

Національна академія наук України,
Інститут молекулярної біології і генетики

Кваліфікаційна наукова
праця на правах рукопису

МРУГА ДАРИНА ОЛЕКСАНДРІВНА

УДК 543.553, 577.15, 543.06

ДИСЕРТАЦІЯ
РОЗРОБКА ДІАГНОСТИЧНОЇ БІОСЕНСОРНОЇ СИСТЕМИ ДЛЯ
ОДНОЧАСНОГО ВИЗНАЧЕННЯ АКТИВНОСТЕЙ
АЛАНІНАМІНОТРАНСФЕРАЗИ, АСПАРТАТАМІНОТРАНСФЕРАЗИ
ТА ЇХ СПІВВІДНОШЕННЯ

091 БІОЛОГІЯ

09 БІОЛОГІЯ

Подається на здобуття наукового ступеня доктора філософії

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

Мруга Д.О.

Науковий керівник Солдаткін Олександр Олексійович, доктор біологічних наук, с.н.с.

Київ - 2026

АНОТАЦІЯ

Мруга Д.О. Розробка біосенсорної системи для одночасного визначення активності АЛТ, АСТ та їх співвідношення для медичної діагностики.- Кваліфікаційна наукова праця на правах рукопису.

Дисертація на здобуття наукового ступеня доктора філософії за спеціальністю 091 Біологія — Інститут молекулярної біології і генетики НАН України, Київ, 2026.

Аланінамінотрансфераза (АЛТ) та аспартатамінотрансфераза (АСТ) є ключовими біохімічними маркерами функціонального стану печінки та міокарда, рівень яких суттєво зростає при патологіях печінки (гепатит, цироз), серцево-судинних захворюваннях (інфаркт міокарда, серцева недостатність) та інших патологічних станах (пreeклампсія, міопатії, метаболічний синдром). Одночасне визначення активності обох трансаміназ та розрахунок коефіцієнта де Рітиса (АСТ/АЛТ) мають важливе діагностичне значення для диференціації печінкових та кардіологічних захворювань. Традиційні лабораторні методи (спектрофотометрія, флуориметрія, імуноензимний аналіз) потребують складного обладнання, тривалої пробопідготовки та централізованої інфраструктури, що обмежує їх застосування для експрес-діагностики в польових умовах. Розробка портативних біосенсорних систем для швидкого, чутливого та економічно ефективного визначення трансаміназ є особливо актуальним завданням біотехнології в контексті світової тенденції до розвитку персоналізованої медицини.

Метою дисертаційної роботи була розробка, оптимізація та апробація амперометричної біосенсорної системи для одночасного визначення активності аланінамінотрансферази (АЛТ) та аспартатамінотрансферази (АСТ) у біологічних рідинах людини.

Аналіз наукової літератури виявив, що для визначення АСТ та АЛТ запропоновано численні біосенсорні підходи, переважно на основі електрохімічних (47% публікацій, головним чином хроноамперометричних) та оптичних (34% публікацій) методів визначення. Однак незважаючи на

багаторічний досвід активних досліджень, жодна розробка не досягла рівня комерціалізації. До того ж, серед описаних 58 біосенсорних систем для визначення АСТ і АЛТ лише 7 систем здатні до одночасної та диференційованої детекції обох цих ензимів, при чому всі вони базуються виключно на оптичних методах детекції, а подібні електрохімічні системи взагалі відсутні.

У роботі обґрунтовано вибір амперометричного методу детекції як оптимального для визначення активності трансаміназ, оскільки він забезпечує низькі межі визначення (1–3 Од.акт./л), широкий лінійний діапазон (2–3 порядки), швидкий відгук (1–3 хв), незалежність від оптичних властивостей та буферної ємності проби, можливість мініатюризації та низьку собівартість виробництва. **Принцип функціонування** розробленої біосенсорної системи заснований на каскадних ензиматичних реакціях: трансаміназа каталізує перенесення аміногрупи з відповідного субстрату (L-аланіну для АЛТ або L-аспартату для АСТ) на α -кетоглутарат (α -КГ) з утворенням глутамату та кетокислоти (пірувату або оксалоацетату відповідно); ці продукти трансаміназних реакцій окиснюються іммобілізованими оксидазами (піруватоксидазою ПОкс або глутаматоксидазою ГлОкс) з генерацією електроактивного пероксиду водню, який у свою чергу окиснюється на платиновому дисковому електроді при потенціалі +600 мВ відносно електроду порівняння Ag/AgCl, створюючи амперометричний сигнал, пропорційний активності відповідної трансамінази в аналізованому розчині.

Перший етап дослідження включав розробку та оптимізацію АСТ-чутливого амперометричного біосенсора на основі ГлОкс.

Платиновий дисковий електрод модифікували електрополімеризованим поліфенілендіаміном (ПФД) для блокування електроактивних інтерферуєчих речовин. Дослідження морфології поверхні цих робочих електродів методом скануючої електронної мікроскопії підтвердило формування рівномірного шару з органічного матеріалу товщиною 100–150 нм з губчастою структурою.

Біоселективний елемент формували шляхом іммобілізації ГлОкс на модифікованому електроді методом поперечного зшивання з БСА за допомогою глутарового альдегіду. Оптимізовано склад та процедуру формування біоселективної мембрани (2,6% ГлОкс, 1,33% БСА, 3,33% гліцерину, 0,33% глутарового альдегіду, 35 хвилин при кімнатній температурі) та склад робочого буфера (20 мМ буфер HEPES, pH 7,4, з додаванням 2 мМ α -КГ та 8 мМ L-аспартату). Досліджено стабільність та селективність роботи біосенсора. Вивчено вплив концентрації вільного білку, йонної сили та коензиму в розчині на функціонування розробленої біосенсорної системи.

Другий етап передбачав створення та порівняння характеристик двох варіантів АЛТ-чутливих біосенсорів. Перший на основі ПОкс (специфічної до продукту АЛТ-реакції – пірувату) та на основі ГлОкс (каталізує розщеплення спільного продукту обох трансаміназ – глутамату). Платинові дискові робочі електроди також модифікували ПФД. Біоселективну мембрану на основі ПОкс створювали шляхом її включення в фотополімер PVA-SbQ. Оптимізовано склад та процедуру формування біоселективної мембрани (4,63% ПОкс, 1,67% БСА, 3,33% гліцерину, 13,2% PVA-SbQ, 2,4 Дж/см² отриманої енергії), склад робочого буфера (25 мМ буфер HEPES, pH 7,4, з додаванням 2 мМ α -КГ та 16 мМ аланіну). Другий варіант АЛТ-чутливого біосенсора на основі ГлОкс виготовляли за процедурою, розробленою на першому етапі роботи. Оптимальним робочим буфером для роботи другого варіанту сенсора був 20 мМ HEPES, pH 7,4, з додаванням 50 мкМ α -КГ та 4 мМ аспартату.

В роботі досліджено селективність та стабільність обох варіантів біосенсора, вивчено вплив концентрації вільного білку, йонної сили та коензиму в розчині на їх роботу. Порівняльний аналіз показав переваги біосенсора на основі ПОкс за низкою параметрів, зокрема специфічністю (відсутність перехресної чутливості до АСТ завдяки вимірюванню через піруват) та стабільністю, тому саме цей варіант було обрано для інтеграції в біосенсорну систему.

Третій етап включав об'єднання оптимізованих АСТ- та АЛТ-чутливих моносенсорів у єдину амперометричну систему для одночасного та диференційованого визначення активності обох трансаміназ. Критичною проблемою інтеграції була неможливість прямої диференціації сигналів, оскільки обидві трансаміназні реакції продукують глутамат як спільний продукт, який реєструється АСТ-чутливим біосенсором на основі ГлОкс. Для вирішення цього завдання розроблено спеціалізовану трьохетапну процедуру послідовного внесення реагентів та математичного розрахунку активностей.

За результатами об'єднання моносенсорів у систему та оптимізації їх одночасної роботи було створено єдину біосенсорну систему, що вирізняється такими аналітичними характеристиками:

- для АЛТ – лінійний діапазон 1–500 Од.акт./л, мінімальна межа визначення – 1 Од.акт./л, чутливість 0,94 нА/хв на 100 Од.акт./л;
- для АСТ – лінійний діапазон 1–200 Од.акт./л, мінімальна межа визначення – 1 Од.акт./л, чутливість 4,39 нА/хв на 100 Од.акт./л;
- час повного аналізу обох ензимів становить близько 12 хвилин

Апробація системи на зразках сироватки крові людини показала високу кореляцію результатів із референсним спектрофотометричним методом (коефіцієнт кореляції $R=0,994$ для аналізу АЛТ та $R=0,989$ для АСТ).

Наукова новизна. Вперше розроблено мультианалітну електрохімічну біосенсорну систему для одночасного визначення активності АЛТ та АСТ на основі інтеграції двох амперометричних моносенсорів на основі іммобілізованих ПОкс та ГлОкс, відповідно. Також в роботі, задля високоспецифічного біосенсорного аналізу, запропоновано нову спеціалізовану процедуру послідовного внесення субстратів для диференціювання сигналів на АСТ та АЛТ.

Вперше здійснено порівняльний аналіз характеристик двох типів АЛТ-чутливих біосенсорів (на основі ПОкс та ГлОкс) та науково обґрунтовано вибір ПОкс варіанту за критеріями специфічності, стабільності та відтворюваності. Удосконалено конструкцію амперометричної біосенсорної

системи для визначення вмісту трансаміназ шляхом застосування двошарової мембранної системи (ПФД + ензимна мембрана), що забезпечило ефективне блокування електроактивних інтерферентів та покращило селективність детекції в зразках сироватки крові.

Практичне значення. Розроблена біосенсорна система перевершує більшість традиційних методів за мінімальним об'ємом зразка, простотою виконання (без складної пробопідготовки та додаткових оптичних реагентів), низькою собівартістю вимірювання та можливістю до мініатюризації та автоматизації для створення технології point-of-care (надання допомоги безпосередньо біля ліжка пацієнта). Порівняно з існуючими біосенсорами для трансаміназ, розроблена система є першою електрохімічною біосенсорною системою, здатною до одночасної детекції обох ензимів, що відкриває можливості для автоматичного розрахунку діагностично значимого коефіцієнта де Рітіса безпосередньо в процесі вимірювання. Лінійні діапазони визначення обох ензимів повністю покривають клінічно значимі концентрації як за норми так і за патологій. Було розпочато метрологічну атестацію і впровадження розробленої системи: затверджено методику вимірювання активності АСТ в ДП «Укрметртестстандарт» (Додаток З) та в планах отримати методику вимірювання активності АЛТ. Розроблений біосенсор було впроваджено в ТОВ «Укрмедсерт» (Додаток И). Отримано патенти на винахід № 129239 та № 125811 та патент на корисну модель № 153303 та № 147481.

Результати дисертаційної роботи, а саме розроблені монобіосенсиори та загальна біосенсорна система, мають **перспективи** практичного застосування для експрес-діагностики функціонального стану печінки та серця в умовах клінічних лабораторій, моніторингу ефективності лікування пацієнтів із гепатопатологіями та серцево-судинними захворюваннями, скринінгових обстежень груп ризику (пацієнти з діабетом, метаболічним синдромом, хронічним алкоголізмом, вірусними гепатитами).

Розроблена технологія створює підґрунтя для створення портативних point-of-care пристроїв для тестування безпосередньо біля ліжка пацієнта або в умовах амбулаторної практики, що особливо актуально для регіонів з обмеженим доступом до централізованих лабораторій. Подальший розвиток системи може включати мініатюризацію на основі електродів з трафаретним друком, інтеграцію з бездротовими системами передачі даних та штучним інтелектом для автоматизованої інтерпретації результатів, а також розширення панелі детектованих біомаркерів (γ-глутамілтрансфераза, лужна фосфатаза, білірубін) для комплексної оцінки функції печінки.

Ключові слова: мультиензимна біосенсорна система, амперометрія, аланінамінотрансфераза та аспартатамінотрансфераза, вимірювання активності ензимів, кінетика, адсорбційна спектроскопія, динамічні зміни, клінічна значимість, неінвазивна діагностика, ензими, зв'язування, полімерна мембрана, клінічна діагностика, гепатит, інфаркт

Список публікацій здобувача за темою дисертації

Статті в наукових виданнях

1. Д. О. Мруга, Є. Р. Ваховський, С. В. Дзядевич, О. О. Солдаткін. Розробка мультиензимної біосенсорної системи для одночасного визначення активності аланінамінотрансферази та аспартатамінотрансферази. *Sensor Electronics and Microsystem Technologies* 2026 в друці. *Особистий внесок здобувача – створення дизайну експериментальної частини, проведення частини експериментальної роботи, підготовка статті до друку.*
2. D. Mruga, Y. Vakhovskyi, V. Bakhmat, V. Pyeshkova, S. Dzyadevych, O. Soldatkin. Evaluation of Two Enzyme-Based Amperometric Biosensor Designs for Alanine Aminotransferase Determination in Biological Fluids. *Micromachines* 2025, 16(10), 1168. <https://doi.org/10.3390/mi16101168> *Особистий внесок здобувача – аналіз даних, проведення частини експериментальної роботи, підготовка статті до друку.*
3. D. Mruga, Vakhovsky, S.V. Dzyadevych, O.O. Soldatkin. Development and comparison of two alanine aminotransferase-sensitive biosensors based on

- pyruvate oxidase and glutamate oxidase. Biopolymers and Cell 2025. Vol. 41, No. 3. <https://doi.org/10.7124/bc.000AD9> *Особистий внесок здобувача – підготовка та аналіз даних, оформлення статті до друку.*
4. Y. Vakhovskiy, D. Mruga, O. Ustinov, A. Di Costanzo Mata, O. Soldatkin, S. Dzyadevych. Design and Optimization of Biosensor for Pyruvate Quantification. Electroanalysis, 2025; 37:e70064. <https://doi.org/10.1002/elan.70064> *Особистий внесок здобувача – створення дизайну експериментальної частини, проведення частини експериментальної роботи, аналіз результатів, підготовка статті до друку.*
 5. D. Mruga, Berketa K., Dzyadevych S., Soldatkin O. Biosensors for transaminase detection: Their diversity and trends – A comprehensive review. Trends in analytical chemistry 2025, Volume 193, 118460. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2025.118460> *Особистий внесок здобувача – пошук та аналіз літератури, аналіз результатів, підготовка статті до друку.*
 6. Д. О. Мруга, Є. Р. Ваховський, С. В. Дзядевич, О. О. Солдаткін. Розробка та оптимізація мультифункціонального біосенсора для визначення концентрації пірувату та/або активності АЛТ у водних зразках. Sensor Electronics and Microsystem Technologies 2025, Т.22, № 1, 26-37. <https://doi.org/10.18524/1815-7459.2025.1.325653> *Особистий внесок здобувача – створення дизайну експериментальної частини, проведення більшості експериментальної роботи, аналіз результатів, підготовка статті до друку.*
 7. D. Mruga, S. Dzyadevych, O. Soldatkin. Development and optimisation of the biosensor for aspartate aminotransferase blood level determination. Analytical and Bioanalytical Chemistry 2025 Volume 417, 721–731. <https://doi.org/10.1007/s00216-024-05682-2> *Особистий внесок здобувача – аналіз літератури, проведення експериментальної роботи, підготовка статті до друку.*
 8. D. Mruga, K. Berketa, A. Sverstiuk, V. Martsenyuk, A. Klos-Witkowska, Yu.

Palianytsia, S. Dzyadevych, O. Soldatkin. Amperometric biosensor based on glutamate oxidase to determine AST activity. *Sensors* 2024, 24(24), 7891. <https://doi.org/10.3390/s24247891> *Особистий внесок здобувача – аналіз літератури, проведення експериментальної роботи, підготовка статті до друку.*

9. D. Mruga, S. Dzyadevych, O. Soldatkin. High-selective alanine transaminase-sensitive biosensor based on nanosize semipermeable poly-metaphenylenediamine membrane. *Applied nanoscience* 2023, Volume 13, 6939–6949. <https://doi.org/10.1007/s13204-023-02810-9> *Особистий внесок здобувача – аналіз літератури, проведення експериментальної роботи, підготовка статті до друку.*

Патенти

1. Мруга Д.О., Солдаткін О.О., Дзядевич С.В., Солдаткін О.П. Біосенсорна система для аналізу аспартатамінотрансферази. Патент на винахід № 129239. № заявки a202204677; заявл. 09.12.2022; опубл. 19.02.2025 бюл. № 8/2025. <https://sis.nipo.gov.ua/uk/search/detail/1842537/>
2. Мруга Д.О., Солдаткін О.О., Дзядевич С.В., Солдаткін О.П. Амперометрична біосенсорна система для визначення активності аспартатамінотрансферази у водних зразках. Патент на корисну модель № 153303. № заявки u202204678; заявл. 09.12.2022; опубл. 14.06.2023, бюл. № 24/2023. <https://sis.nipo.gov.ua/uk/search/detail/1743479/>
3. Солдаткін О.О., Мруга Д.О., Дзядевич С.В., Солдаткін О.П. Біосенсорна система для визначення активності аланініамінонотрансферази. Патент на винахід № 125811. № заявки a202007542; заявл. 26.11.2020; опубл. 08.06.2022, бюл. № 23/2022. <https://sis.nipo.gov.ua/uk/search/detail/1691484/>
4. Солдаткін О.О., Мруга Д.О., Дзядевич С.В., Солдаткін О.П. Амперометрична біосенсорна система для визначення активності аланінамінотрансферази у водних зразках. Патент на корисну модель № 147481. № заявки u202007543; заявл. 26.11.2020; опубл. 12.05.2021, бюл. № 19/2021. <https://sis.nipo.gov.ua/uk/search/detail/1593308/>

