсора має низку переваг. Використання біосенсора не потребує радіоактивно-міченого глутамату або додаткових процедур, тому зразки синапсом можуть бути аналізовані без попередньої обробки. Біосенсор напряму визначає зміни в абсолютному значенні концентрації глутамату у нервових терміналях у відповідь на різноманітні стимуляції.

Крім наукових досліджень, розроблений підхід для визначення глутамату за допомогою біосенсора може бути використаний у медицині для нейромоніторингу концентрації глутамату і характеристик роботи систем транспорту глутамату у зразках нервових тканин і рідин, та в плазмі чи сироватці крові. Вартість повної вимірювальної установки (що включає біосенсор, потенціостат і допоміжне обладнання) є відносно невеликою порівняно з більшістю традиційних методів. Вимірювальна установка є портативною та може бути транспортована до іншої установи для проведення вимірювання концентрації глутамату одразу після приготування зразків, що дозволяє уникнути транспортування останніх і швидко отримати необхідні результати. У медичній практиці легкість транспортування біосенсора є також перевагою. Біосенсорний аналіз є дуже швидким і для аналізу одного зразка необхідно лише кілька хвилин. Біосенсор є дуже специфічним до глутамату завдяки тому, що фермент специфічно каталізує окиснення лише глутамату, а робочий електрод вкритий напівпроникною мембраною, яка запобігає окисненню інтерферуючих речовин. Результати біосенсорних вимірювань добре співпадали з результатами трьох традиційних методів визначення

глутамату: спектрофлуориметричним методом з використанням ГлДГ, методом на основі радіоактивно-міченого глутамату та амінокислотним аналізатором.

Однією з переваг застосування біосенсора у нейрохімічних дослідженнях є здатність визначати абсолютні значення концентрації глутамату у зразках. Такі показники, як позаклітинна концентрація глутамату, кальцій-залежне вивільнення глутамату та повна концентрація глутамату у зруйнованих синапсосомах були майже однаково визначені біосенсором, спектрофлуориметричним методом та амінокислотним аналізатором. Позаклітинна концентрація глутамату становила 11,5 мкМ (за даними біосенсора), 15,0 мкМ (за даними спектрофлуориметрії) та 12 мкМ (за даними амінокислотного аналізатора). Кальцій-залежне вивільнення глутамату з синапсом за 6 хв становило 15,5; 15,0; 14,0 мкМ відповідно. Повна концентрація глутамату у зразках синапсом після їх руйнування ультразвуком складала 60 мкМ (за даними біосенсора), 60 мкМ (за даними спектрофлуориметрії) та 63 мкМ (за даними амінокислотного аналізатора). Втім, значення позаклітинного рівня глутамату та вивільненого глутамату, які були виміряні методом на основі радіоактивно-міченого глутамату були близькі до біосенсорних даних, але не співпадали. Ця різниця може бути пояснена різницею в експериментальних протоколах. Методика з використанням радіоактивно-міченого глутамату потребувала попередньої інкубації ізольованих нервових терміналей з міченим глутаматом, в той час як для біосенсорних та інших методів така попередня обробка не використовувалась. Тому абсолютні значення концентрацій глутамату дещо відрізнялися, проте співвідношення [вивільнення глутамату транспортерами]/[позаклітинна концентрація глутамату], [вивільнення глутамату екзоцитозом]/[позаклітинна концентрація глутамату], а також [вивільнення глутамату у кальцій-вмісному середовищі]/[позаклітинна концентрація глутамату], які є ключовими показниками ефективності роботи транспортних систем, були однаковими при використанні усіх підходів. Таким чином була підтверджена адекватність розробленого біосенсорного підходу.

Порівняльний аналіз даних, які були отримані з одного боку біосенсором, спектрофлуориметрією та амінокислотним аналізатором, а з іншого боку методом на основі радіоактивно-міченого глутамату показав різницю у випадку, коли результати були представлені як відсоток відносно повної концентрації глутамату у зразках синапсом. Для того, щоб дані біосенсора та інших методів співпадали з даними методу на основі радіоактивно-міченого глутамату необхідно, щоб концентрація глутамату в синапсомах становила не 60 мкМ, а дещо більше (приблизно 80-100 мкМ). Ми вважаємо, що ця різниця може бути пояснена двома факторами: по-перше, ймовірно відбувається не повне руйнування внутрішніх компартментів синапсом навіть після багаторазової ультразвукової обробки, і тому не весь ендogenous глутамат вивільняється в середовище і може бути визначений. Використання детергентів та інших підходів для руйнування синапсом було обмежено, оскільки це могло вплинути на результати роботи біосенсора [126, 129, 130]. По-друге, неконтрольоване вивільнення цитоплазматичної ГлДГ під час руйнування синапсом призводило до окиснення глутамату у зразку даним ферментом, що в свою чергу зменшувало повну концентрацію глутамату перед вимірюваннями. В той же час метод на основі радіоактивно-міченого глутамату дозволяв вимірювати повну концентрацію глутамату у синапсомах без попереднього їх руйнування.

Слід відмітити, що запропонований підхід для аналізу захоплення глутамату використовується для рідких зразків і не потребує попередньої обробки зразка або додавання інших речовин, в той час як розповсюджений в галузі нейрохімії метод на основі радіоактивно-міченого глутамату вимагає попереднього додавання до зразка радіоактивно-міченого глутамату і інших різноманітних маніпуляцій [139, 140]. Крім того, радіоізотопний метод є дуже шкідливим для оператора.

Адекватність запропонованого підходу була підтверджена шляхом використання радіоактивної мітки у паралельних експериментах. В останньому випадку, аналіз захоплення глутамату здійснювався не шляхом аналізу

радіоактивності осаду після фільтрації зразків синапсом, а в аліквотах супернатанту після центрифугування. Швидкість захоплення радіоактивно-міченого глутамату синапсами за певні періоди часу була вирахована зі зменшення радіоактивності супернатанту.

Базовий позаклітинний рівень концентрації глутамату у зразках синапсом є балансом між захопленням та нестимульованим вивільненням глутамату з нервових терміналей і є дуже важливою для оцінки тонічної активації пост- та пресинаптичних рецепторів глутамату [141]. В наших експериментах базовий позаклітинний рівень концентрації глутамату складав  $7,9 \pm 0,6$  мкМ. Слід відмітити, що під час визначення кінетичних характеристик захоплення глутамату із використанням радіоактивно-міченої мітки базовий позаклітинний рівень нейротрансмітеру зазвичай ігнорується. Розроблений методичний підхід на основі глутамат-чутливого біосенсора дозволяє вимірювання та розрахування кінетичних характеристик беручи до уваги базовий позаклітинний рівень глутамату. Нещодавно за допомогою глутамат-чутливого біосенсора, було визначено захоплення та вивільнення глутамату нервовими клітинами під час стимуляції [66]. Використовуючи диференційовані клітини лінії P19, отриманої з тератокарциноми миші, було проведено визначення базового позаклітинного рівня глутамату, вивільнення глутамату при стимуляції високою концентрацією хлориду калія та вивільнення глутамату після обробки клітин інгібітором глутаматних транспортерів. Базова позаклітинна концентрація глутамату у культурі клітин складала  $5,8 \pm 0,6$  мкМ, що є дуже близьким до наших результатів. *In vivo* базовий рівень глутамату був визначений як 1-5 мкМ при використанні мікродіалізу [142] та 1,4-1,8 мкМ при використанні біосенсора на основі ГлОД [134], що також підтверджує наші результати.