Тези доповідей на наукових конференціях

1. Ваховський Є., Мруга Д., Дзядевич С., Солдаткін О. Мультианалітна біосенсорна система для визначення активності аланінамінотрансферази та аспартатамінотрансферази. Шевченківська весна: досягнення в науках про життя, 08-10 квітня 2026 року, в друці.
2. Mruga D.O., Vakhovskyi Y.R., Dzyadevych S.V., Soldatkin O.O. Multienzyme biosensor system for simultaneous detection of AST and ALT activities. XX Всеукраїнська конференція молодих вчених Інституту молекулярної біології і генетики НАН України - 26-27 травня 2026, Київ, Україна, в друці.
3. Ваховський Є., Мруга Д., Дзядевич С., Солдаткін О. Розробка та оптимізація біосенсора на основі іммобілізованої піруватоксидази для визначення активності аланінамінотрансферази. XXII Міжнародна наукова конференція студентів і аспірантів, присвячена 90-річчю кафедри мікробіології біологічного факультету Львівського національного університету імені Івана Франка Львів, 15–17 квітня 2026 року
4. Мруга Д. О., Ваховський Є. Р., Дзядевич С. В., Солдаткін О. О. Мультиензимна біосенсорна система для одночасного визначення активності аланінамінотрансферази та аспартатамінотрансферази в біологічних рідинах. Проблеми та досягнення сучасної біотехнології: матеріали VI міжнародної наук.-практ. конф. (27 березня 2026 р., м. Харків). – Електрон. дані. – Х. : НФаУ, 2026. – 473 с.
5. Mruga D.O., Vakhovskyi Y. R., Dzyadevych S.V., Soldatkin O.O. Development of an amperometric biosensor for the detection of alanine aminotransferase activity. XIX Всеукраїнська конференція молодих вчених Інституту молекулярної біології і генетики НАН України - 20-21 травня 2025, Kyiv, Ukraine, p. 28
6. Мруга Д. О. Ваховський Є. Р. Дзядевич С. В. Солдаткін О. О. Laboratory prototype of electrochemical biosensor for the quantitative analysis of alanine aminotransferase activity. Актуальні проблеми біохімії та Біотехнології, 5-6 травня 2025, Київ, Україна

7. Мруга Д. О. Ваховський Є. Р. Дзядевич С. В. Солдаткін О. О. Розробка амперометричного біосенсора на основі піруватоксидази для визначення пірувату. Молодь і поступ біології: збірник тез доповідей XXI Міжнародної наукової конференції студентів і аспірантів (м. Львів, 28 квітня – 1 травня 2025 р.). – Львів: Галич-Прес, 2025. – 384 с.
8. Мруга Д. О. Ваховський Є. Р. Дзядевич С. В. Солдаткін О. О. Розробка амперометричного біосенсора на основі піруватоксидази для визначення пірувату. Шевченківська весна: досягнення в науках про життя / *Advancements in life sciences* : електрон. зб. тез XXII Міжнар. наук. конф. студ. та мол. вчених (м. Київ, 23–25 квітня 2025 р.) – Київ : ВПЦ "Київський університет", 2025. – 476 с.
9. S. Dzyadevych, V. Arkhypova, D. Mruga, O. Soldatkin. Electrochemical enzyme biosensors for medical application. Biogenext, 17-20 September 2024, Kyiv, Ukraine
- 10.D. Mruga, Ye. Vakhovskyi, S. Dzyadevych, O. Soldatkin. Development, optimization, and comparison of two versions of ALT-sensitive biosensor based on glutamate oxidase and pyruvate oxidase. Biogenext, 17-20 September 2024, Kyiv, Ukraine
- 11.D. Mruga, S. Dzyadevych, O. Soldatkin. Development and probation of the amperometric biosensor for determining the ast activity level in blood serum samples. XVIII All-Ukrainian Conference of Young Scientists of the Institute of Molecular Biology and Genetics of the NAS of Ukraine 21-22 May 2024, Kyiv, Ukraine, p. 39
- 12.D. Mruga, K. Berketa, S. Dzyadevych, O. Soldatkin. Development of amperometric biosensor for pyruvate concentration and alt activity analysis. XXV International Conference for Students, PhD Students and Young Scientists «Modern Chemistry Problems» 15-17 May 2024, Kyiv, Ukraine, p. 33
- 13.D. Mruga, K. Berketa, O. Soldatkin. Electrochemical biosensor based on pyruvate oxidase for detection of pyruvate and ALT activity. *Shevchenkivska vesna*, 24-26 April 2023, Kyiv, Ukraine, p. 193-194

- 14.D. Mruga, O. Soldatkin, N. Jaffrezic-Renault, A. Errachid. Amperometric biosensor based on pyruvate oxidase for selective ALT measurement. IX Congress of Ukraine biophysical society, 30 October - 2 November 2023, Kyiv, Ukraine. Ukr.
- 15.D. Mruga, O. Soldatkin, S. Dzyadevych, A. Soldatkin. Development of AST-sensitive amperometric enzyme biosensor. International research and practice conference 'NANOTECHNOLOGY AND NANOMATERIALS' NANO-2023, 16-19 August 2023, Bukovel, Ukraine, p. 338
- 16.D. Mruga, O. Soldatkin, S. Dzyadevych, A. Soldatkin. Development of aspartate aminotransferase sensitivity biosensor based on glutamate oxidase. Deuxièmes Rencontres Capteurs de l'Université Bourgogne Franche Comté. 24-25 Novembre 2022, Dijon, France, p. 28.

SUMMARY

Mruga D.O. Development of a biosensor system for simultaneous determination of ALT, AST activity, and their ratio for medical diagnostics.- The manuscript.

Dissertation for the degree of Doctor of Philosophy in specialty 091 Biology - Institute of Molecular Biology and Genetics of the National Academy of Sciences of Ukraine, Kyiv, 2026.

Alanine aminotransferase (ALT) and aspartate aminotransferase (AST) are key biochemical markers of the functional state of the liver and myocardium, the level of which increases significantly in hepatopathologies (hepatitis, cirrhosis), cardiovascular diseases (myocardial infarction, heart failure) and other pathological conditions (preeclampsia, myopathies, metabolic syndrome). Simultaneous determination of the activity of both transaminases and calculation of the de Ritis ratio (AST/ALT) have significant diagnostic value for the differentiation of liver and cardiac diseases. Traditional laboratory methods (spectrophotometry, fluorimetry, enzyme immunoassay) require complex equipment, lengthy sample preparation and centralized infrastructure, which limits their use for rapid diagnostics in field conditions. Development of portable biosensor systems for rapid, sensitive and cost-effective determination of transaminases represents a critical challenge in biotechnology in the context of the global trend towards the development of personalized medicine.

The **aim** of the dissertation work was to develop, optimize and test an amperometric biosensor system for the simultaneous determination of the activity of alanine aminotransferase (ALT) and aspartate aminotransferase (AST) in human biological fluids.

The **analysis** of the scientific **literature** revealed that numerous biosensor approaches have been proposed for the determination of AST and ALT, mainly based on electrochemical (47% of publications, mainly chronoamperometric) and optical (34% of publications) detection methods. However, despite many years of active research experience, no development has reached the level of

commercialization. In addition, among the 58 described biosensor systems for the determination of AST and ALT, only 7 systems are capable of simultaneous and differential detection of both these enzymes, and all of them are based exclusively on optical detection methods, and similar electrochemical systems have not been reported.

This work in part justifies the choice of the amperometric detection method as the optimal one for determining the activity of transaminases, since it provides low detection limits (1–3 U/L), a wide linear range (2–3 orders of magnitude), a fast response (1–3 min), independence from the optical properties and buffer capacity of the sample, the possibility of miniaturization, and low production cost. The **principle of operation** of the developed biosensor system is based on cascade enzymatic reactions: transaminase catalyzes the transfer of an amino group from the corresponding substrate (L-alanine for ALT or L-aspartate for AST) to α -ketoglutarate (α -KG) with the formation of glutamate and ketoacid (pyruvate or oxaloacetate, respectively); these products of transaminase reactions are oxidized by immobilized oxidases (pyruvate oxidase POx or glutamate oxidase Glox) with the generation of electroactive hydrogen peroxide, which in turn is oxidized on a platinum disk electrode at a potential of +600 mV relative to the Ag/AgCl reference electrode, creating an amperometric signal proportional to the activity of the corresponding transaminase in the analyzed solution.

The **first stage** of the study included the development and optimization of an AST-sensitive amperometric biosensor based on Glox.

The platinum disk electrode was modified with electropolymerized polyphenylenediamine (PPD) to block electroactive interfering substances. The study of the surface morphology of these working electrodes by scanning electron microscopy confirmed the formation of a uniform layer of organic material 100–150 nm thick with a spongy structure.

The bioselective element was formed by immobilizing Glox on a modified electrode by cross-linking with BSA using glutaraldehyde. The composition and procedure for forming the bioselective membrane (2.6% Glox, 1.33% BSA, 3.33%

glycerol, 0.33% glutaraldehyde, 35 minutes at room temperature) and the composition of the working buffer (20 mM HEPES buffer, pH 7.4, with the addition of 2 mM α -KG and 8 mM L-aspartate) were optimized. The stability and selectivity of the biosensor operation were investigated. The influence of the concentration of free protein, ionic strength and coenzyme in the solution on the functioning of the developed biosensor system was studied.

The **second stage** involved the creation and comparative characterization of two variants of ALT-sensitive biosensors. The first one is based on POx (specific to the product of the ALT reaction – pyruvate) and based on Glox (catalyzes the cleavage of the common product of both transaminases – glutamate). Platinum disk working electrodes were also modified with the PPD. The bioselective membrane based on POx was created by incorporating it into the photopolymer PVA-SbQ. The composition and procedure for forming the bioselective membrane (4.63% POx, 1.67% BSA, 3.33% glycerol, 13.2% PVA-SbQ, 2.4 J/cm² of received energy), the composition of the working buffer (25 mM HEPES buffer, pH 7.4, with the addition of 2 mM α -KG and 16 mM alanine) were optimized. The second variant of the ALT-sensitive biosensor based on Glox was manufactured according to the procedure as for the AST-sensitive biosensor. The optimal working buffer for the operation of the second variant of the sensor was 20 mM HEPES, pH 7.4, with the addition of 50 μ M α -KG and 4 mM aspartate.

The work investigated the selectivity and stability of both variants of the biosensor, and studied the influence of the concentration of free protein, ionic strength and coenzyme in the solution on their operation. Comparative analysis showed the advantages of the POx-based biosensor in a number of parameters, in particular specificity (absence of cross-sensitivity to AST due to measurement through pyruvate) and stability, therefore this option was chosen for integration into the biosensor system.

The **third stage** included the combination of optimized AST- and ALT-sensitive monosensors into a single amperometric system for simultaneous and differential determination of the activity of both transaminases. A critical problem

of integration was the impossibility of direct differentiation of signals, since both transaminase reactions produce glutamate as a common product, which is registered by the AST-sensitive Glox-based biosensor. To solve this problem, a specialized three-step procedure for sequential introduction of reagents and mathematical calculation of activities was developed.

Based on the results of combining monosensors into a system and optimizing their simultaneous operation, a single biosensor system was created, which is distinguished by the following analytical characteristics:

- for ALT – linear range 1–500 U/L, limit of determination – 1 U/L, sensitivity 0.94 nA/min per 100 U/L;
- for AST – linear range 1–200 U/L, limit of determination – 1 U/L, sensitivity 4.39 nA/min per 100 U/L;
- the time for the complete analysis of both enzymes is about 12 minutes

The system testing on human serum samples showed a high correlation of the results with the reference spectrophotometric method (correlation coefficient $R=0.994$ for ALT analysis and $R=0.989$ for AST).

Scientific novelty. For the first time, a multi-analyte electrochemical biosensor system was developed for the simultaneous determination of ALT and AST activity based on the integration of two amperometric monosensors based on immobilized POx and Glox, respectively. Also, in the work, for highly specific biosensor analysis, a new specialized procedure for sequential introduction of substrates for differentiation of signals for AST and ALT was proposed.

For the first time, a comparative characterization of two types of ALT-sensitive biosensors (based on POx and Glox) was carried out and the choice of the POx variant was scientifically substantiated according to the criteria of specificity, stability and reproducibility. The design of the amperometric biosensor system was improved for the determination of transaminases by using a two-layer membrane system (PPD + enzyme membrane), which provided effective blocking of electroactive interferents and improved detection selectivity in real blood serum samples.

Patent for invention No. 129239 (Appendix 7) and patent for utility model No. 153303 (Appendix 8) were obtained for the developed biosensor.

Practical significance. The developed biosensor system surpasses most traditional methods in terms of minimum sample volume, ease of implementation (without complex sample preparation and additional optical reagents), low cost of measurement and the possibility of miniaturization and automation to create point-of-care technology. Compared with existing biosensors for transaminases, the developed system is the first electrochemical biosensor system capable of simultaneous detection of both enzymes, which opens up opportunities for automatic calculation of diagnostically significant de Ritis ratio directly in the measurement process. The linear ranges of determination of both enzymes fully cover clinically significant concentrations both in normal and pathological conditions. Metrological certification and implementation of the developed system have been started: the method of measuring AST activity has been approved in the State Enterprise "Ukrmetrteststandart" (Appendix 9) and plans are to obtain a method of measuring ALT activity. The developed biosensor was implemented in LLC "Ukrmedsert" (Appendix 10).

The results of the dissertation work, namely the developed monobiosensors and the general biosensor system, have **prospects** for practical application for express diagnostics of the functional state of the liver and heart in clinical laboratories, monitoring the effectiveness of treatment of patients with hepatopathologies and cardiovascular diseases, screening examinations of risk groups (patients with diabetes, metabolic syndrome, chronic alcoholism, viral hepatitis).

The developed technology creates the basis for the creation of portable point-of-care devices for testing directly at the patient's bedside or in outpatient practice, which is especially relevant for regions with limited access to centralized laboratories. Further development of the system may include miniaturization based on screen-printed electrodes, integration with wireless data transmission systems and artificial intelligence for automated interpretation of results, as well as

expansion of the panel of detected biomarkers (γ -glutamyltransferase, alkaline phosphatase, bilirubin) for a comprehensive assessment of liver function.

Keywords: multienzyme biosensor system, amperometry, oxidases, alanine aminotransferase and aspartate aminotransferase, enzyme activity measurement, kinetics, adsorption spectroscopy, dynamic changes, clinical significance, non-invasive diagnostics, enzymes, binding, polymer membrane, clinical diagnostics, diseases of the liver and cardiovascular system

List of publications of the applicant on the topic of the dissertation

Scientific articles

1. D. Mruga, Y. Vakhovskyi, V. Bakhmat, V. Pyeshkova, S. Dzyadevych, O. Soldatkin. Evaluation of Two Enzyme-Based Amperometric Biosensor Designs for Alanine Aminotransferase Determination in Biological Fluids. *Micromachines* 2025, 16(10), 1168. <https://doi.org/10.3390/mi16101168>
2. D. Mruga, Vakhovsky, S.V. Dzyadevych, O.O. Soldatkin. Development and comparison of two alanine aminotransferase-sensitive biosensors based on pyruvate oxidase and glutamate oxidase. *Biopolymers and Cell* 2025. Vol. 41, No. 3. <https://doi.org/10.7124/bc.000AD9>
3. Y. Vakhovskyi, D. Mruga, O. Ustinov, A. Di Costanzo Mata, O. Soldatkin, S. Dzyadevych. Design and Optimization of Biosensor for Pyruvate Quantification. *Electroanalysis*, 2025; 37:e70064. <https://doi.org/10.1002/elan.70064>
4. D. Mruga, Berketa K., Dzyadevych S., Soldatkin O. Biosensors for transaminase detection: Their diversity and trends – A comprehensive review. *Trends in analytical chemistry* 2025, Volume 193, 118460. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2025.118460>
5. Д. О. Мруга, Є. Р. Ваховський, С. В. Дзядевич, О. О. Солдаткін. Розробка та оптимізація мультифункціонального біосенсора для визначення концентрації пірувату та/або активності АЛТ у водних зразках. *Sensor Electronics and Microsystem Technologies* 2025, Т.22, № 1, 26-37. <https://doi.org/10.18524/1815-7459.2025.1.325653>

6. D. Mruga, S. Dzyadevych, O. Soldatkin. Development and optimisation of the biosensor for aspartate aminotransferase blood level determination. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 2025 Volume 417, 721–731. <https://doi.org/10.1007/s00216-024-05682-2>
7. D. Mruga, K. Berketa, A. Sverstiuk, V. Martsenyuk, A. Klos-Witkowska, Yu. Palianytsia, S. Dzyadevych, O. Soldatkin. Amperometric biosensor based on glutamate oxidase to determine AST activity. *Sensors* 2024, 24(24), 7891. <https://doi.org/10.3390/s24247891>
8. D. Mruga, S. Dzyadevych, O. Soldatkin. High-selective alanine transaminase-sensitive biosensor based on nanosize semipermeable poly-metaphenylenediamine membrane. *Applied nanoscience* 2023, Volume 13, 6939–6949. <https://doi.org/10.1007/s13204-023-02810-9>

Patents

1. Mruga D.O., Soldatkin O.O., Dzyadevich S.V., Soldatkin O.P. Biosensor system for aspartate aminotransferase analysis. Patent for an invention № 129239. <https://sis.nipo.gov.ua/uk/search/detail/1842537/>
2. Mruga D.O., Soldatkin O.O., Dzyadevich S.V., Soldatkin O.P. Amperometric biosensor system for detection of aspartate aminotransferase activity in aqueous samples. Utility model patent № 153303. <https://sis.nipo.gov.ua/uk/search/detail/1743479/>
3. Soldatkin O.O., Mruga D.O., Dzyadevych S.V., Soldatkin O.P. Biosensor system for determining the activity of alanine aminotransferase. Patent for an invention № 125811. <https://sis.nipo.gov.ua/uk/search/detail/1691484/>
4. Soldatkin O.O., Mruga D.O., Dzyadevych S.V., Soldatkin O.P. Amperometric biosensor system for determining the activity of alanine aminotransferase in water samples. Utility model patent № 147481. <https://sis.nipo.gov.ua/uk/search/detail/1593308/>

Abstracts of reports at scientific conferences

1. Ваховський Є., Мруга Д., Дзядевич С., Солдаткін О. Мультианалітна біосенсорна система для визначення активності аланінамінотрансферази та

аспартатамінотрансферази. Шевченківська весна: досягнення в науках про життя, 08-10 квітня 2026 року, в друці.