Також слід згадати про можливість використання біосенсорів для імплантації у мозок з метою вимірювання концентрації глутамату безпосередньо у живих тканинах. Через відносно великий розмір робочого електроду, який використовувався в даній роботі, запропонований біосенсор не



підходить для імплантації. Втім, можливо використовувати платинові мікроелектроди діаметром 50-100 мкм для виготовлення біосенсора і імплантувати їх у живу тканину [143]. Процедура виготовлення біосенсора (нанесення ПФД мембрани та іммобілізація ГЛОД) має бути лише незначно модифікована в цьому випадку, оскільки матеріал електроду та принцип детектування будуть однаковими.

Перспективним є використання розробленого біосенсора на практиці з наступних причин. По-перше, позаклітинний рівень глутамату є унікальним для кожного синапса [24, 25, 144]. По-друге, зміни в позаклітинному рівні глутамату в ізольованих нервових терміналях під час терапевтичної гіпотермії є специфічними для кожної досліджуваної тварини і, відповідно, рівень глутамату може бути індивідуальним для кожного пацієнта і необхідність персоналізованого нейромоніторингу нещодавно розглядалася [33].

Окремо слід згадати про перспективи використання біосенсора для аналізу процесів транспорту глутамату у тромбоцитах, оскільки ці клітини вважаються потенційними периферичними маркерами для аналізу порушень глутаматного транспорту у мозкових нейронах [24, 25]. В тромбоцитах відбувається експресія низки глутаматних транспортерів плазматичної мембрани, а також рецепторів глутамату. Нещодавно було продемонстровано подібність процесів транспорту глутамату у нервових терміналях та тромбоцитах, проте останні мають обмежене використання у дослідженнях [33]. Глутамат вивільняється з тромбоцитів виключно шляхом екзоцитозу [25]. В перспективі було б доцільно розробити системи для всебічної оцінки процесів, які пов'язані з глутаматом, зокрема концентрації глутамату в крові та спинномозковій рідині, характеристики транспортних процесів у тромбоцитах тощо. Це має діагностичне та прогностичне значення і необхідно для прийняття рішення щодо лікування пацієнта, зокрема для вибору оптимального індивідуального температурного режиму для пацієнтів з терапевтичною гіпотермією під час лікування ішемічної хвороби і травм головного мозку, а також хірургічних втручань у дугу аорти.

На завершальному етапі досліджень було використано розроблений глутамат-чутливий біосенсор для визначення концентрацій глутамату в продуктах харчування, а саме – в соусах і приправах. Контролювати вміст глутамату в харчових продуктах є необхідним, оскільки в даний час харчова промисловість та заклади громадського харчування пропонують велику кількість продуктів з додаванням іноді занадто значних концентрацій глутамату натрію як підсилювач смаку.

Розрахунок концентрації глутамату у досліджуваних зразках на основі біосенсорних вимірювань проводили за допомогою двох підходів – з використанням калібрувального графіка та методу стандартних додавань, та встановлено концентрації глутамату у 6 соусах і 4 приправах. Для контролю результатів біосенсора, паралельно було проведено визначення концентрацій глутамату в цих же зразках за допомогою спектрофотометричного методу та показано гарну кореляцію результатів, отриманими даним методом і біосенсором ( $R^2 = 0,989$ ). Масова доля глутамату, що містилась в соусах, становила від 0,4 до 2,4 %, а в приправах – від 4,6 до 9,7%.

Результати дослідження показали, що наявність в розчині соусів та приправ суттєво не впливає на величину спектрофотометричного відгуку, отриманого при додаванні модельного розчину глутамату. Це свідчить про відсутність суттєвих матричних ефектів і адекватність підібраного контрольного методу.

Відтворюваність відгуків біосенсора при аналізі зразків харчових продуктів була досить гарною: відносне стандартне відхилення 12 відгуків біосенсора при аналізі одного й того ж харчового зразка становило 2,7 %. Показано, що розведення зразків суттєво не впливало на біосенсорне визначення кінцевої концентрації глутамату – при розведеннях соусу від 700 разів до 2917 разів результати біосенсора були однакові (з врахуванням ступеня розведення).

Розроблений біосенсор можна використовувати для швидкого визначення глутамату у зразках харчових продуктів з мінімальною необхідністю в пробопідготовці. Тривалість одного аналізу становить близько 5 хв.

Окремо слід розглянути приблизну вартість біосенсора і всієї установки для вимірювань. Всі необхідні компоненти і їх вартість станом на жовтень 2018 р. наведені на рис. 6.3.