2. Mruga D.O., Vakhovskyi Y.R., Dzyadevych S.V., Soldatkin O.O. Multienzyme biosensor system for simultaneous detection of AST and ALT activities. XX Всеукраїнська конференція молодих вчених Інституту молекулярної біології і генетики НАН України - 26-27 травня 2026, Київ, Україна, в друці.
3. Ваховський Є., Мруга Д., Дзядевич С., Солдаткін О. Розробка та оптимізація біосенсора на основі іммобілізованої піруватоксидази для визначення активності аланінамінотрансферази. XXII Міжнародна наукова конференція студентів і аспірантів, присвячена 90-річчю кафедри мікробіології біологічного факультету Львівського національного університету імені Івана Франка Львів, 15–17 квітня 2026 року
4. Мруга Д. О., Ваховський Є. Р., Дзядевич С. В., Солдаткін О. О. Мультиензимна біосенсорна система для одночасного визначення активності аланінамінотрансферази та аспартатамінотрансферази в біологічних рідинах. Проблеми та досягнення сучасної біотехнології: матеріали VI міжнародної наук.-практ. конф. (27 березня 2026 р., м. Харків). – Електрон. дані. – Х. : НФаУ, 2026. – 473 с.
5. Mruga D.O., Vakhovskyi Y. R., Dzyadevych S.V., Soldatkin O.O. Development of an amperometric biosensor for the detection of alanine aminotransferase activity. XIX Всеукраїнська конференція молодих вчених Інституту молекулярної біології і генетики НАН України - 20-21 травня 2025, Kyiv, Ukraine, p. 28
6. Мруга Д. О. Ваховський Є. Р. Дзядевич С. В. Солдаткін О. О. Laboratory prototype of electrochemical biosensor for the quantitative analysis of alanine aminotransferase activity. Актуальні проблеми біохімії та Біотехнології, 5-6 травня 2025, Київ, Україна
7. Мруга Д. О. Ваховський Є. Р. Дзядевич С. В. Солдаткін О. О. Розробка амперометричного біосенсора на основі піруватоксидази для визначення пірувату. Молодь і поступ біології: збірник тез доповідей XXI Міжнародної

наукової конференції студентів і аспірантів (м. Львів, 28 квітня – 1 травня 2025 р.). – Львів: Галич-Прес, 2025. – 384 с.

8. Мруга Д. О. Ваховський Є. Р. Дзядевич С. В. Солдаткін О. О. Розробка амперометричного біосенсора на основі піруватоксидази для визначення пірувату. Шевченківська весна: досягнення в науках про життя / *Advancements in life sciences* : електрон. зб. тез XXII Міжнар. наук. конф. студ. та мол. Вчених. 476 с. 23–25 квітня 2025, Київ, Україна
9. S. Dzyadevych, V. Arkhypova, D. Mruga, O. Soldatkin. Electrochemical enzyme biosensors for medical application. Biogenext, 17-20 September 2024, Kyiv, Ukraine
- 10.D. Mruga, Ye. Vakhovskyi, S. Dzyadevych, O. Soldatkin. Development, optimization, and comparison of two versions of ALT-sensitive biosensor based on glutamate oxidase and pyruvate oxidase. Biogenext, 17-20 September 2024, Kyiv, Ukraine
- 11.D. Mruga, S. Dzyadevych, O. Soldatkin. Development and probation of the amperometric biosensor for determining the ast activity level in blood serum samples. XVIII All-Ukrainian Conference of Young Scientists of the Institute of Molecular Biology and Genetics of the NAS of Ukraine 21-22 May 2024, Kyiv, Ukraine, p. 39
- 12.D. Mruga, K. Berketa, S. Dzyadevych, O. Soldatkin. Development of amperometric biosensor for pyruvate concentration and alt activity analysis. XXV International Conference for Students, PhD Students and Young Scientists «Modern Chemistry Problems» 15-17 May 2024, Kyiv, Ukraine, p. 33
- 13.D. Mruga, K. Berketa, O. Soldatkin. Electrochemical biosensor based on pyruvate oxidase for detection of pyruvate and ALT activity. *Shevchenkivska vesna*, 24-26 April 2023, Kyiv, Ukraine, p. 193-194
- 14.D. Mruga, O. Soldatkin, N. Jaffrezic-Renault, A. Errachid. Amperometric biosensor based on pyruvate oxidase for selective ALT measurement. IX Congress of Ukraine biophysical society, 30 October - 2 November 2023, Kyiv, Ukraine. Ukr.

- 15.D. Mruga, O. Soldatkin, S. Dzyadevych, A. Soldatkin. Development of AST-sensitive amperometric enzyme biosensor. International research and practice conference 'NANOTECHNOLOGY AND NANOMATERIALS' NANO-2023, 16-19 August 2023, Bukovel, Ukraine, p. 338
- 16.D. Mruga, O. Soldatkin, S. Dzyadevych, A. Soldatkin. Development of aspartate aminotransferase sensitivity biosensor based on glutamate oxidase. Deuxièmes Rencontres Capteurs de l'Université Bourgogne Franche Comté. 24-25 Novembre 2022, Dijon, France, p. 28.

ЗМІСТ

АНОТАЦІЯ.....	2
SUMMARY.....	13
ЗМІСТ	23
ПЕРЕЛІК УМОВНИХ ПОЗНАЧЕНЬ	29
ВСТУП.....	31
РОЗДІЛ 1_ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ	41
1.1 Роль АЛТ і АСТ у метаболізмі та патологічних процесах.....	41
1.2 Традиційні методи детекції АЛТ і АСТ	42
1.2.1 Методи виявлення концентрації трансаміназ.	44
1.2.2 Методи визначення активності трансаміназ.....	45
1.3 Біосенсори для детекції АЛТ і АСТ	47
1.3.1 Класифікація біосенсорів за методом детекції.	49
1.3.1.1 Оптичні біосенсори	51
1.3.1.1.1 Біосенсори на основі колориметрії та спектроскопії.....	51
1.3.1.1.2 Біосенсори на основі флуоресценції та електрохемілюмінесценції.	53
1.3.1.1.3 Інші оптичні біосенсори (фотометрична рефлектومتрія, локалізований поверхневий плазмонний резонанс).	54
1.3.1.2 Електрохімічні біосенсори для визначення активності АЛТ та АСТ	55
1.3.1.2.1 Біосенсори на основі хроноамперометрії.....	55
1.3.1.2.2 Біосенсори на основі циклічної вольтамперометрії, диференціальної імпульсної вольтамперометрії та вольтамперометрії прямокутних імпульсів.....	55
1.3.1.2.3 Біосенсори на основі електрохімічної імпедансної спектроскопії, потенціометрії та фотострумової спектроскопії.	57
1.3.1.3 Масові біосенсори (кварцовий кристалічний мікробаланс) для детекції трансаміназ.	58

1.3.2 Класифікація АЛТ- та АСТ-чутливих біосенсорів за біоселективним матеріалом.	58
1.3.2.1 Ензимні біосенсори для визначення активності трансаміназ.....	60
1.3.2.1.1 Біосенсори на основі оксидаз (глутаматоксидаза, піруватоксидаза, оксидаза + люмінол).....	60
1.3.2.1.2 Біосенсори на основі дегідрогеназ (малатдегідрогеназа, лактатдегідрогеназа).....	62
1.3.2.1.3 Мультиензимні біосенсори (піруватоксидаза + оксалоацетатдекарбоксилаза, глутаматоксидаза + пероксидаза хрону, піруватоксидаза + пероксидаза хрону).	63
1.3.2.2 Неензимні біосенсори для визначення активності трансаміназ.....	64
1.3.2.3 Біосенсори для визначення концентрації трансаміназ.	65
1.3.3 Класифікація біосенсорів за методом іммобілізації біоселективного матеріалу.....	66
1.3.4 Додаткові підходи до поліпшення аналітичних характеристик біосенсорів.....	68
1.4 Підсумки огляду літератури та перспективи на майбутнє.....	70
РОЗДІЛ 2_МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ	74
2.1 Матеріали.....	74
2.2 Амперометричні сенсори та прилади.....	75
2.3 Формування додаткових напівпроникних мембран на основі ПФД..	78
2.4 Процедура дослідження морфології поверхні електродів методом скануючої електронної мікроскопії.....	79
2.5 Формування біоселективного елементу на основі ГлОкс	80
2.6 Формування біоселективного елементу на основі ПОкс	80
2.7 Методика біосенсорного вимірювання АЛТ та АСТ.....	81
2.8 Підготовка зразків сироватки крові для біосенсорного аналізу	82
2.9 Методика біосенсорного вимірювання вмісту трансаміназ у сироватці крові	83

2.10 Методика спектрофотометричного вимірювання вмісту трансаміназ у сироватці крові	84
РОЗДІЛ 3 РЕЗУЛЬТАТИ І ОБГОВОРЕННЯ.....	87
3.1 Принцип функціонування біосенсорної системи.....	87
3.1.1 Аналіз ензиматичних та фізико-хімічних реакцій, що лежать в основі функціонування біосенсорної системи.....	87
3.1.2 Покращення характеристик амперометричних сенсорів.....	92
3.2 Розробка АСТ-чутливого біосенсора на основі ГлОкс.....	96
3.2.1 Розробка процедури формування біоселективної мембрани на основі ГлОкс.....	97
3.2.1.1 Підбір оптимальних умов іммобілізації (концентраційзшиваючого агенту та ГлОкс, тривалість процедури).	97
3.2.1.2 Оцінка ефективності та стабільності біоселективного елементу на основі ГлОкс.....	100
3.2.2 Вивчення впливу параметрів робочого середовища на функціонування розробленого біосенсора	103
3.2.2.1 Дослідження впливу температури середовища на функціонування біосенсора.....	103
3.2.2.2 Вибір буферної системи та вивчення впливу буферної ємності на функціонування біосенсора на основі ГлОкс.....	104
3.2.2.3 Перевірка впливу вмісту білку та іонної сили розчину на функціонування біосенсора на основі ГлОкс.....	106
3.2.2.4 Вивчення селективності розробленого біосенсора відносно можливих інтерферентів.....	108
3.2.3 Вибір оптимальних концентрацій коензиму та субстратів АСТ для роботи біосенсора.	111
3.2.4 Вивчення аналітичних характеристик розробленого біосенсора при аналізі АСТ.....	115
3.2.5 Дослідження стабільності АСТ-чутливого біосенсора на основі ГлОкс.....	116

3.3 Розробка АЛТ-чутливого біосенсора	117
3.3.1 Розробка та оптимізація АЛТ-чутливого біосенсора на основі ГлОкс.	118
3.3.1.1 Вибір процедури формування біоселективної мембрани на основі ГлОкс та складу робочого буферного розчину.	119
3.3.1.2 Підбір оптимальних концентрацій коензиму та субстратів АЛТ для біосенсорного аналізу.	119
3.3.1.3 Дослідження аналітичних характеристик АЛТ-чутливого біосенсора на основі ГлОкс.	122
3.3.1.4 Дослідження стабільності АЛТ-чутливого біосенсора на основі ГлОкс.	123
3.3.1.5 Дослідження роботи АЛТ-чутливого біосенсора на основі ГлОкс в присутності АСТ.....	125
3.3.2 Розробка АЛТ-чутливого біосенсора на основі ПОкс.	127
3.3.2.1 Розробка процедури формування біоселективної мембрани на основі ПОкс.	128
3.3.2.1.1 Вибір методу іммобілізації, підбір оптимальної концентрації PVA-SbQ та умов іммобілізації.	128
3.3.2.1.2 Оцінка біоселективної мембрани на основі ПОкс.	130
3.3.2.2 Дослідження впливу параметрів робочого середовища на роботу АЛТ-чутливого біосенсора на основі ПОкс.	132
3.3.2.2.1 Дослідження впливу буферної ємності, рН та йонної сили розчину на функціонування біосенсора на основі ПОкс.	132
3.3.2.2.2 Аналіз впливу білку в розчині на біосенсорні вимірювання. ...	134
3.3.2.2.3 Дослідження селективності АЛТ-чутливого біосенсора на основі ПОкс.....	135
3.3.2.3 Вибір оптимальних концентрацій коензиму, кофактору і косубстрату ПОкс для біосенсорного вимірювання.	136
3.3.2.4 Вибір концентрації коензиму та субстратів для біосенсорного визначення АЛТ.	139

3.3.2.5 Дослідження аналітичних характеристик біосенсора на основі ПОкс для визначення активності АЛТ..	142
3.3.2.6 Дослідження стабільності біосенсора на основі ПОкс для визначення активності АЛТ.	143
3.3.3 Порівняння двох АЛТ-чутливих біосенсорів на основі різних ензимних систем.	145
3.4 Розробка біосенсорної системи для одночасного визначення вмісту АСТ і АЛТ	148
3.4.1 Дослідження перехресного впливу монобіосенсорів та їх об'єднання в єдину біосенсорну систему.	149
3.4.2 Забезпечення одночасного вимірювання вмісту трансаміназ в модельних розчинах та аналітичні характеристики розробленої біосенсорної системи.	151
3.4.3 Апробація біосенсорної системи при вимірюванні вмісту трансаміназ в сироватці крові.	153
3.4.4 Вивчення кореляції між біосенсорними та референсними вимірюваннями сироватки крові.	155
РОЗДІЛ 4	162
АНАЛІЗ І УЗАГАЛЬНЕННЯ РЕЗУЛЬТАТІВ ДОСЛІДЖЕНЬ	162
4.1 Клінічне значення трансаміназ та необхідність point-of-care діагностики	162
4.2 Обмеження існуючих методів	163
4.3 Переваги розробленої біосенсорної системи для одночасної детекції АЛТ та АСТ	167
4.4 Методологічна новизна розробленої системи	168
4.5 Перспективи розвитку та впровадження	168
ВИСНОВКИ	170
СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ	172
ДОДАТОК А	194
ДОДАТОК Б	200

	28
ДОДАТОК В.....	202
ДОДАТОК Г.....	211
ДОДАТОК Д.....	213
ДОДАТОК Е.....	215
ДОДАТОК Ж.....	216
ДОДАТОК З.....	217
ДОДАТОК И.....	218

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ ПОЗНАЧЕНЬ

4ААП	4-аміноатипірин
СА	хроноамперометрія
CV	циклічна вольтамперометрія
DAOS	N-етил-N-(2-гідрокси-3-сульфопропіл)-3,5- диметоксианіліну
DET	прямий перенос електронів
DPV	диференційна імпульсна вольтамперометрія
EC	номер за класифікацією ензимів
ECL	електрохемілюмінесценція
EHSP	N-етил-N-(2-гідрокси-3-сульфопропіл)-m-толуїдин
EIS	електрохімічна імпедансна спектроскопія
ELISA	ензим-мічений імуноферментний аналіз
FET	польовий транзистор
FRET	флуоресцентний резонансний перенос енергії
H ₂ O ₂	пероксид водню
HEPES	N-[2-Hydroxyethyl]piperazine-N'-[2-ethanesulfonic acid]
LSPR	локалізований поверхневий плазмонний резонанс
PCS	фотострумова спектроскопія
PhR	фотометрична рефлектометрія
PVA-SbQ	полівініловий спирт з стерил-піридиміновими групами
QCM	кварцевий кристалічний мікробаланс
R	коефіцієнт кореляції Пірсона
RSD	відносне стандартне відхилення
SWV	квадратно-хвильова вольтамперометрія
UV-Vis	спектрофотометрія
α -КГ	α -кетоглутарат
АЛТ	аланінамінотрансфераза
АСТ	аспартатамінотрансфераза

БСА	бичачий сироватковий альбумін
ГА	глутаровий альдегід
ГлОкс	глутаматоксидаза
ЕДТА	Етилендіамінтетраоцтова кислота
ЛДГ	лактатдегідрогеназа
МДГ	малатдегідрогеназа
НАДН, НАД ⁺	нікотинамідаденіндинуклеотид
НЧЗ	наночастинки золота
ОАД	оксалоацетатдекарбоксилаза
Од.акт./л	одиниць активності на літр
ПерОкс	пероксидаза хрону
ПОкс	піруватоксидаза
ПФ	піридоксальфосфат
ПФД	полі(м-фенілендіамін)
СЕМ	скануюча електронна мікроскопія
ТМБ	3,3',5,5'-тетраметилбензидин
ТПФ	тіамінпірофосфат, тіаміндифосфат, вітамін В1
ФАД	флавінаденіндинуклеотид
ФБ	фосфатний буфер
ЯМР	ядерний магнітний резонанс

ВСТУП

Обґрунтування вибору теми дослідження. У сучасній медицині спостерігається стрімкий розвиток персоніфікованих підходів до діагностики, лікування та профілактики захворювань [1-4]. Персоналізована медицина зосереджується на індивідуальних особливостях кожного пацієнта, враховуючи його генетичний профіль, метаболічний стан та інші біологічні параметри. У цьому контексті зростає потреба у швидких, точних та доступних інструментах для моніторингу біохімічних маркерів, які можуть вказувати на стан здоров'я людини, наявність патологій та динаміку їх прогресування. Не останнє місце серед таких маркерів займають аланінамінотрансфераза (АЛТ, глутамат-піруват трансаміназа, ЕС 2.6.1.2) та аспартатамінотрансфераза (АСТ, глутамат-оксалоацетат трансаміназа, ЕС 2.6.1.1) [5] — ензими, які відіграють ключову роль у метаболізмі амінокислот і слугують важливими показниками функції печінки та серцевого м'яза. Зокрема, їх рівень допомагає діагностувати ішемічну хворобу серця [6-7], інфаркт міокарда [8], гепатит [9-12], рак печінки [13] та різні інші критично важливі патологічні стани [14-26].

Традиційно рівні АСТ та АЛТ у біологічних рідинах визначаються за допомогою лабораторних методів, таких як спектрофотометрія (UV-Vis) [27-37], газова та рідинна хроматографії з мас-спектрометрією (ГХ-МС, РХ-МС) [38-42], флуоресцентні методики [43], імуноаналізи (наприклад, ELISA) [44-45] та діагностичні підходи на основі ядерного магнітного резонансу (ЯМР) [46]. Ці методи забезпечують високу точність, чутливість та мультиплексну здатність, що робить їх незамінними в дослідженнях та централізованій діагностиці [47]. Однак вони мають серйозні обмеження для швидкого клінічного використання: складну підготовку зразків (наприклад, очищення для спектрофотометрії, токсичні розчинники для ЯМР, флуоресцентні мітки), високу вартість обладнання (від тисяч до мільйонів доларів), громіздкі розміри

та необхідність кваліфікованих операторів і стабільних умов (особливо для МС і ЯМР). Багато з них не підходять для використання в місцях надання медичної допомоги, оскільки аналіз займає від десятків хвилин до годин і вимагає централізованої інфраструктури.

Вирішити зазначені проблеми медичної діагностики можливо за рахунок розробки нових портативних біоаналітичних пристроїв — біосенсорів, що поєднують біологічні компоненти з фізико-хімічними перетворювачами [48-49]. На сьогодні відомо про низку біосенсорів для виявлення активності АЛТ та АСТ. Ці технології забезпечують високу чутливість, специфічність, низьку вартість (до декількох доларів за тест), швидкий аналіз (секунди або хвилини) та можливість роботи з біологічними зразками.

Незважаючи на значну кількість наукових досліджень, жоден біосенсор для визначення АЛТ або АСТ не був доведений до стадії комерційного продукту. Основними перешкодами залишаються: обмежені аналітичні характеристики (селективність, лінійний діапазон, стабільність) для роботи з біологічними зразками, а також відсутність ефективних підходів до мультианалітної детекції обох ензимів. Особливо критичною є проблема одночасного диференційованого визначення АСТ та АЛТ в одному зразку: серед усіх описаних біосенсорів лише декілька призначені для одночасного визначення обох трансаміназ, і всі вони базуються виключно на оптичних методах детекції з просторовим розділенням аналітичних зон, що значно ускладнює конструкцію [50-56]. Електрохімічна біосенсорна система, здатна одночасно та диференційовано визначати активність АСТ і АЛТ, на момент початку дослідження не була описана у науковій літературі.

Таким чином, розробка електрохімічної біосенсорної системи для одночасного визначення активності АЛТ та АСТ із забезпеченням селективності та достовірності аналізу в біологічних рідинах є актуальною науковою задачею, що має важливе практичне значення для медичної діагностики.

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

Дисертаційна робота відповідає основному плану науково-дослідних робіт відділу біомолекулярної електроніки Інституту молекулярної біології і генетики НАН України та виконувалась в рамках наступних проєктів:

- Відомча тематика 2.2.4.22 «Нові електрохімічні та оптичні біосенсиори на основі функціональних наноструктурованих матеріалів» (№ держ. реєстрації 0117U002879, 2018-2022 рр);
- Відомча тематика 2.2.4.22 «Складні мультифункціональні біосенсорні системи на основі ензимів, каскадів ензиматичних реакцій та біоміміків» (№ держ. реєстрації 0123U100964, 2023-2027 рр);
- «Дослідження нових підходів інтеграції біологічного матеріалу з мікроелектронними датчиками в портативних системах персоніфікованої медицини» за конкурсом НФДУ «Передова наука в Україні 2026-2028» (№ держ. реєстрації 0126U003404, 2026-2028 рр);
- «Розробка технології створення біосенсорних тест систем для аналізу активності ензимів як діагностичних показників пошкоджень внутрішніх органів» за фінансування НАНУ (Наукові і науково-технічні (експериментальні) роботи за пріоритетним напрямом «Розроблення сучасних біологічних та біомедичних методів, діагностичних засобів і технологій для забезпечення держави у воєнний та повоєнний час» (№ держ. реєстрації 0125U000950, 2025–2026 рр.);
- «Розробка портативної системи експрес моніторингу співвідношення лактату і пірувату в крові для нагальних потреб клінічної діагностики» за конкурсом НФДУ «Наука для відбудови України у воєнний та повоєнний періоди» (№ держ. реєстрації 0124U002066, 2023-2024 рр.);
- Дослідження особливостей формування сучасних біоселективних елементів на основі наноматеріалів різної природи для електрохімічних біосенсорів та сенсорних масивів із заданими та керованими властивостями", за конкурсом НФДУ «Підтримка досліджень провідних та молодих учених» (№ держ. реєстрації 0120U104529, 2020-2022 рр.);

- «Розроблення та оптимізація біосенсорної системи моніторингу нейромедіаторів для експрес діагностики та контролю ефективності лікування нейропатологій» в межах цільової програми наукових досліджень НАН України «“Розумні” сенсорні прилади нового покоління на основі сучасних матеріалів та технологій» (№ держ. реєстрації 0118U005174, 2018–2022 роки);
- «Розробка біосенсорної системи для моніторингу АЛТ та АСТ у пацієнтів із захворюваннями печінки та серця», гранти НАН України дослідницьким лабораторіям/групам молодих вчених НАН України для проведення досліджень за пріоритетними напрямками розвитку науки і техніки (№ держ. реєстрації 0122U002131, 2022–2023 роки);
- «Розроблення та оптимізація біосенсорної системи моніторингу нейромедіаторів для експрес діагностики та контролю ефективності лікування нейропатологій» в рамках комплексної науково-технічної програми НАН України «Розумні» сенсорні прилади нового покоління на основі сучасних матеріалів та технологій» (№ держ. реєстрації 0118U005173, 2018–2022 роки);
- грант № 225067 «Novel Portable Non-Invasive Real-Time Monitoring System for Biomarker Detection in Preterm Infants» від Swiss National Science Foundation в рамках «Спільні українсько-швейцарські проєкти з виконання наукових досліджень Ukrainian-Swiss Joint Project Proposal» (2024-2027 pp.);
- грант № 951887 «BioNanoSens «Deeping collaboration on novel biomolecular electronics based on «smart» nanomaterials», профінансований Horizon 2020 (2020-2024 pp.);
- гранти № 1290589, № 1030279, № SFI-PD-Ukraine-00017453 від Simons Foundation на підтримку Інституту молекулярної біології і генетики (2024-2026 pp.).

Мета і завдання дослідження. Метою роботи є розробка, оптимізація та апробація амперометричної біосенсорної системи для одночасного визначення активності аланінамінотрансферази (АЛТ) та аспартатамінотрансферази (АСТ) у біологічних рідинах людини.

Відповідно до мети роботи було визначено наступні *завдання*:

1. Проаналізувати, обрати та перевірити ензимні системи, методи та умови їхньої іммобілізації для селективної детекції АЛТ і АСТ;
2. Розробити та оптимізувати конструкцію амперометричних ензимних монобіосенсорів для визначення активності АСТ та АЛТ в розчинах, визначити оптимальні параметри робочого розчину, зокрема склад та концентрації субстратів, коензимів та буферного розчину, для найкращого функціонування отриманих біосенсорів;
3. Підібрати умови формування додаткової напівпроникної мембрани на поверхні перетворювачів для максимального нівелювання впливу електроактивних речовин, які присутні в біологічних рідинах;
4. Об'єднати розроблені монобіосенсиори в єдину аналітичну біосенсорну систему, вивчити перехресний вплив субстратів, коензимів та кофакторів монобіосенсорів та оптимізувати функціонування обох сенсорів при одночасній роботі, вивчити селективність розроблених монобіосенсорів та об'єднаної системи відносно можливих інтерферуючих речовин;
5. Дослідити аналітичні характеристики розроблених монобіосенсорів і біосенсорної системи та проаналізувати перспективність їх застосування на практиці, перевірити стабільність (зберігання, операційну стабільність, відтворюваність сигналів, відтворюваність ензимної мембрани) розроблених монобіосенсорів та системи на їх основі;
6. Провести апробацію лабораторного прототипу розробленої біосенсорної системи при роботі зі зразками сироватки крові та провести верифікацію отриманих біосенсорних результатів референсним спектрофотометричним методом.

Об'єкт дослідження – амперометричні ензимні біосенсиори на основі глутаматоксидази (ГлОкс) та піруватоксидази (ПЮкс) для визначення активності трансаміназ та біосенсорна система на їх основі.

Предмет дослідження – закономірності функціонування мультиензимної біосенсорної системи, зокрема перехресний вплив компонентів системи, кінетика ензиматичних реакцій у біоселективних

мембранах, аналітичні характеристики біосенсорної системи для одночасного визначення активності аланінамінотрансферази та аспартатамінотрансферази у водних розчинах та біологічних зразках.

Методи дослідження. У роботі використано наступні методи досліджень: хроноамперометрію – як основний метод реєстрації аналітичного сигналу біосенсорів при визначенні активності трансаміназ за концентрацією утвореного пероксиду водню; циклічну вольтамперометрію – для формування додаткових напівпроникних мембран на основі полі(м-фенілендіаміну) шляхом електрополімеризації; спектрофотометрію – як референсний метод для валідації результатів біосенсорного аналізу активності трансаміназ у зразках сироватки крові; методи іммобілізації ензимів (ковалентна зшивка глутаровим альдегідом та включення у фотополімеризовану матрицю PVA-SbQ) – для формування біоселективних мембран на поверхні платинових електродів; метод скануючої електронної мікроскопії – для аналізу зміни поверхні електродів в ході підготовки біосенсорів; методи статистичної обробки даних – для визначення достовірності та відтворюваності отриманих результатів, розрахунку аналітичних характеристик біосенсорів та побудови кореляційних залежностей.

Наукова новизна отриманих результатів. Вперше розроблено електрохімічну біосенсорну систему для одночасного диференційованого визначення активності аспартатамінотрансферази в одному зразку біологічної рідини. На відміну від усіх раніше описаних мультианалітичних систем для визначення трансаміназ, що базуються на оптичних методах детекції, запропонована система використовує амперометричний принцип реєстрації сигналу, що забезпечує високу чутливість, простоту конструкції та можливість мініатюризації.

Вперше проведено порівняльну характеристику двох варіантів АЛТ-чутливого амперометричного біосенсора, створених на основі різних ензимних систем, на основі ГлОкс чи ПОкс. Встановлено переваги та обмеження кожного підходу за сукупністю аналітичних характеристик

(чутливість, лінійний діапазон, селективність, стабільність) та обґрунтовано вибір оптимального варіанту для інтеграції в мультианалітну біосенсорну систему.

Продemonстровано здатність розробленої біосенсорної системи достовірно визначати активність АСТ та АЛТ у зразках сироватки крові людини; достовірність результатів біосенсорного аналізу підтверджено високим коефіцієнтом кореляції ($R = 0,989$ для АСТ та $R = 0,994$ для АЛТ) з результатами контрольного спектрофотометричного методу.

Практичне значення отриманих результатів. Створено діючі лабораторні прототипи монобіосенсора для визначення АСТ на основі ГлОкс, монобіосенсорів для визначення АЛТ на основі ГлОкс та ПОкс та біосенсорної системи для одночасного визначення активності АСТ та АЛТ у зразках сироватки крові. Дані прототипи можуть бути використані як основа для розробки портативних діагностичних приладів, придатних до використання в лабораторіях клінічної діагностики, каретах швидкої допомоги або в амбулаторних палатах. Отримані результати щодо закономірностей функціонування іммобілізованих та вільних ензимів і мультиензимних систем дозволять доповнити існуючі фундаментальні знання ензимології, зокрема щодо впливу іммобілізації на кінетичні параметри ензимів, дифузійних обмежень у багатошарових біоселективних мембранах та особливостей функціонування каскадних ензиматичних реакцій. Отримані дані можуть бути використані як матеріал для розширення освітніх програм з біосенсорики, біоаналітичної хімії та прикладної ензимології.

Розпочато метрологічну атестацію і впровадження розробленої системи: в ДП «Укрметртестстандарт» затверджено методику вимірювання активності АСТ № МВ 031-36-2025 та виконуються роботи з розробки методики вимірювання активності АЛТ. Розроблений біосенсор для визначення АСТ впроваджено в ТОВ «Укрмедсерт». Отримано патент на винахід № 129239, № 125811 та патент на корисну модель № 153303, № 147481.

Особистий внесок здобувача. Основний обсяг експериментальних досліджень, викладених у дисертації, отримано за безпосередньої участі автора. Здобувачем самостійно проведено планування та виконання основних експериментів, оптимізацію складу біоселективних мембран та умов вимірювання, розробку та апробацію біосенсорної системи для одночасного визначення трансаміназ, аналіз зразків сироватки крові, статистичну обробку та інтерпретацію отриманих даних, підготовку публікацій до друку. Експериментальні дослідження АЛТ-чутливого біосенсора на основі ПОкс та спектрофотометричні вимірювання активності АЛТ в зразках сироватки, проведено у співпраці з Ваховським Є.Р. Спектрофотометричне визначення активності АСТ в зразках сироватки крові здійснено спільно з Марчук О.Д. Дослідження морфології поверхні перетворювачів методом скануючої електронної мікроскопії виконано в Інституті фізики напівпровідників НАН України у співпраці з к.т.н. Гриньком Д.О. та Інституті фізики НАН України у співпраці з к.фіз-мат.н. Стьопкіним В.І. Огляд наукової літератури біосенсорних методів визначення АЛТ та АСТ здійснено спільно з Беркетою К.О. Консультації щодо розробки біосенсорної системи проводились з академіком НАН України, д.б.н., проф. Дзядевичем С.В. Планування досліджень, обговорення та аналіз отриманих результатів проводились разом із науковим керівником, д.б.н., с.н.с О.О. Солдаткіним. Особистий внесок здобувача у спільних публікаціях зазначено в анотації до дисертації.

Апробація матеріалів дисертації. Результати дисертаційного дослідження були апробовані на вітчизняних та міжнародних наукових конференціях:

- Deuxièmes Rencontres Capteurs de l'Université Bourgogne Franche Comté (м. Діжон, Франція, 24–25 листопада 2022 р.);
- Міжнародна конференція «Nanotechnology and Nanomaterials» НАНО-2023 (м. Буковель, Україна, 16–19 серпня 2023 р.);
- IX З'їзд Українського біофізичного товариства (м. Київ, Україна, 30 жовтня – 2 листопада 2023 р.);

- Шевченківська весна (м. Київ, Україна, 24–26 квітня 2023 р.);
- XVIII Всеукраїнська конференція молодих вчених Інституту молекулярної біології і генетики НАН України (м. Київ, Україна, 21–22 травня 2024 р.);
- XXV Міжнародна конференція студентів, аспірантів та молодих вчених «Сучасні проблеми хімії» (м. Київ, Україна, 15–17 травня 2024 р.);
- Міжнародна конференція «Biogenext» (м. Київ, Україна, 17–20 вересня 2024 р.);
- Шевченківська весна: досягнення в науках про життя, XXII Міжнародна наукова конференція студентів та молодих вчених (м. Київ, Україна, 23–25 квітня 2025 р.);
- XXI Міжнародна наукова конференція студентів і аспірантів «Молодь і поступ біології» (м. Львів, Україна, 28 квітня – 1 травня 2025 р.);
- Конференція «Актуальні проблеми біохімії та біотехнології» (м. Київ, Україна, 5–6 травня 2025 р.);
- XIX Всеукраїнська конференція молодих вчених Інституту молекулярної біології і генетики НАН України (м. Київ, Україна, 20–21 травня 2025 р.);
- Проблеми та досягнення сучасної біотехнології: матеріали VI міжнародної наук.-практ. конф. (м. Харків, Україна, 27 березня 2026 р.);
- XXII Міжнародна наукова конференція студентів і аспірантів, присвячена 90-річчю кафедри мікробіології біологічного факультету Львівського національного університету імені Івана Франка (м. Львів, Україна, 15–17 квітня 2026 р.);
- XX Всеукраїнська конференції молодих вчених Інституту молекулярної біології і генетики НАН України (м. Київ, Україна, 26–27 травня 2026 р.)

Публікації. За результатами дисертаційної роботи опубліковано 9 статей у наукових виданнях, що індексуються у базах даних Web of Science Core Collection та Scopus (сумарний імпакт-фактор становить 28,345), та 16 тез доповідей на вітчизняних та міжнародних наукових конференціях, метрологічно затверджено 1 методику визначення, оформлено 2 патенти.

Структура та обсяг дисертації. Дисертація складається із вступу, огляду літератури, опису матеріалів та методів дослідження, експериментальної частини, висновків, списку використаних джерел та додатків. Загальний обсяг дисертації – 218 сторінок. Робота містить 50 рисунків і 11 таблиць. Список використаної літератури охоплює 190 найменувань.

РОЗДІЛ 1

ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ

1.1 Роль АЛТ і АСТ у метаболізмі та патологічних процесах

Аланінамінотрансфераза (АЛТ) та аспартатамінотрансфераза (АСТ) (далі — трансамінази) є високоселективними ензимами з органоспецифічним розташуванням в цитоплазмі та матриксі мітохондрій серця та печінки. Вони каталізують оборотний перенос аміногрупи з амінокислоти до кетокислоти, що призводить до утворення нової кетокислоти та нової амінокислоти. Однак, якщо концентрація продуктів вища за субстрати, ензиматична реакція може протікати в зворотному напрямку (реакції 2.1, 2.2). Детальну інформацію про кінетику цих ензиматичних реакцій за стандартних умов можна знайти в комплексних дослідженнях з цього питання [57-58].



Найбільш значимою роллю трансаміназ є їх участь у біохімічних каскадах синтезу енергетичних молекул, зокрема циклу трикарбонових кислот [59] та малат-аспартатного циклу [60]. Вони також відіграють важливу роль у метаболізмі амінокислот, включаючи катаболізм і анаболізм незамінних і замінних амінокислот та у процесах метаболізму азоту, таких як цикл сечовини [61] і цикл глюкози-аланіну [62]. Крім того, трансамінази впливають на багато інших біохімічних шляхів, оскільки їх субстрати служать ключовими сигнальними молекулами і проміжними речовинами в різноманітних метаболічних перетвореннях.

У здорових людей рівні трансаміназ у сироватці крові варіюють залежно від віку [63-65], етнічної приналежності [66-67] та статі (зазвичай до 30/19 Од.акт./л АЛТ у чоловіків/жінок відповідно, тоді як рівні АСТ досягають до 32/26 Од.акт./л у чоловіків/жінок) [68]. Дослідження показали, що концентрації АСТ у міокарді та печінці відповідно у 7700 та 7000 разів вищі, ніж у сироватці [69]. Аналогічно, концентрація АЛТ у печінці приблизно в 3000 разів вища, ніж у сироватці [70]. Коли ці органи пошкоджуються, внутрішньоклітинний вміст ензимів вивільняється в міжклітинну матрицю, що призводить до значного підвищення активності трансаміназ у крові [71,6-26,72]. Як результат, рівні трансаміназ слугують широко використовуваними неспецифічними біомаркерами ураження міокарда та печінки. Однак аналіз змін активності ензимів з часом, тривалості підвищених рівнів та зміненого співвідношення АСТ до АЛТ (коефіцієнт де Рітіса) може допомогти звужити коло причин ураження та сприяти діагностиці. Порівняльні дані, що приведено в таблиці (Додаток Б), ілюструють широкий спектр медичних станів, які вимагають рутинного або термінового моніторингу трансаміназ.

Незначні зміни коефіцієнта де Рітіса також можуть відбуватися під час вагітності та пов'язаних з нею станів організму (Додаток Б), наприклад, при преєклампсії або гестаційному діабеті, а збільшення рівню трансаміназ у вагінальних рідинах вдвічі слугує маркером передчасного розриву плодових оболонок [26].

1.2 Традиційні методи детекції АЛТ і АСТ

Через нагальну потребу клінічної медицини у виявленні рівнів АСТ та АЛТ у біологічних зразках було розроблено різні методи їх виявлення. Усі ці методи загалом поділяються на дві основні групи:

- Визначення **концентрації** ензимів – використовується для діагностики патологій, що змінюють рівень експресії трансаміназ, або генетичними аномаліями, що змінюють їх структуру та ефективність;

- Визначення **активності** ензимів – допомагає діагностувати захворювання, пов'язані з пошкодженням клітин-депо в серцево-судинній та травній системах.