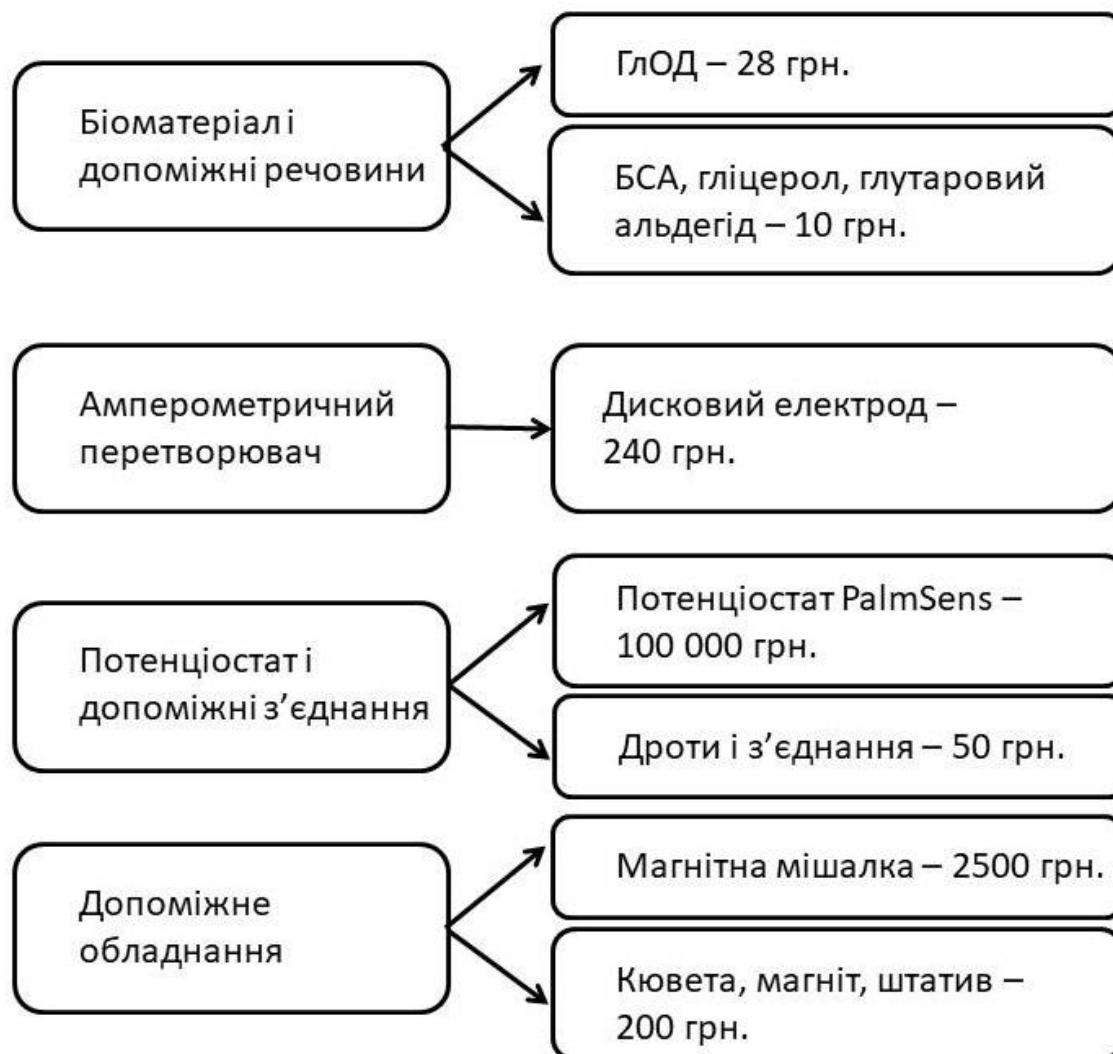


Рис. 6.3. Компоненти установки для біосенсорних вимірювань і їх приблизна вартість

Для виготовлення біоселективного елемента біосенсора використовується фермент ГЛОД, одна баночка якого (25 од. акт.) коштує у виробника 52 000 японських єн, що дорівнює 12 400 грн. Даної кількості достатньо для 450

біосенсорів, і, відповідно, для одного біосенсора необхідно фермента на суму 28 грн. Вартість допоміжних речовин (БСА, гліцерол, глутаровий альдегід) становить близько 10 грн для одного біосенсора.

Платиновий дріт необхідного діаметра коштує у виробника (Sigma-Aldrich, США) 1 241 євро за 1 метр (4 г), або 38 030 грн. Для виготовлення амперометричного дискового платинового перетворювача необхідно близько 5 мм дроту, вартість якого становить 190 грн. Вартість скляної трубочки і допоміжних з'єднань становить 50 грн. Таким чином, собівартість одного перетворювача – близько 240 грн.

Для біосенсорних вимірювань використовується потенціостат PalmSens вартістю 3250 євро, або 100000 грн. Він є найдорожчою складовою біосенсорної установки. Втім, слід відзначити, що потенціостат є універсальним і може використовуватись не лише з розробленим в даній роботі біосенсором, а і з майже будь-яким амперометричним біосенсором.

Повна вартість установки для біосенсорних вимірювань становить близько 103 000 грн, а вартість замінного елемента (перетворювача з біоселективної мембраною) – 280 грн. Це значно менше за вартість, наприклад, приладів для ВЕРХ, які традиційно використовуються для визначення концентрацій глутамату.

## 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 елементу 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  $\leq 5$  %), 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 синаптосомами та рівень його накопичення в синаптосомах, а також тонічне та стимульоване вивільнення глутамату з синаптосом 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.

**СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ**

1. Lv K., Song W., Tang R., Pan Z., Zhang Y., Xu Y., Lv B., Fan Y., Xu M. Neurotransmitter alterations in the anterior cingulate cortex in Crohn's disease patients with abdominal pain: A preliminary MR spectroscopy study. *NeuroImage: Clinical*. 2018. Vol. 20. P. 793–799.
2. Kaur R., Mehan S., Singh S. Understanding multifactorial architecture of Parkinson's disease: pathophysiology to management. *Neurological Sciences*. 2018. P. 1–11.
3. Macrez R., Stys P. K., Vivien D., Lipton S. A., Docagne F. Mechanisms of glutamate toxicity in multiple sclerosis: biomarker and therapeutic opportunities. *The Lancet Neurology*. 2016. Vol. 15, № 10. P. 1089–1102.
4. Yang W., Yang R., Luo J., He L., Liu J., Zhang J. Increased Absolute Glutamate Concentrations and Glutamate-to-Creatine Ratios in Patients With Methamphetamine Use Disorders. *Frontiers in Psychiatry*. 2018. Vol. 9. P. 368.
5. Wang T., Yao W., He Q., Shao Y., Zheng R., Huang F. L-leucine stimulates glutamate dehydrogenase activity and glutamate synthesis by regulating mTORC1/SIRT4 pathway in pig liver. *Animal Nutrition*. 2018. Vol. 4, № 3. P. 329–338.
6. Henry-Unaeze H. N. Update on food safety of monosodium L -glutamate (MSG). *Pathophysiology*. 2017. Vol. 24, № 4. P. 243–249.
7. Moody A. S., Sharma B. Multi-metal, multi-wavelength surface-enhanced raman spectroscopy detection of neurotransmitters. *ACS Chemical Neuroscience*. 2018. Vol. 9, № 6. P. 1380–1387.
8. Defaix C., Solgadi A., Pham T. H., Gardier A. M., Chaminade P., Tritschler L. Rapid analysis of glutamate, glutamine and GABA in mice frontal cortex microdialysis samples using HPLC coupled to electrospray tandem mass spectrometry. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. 2018. Vol. 152. P. 31–38.

9. Fontana A. C. K. Protocols for measuring glutamate uptake: dose-response and kinetic assays in in vitro and ex vivo systems. *Current Protocols in Pharmacology*. 2018. Vol. 82, № 1. P. e45.
10. Campos C. D. M., Braga P. A., Reyes F. G. R., DaSilva J. A. F. Elimination of the artefact peaks in capillary electrophoresis determination of glutamate by using organic solvents in sample preparation. *Journal of Separation Science*. 2015. Vol. 38, № 21. P. 3781–3787.
11. Brosnan J. T., Brosnan M. E. Glutamate: a truly functional amino acid. *Amino acids*. 2013. Vol. 45, № 3. P. 413–418.
12. Danbolt N. C. Glutamate uptake. *Progress in neurobiology*. 2001. Vol. 65, № 1. P. 1–105.
13. Viña J. R., DeJoseph M. R., Hawkins P. A., Hawkins R. A. Penetration of glutamate into brain of 7-day-old rats. *Metabolic Brain Disease*. 1997. Vol. 12, № 3. P. 219–227.
14. Hertz L., Dringen R., Schousboe A., Robinson S. R. Astrocytes: glutamate producers for neurons. *Journal of neuroscience research*. 1999. Vol. 57, № 4. P. 417–28.
15. Schousboe A., Westergaard N., Waagepetersen H. S., Larsson O. M., Bakken I. J., Sonnewald U. Trafficking between glia and neurons of TCA cycle intermediates and related metabolites. *Glia*. 1997. Vol. 21, № 1. P. 99–105.
16. Ventura R., Harris K. M. Three-dimensional relationships between hippocampal synapses and astrocytes. *The Journal of Neuroscience*. 1999. Vol. 19, № 16. P. 6897–6906.
17. Schousboe A., Scafidi S., Bak L. K., Waagepetersen H. S., McKenna M. C. Glutamate metabolism in the brain focusing on astrocytes. 2014. P. 13–30.
18. Hoft S., Griemsmann S., Seifert G., Steinhauser C. Heterogeneity in expression of functional ionotropic glutamate and GABA receptors in astrocytes across brain regions: insights from the thalamus. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*. 2014. Vol. 369, № 1654. P. 20130602.
19. Nedergaard M., Takano T., Hansen A. J. Beyond the role of glutamate as a



- neurotransmitter. *Nature reviews. Neuroscience*. 2002. Vol. 3, № 9. P. 748–55.
20. Auger C., Attwell D. Fast removal of synaptic glutamate by postsynaptic transporters. *Neuron*. 2000. Vol. 28, № 2. P. 547–58.
  21. Yamamoto T., Rossi S., Stiefel M., Doppenberg E., Zauner A., Bullock R., Marmarou A. CSF and ECF glutamate concentrations in head injured patients. *Acta neurochirurgica. Supplement*. 1999. Vol. 75. P. 17–9.
  22. Coccaro E. F., Lee R., Vezina P. Cerebrospinal fluid glutamate concentration correlates with impulsive aggression in human subjects. *Journal of Psychiatric Research*. 2013. Vol. 47, № 9. P. 1247–1253.
  23. Manev H., Favaron M., Guidotti A., Costa E. Delayed increase of Ca<sup>2+</sup> influx elicited by glutamate: role in neuronal death. *Molecular pharmacology*. 1989. Vol. 36, № 1. P. 106–12.
  24. Borisova T. Permanent dynamic transporter-mediated turnover of glutamate across the plasma membrane of presynaptic nerve terminals: arguments in favor and against. *Reviews in the Neurosciences*. 2016. Vol. 27, № 1.
  25. Borisova T., Borysov A. Putative duality of presynaptic events. *Reviews in the Neurosciences*. 2016. Vol. 27, № 4. P. 377–383.
  26. Zhu S., Gouaux E. Structure and symmetry inform gating principles of ionotropic glutamate receptors. *Neuropharmacology*. 2017. Vol. 112. P. 11–15.
  27. Gill S. S., Pulido O. M., Mueller R. W., McGuire P. F. Molecular and immunochemical characterization of the ionotropic glutamate receptors in the rat heart. *Brain research bulletin*. 1998. Vol. 46, № 5. P. 429–34.
  28. Weaver C. D., Yao T. L., Powers A. C., Verdoorn T. A. Differential expression of glutamate receptor subtypes in rat pancreatic islets. *The Journal of biological chemistry*. 1996. Vol. 271, № 22. P. 12977–84.
  29. Gill S. S., Pulido O. M. Glutamate receptors in peripheral tissues: current knowledge, future research, and implications for toxicology. *Toxicologic pathology*. 2001. Vol. 29, № 2. P. 208–23.
  30. Janovjak H., Sandoz G., Isacoff E. Y. A modern ionotropic glutamate receptor with a K<sup>+</sup> selectivity signature sequence. *Nature Communications*. 2011. Vol.

- 2, № 1. P. 232.
31. Lam H.-M., Chiu J., Hsieh M.-H., Meisel L., Oliveira I. C., Shin M., Coruzzi G. Glutamate-receptor genes in plants. *Nature*. 1998. Vol. 396, № 6707. P. 125–126.
  32. Forde B. G., Roberts M. R. Glutamate receptor-like channels in plants: a role as amino acid sensors in plant defence? *F1000Prime Reports*. 2014. Vol. 6. P. 37–44.
  33. Pastukhov A., Krisanova N., Maksymenko V., Borisova T. Personalized approach in brain protection by hypothermia: individual changes in non-pathological and ischemia-related glutamate transport in brain nerve terminals. *EPMA Journal*. 2016. Vol. 7, № 1. P. 26.
  34. Gottlieb M., Wang Y., Teichberg V. I. Blood-mediated scavenging of cerebrospinal fluid glutamate. *Journal of Neurochemistry*. 2003. Vol. 87, № 1. P. 119–126.
  35. Wang Y., Gottlieb M., Teichberg V. I. An evaluation of erythrocytes as plasma glutamate scavengers for enhanced brain-to-blood glutamate efflux. *Neurochemical Research*. 2004. Vol. 29, № 4. P. 755–760.
  36. O’Kane R. L., Martínez-López I., DeJoseph M. R., Viña J. R., Hawkins R. A. Na<sup>+</sup>-dependent glutamate transporters (EAAT1, EAAT2, and EAAT3) of the blood-brain barrier. *Journal of Biological Chemistry*. 1999. Vol. 274, № 45. P. 31891–31895.
  37. Aliprandi A., Longoni M., Stanzani L., Tremolizzo L., Vaccaro M., Begni B., Galimberti G., Garofolo R., Ferrarese C. Increased plasma glutamate in stroke patients might be linked to altered platelet release and uptake. *Journal of cerebral blood flow and metabolism: official journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism*. 2005. Vol. 25, № 4. P. 513–519.
  38. Ghobadi S., Gorton L. Bienzyme carbon paste electrodes for L-glutamate determination. *Current Separations*. 1996. Vol. 4. P. 94–102.
  39. Almeida N. F., Mulchandani A. K. A mediated amperometric enzyme electrode