Концентрація ензиму зазвичай вимірюється шляхом прямої взаємодії між системою та молекулою ензиму, тоді як активність ензиму вимірюється опосередковано через каталізовану ним біохімічну реакцію (через зміни концентрації субстрату або продукту реакції). На рис. 1.1 представлено загальну класифікацію методів виявлення трансамінази.

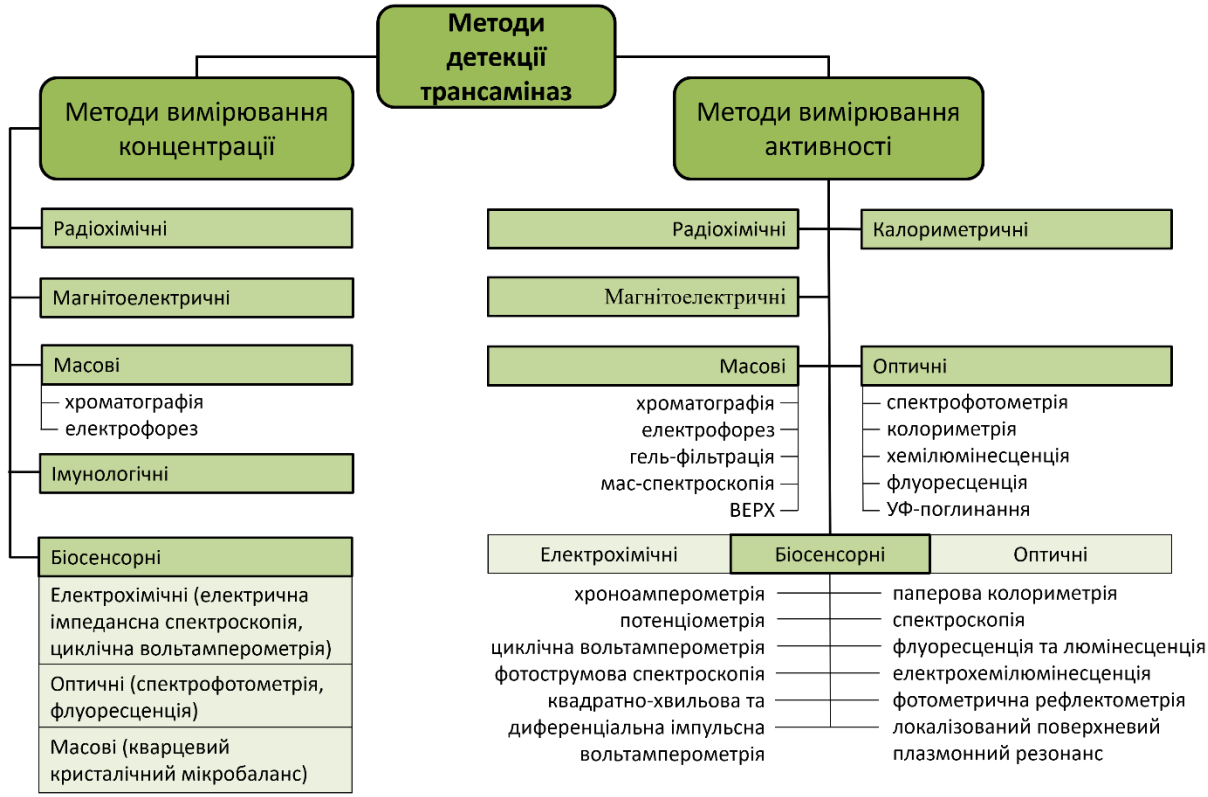


Рис. 1.1. Методи детекції трансаміназ

1.2.1 Методи виявлення концентрації трансаміназ. Методи прямого виявлення молекул АСТ і АЛТ сьогодні використовуються рідко, оскільки вони часто менш ефективні, селективні та діагностично значущі в порівнянні з виявленням активності; проте існує цілий низка таких методів [43-46,73-75]. Наприклад, кількісне визначення трансаміназ на основі маси включає електрофоретичне розділення на целюлозній мембрані з поліклональними антитілами [73] та швидку рідинну хроматографію білків з вертикальною аніонообмінною колонкою [74]. Також повідомлялося про застосування передових методів мас-спектрометрії [38] для характеристики посттрансляційних модифікацій АСТ, хоча жодне дослідження не застосовувало їх для кількісного визначення концентрації трансаміназ.

У дослідженні [46] було застосовано **магнітоелектричний** метод, ЯМР, для прямого визначення АСТ та АЛТ у сироватці крові. Хоч ЯМР є високоспецифічним, але відрізняється високою вартістю обладнання, суворими вимогами до характеристик зразків (температура, рН, склад) та складною інтерпретацією результатів, що робить його непридатним для рутинної діагностики.

Радіохімічні дослідження [75] використовували обмін аланіну на N-кінці трансамінази для включення радіоактивної мітки (радіовуглець ^{14}C) в її структуру. Цей метод вимагав багато підготовчих етапів (знесолення, фільтрація, сушіння, нагрівання, визначення щільності, розведення, інкубація з радіоактивним реагентом, вимивання, хроматографія, підтвердження чистоти тощо), але надавав дані про концентрацію трансамінази, а також молекулярну масу і субодиниці.

Імунологічні методи для визначення концентрації трансаміназ базуються на класичному ELISA з антитілами, міченими пероксидазою хрому [44-45], або ELISA з моноклональними антитілами, міченими флуоресцентною речовиною [43]. Основною перевагою цього методу є можливість розрізнити цитозольні, мітохондріальні та різні ізоензими трансаміназ за допомогою специфічних антитіл, що в деяких випадках є

надзвичайно важливим. Серед недоліків варто згадати високу вартість антитіл та імовірність рідкісної мутації в епітопі трансамінази, яка завадить афінному зв'язуванню.

1.2.2 Методи визначення активності трансаміназ. Вимірювання активності АСТ і АЛТ набагато більш поширене, ніж виявлення концентрації трансаміназ, і тому представлене більшою різноманітністю методів. В основному це оптичні методи, хоча також відомо про інші варіанти детекції АСТ та/або АЛТ: ЯМР [46], масова спектрометрія [39-41], колонкова хроматографія [76], електрофорез [77], гель-фільтрація [78], ВЕРХ [42]), радіохімічні [79-82] та калориметричні [83-85], а також їх комбінації [86-87].

В даний час **спектрофотометрія і колориметрія** є найбільш поширеними методами виявлення активності трансаміназ. Оскільки АСТ, АЛТ, їх субстрати і продукти не мають сильних оптичних властивостей, для їх виявлення необхідне залучення додаткових реакційних каскадів з оптично активними речовинами. НАДН має високий коефіцієнт екстинкції при 340 нм і тому часто використовується в комерційних системах вимірювання для АСТ [27-28] та АЛТ [29-31]. Наприклад, АСТ каталізує перетворення аспартату в оксалоацетат, який відновлюється малатдегідрогеназою за допомогою НАДН, зниження рівня НАДН призводить до зменшення поглинання світла. Аналогічно, АЛТ перетворює кетоглутарат на піруват, який відновлюється лактатдегідрогеназою за допомогою НАДН. Діапазон вимірювання для цих оптичних методів зазвичай становить 5-500 Од.акт./л. У роботі [32] АЛТ визначали через каскадну реакцію: утворений глутамат окиснювався глутаматоксидазою з генерацією H_2O_2 , який у присутності нанокаталізатора Fe@BC окиснював ТМБ (3,3',5,5'-тетраметилбензидин) до оксТМБ. Оптичний сигнал при 450 нм був пропорційний активності АЛТ. Межа виявлення становила 4 Од.акт./л, з лінійним діапазоном 10-1000 Од.акт./л АЛТ. Деякі інші комерційні колориметричні системи для виявлення АЛТ [36] та АСТ [33] використовували глутамат як проміжний аналіт, що реагує з органічним

барвником, тоді як інші покладалися на кольорові реакції з оксалоацетатом [34] або піруватом [35,37].

Флуориметричне виявлення трансаміназ є менш поширеним. Існує лише один комерційний набір для АСТ з межею виявлення 2 Од.акт./л [88] та один набір для АЛТ з діапазоном 0,01-0,83 Од.акт./л [89]. Ці методи за допомогою ензиматичних реакцій генерують з проміжних аналітів (перекис водню і глутамат, відповідно) червоні флуоресцентні сполуки (зміщення довжини хвилі 535→587 нм і 540→590 нм, відповідно). Комбінований набір для виявлення АЛТ [90] пропонує як колориметричний, так і флуориметричний режими, використовуючи АЛТ-залежне утворення пірувату для формування оптично активної речовини, яка поглинає світло (570 нм) і каталізує флуоресцентне зміщення (535→587 нм).

Для підвищення точності флуоресцентного аналізу були розроблені нові лабораторні методи. Один з методів виявлення АСТ вимірює концентрацію оксалоацетату за його здатністю посилювати фотолюмінесценцію азот-легованих вуглецевих точок (350→440 нм) [91], з робочим діапазоном 1-54 Од.акт./л. Інший метод кількісно визначає активність АЛТ шляхом гасіння флуоресценції бичачого сироваткового альбуміну (БСА) [92]: аланін зазвичай координується з Cu(II), але АЛТ перетворює аланін на піруват, руйнуючи комплекс аланін-Cu(II) і вивільняючи Cu(II). Вільний Cu(II) зв'язується з БСА, зменшуючи його флуоресценцію. Діапазон цього методу становить 5-400 Од.акт./л, з межею виявлення 3 Од.акт./л.

Деякі дослідження включали додаткові етапи розділення за допомогою капілярного електрофорезу з подальшим оптичним виявленням за допомогою лазерної флуоресценції (де продукти трансамінази були мічені флуоресцеїн ізотіоціанатом) [86] або електрохемілюмінесценції (де глутамат окиснювався за допомогою Ru(bpy)₃³⁺, при цьому Ru(bpy)₃²⁺ релаксував і випромінював світло) [87]. Ці методи мали похибку 3-8% відносно еталонних методів, але вимагали понад годину аналізу на кожну пробу.

Калориметричне виявлення активності трансамінази вимірює зміни температури спричинені біомолекулярним зв'язуванням. Цей метод застосовувався в дослідженнях [83-84] для оцінки преекламписії та функції печінки. На відміну від попередніх методів, калориметрія дозволяє уникнути додаткових реакцій та модифікацій субстрату, зберігаючи природну кінетику трансамінази. Однак він має низьку селективність та чутливість, вимагає складного обладнання та є дуже залежним від температури.

Загалом, ці методи часто не здатні працювати в режимі реального часу і вимагають ретельної підготовки зразків. Також під час підготовки та аналізу необхідні точні інтервали, що вимагає постійного контролю оператора і збільшує ризик людської помилки. Крім того, дані методи не придатні до оцінки активності обох трансаміназ в одному зразку і вимагають окремих вимірювань на кожен аналіт, що збільшує необхідний об'єм зразку.

1.3 Біосенсори для детекції АЛТ і АСТ

Біосенсорні методи з'явилися як альтернатива традиційним методам аналізу трансаміназ. Їхня зростаюча популярність пов'язана з такими перевагами, як проста підготовка зразків, швидкий аналіз, портативність, висока чутливість і специфічність, низькі витрати на обладнання та аналіз, автономність, доступність для непідготовлених користувачів та моніторинг в режимі реального часу [93].

Перший метод виявлення АСТ та АЛТ на основі біосенсорів був представлений у 1980 році Фуміо Мізутані та ін. [94]. Вони розробили амперометричний біосенсор з використанням ПОкс для визначення пірувату та непрямого вимірювання активності АЛТ. З того часу було розроблено численні біосенсори для виявлення трансаміназ, що залучають такі передові підходи як додаткові мембрани, наноматеріали, складні біоселективні елементи та сучасні системи виявлення.

Для оцінки перспективності біосенсорів для виявлення АСТ та АЛТ, всі роботи були згруповані за стадією готовності:

- Стадія **розробки** (23 роботи, 38% всіх робіт): демонструє фундаментальну можливість використання методу або лабораторного прототипу, іноді адаптованого для конкретних зразків (сироватка, слина, вагінальні виділення тощо), але ще не випробуваного на них (виділено жовтим у Додатку 2);
- Стадія **апробації** (34 роботи, 56%): описує завершене дослідження, включаючи розробку прототипу, адаптацію та тестування на цільових зразках (виділено зеленим, тип зразка зазначений у Додатку 2);
- **Теоретичні** роботи (4 роботи, 6%): охоплює три огляди раніше розроблених біосенсорів АСТ та АЛТ [95-97] та опис теоретичного колориметричного пристрою для виявлення АСТ і АЛТ [50] (виділено синім у Додатку 2);
- **Комерційне** впровадження: дані відсутні.

Після аналізу опублікованих досліджень щодо моно- та мультисенсорних систем для виявлення АСТ та АЛТ, всі експериментальні роботи було розділено на чотири основні групи залежно від аналіту. Ці категорії будуть використовуватися і далі по огляду літератури (Додаток В):

- **Біосенсори АЛТ**, що виявляють тільки АЛТ (29 робіт, 50%).
- **Біосенсори АСТ** виявляють тільки АСТ (10 робіт, 17,24%).
- **Біосенсори АЛТ/АСТ** неспецифічно вимірюють як АСТ, так і АЛТ, відповідно, вони не можуть розрізняти сигнали між трансаміназами та проводять вимірювання по чергово (12 робіт, 20,68%).
- **Біосенсорні системи АСТ+АЛТ** є подвійними за специфічністю, тому вони здатні вимірювати АСТ і АЛТ як одночасно, так і окремо (7 робіт, 12,08%).

Більшість досліджень зосереджуються на **біосенсорах АЛТ**, ймовірно, через вищу специфічність АЛТ як біомаркера стану печінки, в той час як АСТ присутній у різних органах, включаючи печінку, серце, скелетні м'язи, нирки,

мозок, підшлункову залозу, легені, та клітини крові [98]. Друга за величиною група включає **біосенсиори АЛТ/АСТ**, майже всі з яких використовували електрохімічні методи виявлення і в основному покладалися на ГлОкс як елемент біорозпізнавання. Оскільки обидві трансамінази виробляють глутамат, розрізнити сигнал від АСТ і АЛТ досить складно. На відміну від **АЛТ/АСТ біосенсорів**, всі **біосенсиори АСТ+АЛТ** використовували оптичні неензиматичні методи виявлення. Дивно, але не було розроблено жодного електрохімічного біосенсорного пристрою для одночасного та диференційованого виявлення активності АСТ і АЛТ в одній пробі.

1.3.1 Класифікація біосенсорів за методом детекції. Усі відомі розробки біосенсорів для виявлення АСТ та АЛТ базуються на оптичних, електрохімічних або масових методах (рис. 1.2). Оптичні методи визначають зміни в інтенсивності випромінювання або оптичній густині розчину і зазвичай використовують безконтактну детекцію, в той час як електрохімічні біосенсиори реєструють зміни параметрів розчину, спричинені біохімічними реакціями безпосередньо на поверхні електрода.

Більшість систем є електрохімічними, причому хроноамперометричні біосенсиори становлять 47,41% досліджень. Інші електрохімічні методи становлять 17,24 %, хоча кожен метод з'являється лише в одному або двох дослідженнях. Оптичні методи виявлення становлять 34,48% досліджень. Метод кварцового кристалічного мікробалансу на основі маси з'являється в одному дослідженні поєднуючись з електрохімічним виявленням.

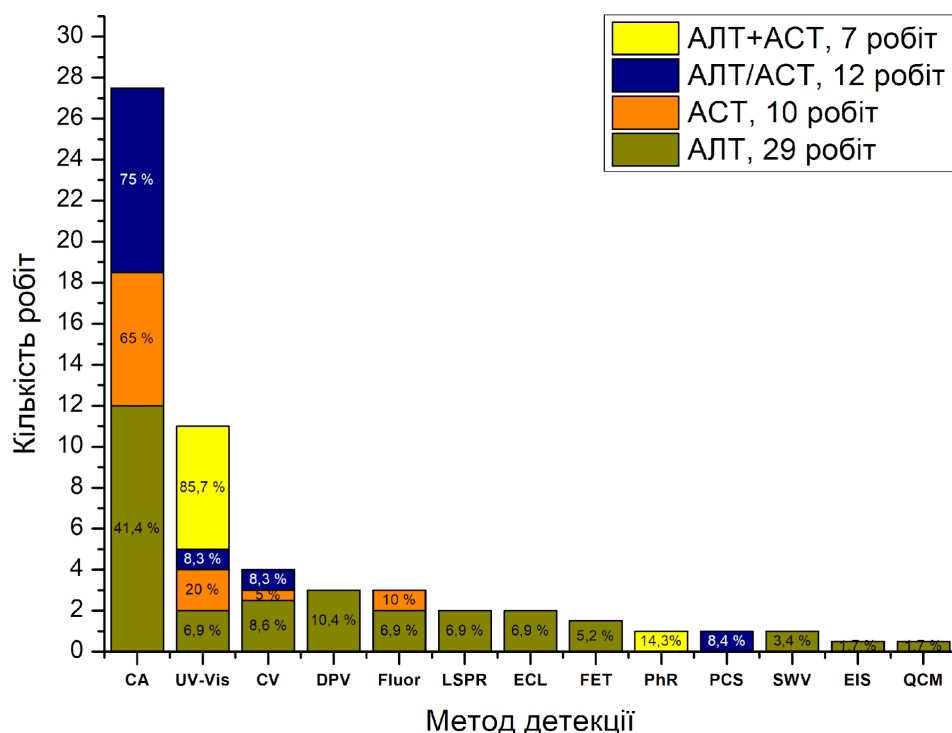


Рис. 1.2. Порівняння вживаності різних методів детекції в біосенсорах для вимірювання активності АЛТ та АСТ. СА – хроноамперометрія. CV – циклічна вольтамперометрія. FET – потенціометрія на польових транзисторах. DPV – диференціальна імпульсна вольтамперометрія. SWV – квадратно-хвильова вольтамперометрія. ECL – електрохемілюмінесценція. QCM – кварцевий кристалічний мікробаланс. Fluor – флуоресценція. UV-Vis – УФ-спектроскопія та колориметрія. PhR – фоторефлектометрія. LSPR – локалізований поверхневий плазмонний резонанс. PCS – фотоструменева спектроскопія. EIS – електрохімічна імпедансна спектроскопія

Крім загального розподілу частоти методів виявлення, у групах біосенсорів виявляються деякі тенденції. Усі біосенсиори АСТ+АЛТ базуються на оптичних методах, ймовірно, завдяки їхній конструкції з просторово розділеними чутливими зонами та, відповідно, різними елементами біорозпізнавання та реакційними сумішами в кожній зоні. При цьому, майже всі неспецифічні біосенсиори АСТ/АЛТ і більшість біосенсорів АСТ використовують хроноамперометрію, що відображає популярність

амперометричних методів через їх високу чутливість, швидкість, низьку вартість, просту конструкцію, мініатюризацію та потенціал до автоматизації. Найбільша за кількістю група (АЛТ), також демонструє найбільшу різноманітність методів виявлення (загалом 11), включно з усіма обговореними далі підходами (за винятком фоторефлектометрії та фотострумової спектроскопії).