- using tetrathiafulvalene and L-glutamate oxidase for the determination of L-glutamic acid. *Analytica Chimica Acta*. 1993. Vol. 282, № 2. P. 353–361.
40. Villarta R. L., Cunningham D. D., Guilbault G. G. Amperometric enzyme electrodes for the determination of L-glutamate. *Talanta*. 1991. Vol. 38, № 1. P. 49–55.
41. Dremel B. A. A., Schmid R. D., Wolfbeis O. S. Comparison of two fibre-optic L-glutamate biosensors based on the detection of oxygen or carbon dioxide, and their application in combination with flow-injection analysis to the determination of glutamate. *Analytica Chimica Acta*. 1991. Vol. 248, № 2. P. 351–359.
42. Vahjen W., Bradley J., Bilitewski U., Schmid R. D. Mediated enzyme electrode for the determination of L-glutamate. *Analytical Letters*. 1991. Vol. 24, № 8. P. 1445–1452.
43. Umukoro S., Oluwole G. O., Olamijowon H. E., Omogbiya A. I., Eduviere A. T. Effect of monosodium glutamate on behavioral phenotypes, biomarkers of oxidative stress in brain tissues and liver enzymes in mice. *World Journal of Neuroscience*. 2015. Vol. 05, № 05. P. 339–349.
44. Bawaskar H., Bawaskar P., Bawaskar P. Chinese restaurant syndrome. *Indian Journal of Critical Care Medicine*. 2017. Vol. 21, № 1. P. 49.
45. Freeman M. Reconsidering the effects of monosodium glutamate: A literature review. *Journal of the American Academy of Nurse Practitioners*. 2006. Vol. 18, № 10. P. 482–486.
46. Mondal M., Sarkar K., Nath P. P., Paul G. Monosodium glutamate suppresses the female reproductive function by impairing the functions of ovary and uterus in rat. *Environmental Toxicology*. 2018. Vol. 33, № 2. P. 198–208.
47. Dong H. V., Robbins W. A. Ingestion of monosodium glutamate (MSG) in adult male rats reduces sperm count, testosterone, and disrupts testicular histology. *Nutrition Bytes*. 2015. Vol. 19, № 1.
48. He K., Du S., Xun P., Sharma S., Wang H., Zhai F., Popkin B. Consumption of monosodium glutamate in relation to incidence of overweight in Chinese adults:

- China Health and Nutrition Survey (CHNS). *The American Journal of Clinical Nutrition*. 2011. Vol. 93, № 6. P. 1328–1336.
49. Araujo T. R., Freitas I. N., Vettorazzi J. F., Batista T. M., Santos-Silva J. C., Bonfleur M. L., Balbo S. L., Boschero A. C., Carneiro E. M., Ribeiro R. A. Benefits of L-alanine or L-arginine supplementation against adiposity and glucose intolerance in monosodium glutamate-induced obesity. *European Journal of Nutrition*. 2017. Vol. 56, № 6. P. 2069–2080.
  50. Sharma A. Monosodium glutamate-induced oxidative kidney damage and possible mechanisms: a mini-review. *Journal of Biomedical Science*. 2015. Vol. 22, № 1. P. 93.
  51. Khalil R. M., Khedr N. F. Curcumin protects against monosodium glutamate neurotoxicity and decreasing NMDA2B and mGluR5 expression in rat hippocampus. *Neurosignals*. 2016. P. 81–87.
  52. Radnitz C. L. Food-triggered migraine: a critical review. *Annals of Behavioral Medicine*. 1990. Vol. 12, № 2. P. 51–65.
  53. Yang W. H., Drouin M. A., Herbert M., Mao Y., Karsh J. The monosodium glutamate symptom complex: assessment in a double-blind, placebo-controlled, randomized study. *The Journal of allergy and clinical immunology*. 1997. Vol. 99, № 6 Pt 1. P. 757–62.
  54. Shi Z., Yuan B., Taylor A. W., Dal Grande E., Wittert G. A. Monosodium glutamate intake increases hemoglobin level over 5 years among Chinese adults. *Amino Acids*. 2012. Vol. 43, № 3. P. 1389–1397.
  55. Rudyk M. P., Pozur V. V., Voieikova D. O., Hurmach Y. V., Khranovska N. M., Skachkova O. V., Svyatetska V. M., Fedorchuk O. G., Skivka L. M., Berehova T. V., Ostapchenko L. I. Sex-based differences in phagocyte metabolic profile in rats with monosodium glutamate-induced obesity. *Scientific Reports*. 2018. Vol. 8, № 1. P. 5419.
  56. Saikusa T., Horino T., Mori Y. Distribution of free amino acids in the rice kernel and kernel fractions and the effect of water soaking on the distribution. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 1994. Vol. 42, № 5. P. 1122–

- 1125.
57. Meldrum B. S. Glutamate as a neurotransmitter in the brain: review of physiology and pathology. *The Journal of Nutrition*. 2000. Vol. 130, № 4. P. 1007S–1015S.
  58. Howell J. A., Matthews A. D., Swanson K. C., Harmon D. L., Matthews J. C. Molecular identification of high-affinity glutamate transporters in sheep and cattle forestomach, intestine, liver, kidney, and pancreas. *Journal of animal science*. 2001. Vol. 79, № 5. P. 1329–36.
  59. Husarova V., Ostatnikova D. Monosodium glutamate toxic effects and their implications for human intake: a review. *JMED Research*. 2013. P. 1–12.
  60. Brosnan M. E., Brosnan J. T. Hepatic glutamate metabolism: a tale of 2 hepatocytes. *The American Journal of Clinical Nutrition*. 2009. Vol. 90, № 3. P. 857S–861S.
  61. Henry-Unaeze H. N. Update on food safety of monosodium L -glutamate (MSG). *Pathophysiology*. 2017. Vol. 24, № 4. P. 243–249.
  62. Niaz K., Zaplatic E., Spoor J. Extensive use of monosodium glutamate: A threat to public health? *EXCLI journal*. 2018. Vol. 17. P. 273–278.
  63. Devi R., Gogoi S., Barua S., Sankar Dutta H., Bordoloi M., Khan R. Electrochemical detection of monosodium glutamate in foodstuffs based on Au@MoS<sub>2</sub>/chitosan modified glassy carbon electrode. *Food Chemistry*. 2019. Vol. 276. P. 350–357.
  64. Innocenti B., Parpura V., Haydon P. G. Imaging extracellular waves of glutamate during calcium signaling in cultured astrocytes. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*. 2000. Vol. 20, № 5. P. 1800–8.
  65. Herbreteau B., Lafosse M., Morin-Allory L., Dreux M. Automatic sugar analysis in the beet industry. Part I: Parameter optimization of a reversed phase HPLC carbohydrate determination. *Journal of High Resolution Chromatography*. 1990. Vol. 13, № 4. P. 239–243.
  66. McLamore E. S., Mohanty S., Shi J., Claussen J., Jedlicka S. S., Rickus J. L.,