1.3.1.1 Оптичні біосенсиори

1.3.1.1.1 Біосенсиори на основі колориметрії та спектроскопії. Серед оптичних АСТ і АЛТ біосенсорів найпоширенішим методом є колориметрія або ультрафіолетово-видима спектрофотометрія (UV-Vis на рис. 1.2). Перший приклад (1986 р.) [99] описує два імуносенсиори для визначення АСТ методом сендвіч-аналізу з кон'югатом антитіло-пероксидаза, що каталізує утворення речовини з максимумом поглинання при 492 нм: на основі полістирольних кульок та на основі паперових дисків. Обидва імуносенсиори вимагали значної кількості етапів при вимірюванні (6-7 етапів) та тривалості аналізу (3-16 годин).

Після тривалої перерви, роботи 2012–2025 років [54-56,100-101] почали використовувати цифрові камери для реєстрації біосенсорного сигналу з аналізом інтенсивності фоторедакторами або штучним інтелектом. Виготовлення біосенсорів включало восковий та струменевий друк з наступним нанесенням зразків на чутливі ділянки та їх адсорбцією на спеціальних мембранах. Використовувалися такі реакції виявлення:

- Піруват-каталізоване перетворення 2,4-динітрофеніл-3-гідразину на піруватгідразон з утворенням темно-жовтого барвника [100];
- Класичні спектрофотометричні реакції малатдегідрогенази (МДГ) і лактатдегідрогенази (ЛДГ) з детекцією зниження концентрації оптичноактивного НАДН [54];
- ПОкс і пероксидаза хрону (ПерОкс) сприяли окисненню 4-аміноантипірину (4ААП) з утворенням жовтого барвника [55];

- Двошарова структура, в якій прихований рожевий шар родаміну синього стає видимим після АСТ-каталізованого знебарвлення верхнього шару метиленового зеленого [56]. Та сама реакція метиленового зеленого була запропонована в теоретичній роботі [50];
- ПОкс і ПерОкс сприяли реакції між 4ААП і N,N-диметиламінобензойною кислотою з утворенням червоного барвника [56, теоретична 50];
- ПОкс і ПерОкс сприяли окисненню та конденсації N-етил-N-(2-гідрокси-3-сульфопропіл)-3,5-диметоксианіліну (DAOS) та 4ААП з утворенням синього барвника [101].

В інших дослідженнях (2020 [53], 2022 [52], 2025 [102]) також застосовували колориметричні підходи, але результати обчислювали за чорно-білими фотографіями, аналізуючи інтенсивність сірого у зоні детекції. В одному випадку [53] визначення АСТ та АЛТ базувалося на комерційному наборі, в іншому [52] – на ензиматичних реакціях ГлОкс та ПОкс з утворенням H_2O_2 , що окиснював ТМБ у присутності покритого золотом подвійного оксиду кобальту та алюмінію, збільшуючи поглинання світла довжиною 650 нм. ТМБ також використано в [102], де його окиснював кубічний MnO_2 -наноензим з НАДН-оксидазною активністю, а концентрація НАДН змінювалась реакціями ЛДГ або МДГ. Зміну кольору реєстрували в сірій шкалі смартфоном у спеціальній камері зі стабільними умовами освітлення. Незважаючи на позиціонування як point-of-care пристроїв для швидкого визначення трансаміназ, ці біосенсиори мають обмежений робочий діапазон. Тому ці біосенсиори непридатні для реєстрації високих рівнів трансаміназ (~2000 Од/л). Точні вимірювання також потребують контрольованої камери зі стандартизованими умовами освітлення та реєстрації сигналу.

Єдиний ультрафіолетовий спектрофотометричний АСТ-біосенсор [103] (UV-Vis на рис. 1.2) використовує АСТ-чутливий комплекс з ензиматичною активністю, що каталізує утворення кольорової речовини, яку вимірюють за поглинанням при 450 нм.

1.3.1.1.2 Біосенсори на основі флуоресценції та електрохемілюмінесценції. Флуоресцентні методи (Fluor на рис. 1.2) застосовували для визначення АЛТ [104] з використанням металоорганічних люмінесцентних каркасів та флуоресцентного резонансного перенесення енергії (FRET). При FRET відбувається безвипромінювальний перенос енергії за умови, що частота випромінювання молекули-донора збігається з частотою поглинання молекули-акцептора. Описаний біосенсор містив комплекс $\text{MnO}_2@\text{ZIF-8}$ -люмінол, який при збудженні 365 нм виступав молекулою-донором із синьою флуоресценцією (431 нм), і був покритий молекулою-акцептором 2,3-діамінофеназином (ДАФ). Спектр поглинання ДАФ збігався з випромінюванням люмінолу (431 нм), що забезпечувало ефективний FRET та жовту флуоресценцію ДАФ (566 нм). При додаванні АЛТ утворювався комплекс з тіопроїном, який зміщував спектр поглинання ДАФ, знижуючи ефективність FRET та відновлюючи синю флуоресценцію люмінолу пропорційно концентрації АЛТ.

Активність АЛТ також вимірювали флуоресцентною олігонуклеотидною міткою [105]: флуорофор в його складі активувався молекулою NAD^+ , що утворювалась при окисненні пірувату за допомогою ЛДГ. Для визначення АСТ використовували азот-леговані графенові квантові точки [106], флуоресценція яких реагувала на зміну співвідношення груп $-\text{NH}_2$ та $\text{C}=\text{O}$ у середовищі. Реакція АСТ змінювала концентрації субстратів та продуктів, які мали різну афінність до графену та різну структуру донорно-акцепторних груп. В свою чергу це змінювало електронну конфігурацію квантових точок та викликало червоне зміщення флуоресценції пропорційно активності АСТ.

Для визначення трансаміназ розроблено ензимні біосенсори на основі електрохемілюмінесценції (ECL на рис. 1.2) [107-108]. Ці системи базуються на пероксидазо-залежному окисненні люмінолу: електрохімічно активований люмінол утворює пероксид-реактивний радикал, що емітує флуоресцентне

світло. Необхідний H_2O_2 генерується окисненням глутамату або пірувату за допомогою ГлОкс або ПОкс. Ці біосенсиори демонструють перспективні аналітичні характеристики (Додаток В).

1.3.1.1.3 Інші оптичні біосенсиори (фотометрична рефлектометрія, локалізований поверхневий плазмонний резонанс). Фотометричну рефлектометрію (PhR на рис. 1.2) також застосовували для визначення АСТ та АЛТ [51]. Метод вимірює інтенсивність світла певних довжин хвиль, відбитого від реакційної поверхні. У колориметричній реакції на пресованій тест-смужці хромогенний субстрат DAOS (сульфонатне похідне з аніліновою групою) окиснювався ензимами ПерОкс, ПОкс та оксалоацетатдекарбоксилаза (ОАД) з утворенням синього осаду. Смужку опромінювали світлодіодом 630 нм, а фотодетектор вимірював інтенсивність відбитого від осаду світла, що корелювала з рівнем ензиму. Результати передавалися на смартфон через Bluetooth.

Локалізований поверхневий плазмонний резонанс (LSPR на рис. 1.2) базується на колективних коливаннях електронів (плазмонний резонанс) на поверхні металевих наноструктур (наночастинках або тонких плівках), що збуджуються при резонансі фотонів падаючого світла з базовим коливанням електронів в металі. Резонанс призводить до посиленого поглинання або розсіювання світла. LSPR-біосенсиори здатні детектувати біохімічні взаємодії на поверхні сенсора через те, що резонансна частота і кут сильно залежать від умов середовища (показник заломлення навколишнього середовища, температура, рН, осадження молекул, афінні взаємодії тощо). Наприклад, АЛТ-біосенсор на основі LSPR [109-110] детектував зв'язування глутамату з ГлОкс, іммобілізованою на золотих наночастинках (НЧЗ), що змінювало показник заломлення поблизу НЧЗ на симетрично звуженому оптоволокну. Світло, що проходило через волокно з повним внутрішнім відбиттям, генерувало еванесцентні хвилі в звужених ділянках. Ці хвилі поширювалися за межі волокна, взаємодіяли з НЧЗ, збуджували плазмонний резонанс та

утворювали піки в спектрах поглинання або розсіювання. У роботі [111] розроблено фізико-оптичний LSPR-сенсор на фотонно-кристалічному волокні з повітряними каналами та золотим покриттям, що демонстрував високу чутливість до змін показника заломлення. Його ефективність продемонстровано на аланіні, і хоча було згадано про потенціал сенсора для виявлення АЛТ, експериментальні дані не були надані.

1.3.1.2 Електрохімічні біосенсиори для визначення активності АЛТ та АСТ

1.3.1.2.1 Біосенсиори на основі хроноамперометрії. Застосування хроноамперометрії домінує серед усіх відомих біосенсорів для визначення АСТ та АЛТ (47,41% публікацій, Додаток В, СА на рис. 1.2) [94, 112-138] завдяки простоті, швидкості та потенціалу до комерціалізації. Перший трансаміназний біосенсор [94] визначав активність АЛТ через моніторинг споживання кисню ензимом ПОкс: ПОкс окиснював продукт реакції АЛТ, кисневий електрод конкурував з ПОкс за кисень, відповідно, активність АЛТ знижувала зареєстрований струм. Типовий сучасний амперометричний біосенсор [113] визначає активність АЛТ за зростанням струму від електрохімічного окиснення H_2O_2 , утвореного в ході реакції ГлОкс.

1.3.1.2.2 Біосенсиори на основі циклічної вольтамперометрії, диференціальної імпульсної вольтамперометрії та вольтамперометрії прямокутних імпульсів. Циклічну вольтамперометрію (CV на рис. 1.2) використовували в кількох розробках для визначення АСТ та АЛТ з різними принципами роботи.

Зокрема, в [139] H_2O_2 , утворений за участі ГлОкс, кількісно визначали через відновлення Ir-C наночастинок на товстоплівковому друкованому біосенсорі. У [140] H_2O_2 утворювався внаслідок реакції ПОкс (інкапсульованої в матрицю з 4-амінофенолу та платинових наночастинок), а вільноплаваючий 4ААП діяв як редокс-медіатор. Дослідження [141] описує імуносенсор, що

поєднує імунологічні та редокс-реакції в конструкції системи з подвійним принципом дії. Анти-АЛТ антитіло іммобілізували на каліксарен-покритому золотому електроді для захоплення АЛТ із зразка. Після промивання додавали ПерОкс-мічене анти-АЛТ антитіло з наступним промиванням. ПерОкс окиснювала воду до H_2O_2 , що потім окиснював оптичноактивний ТМБ. ТМБ електрохімічно окиснювався, вивільняючи електрони пропорційно кількості АЛТ. Дворежимні біосенсори, що поєднують CV з СА, також описано в [112, 139].

Диференціальна імпульсна вольтамперометрія (DPV на рис. 1.2) [142-144,150] подібна до CV, але потенціал збільшується серією коротких імпульсів. Струм вимірюють безпосередньо перед та в кінці імпульсу, що дозволяє розділити базовий (нефарадеївський) і фарадеївський струми, підвищуючи чутливість. Споріднена імпульсна техніка – квадратно-хвильова вольтамперометрія (SWV на рис. 1.2) – використовує симетричні квадратні імпульси. Цей метод застосовано для АЛТ-чутливого сенсора [142] на основі ензиматичного каскаду (АЛТ і ПОкс), що генерує H_2O_2 , який електрохімічно окиснюється на електроді. Усі реагенти додавали до зразка, інкубували при 37°C протягом 40 хв та вимірювали вміст H_2O_2 при амплітуді 0,025 В та частоті 15 Гц. У [143] застосовано подібний принцип з каскадом ГлОкс та наноструктурованим електродом, модифікованим комплексом дитіолен-метал-малеонітрилдитіолат $[\text{TBA}]_2[\text{Ni}(\text{mnt})_2]$ у формі нанокубів. Ця конфігурація підвищила редокс-активність та збільшила ефективну робочу площу DPV-електрода. Дослідження [144] поєднало DPV та SWV застосуванням прямокутних імпульсів (500–900 мВ, інтервал 2 мВ, ширина 10 мс) з періодом 20 мс. Детекцію H_2O_2 проводили через 15 хв після додавання реагентів (АЛТ, субстрати, ГлОкс).

1.3.1.2.3 Біосенсиори на основі електрохімічної імпедансної спектроскопії, потенціометрії та фотострумової спектроскопії.

Електрохімічна імпедансна спектроскопія (EIS на рис. 1.2) вимірює зміни імпедансу системи у відповідь на прикладений змінний струм у діапазоні частот. Ці зміни спричинені коливаннями маси та щільності молекулярного шару, що впливає на опір і ємність подвійного електричного шару на поверхні сенсора та швидкість перенесення заряду між сенсором та розчином. У роботі [145] створено АЛТ-біосенсор шляхом іммобілізації АЛТ-зв'язувального пептиду на поверхні сенсора та розчинення електроактивного фероціаніду в буфері для зниження базового імпедансу. Зв'язування АЛТ з пептидом підвищувало локальну щільність розчину, зменшуючи доступ фероціаніду до поверхні електрода та збільшуючи імпеданс. Примітно, що цей біосенсор також демонстрував другий принцип вимірювання за допомогою QCM.

Потенціометричні біосенсиори на основі польових транзисторів (FET на рис. 1.2) детектують зміни потенціалу на поверхні затвору при або при переходів сенсора. Потенціал затвора виникає у відповідь на локальні зміни рН або іонного складу поблизу FET. У роботі [146] розроблено АЛТ-біосенсор з субстратами АЛТ, іммобілізованими на кальцій-альгінатному графеновому FET. Він виявляв локальне підвищення рН, яке відбувалося через те, що піруват та глутамат мали нижчу здатність до депротонування порівняно з аланіном та кетоглутаратом. У роботі [147] зміна рН була результатом реакції між піруватом та іммобілізованим ПОкс, що окиснював фероціанід та змінював локальну концентрацію протонів.

Фотоелектрохімічна спектроскопія (PCS на рис. 1.2) вимірює зміни струму внаслідок освітлення кремнієвих поверхонь (SiO_x/Si), функціоналізованих металами (Au, Gd, Ag, Tb). У біосенсорі [148] продукти реакцій АЛТ та АСТ (піруват або оксалоацетат із зарядженими COO^- групами) змінюють локальний розподіл заряду поблизу поверхні перетворювача. Під час АЛТ-реакції фотострум зростає через зменшення поверхневої рекомбінації, тоді як під час АСТ-реакції – струм знижується. Специфічність

аналізу забезпечували додаванням у розчин субстратів відповідної трансамінази.

1.3.1.3 Масові біосенсиори (кварцовий кристалічний мікробаланс) для детекції трансаміназ. Біосенсиори на основі кварцового кристалічного мікробалансу (QCM на рис. 1.2) відстежують зменшення частоти коливання кварцового кристала при зростанні його маси, яке відбувається внаслідок зв'язування біомолекул з його поверхнею. У роботі [145] цей принцип був успішно застосований для визначення концентрації АЛТ у розчині (Додаток В), де ензим специфічно зв'язувався з пептидом АЛТ5-8, попередньо іммобілізованим на поверхні кристала.

1.3.2 Класифікація АЛТ- та АСТ-чутливих біосенсорів за біоселективним матеріалом. Окрім методу реєстрації сигналів, на конструкцію та функціонування біосенсорів значний вплив має біоселективний елемент (як сам біоматеріал, так і метод іммобілізації цього біоматеріалу) (рис. 1.3, Додаток В). На рис. 1.3 класифіковано всі відомі АЛТ та АСТ чутливі біосенсиори за типом біоселективного елемента. Більшість є ензимними, тоді як неензимні біосенсиори становлять лише близько п'ятої частини всіх розробок. Серед ензимних конструкцій найпоширенішим є ГлОкс (42,24% всіх робіт). Наприклад, він присутній у 50% АСТ біосенсорів і 66,7% систем групи АЛТ/АСТ. Однак ГлОкс рідко використовується для одночасного виявлення АСТ+АЛТ (лише один зареєстрований випадок), оскільки він не може розрізнити джерело утворення глутамату (АСТ чи АЛТ). З цієї причини, багато біосенсорів покладаються на ПОкс (22,41% робіт), оскільки він дозволяє селективно розрізняти сигнал від АЛТ.

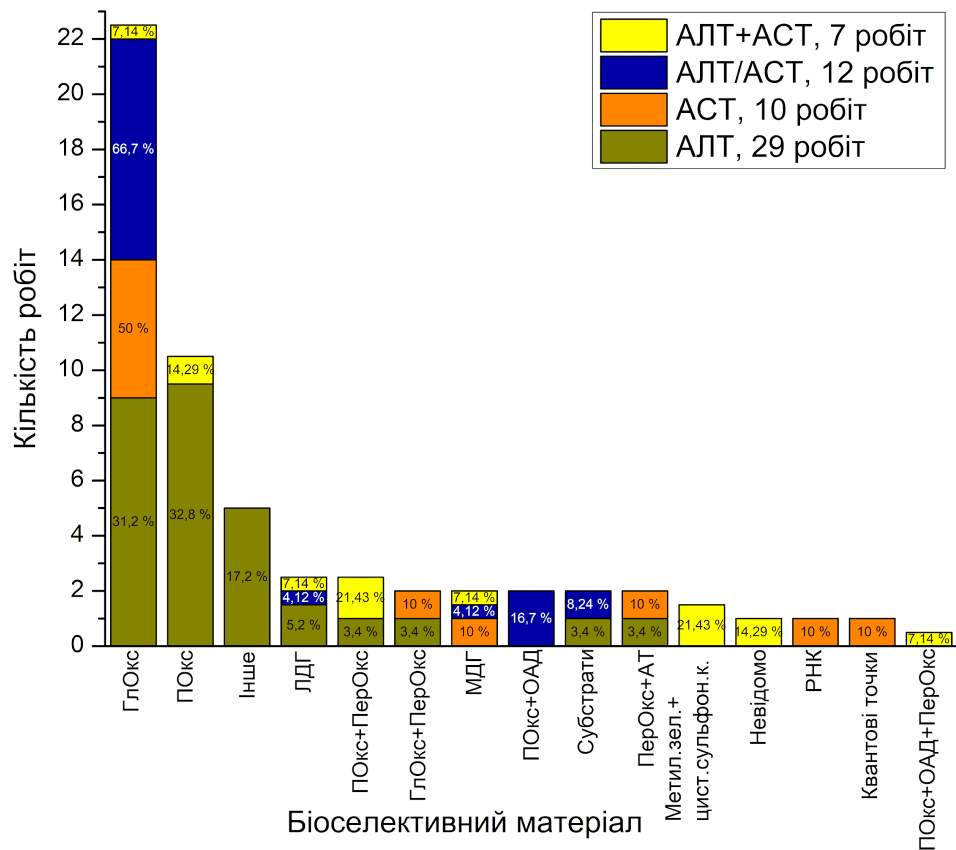
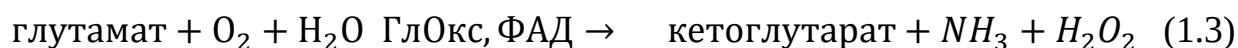


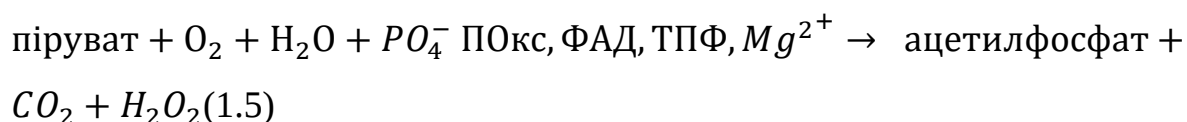
Рис. 2.3. Порівняння вживаності різних біоселективних матеріалів у біосенсорах для вимірювання активності АЛТ та АСТ. ГлОкс – глутаматоксидаза. ПОкс – піруватоксидаза. ПерОкс – пероксидаза хрому. ОАД – оксалоацетатдекарбоксилаза. МДГ – малатдегідрогеназа. ЛДГ – лактатдегідрогеназа. АТ – антитіло. РНК – рибонуклеїнова кислота. Метил.зел.+цист.сульфон.к. – метиленовий зелений та цистеїнсульфонова кислота. Інше – один з 5 варіантів: пептид, молекулярна мітка з лактатдегідрогеназою, пруський синій, тіопронін з люмінолом або 2,4-динітрофенілгідразин

1.3.2.1 Ензимні біосенсиори для визначення активності трансаміназ

1.3.2.1.1 Біосенсиори на основі оксидаз (глутаматоксидаза, піруватоксидаза, оксидаза + люмінол). Як згадувалося раніше, більшість біосенсорів для визначення активності трансаміназ у всіх чотирьох групах (АСТ, АЛТ, АСТ/АЛТ та АСТ+АЛТ) базуються на ензимі глутаматоксидазі (ГлОкс на рис. 1.3) (Додаток В). Популярність ГлОкс для створення біоселективних елементів зумовлена збереженням високої стабільності та селективності ензиму навіть після іммобілізації. Реакція за участі ГлОкс є відносно простою, потребує лише одного часто вбудованого коензиму (ФАД), що спрощує розробку біосенсорів, усуваючи необхідність складної оптимізації реакційного середовища (зокрема, регулювання концентрацій додаткових субстратів і коензимів) та вибору умов іммобілізації складних багатокомпонентних систем. Біосенсиори на основі ГлОкс функціонують через каталізовану реакцію, що продукує H_2O_2 (1.3). Ця електроактивна сполука розкладається при певному потенціалі (що залежить від матеріалу сенсора), вивільняючи електрони (1.4), що протікають через електричний контур та збільшують силу струму. Таким чином, активність трансамінази вимірюють опосередковано через детекцію та розрахунок концентрацій H_2O_2 та глутамату. Оскільки глутамат утворюється обома трансаміназами – АЛТ та АСТ (1.1, 1.2), біосенсиори на основі ГлОкс можуть детектувати будь-який із цих ензимів, але не можуть їх розрізнити або вимірювати одночасно. ГлОкс також використовують в оптичних LSPR-біосенсорах АЛТ [130-131], де зв'язування глутамату з ензимом змінює показник заломлення на поверхні перетворювача. У колориметричному АСТ-біосенсорі [52] утворений за участі ГлОкс H_2O_2 окиснює оптично активний ТМБ.



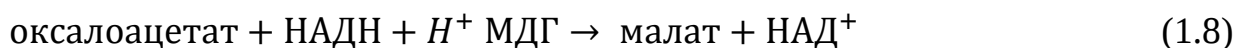
Іншим широко використовуваним ензимом у АЛТ-біосенсорах є піруватоксидаза (ПОкс на рис. 1.3) [94, 107, 112, 119, 122, 140, 142, 147]. ПОкс каталізує реакцію (1.5) та для належного функціонування потребує кількох субстратів (піруват, фосфат-іони) і коензимів (іони магнію, ФАД, тіамінпірофосфат), що збільшує необхідність додаткової оптимізації при розробці біосенсора. Типовий приклад біосенсора на основі ПОкс [119]: АЛТ продукує піруват, що окиснюється ПОкс з утворенням H_2O_2 , який електрохімічно розкладається на поверхні електрода, змінюючи силу струму в електричному контурі. Подібний принцип з варіаціями (матеріал електрода, метод іммобілізації, наявність медіатора, методика електрохімічної детекції) використано в роботах [112, 118-119, 122, 140-141]. У АЛТ-біосенсорі [147] замість утворення H_2O_2 ПОкс окиснював ферроціанід, спричиняючи локальне зміщення рН. У роботі [94] замість H_2O_2 вимірювали споживання O_2 у реакції (1.5). У колориметричному АЛТ-чутливому біосенсорі [52] ПОкс-утворений H_2O_2 окиснював ТМБ, змінюючи його колір з безбарвного на синій.



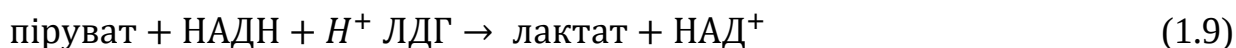
Нарешті, електрохемілюмінесцентні ензимні біосенсори базуються на реактивній формі люмінолу (1.6), що реагує з H_2O_2 , утвореним під час реакцій ГЛОкс (1.3) [107] або ПОкс (1.5) [108]. Ця взаємодія емітує квант світла (1.7), що детектується біосенсором (ГЛОкс, ПОкс на рис. 1.3).



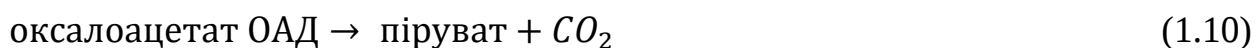
1.3.2.1.2 Біосенсиори на основі дегідрогеназ (малатдегідрогеназа, лактатдегідрогеназа). Існує також група біосенсорів на основі дегідрогеназ для детекції активності АСТ ат АЛТ. Наприклад, для аналізу активності АСТ було розроблено біосенсор в якому оксалоацетат детектували за допомогою малатдегідрогенази [125] (МДГ на рис. 1.3). Оксалоацетат брав участь у НАДН-залежній МДГ-реакції (1.8), знижуючи концентрацію НАДН. Це зменшувало струм внаслідок зниження інтенсивності окиснення НАДН на модифікованому карбоновими нанотрубками та хітозаном електроді [149]. МДГ також використано в оптичному біосенсорі [102], де НАДН окиснював ТМБ у присутності наноензиму у формі MnO_2 -нанокубів.



Лактатдегідрогеназу (ЛДГ, рис. 1.3) аналогічно використано в кількох АЛТ-чутливих біосенсорах з диференціальною імпульсною вольтамперометрією [150], флуоресцентною [105] та оптичною [102] детекцією. Перший працював по згаданому вище принципу з МДГ, але в основі його біоселективного елементу був ЛДГ (1.9). У наступному варіанті, утворення НАД^+ відновлювало флуоресценцію молекулярної мітки (Інше на рис. 1.3). В оптичному сенсорі [54] застосовано класичні колориметричні ЛДГ та МДГ реакції.



1.3.2.1.3 Мультиензимні біосенсиори (піруватоксидаза + оксалоацетатдекарбоксилаза, глутаматоксидаза + пероксидаза хрону, піруватоксидаза + пероксидаза хрону). Мультиензимні біосенситивні системи іноді використовуються для посилення сигналів одного ензиму або для створення каскадів для виявлення молекул, які не реагують безпосередньо з електроактивними речовинами (ПОкс+ОАД, ГлОкс+ПерОкс, ПОкс+ПерОкс на рис. 1.3). Одним із прикладів є біосенсор на основі ПОкс для виявлення АСТ та АЛТ [129]. У ньому використовувалися два електроди: АЛТ-чутливий біосенсор мав три мономолекулярні шари ПОкс, а АСТ-чутливий біосенсор мав два шари ПОкс, покриті шаром оксалоацетатдекарбоксилази (ОАД). ОАД перетворював оксалоацетат в піруват (1.10). Селективність досягалась суворою організацією ензимних шарів: внутрішні ПОкс-шари реагували лише з піруватом, утвореним ОАД-шаром, але не з піруватом у розчині. Ця мультиензимна комбінація ПОкс+ОАД також використовувалася в роботі [137].



Деякі мультиензимні біосенсиори використовують пероксидазу хрону (ПерОкс) у ензиматичних каскадах для зниження робочого потенціалу. У роботах [120,126] зниження потенціалу досягнуто комбінацією ГлОкс-ПерОкс: ПерОкс окиснювався H_2O_2 , потім осмієва мембрана регенерувала ПерОкс, а сама мембрана регенерувалась при потенціалах 50 мВ [120] та 0 В [126] (замість +0,8 В, якби H_2O_2 окиснювався безпосередньо на золоті), що значно покращує селективність біосенсора. Комбінація ПОкс-ПерОкс є типовою як для біосенсорів [51,55-56, 101, теоретично 50], так і для традиційних колориметричних аналізів, демонструючи її універсальність.

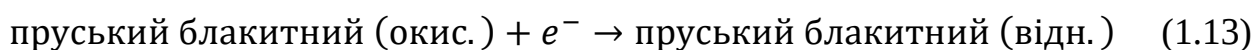
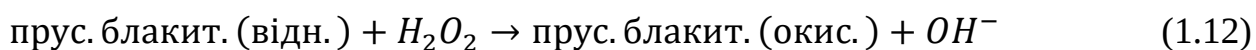
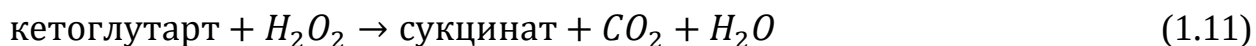
Крім того, ензими часто поєднують з наноензимами з пероксидазною або оксидазною активністю для неензиматичного окиснення ТМБ [52,102] або окиснення H_2O_2 при нижчих потенціалах [119,139,142-143]. Існує також

мультиензимний біосенсор для моніторингу гепатиту В [151], що поєднує АЛТ, ЛДГ та лактатоксидазу для якісної детекції вірусу і теоретично може бути адаптований для електрохімічного визначення АЛТ.

1.3.2.2 Неензимні біосенсори для визначення активності трансаміназ.

Серед проаналізованих публікацій описано кілька неензиматичних біосенсорів. У деяких випадках [146,148] самі субстрати трансамінази служили елементами біорозпізнавання (Субстрати на рис. 1.3). У роботі [146] аланін та кетоглутарат іммобілізували на чутливій ділянці FET. Завдяки активності АЛТ ці субстрати перетворювались на продукти з іншими константами депротонування, змінюючи потенціал затвора на перетворювачі. У роботі [148] іммобілізація не застосовувалась; детекція базувалась на змінах фотогенерованого струму на поверхні фотополімеру через зміну поверхневого заряду внаслідок активності трансамінази.

Інший тип неензиматичних біосенсорних систем передбачає автокаталітичні реакції [55-56,100,115]. Наприклад, для визначення АЛТ у [100] використовували реакцію 2,4-динітрофенілгідразину з піруватом з утворенням жовтого піруватгідразону (Інше на рис. 1.3). Для визначення АСТ у [55-56] глутамат взаємодіяв з метиленовим зеленим, спричиняючи зміну кольору з синього на прозорий (Метил.зел.+цист.сульфон.к. на рис. 1.3). Електрохімічний біосенсор [115] використовував для детекції конкуренцію між пруським блакитним та автокаталітичною реакцією кетоглутарату з доданим H_2O_2 (1.11) (Інше на рис. 1.3). Активність АЛТ знижувала концентрацію кетоглутарату, посилюючи редокс-реакцію між H_2O_2 та пруським блакитним (1.12), що збільшувало споживання електронів та зменшувало силу струму (1.13).



Остання категорія неензиматичних біосенсорів для визначення активності трансаміназ включає системи на основі квантових точок (Квантова точка на рис. 1.3), що змінюють колір флуоресценції у відповідь на активність АСТ [106].

Головною перевагою неензиматичних систем детекції є потенційно вища стабільність при роботі та зберіганні завдяки відсутності біологічного матеріалу в складі селективних елементів. На жаль, жодне з розглянутих досліджень не оцінювало стабільність біосенсорів (Додаток В). Однак загальним недоліком цих систем є обмежена селективність щодо інтерферентів.

1.3.2.3 Біосенсиори для визначення концентрації трансаміназ.

Біосенсиори для вимірювання концентрації трансаміназ (молекула АЛТ і молекула АСТ у Додаток В) існують окремо від попередніх систем аналізу активності трансаміназ. Один з підходів використовує модифікований імуноаналіз (ПерОкс+АТ на рис. 1.3), в якому серія афінних взаємодій на поверхні перетворювача осаджує ПерОкс як ензиматичну мітку. Кількість ПерОкс пропорційна концентрації трансамінази, а детекція відбувається за допомогою електрохімічного [99] або оптичного [105] методу. Інший біосенсор використовує химеру β -лактамази-кальмодуліну (СаМ-ВР), модифіковану для специфічного розпізнавання цитозольної АСТ [103]. Зв'язування аналіту викликає конформаційну зміну в СаМ-ВР, активуючи β -лактамазу, яка розщеплює нітроцефін з утворенням кольорової речовини.

До систем цієї групи також належить люмінесцентний біосенсор [104], в якому тіопронін зв'язується з АЛТ, відновлюючи люмінесценцію люмінолу. Інший біосенсор АЛТ [145] створений на основі пептиду АЛТ5-8 (розроблений за допомогою фагового дисплея M13), здатного до афінного зв'язування АЛТ. Нові біоселективні елементи на основі аптамерів для виявлення АСТ та АЛТ були запропоновані через їх високу афінність,

стабільність та селективність, однак лабораторні прототипи ще не розроблені, тому вони залишаються теоретичними системами [152].

1.3.3 Класифікація біосенсорів за методом іммобілізації біоселективного матеріалу. При розробці біосенсорів для виявлення трансаміназ, іммобілізація біологічного матеріалу на поверхні перетворювача є вирішальним фактором, що впливає на ефективність біосенсорів. Цей процес впливає на молекулярну орієнтацію біологічного матеріалу, третинну структуру, біоселективну проникність мембрани, фоновий шум, дрейф сигналу та інші параметри. Стратегії іммобілізації зазвичай поділяють на ковалентні та нековалентні методи, залежно від природи утворених зв'язків. Аналіз літератури стосовно біосенсорів для детекції АСТ та АЛТ вказує, що ковалентна іммобілізація використовується рідше, ніж нековалентна (32,76% та 48,28% відповідно), але частіше, ніж вільний біоселективний матеріал (18,96%).

Отже, **ковалентне** зшивання передбачає стабільне хімічне зв'язування між компонентами біосенсора або з поверхнею сенсора, що досягається за допомогою:

- *Глутаральдегід* утворює ковалентні зв'язки Шиффа з аміногрупами білків, що є найпоширенішим методом (15,5%) [113-114, 116, 132, 138, 142-143].
- *Інших ковалентних зшиваючих агентів* безпосередньо з поверхнею сенсора (близько 8%): тіол-похідне калікскроуну [141], зв'язування цистеїну із золотом [145], та 1-(3-диметиламінопропіл)-3-етилкарбодіїмід гідрохлорид (каталізує зв'язування аміногруп і карбоксильних груп білків з раніше іммобілізованим N-гідроксисукцинімідом) [104].
- *Силанізація* з APTES (3-амінопропіл)триетоксисилан), що зв'язується етоксигрупами з гідроксигрупами перетворювача, а аміногрупами з біоматеріалами [130, 133, 147] (5%).

- *Кон'югація* (біоматеріал утворює спільні π -молекулярні орбіталі з перетворювачем) [99].
- *Афінні* взаємодії (3%): мембрана Immobilon-AV (гідрофільний фторуглецевий полімер з хімічно обробленою поверхнею для ковалентного зв'язування з білком лізином ϵ -аміногрупами) [135] та біотинил-стрептавідин зв'язування на Dynabeads [103].

Нековалентне зв'язування зазвичай утримує біочутливий матеріал у полімерних мембранах за рахунок фізичного обмеження або залучає адсорбцію на пористих матеріалах:

- *Фотополімери* (7%): полівініловий спирт зі стерил-піридиміновими групами (PVA-SbQ) [121] або PVA-SbQ у поєднанні з глутаральдегідом [131], полігідроксиетилметакрилат [134], полі(етиленгліколь)дигліцидиловий ефір [120] та інші [127].
- *Друк* восковими чорнилами [50,53-56,100, 108] (більше 8%).
- *Полімерні* мембрани, в яких ікапсульовано біоселективний матеріал (10%): мікрокристалічна/ гідрооксиетилцелюлоза [126], альгінатний гель [106,146], агарозний гідрогель [52], електрополімеризований 4-амінофенол [140].
- *Адгезія* на межі двох фаз перетворювач-біоматеріал [110].
- *Адсорбція* (19%) на пористих підкладках, включно з: ацетилцелюлозною мембраною [94], полівінілхлоридом [122,137], нейлоною мембраною [112], еталюваним карбонованим папером [136], нафіоном та переокисненим поліпіролом [117], полі-4-амінофенолом [118], фільтрувальним папером [53,99], папером для хроматографії [100], поліетерсульфоною мембраною [101] та хемісорбцією на 3,3'-дитіобіс(N-гідроксисукцинімідний естер пропіонової кислоти) [129].