- Porterfield D. M. A self-referencing glutamate biosensor for measuring real time neuronal glutamate flux. *Journal of neuroscience methods*. 2010. Vol. 189, № 1. P. 14–22.
67. Obrenovitch T. P., Zilkha E. Microdialysis coupled to online enzymatic assays. *Methods (San Diego, Calif.)*. 2001. Vol. 23, № 1. P. 63–71.
68. Kohno T., Asai S., Iribe Y., Hosoi I., Shibata K., Ishikawa K. An improved method for the detection of changes in brain extracellular glutamate levels. *Journal of neuroscience methods*. 1998. Vol. 81, № 1–2. P. 199–205.
69. Fosse V. M., Kolstad J., Fonnum F. A bioluminescence method for the measurement of L-glutamate: applications to the study of changes in the release of L-glutamate from lateral geniculate nucleus and superior colliculus after visual cortex ablation in rats. *Journal of neurochemistry*. 1986. Vol. 47, № 2. P. 340–9.
70. Murachi T., Tabata M. Use of a bioreactor consisting of sequentially aligned L-glutamate dehydrogenase and L-glutamate oxidase for the determination of ammonia by chemiluminescence. *Biotechnology and Applied Biochemistry*. 1987. Vol. 9, № 4. P. 303–309.
71. Krishna Veni N., Karthika D., Surya Devi M., Rubini M. F., Vishalini M., Pradeepa Y. J. Analysis of monosodium L-glutamate in food products by high-performance thin layer chromatography. *Journal of Young Pharmacists*. 2010. Vol. 2, № 3. P. 297–300.
72. Troise A. D., Fiore A., Roviello G., Monti S. M., Fogliano V. Simultaneous quantification of amino acids and Amadori products in foods through ion-pairing liquid chromatography–high-resolution mass spectrometry. *Amino Acids*. 2015. Vol. 47, № 1. P. 111–124.
73. Benveniste H., Hüttemeier P. C. Microdialysis--theory and application. *Progress in neurobiology*. 1990. Vol. 35, № 3. P. 195–215.
74. Hughes G., Pemberton R. M., Fielden P. R., Hart J. P. The design, development and application of electrochemical glutamate biosensors. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*. 2016. Vol. 79. P. 106–113.

75. Farina D. Implantable (Bio)sensors as new tools for wireless monitoring of brain neurochemistry in real time. *World Journal of Pharmacology*. 2014. Vol. 3, № 1. P. 1.
76. Mizutani F., Sato Y., Sawaguchi T., Yabuki S., Iijima S. Rapid measurement of transaminase activities using an amperometric L-glutamate-sensing electrode based on a glutamate oxidase–polyion complex-bilayer membrane. *Sensors and Actuators B: Chemical*. 1998. Vol. 52, № 1–2. P. 23–29.
77. Chang K.-S., Hsu W.-L., Chen H.-Y., Chang C.-K., Chen C.-Y. Determination of glutamate pyruvate transaminase activity in clinical specimens using a biosensor composed of immobilized L-glutamate oxidase in a photo-crosslinkable polymer membrane on a palladium-deposited screen-printed carbon electrode. *Analytica Chimica Acta*. 2003. Vol. 481, № 2. P. 199–208.
78. Alvarez-Crespo S. L., Lobo-Castañón M. J., Miranda-Ordieres A. J., Tuñón-Blanco P. Amperometric glutamate biosensor based on poly(o-phenylenediamine) film electrogenerated onto modified carbon paste electrodes. *Biosensors and Bioelectronics*. 1997. Vol. 12, № 8. P. 739–747.
79. Gholizadeh A., Shahrokhian S., Zad A. I., Mohajerzadeh S., Vosoughi M., Darbari S., Sanaee Z., Irajizad A., Mohajerzadeh S., Vosoughi M., Darbari S., Sanaee Z. Mediator-less highly sensitive voltammetric detection of glutamate using glutamate dehydrogenase/vertically aligned CNTs grown on silicon substrate. *Biosensors and Bioelectronics*. 2012. Vol. 31, № 1. P. 110–115.
80. Batra B., Kumari S., Pundir C. S. Construction of glutamate biosensor based on covalent immobilization of glutamate oxidase on polypyrrole nanoparticles/polyaniline modified gold electrode. *Enzyme and Microbial Technology*. 2014. Vol. 57. P. 69–77.
81. Ryan M. R., Lowry J. P., O'Neill R. D. Biosensor for neurotransmitter L-glutamic acid designed for efficient use of L-glutamate oxidase and effective rejection of interference. *The Analyst*. 1997. Vol. 122, № 11. P. 1419–1424.
82. Özel R. E., Ispas C., Ganesana M., Leiter J. C., Andreescu S. Glutamate oxidase biosensor based on mixed ceria and titania nanoparticles for the

- detection of glutamate in hypoxic environments. *Biosensors and Bioelectronics*. 2014. Vol. 52. P. 397–402.
83. Kwong A. W. K., Gründig B., Hu J., Renneberg R. Comparative study of hydrogel-immobilized l-glutamate oxidases for a novel thick-film biosensor and its application in food samples. *Biotechnology Letters*. 2000. Vol. 22, № 4. P. 267–272.
84. Batra B., Pundir C. S. S. An amperometric glutamate biosensor based on immobilization of glutamate oxidase onto carboxylated multiwalled carbon nanotubes/gold nanoparticles/chitosan composite film modified Au electrode. *Biosensors and Bioelectronics*. 2013. Vol. 47. P. 496–501.
85. Солдаткін О.О. Оптимізація одночасної роботи трьох мікробіосенсорів для мультианалізу глюкози, лактату та глутамату. *Sensor Electronics and Microsystem Technologies*. 2012. Vol. 3(9), № 3. P. 53–61.
86. Jamal M., Xu J., Razeeb K. M. Disposable biosensor based on immobilisation of glutamate oxidase on Pt nanoparticles modified Au nanowire array electrode. *Biosensors and Bioelectronics*. 2010. Vol. 26, № 4. P. 1420–1424.
87. Basu A. K., Chattopadhyay P., Roychudhuri U., Chakraborty R. Development of biosensor based on immobilized L-glutamate oxidase for determination of monosodium glutamate in food. *Indian journal of experimental biology*. 2006. Vol. 44, № 5. P. 392–8.
88. Meng L., Wu P., Chen G., Cai C., Sun Y., Yuan Z. Low potential detection of glutamate based on the electrocatalytic oxidation of NADH at thionine/single-walled carbon nanotubes composite modified electrode. *Biosensors and Bioelectronics*. 2009. Vol. 24, № 6. P. 1751–1756.
89. Hughes, G., Pemberton, R.M., Fielden, P.R., Hart J. P. Development of a disposable screen printed amperometric biosensor based on glutamate dehydrogenase, for the determination of glutamate in clinical and food applications. *Analytical and Bioanalytical Electrochemistry*. 2014. Vol. 6, № 4. P. 435–449.
90. Chakraborty S., Retna Raj C. Amperometric biosensing of glutamate using



- carbon nanotube based electrode. *Electrochemistry Communications*. 2007. Vol. 9, № 6. P. 1323–1330.
91. Hughes G., Pemberton R. M., Fielden P. R., Hart J. P. Development of a novel reagentless, screen-printed amperometric biosensor based on glutamate dehydrogenase and NAD<sup>+</sup>, integrated with multi-walled carbon nanotubes for the determination of glutamate in food and clinical applications. *Sensors and Actuators B: Chemical*. 2015. Vol. 216. P. 614–621.
  92. Girousi S. T., Pantazaki A. A., Voulgaropoulos A. N. Mitochondria-based amperometric biosensor for the determination of L-glutamic acid. *Electroanalysis*. 2001. Vol. 13, № 3. P. 243–245.
  93. Tang L., Zhu Y., Xu L., Yang X., Li C. Amperometric glutamate biosensor based on self-assembling glutamate dehydrogenase and dendrimer-encapsulated platinum nanoparticles onto carbon nanotubes. *Talanta*. 2007. Vol. 73, № 3. P. 438–443.
  94. Poitry S., Poitry-Yamat C., Innocent C., Cosnier S., Tsacopoulos M. Detection of glutamate released by neurons with an enzyme-based microelectrode: applications and limitations. *Electrochimica Acta*. 1997. Vol. 42, № 20–22. P. 3217–3223.
  95. Burmeister J. J., Pomerleau F., Palmer M., Day B. K., Huettl P., Gerhardt G. A. Improved ceramic-based multisite microelectrode for rapid measurements of L-glutamate in the CNS. *Journal of neuroscience methods*. 2002. Vol. 119, № 2. P. 163–71.
  96. Burmeister J. J., Gerhardt G. A. Ceramic-based multisite microelectrode arrays for in vivo electrochemical recordings of glutamate and other neurochemicals. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*. 2003. Vol. 22, № 8. P. 498–502.
  97. Burmeister J. J., Gerhardt G. A. Self-referencing ceramic-based multisite microelectrodes for the detection and elimination of interferences from the measurement of L-glutamate and other analytes. *Analytical Chemistry*. 2001. Vol. 73, № 5. P. 1037–1042.
  98. Belay A., Collins A., Ruzgas T., Kissinger P. T., Gorton L., Csöregi E. Redox

- hydrogel based bienzyme electrode for L-glutamate monitoring. *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis*. 1999. Vol. 19, № 1–2. P. 93–105.
99. Nakajima K., Yamagiwa T., Hirano A., Sugawara M. A glass capillary microelectrode based on capillarity and its application to the detection of L-glutamate release from mouse brain slices. *Analytical sciences: the international journal of the Japan Society for Analytical Chemistry*. 2003. Vol. 19, № 1. P. 55–60.
100. Md Muslim N. Z., Ahmad M., Heng L. Y., Saad B. Optical biosensor test strip for the screening and direct determination of L-glutamate in food samples. *Sensors and Actuators B: Chemical*. 2012. Vol. 161, № 1. P. 493–497.
101. Mizutani F., Sato Y., Hirata Y., Yabuki S. High-throughput flow-injection analysis of glucose and glutamate in food and biological samples by using enzyme/polyion complex-bilayer membrane-based electrodes as the detectors. *Biosensors and Bioelectronics*. 1998. Vol. 13, № 7–8. P. 809–815.
102. Isa I. M., Ab Ghani S. A non-plasticized chitosan based solid state electrode for flow injection analysis of glutamate in food samples. *Food Chemistry*. 2009. Vol. 112, № 3. P. 756–759.
103. Chen R. L. C., Matsumoto K. Sequential enzymatic monitoring of glucose, ethanol and glutamate in bioreactor fermentation broth containing a high salt concentration by a multi-channel flow-injection analysis method. *Analytica Chimica Acta*. 1995. Vol. 308, № 1. P. 145–151.
104. Jamal M., Hasan M., Mathewson A., Razeeb K. M. Disposable sensor based on enzyme-free Ni nanowire array electrode to detect glutamate. *Biosensors and Bioelectronics*. 2013. Vol. 40, № 1. P. 213–218.
105. Alves L. M., Castro A. C. H., Oliveira S. M., Júnior L. C. O., Goulart L. R., Bonetti A. M., Machado A. E. H., Ueira-Vieira C., Madurro J. M., Brito-Madurro A. G. Development of a mimetic system for electrochemical detection of glutamate. *Journal of Solid State Electrochemistry*. 2016. Vol. 20, № 9. P. 2479–2489.
106. White S. F., Turner A. P. F., Bilitewski U., Schmid R. D., Bradley J. Lactate,

- glutamate and glutamine biosensors based on rhodinised carbon electrodes. *Analytica Chimica Acta*. 1994. Vol. 295, № 3. P. 243–251.
107. Berners M. O. M., Boutelle M. G., Fillenz M. Online measurement of brain glutamate with an enzyme/polymer-coated tubular electrode. *Analytical Chemistry*. 1994. Vol. 66, № 13. P. 2017–2021.
108. Zilkha E., Koshy A., Obrenovitch T. P., Bennetto H. P., Symon L. Amperometric biosensors for on-line monitoring of extracellular glucose and glutamate in the brain. *Analytical Letters*. 1994. Vol. 27, № 3. P. 453–473.
109. Li Q., Ye B., Zhang S., Yu J. Determination of L-glutamate using flow injection analysis with immobilized L-glutamate oxidase reactor. *Chinese journal of biotechnology*. 1994. Vol. 10, № 4. P. 291–7.
110. Bahadır E. B., Sezgintürk M. K. Applications of commercial biosensors in clinical, food, environmental, and biothreat/biowarfare analyses. *Analytical Biochemistry*. 2015. Vol. 478. P. 107–120.
111. Kirdeciler S. K., Soy E., Öztürk S., Kucherenko I., Soldatkin O., Dzyadevych S., Akata B. A novel urea conductometric biosensor based on zeolite immobilized urease. *Talanta*. 2011. Vol. 85, № 3. P. 1435–1441.
112. Bereghetskyy A. L., Schuvaylo O. M., Arkhypova V. M., Shkotova L. V., Chovelon J.-M., Soldatkin O. P., Dzyadevych S. V. Investigation and optimization of different transducers for creation of amperometric biosensors. *Sensor Electronics and Microsystem Technologies*. 2005. Vol. 2, № 2. P. 55–62.
113. European convention for the protection of vertebrate animals used for experimental and other scientific purposes. *European Treaty Series*. 1986. № 123. P. 1–11.
114. Cotman C. W. Isolation of synaptosomal and synaptic plasma membrane fractions. *Methods in enzymology*. 1974. Vol. 31. P. 445–52.
115. Larson E., Howlett B., Jagendorf A. Artificial reductant enhancement of the Lowry method for protein determination. *Analytical biochemistry*. 1986. Vol. 155, № 2. P. 243–8.

116. Krisanova N., Sivko R., Kasatkina L., Borysov A., Borisova T. Excitotoxic potential of exogenous ferritin and apoferritin: Changes in ambient level of glutamate and synaptic vesicle acidification in brain nerve terminals. *Molecular and Cellular Neuroscience*. 2014. Vol. 58. P. 95–104.
117. Krisanova N., Sivko R., Kasatkina L., Borisova T. Neuroprotection by lowering cholesterol: A decrease in membrane cholesterol content reduces transporter-mediated glutamate release from brain nerve terminals. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease*. 2012. Vol. 1822, № 10. P. 1553–1561.
118. Cosnier S., Holzinger M. Electrosynthesized polymers for biosensing. *Chemical Society Reviews*. 2011. Vol. 40, № 5. P. 2146.
119. Killoran S. J., O'Neill R. D. Characterization of permselective coatings electrosynthesized on Pt–Ir from the three phenylenediamine isomers for biosensor applications. *Electrochimica Acta*. 2008. Vol. 53, № 24. P. 7303–7312.
120. Kelly S. C., O'Connell P. J., O'Sullivan C. K., Guilbault G. G. Development of an interferent free amperometric biosensor for determination of l-lysine in food. *Analytica Chimica Acta*. 2000. Vol. 412, № 1–2. P. 111–119.
121. Schuvailo O. M., Soldatkin O. O., Lefebvre A., Cespuglio R., Soldatkin A. P. Highly selective microbiosensors for in vivo measurement of glucose, lactate and glutamate. *Analytica Chimica Acta*. 2006. Vol. 573–574. P. 110–116.
122. Zhang Y., Hu Y., Wilson G. S., Moatti-Sirat D., Poitout V., Reach G. Elimination of the acetaminophen interference in an implantable glucose sensor. *Analytical Chemistry*. 1994. Vol. 66, № 7. P. 1183–1188.
123. Moussy F., Harrison D. J., O'Brien D. W., Rajotte R. V. Performance of subcutaneously implanted needle-type glucose sensors employing a novel trilayer coating. *Analytical chemistry*. 1993. Vol. 65, № 15. P. 2072–7.
124. Wilkins E., Atanasov P. Glucose monitoring: state of the art and future possibilities. *Medical engineering & physics*. 1996. Vol. 18, № 4. P. 273–88.
125. Marchenko S. V., Kucherenko I. S., Soldatkin O. O., Soldatkin A. P.

- Potentiometric biosensor system based on recombinant urease and creatinine deiminase for urea and creatinine determination in blood dialysate and serum. *Electroanalysis*. 2015. Vol. 27, № 7.
126. Borisova T., Sivko R., Borysov A., Krisanova N. Diverse presynaptic mechanisms underlying methyl- $\beta$ -cyclodextrin-mediated changes in glutamate transport. *Cellular and molecular neurobiology*. 2010. Vol. 30, № 7. P. 1013–1023.
127. Borisova T., Krisanova N., Sivko R., Kasatkina L., Borysov A., Griffin S., Wireman M. Presynaptic malfunction: the neurotoxic effects of cadmium and lead on the proton gradient of synaptic vesicles and glutamate transport. *Neurochemistry international*. 2011. Vol. 59, № 2. P. 272–9.
128. Krisanova N., Kasatkina L., Sivko R., Borysov A., Nazarova A., Slenzka K., Borisova T. Neurotoxic potential of lunar and martian dust: influence on em, proton gradient, active transport, and binding of glutamate in rat brain nerve terminals. *Astrobiology*. 2013. Vol. 13, № 8. P. 679–92.
129. Kanwal S., Incharoensakdi A. Extraction and quantification of GABA and glutamate from cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803. *Bio-protocol*. 2016. Vol. 6, № 18.
130. Wojnicz A., Avendaño Ortiz J., Casas A. I., Freitas A. E., G. López M., Ruiz-Nuño A. Simultaneous determination of 8 neurotransmitters and their metabolite levels in rat brain using liquid chromatography in tandem with mass spectrometry: Application to the murine Nrf2 model of depression. *Clinica Chimica Acta*. 2016. Vol. 453. P. 174–181.
131. Zhou Y., Danbolt N. C. Glutamate as a neurotransmitter in the healthy brain. *Journal of Neural Transmission*. 2014. Vol. 121, № 8. P. 799–817.
132. Jedlicka S. S., Little K. M., Nivens D. E., Zemlyanov D., Rickus J. L. Peptide ormosils as cellular substrates. *Journal of Materials Chemistry*. 2007. Vol. 17, № 48. P. 5058.
133. Watson C. J., Venton B. J., Kennedy R. T. In vivo measurements of neurotransmitters by microdialysis sampling. *Analytical chemistry*. 2006. Vol.

- 78, № 5. P. 1391–9.
134. Day B. K., Pomerleau F., Burmeister J. J., Huettl P., Gerhardt G. A. Microelectrode array studies of basal and potassium-evoked release of l-glutamate in the anesthetized rat brain. *Journal of Neurochemistry*. 2006. Vol. 96, № 6. P. 1626–1635.
  135. Niwa O., Horiuchi T., Torimitsu K. Continuous monitoring of L-glutamate released from cultured nerve cells by an online sensor coupled with microcapillary sampling. *Biosensors and Bioelectronics*. 1997. Vol. 12, № 4. P. 311–319.
  136. Oldenziel W. H., Zeyden M. van der, Dijkstra G., Ghijsen W. E. J. M., Karst H., Cremers T. I. F. H., Westerink B. H. C. Monitoring extracellular glutamate in hippocampal slices with a microsensor. *Journal of Neuroscience Methods*. 2007. Vol. 160, № 1. P. 37–44.
  137. Dale N., Hatz S., Tian F., Llaudet E. Listening to the brain: microelectrode biosensors for neurochemicals. *Trends in Biotechnology*. 2005. Vol. 23, № 8. P. 420–428.
  138. Wilson G. S., Gifford R. Biosensors for real-time in vivo measurements. *Biosensors and Bioelectronics*. 2005. Vol. 20, № 12. P. 2388–2403.
  139. Borisova T. A., Himmelreich N. H. Centrifuge-induced hypergravity: [3H]GABA and L-[14C]glutamate uptake, exocytosis and efflux mediated by high-affinity, sodium-dependent transporters. *Advances in Space Research*. 2005. Vol. 36, № 7. P. 1340–1345.
  140. Borisova T., Krisanova N., Himmelreich N. Exposure of animals to artificial gravity conditions leads to the alteration of the glutamate release from rat cerebral hemispheres nerve terminals. *Advances in Space Research*. 2004. Vol. 33, № 8. P. 1362–1367.
  141. Borisova T. Cholesterol and presynaptic glutamate transport in the brain. New York, USA: Springer New York, 2013. ISBN 978-1-4614-7758-7.
  142. Baker D. A., Xi Z.-X., Shen H., Swanson C. J., Kalivas P. W. The origin and neuronal function of in vivo nonsynaptic glutamate. *The Journal of*

- neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*. 2002. Vol. 22, № 20. P. 9134–41.
143. Soldatkin O. O., Schuvailo O. M., Marinesco S., Cespuglio R., Soldatkin A. P. Microbiosensor based on glucose oxidase and hexokinase co-immobilised on platinum microelectrode for selective ATP detection. *Talanta*. 2009. Vol. 78, № 3. P. 1023–1028.
144. Borisova T., Borysov A., Pastukhov A., Krisanova N. Dynamic gradient of glutamate across the membrane: glutamate/aspartate-induced changes in the ambient level of L-[14C]glutamate and D-[3H]aspartate in rat brain nerve terminals. *Cellular and Molecular Neurobiology*. 2016. Vol. 36, № 8. P. 1229–1240.

## ДОДАТОК А

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 синапсом 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 синапсом 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 синаптосомах: 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., Кірдесілер 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).*