Нарешті, в деяких дослідженнях повністю уникнули іммобілізації, натомість використовують **незв'язані** реакційні речовини в аналізованому розчині [51,105,107,115,119,125,128,139,144,150], що становить 18,96% від всіх біосенсорів для детекції АЛТ і АСТ.

1.3.4 Додаткові підходи до поліпшення аналітичних характеристик біосенсорів. В електрохімічних біосенсорах, окрім біочутливого елемента та системи детекції, вирішальне значення має також ефективний транспорт електронів від біоматеріалу в біомембрані до поверхні перетворювача. За механізмом електронного транспорту біосенсиори класифікують на три покоління. Біосенсиори **першого покоління** становлять більшість АЛТ і АСТ чутливих біосенсорів та базуються на пасивній дифузії електроактивних продуктів (наприклад, H_2O_2) з біочутливого шару до перетворювача [94,114-117,121-128, 130-138,140-142,144,146,148,150]. Біосенсиори **другого покоління** містять редокс-медіатори, що розташовуються між біоматеріалом та перетворювачем, переносячи електрони між ними, знижуючи робочий потенціал та покращуючи селективність. У біосенсорів для визначення АЛТ та АСТ серед іммобілізованих медіаторів повідомлено про: *фероценкарбонову кислоту* (за рахунок її використання робочий потенціал знижено до 0,4 В) [113], *метанолфероцен* (0,4 В) [129], *Ir/C* (0,3 В [139], 0,28 В [119]), *4AAP* (0,24 В) [118], *[TBA]_2[Ni(mnt)_2]/нанокуби на золоті* (0,16 В) [143], *2-(4-меркаптобутил)гідрокінон* (0,12 В) [112] та *полі(4-вінілпіридин)* з *Os(2,2'-біпіридином)* (0,0 В) [120]. Біосенсиори **третього покоління** досягають прямого переносу електронів (DET) між біоселективним матеріалом та перетворювачем, дозволяючи роботу при ще нижчих потенціалах та вищу специфічність. Однак для цього біоматеріал повинен бути спеціально модифікован. Зокрема, наразі відомо лише два DET-модифіковані варіанти біоселективного матеріалу, придатного до визначення трансаміназ (ЛДГ [153]). Проте наразі жодного біосенсора третього покоління на їх основі ще не розроблено.

При розробці АЛТ та АСТ біосенсорів перетворювачі та/або самі біосенсиори часто модифікують допоміжними мембранами для покращення аналітичних характеристик, наприклад, чутливості, селективності, стабільності, тощо. **Зовнішні додаткові мембрани** між робочим розчином та

біоселективним елементом виконують кілька функцій: *полікарбонатні* запобігають забрудненню макромолекулами (білками) та бактеріальним атакам, тоді як *Nafion*-мембрани діють як дифузійні бар'єри проти електроактивних інтерферентів (переважно аскорбінової та сечової кислот), мінімізують забруднення сенсора, забезпечують катіонний обмін та блокують аніони [116-117,131,138]. **Внутрішні додаткові мембрани** між біоселективним елементом та перетворювачем переважно запобігають хибнопозитивним сигналам за рахунок блокування електроактивних інтерферентів. Приклади включають *переокиснений поліпірол* [117], *ацетат целюлози* [135] та *поліфенілендіамін* [114, 123-124]. Іноді у розробках одночасно використовують кілька мембран різних функцій. Наприклад, оптичний біосенсор [101] застосовував багатошарову тест-смужку з такою конструкцією: носій, поліетилентерефталат з *нітроцелюлозною* мембраною (забезпечує місце для оптичних реакцій), *полієфірсульфову* мембрану (утримує ензимний розчин), *фільтраційну* мембрану (сепарує кров для отримання плазми), *скловолоконну* мембрану (з більшими порами для фільтрації великих молекул та клітин крові), *гідрофільну сітку* (забезпечує рівномірну дифузію зразка) та кришку.

Крім того, поверхні сенсорів можуть додатково модифікувати **функціональними речовинами** для підвищення продуктивності аналізу. В електрохімічних сенсорах *хітозан* покращує адгезію нанотрубок [125], а *феріціанід калію* активує ензими в біоселективному елементі [107].

Наноматеріали також широко використовують у біосенсорах для визначення АЛТ та АСТ завдяки унікальним оптичним, каталітичним та провідним властивостям:

- *Наночастинки золота (НЧЗ)* [109-110] є ключовими компонентами оптичних SPR-біосенсорів завдяки здатності генерувати плазмон та реагувати на зміни показника заломлення;
- Додаткові наноконкомпозити з *НЧЗ*: *наночастинки оксиду церію* збільшують здатність ензимів до іммобілізації без погіршення оптичних

властивостей $H\dot{C}3$, а внутрішній шар *наночасток дисульфиду молібдену* покращує адгезію наночасток [110];

- Наноензими з оксидажною активністю замінюють ПерОкс в окисненні ТМБ в оптичних системах (*покритий золотом подвійний оксид кобальту та алюмінію* [52], $H-MnO_2$ [102]) або модулюють флуоресценцію люмінолу (*нанолисти MnO_2 гасять синій люмінол через FRET та окиснюють о-фенілендіамін до жовто-флуоресціюючого 2,3-діамінофеназину* [104]);
- В електрохімічних сенсорах оксидазоподібні наноматеріали знижують потенціал окиснення (Ir/C [119, 139], *Graphene@MXene* [142], $[TBA]_2[Ni(mnt)_2]$ *нанокуби* [143]);
- Вуглецеві наноструктури надають численні переваги: *багатостінні вуглецеві нанотрубки* збільшують площу поверхні, забезпечують ковалентне зв'язування медіатора, покращують перенесення електронів, підтримують електрокаталіз [107] та сприяють окисненню НАДН [125]; *оксид графену* в суміші з вуглецевими нанотрубками підтримує іммобілізацію $H\dot{C}3$ для LSPR [134];
- Інші наноструктури – *ієрархічні структури Pt/Au* [138], *Pt наночастинки* [140], *кремнієві нанодроти* [147] та *нанопористий кремній* [133] – також збільшують поверхню та транспорт електронів, а інколи забезпечують ковалентне зв'язування ензимів.

1.4 Підсумки огляду літератури та перспективи на майбутнє

Таким чином, всі розроблені біосенсори для детекції АЛТ і АСТ можна класифікувати відповідно до категорій, наведених на рисунку 1.4. При цьому, незважаючи на прогрес у галузі біосенсорики та клінічну важливість співвідношення АСТ/АЛТ, лише декілька систем дозволяють одночасно вимірювати АСТ+АЛТ. Більшість існуючих розробок або виконують послідовне вимірювання АСТ і АЛТ, або використовують оптичні системи з

декількома зонами вимірювання, що фактично подвоює вимоги до обсягу зразка та собівартості аналізу. Логічним і перспективним напрямком була б система з декількома біосенсорами, що поєднує сенсор на основі глутамат оксидази для виявлення обох трансаміназ з сенсором на основі піруват оксидази для селективного розпізнавання АЛТ, з подальшим математичним розрахунком активності АСТ та коефіцієнта де Рітса. Такі розробки можуть забезпечити більш комплексну оцінку стану пацієнта та поліпшити діагностику захворювань. Однак на сьогоднішній день не повідомлялося про жодну електрохімічну розробку, яка б дозволяла проводити справді одночасне вимірювання активності трансаміназ (АСТ+АЛТ). Це, ймовірно, пов'язано зі складністю збереження різних біоселективних матеріалів у спільному робочому середовищі, запобігання перехресного впливу електрохімічних сигналів та компенсації різної швидкості виснаження біоматеріалу і реакцій на навколишнє середовище.

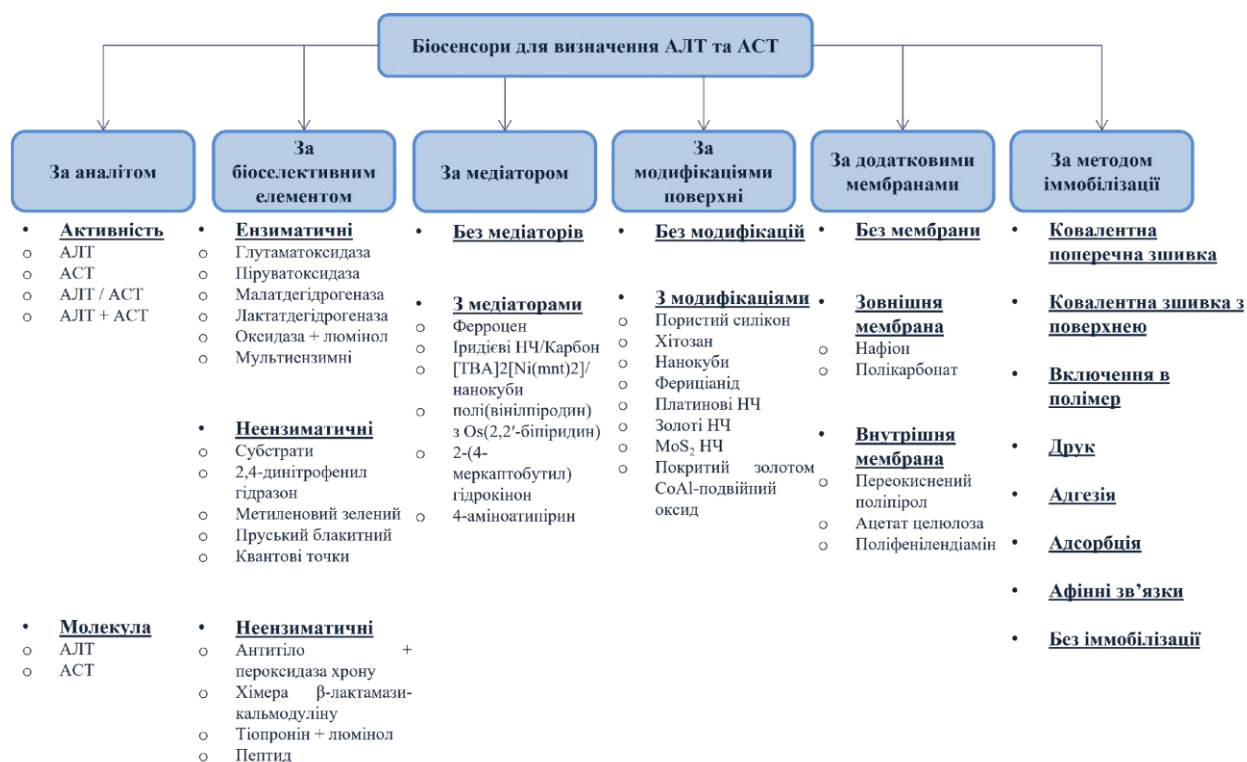


Рис. 1.4. Класифікація біосенсорів для виявлення АЛТ та АСТ

Крім того, незважаючи на активні дослідження, жоден з відомих біосенсорів для визначення АСТ та/або АЛТ ще не досяг рівня впровадження та комерціалізації, що свідчить про наявність суттєвих технічних та економічних бар'єрів. На нашу думку, окрім зазначеного вище підходу по створенню мультибіосенсорної системи, для комерціалізації будь-яких біосенсорів (включно з системами для детекції АСТ та АЛТ), найбільш актуальними є наступні напрямки досліджень:

- **Покращення загальної аналітичної ефективності** [154-155]. Наприклад, зменшення мінімальної межі визначення шляхом підвищення співвідношення сигнал/шум (з використанням більш ефективних детекторів, наноматеріалів, що зменшують шум, та збільшенню навантаження біорозпізнавальних елементів); покращення селективності через застосування біологічних ампліфікаторів сигналу, додаткових біоматеріалів для усунення інтерферентів, вдосконалених мембранних систем, прямого переносу електронів.
- **Створення мультибіосенсорних систем** для одночасного та диференційованого виявлення АСТ, АЛТ, а також інших ензимів або аналітів, зокрема, за рахунок поліпшення просторового розділення реакційних зон за допомогою наноматеріалів та інтеграції мікро-/нанофлюїдних систем (використаних в [116, 122, 132-133], запропонованих в небіосенсорній системі [156]).
- **Розробка нових високоспецифічних елементів розпізнавання** (наприклад, штучних ензимів) для одночасного селективного аналізу обох трансаміназ.
- **Підвищення стабільності вимірювання** в зразках шляхом розробки стабілізуючих покриттів, збільшення допустимого розведення зразку, або використання стратегій проти біофолінгу [157].
- **Інтеграція біосенсорів у портативні системи** для діагностики *in vivo*. Наразі доступні лише два комерційні аналізатори цільної крові з пальця (Alere

Cholestech LDX® [158] та Roche Reflotron Plus [159]) – обидва спектрофотометричні та дорогі.

- **Автоматизація** на основі штучного інтелекту для точного зчитування сигналів, компенсації зовнішніх факторів (температура, pH) та автоматичної інтерпретації результатів з використанням індивідуальних даних пацієнта.
- Застосування **неінвазивних** або мінімально інвазивних методів **відбору проб** (альтернативні біорідини, мікроголкові пластирі [160], пробовідбірники на основі гідрогелю). На сьогоднішній день не повідомлялося про біосенсиори АЛТ або АСТ, які використовують такі підходи до відбору проб.
- Дослідження **інноваційних методів детекції** (фотоелектрична спектроскопія, масові методи).

Відповідно, дана робота зосереджена на створенні першої електрохімічної біосенсорної системи для одночасної та селективної детекції активності АСТ і АЛТ в сироватці крові за допомогою ензимів класу оксидаз та з використанням полімерних покриттів для покращення селективності.

РОЗДІЛ 2

МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ

2.1 Матеріали

В якості аналітів було використано аланінамінотрансферазу (АЛТ) та аспартатамінотрансферазу (АСТ), отримані з серця свині та з активністю 188 одиниць активності на мг білку та 75 одиниць активності на мг білку відповідно, виробник Sigma-Aldrich, США. Субстратами і коензимами трансаміназ виступали: піридоксальфосфат (ПФ) (Sigma-Aldrich, Японія), L-аланін (Sigma-Aldrich, Китай), L-аспартат (Sigma-Aldrich, Німеччина), α -кетоглутарат (α -КТ) Sigma-Aldrich, США.

В якості біорозпізнавальних матеріалів було використано рекомбінантну глутаматоксидазу (ГлОкс) (отриману з *Streptomyces sp.* з активністю 7 одиниць активності на мг білку, виробник Yamasa Corporation, Японія) та піруватоксидазу (ПОкс) (отриману з *Aerococcus viridans* з активністю 35 одиниць активності на мг білку, виробник Sigma-Aldrich, Японія). Субстратами, кофакторами і коензимами були: нітрат магнію, тіамін пірофосфат (ТПФ) (Sigma-Aldrich, США), дигідрофосфат калію (Фі) («ХІМЛАБОРРЕАКТИВ», Україна).

Для перевірки реакції біосенсорів на проміжні аналіти використано: L-глутамат натрію (Sigma-Aldrich, Франція), L-піруват натрію (Sigma-Aldrich, Японія), пероксид водню (ПрАТ Фармацевтична фабрика «Віола», Україна).

Для формування біоселективних мембран було використано: 25% водний розчин глутарового альдегіду (ГА) (Sigma-Aldrich, Німеччина) полівініловий спирт із стерил піридинієвими групами (PVA-SbQ) (Yamasa Corporation, Японія). Додаткові компоненти мембрани включали: бичачий

сироватковий альбумін (фракція V) (BCA), гліцерин, 4-(2-гідроксиетил)піперазин-1-етансульфонова кислота (HEPES), фосфатний буфер (ФБ) (Sigma-Aldrich, США).

Для формування додаткової напівпроникної мембрани було використано м-фенілендіамін (Sigma-Aldrich, Китай).

Перевірка впливу інтерферентів проводилась за допомогою: аскорбінова кислота, валін, серин, лейцин, гістидин, аспарагін, гліцин, треонін, пролін, фенілаланін, триптофан, ацетамінофан, бензойна кислота, сечовина, етилендіамінтетраоцтова кислота (ЕДТА) (Sigma-Aldrich, США); лізин (Sigma-Aldrich, Китай); допамін, тирозин (Sigma-Aldrich, Німеччина); лимонна кислота (Sigma-Aldrich, Австрія); ізолейцин, глютамін (Sigma-Aldrich, Бразилія); аргінін, метіонін (Sigma-Aldrich, Японія); глюкоза (Sigma-Aldrich, Мексика); сечова кислота (Sigma-Aldrich, Швейцарія); цистеїн (Acros, Іспанія).

Зразки сироватки крові людини були придбані в Sigma-Aldrich або отримані від Оксани Маньковської та зібрані в Національному інституті раку України, відділення Пластичної та реконструктивної онкоурології.

Референсні спектрофотометричні вимірювання проводились за допомогою пероксидази хрому (ПерОкс) з активністю 588 одиниць активності на мг білку (Fluka, Швейцарія), 4-аміноантипірину (Sigma-Aldrich, Китай), N-етил-N-(2-гідрокси-3-сульфопропіл)-m-толуїдин (EHSPT) (Sigma-Aldrich, Японія).

Інші неорганічні сполуки, що використовувалися в роботі, зокрема, етиловий спирт, порошок оксиду алюмінію (0,5 та 0,03 мкм), KCl, NaN₃, NaCl, NaOH, CaCl₂ мали ступінь чистоти „х.ч.“ та „ч.д.а.“ (ЛабЛогікГруп, Україна).

2.2 Амперометричні сенсори та прилади

В якості фізичного перетворювача використовувався платиновий дисковий електрод, схема якого наведена на рис. 2.1. Електроди виготовлялись в Інституті молекулярної біології та генетики НАН України. Для виготовлення

такого електроду платиновий дріт (діаметром 0,4 мм) запаювали в скляний капіляр та легкоплавким сплавом Вуда з'єднували його з внутрішнім срібним провідником (діаметром 0,2 мм). Зріз платинового дроту, що контактує з оточуючим середовищем є робочою поверхнею з загальною площею 0,126 мм². Епоксидною смолою герметизувався протилежний від робочої зони кінець скляної трубки та приєднувався контактний майданчик для підключення електроду до вимірювальної системи. Робочу зону перед першим використанням та періодично в подальшому використанні механічно обробляли за допомогою шліфувального паперу (зернистість 300-2500) та пасти з порошку оксиду алюмінію різного діаметру (0,3 та 0,05 мкм). Очищення робочої поверхні спиртовим розчином та промивка дистильованою водою здійснювалося перед кожним нанесенням біоселективного елементу.

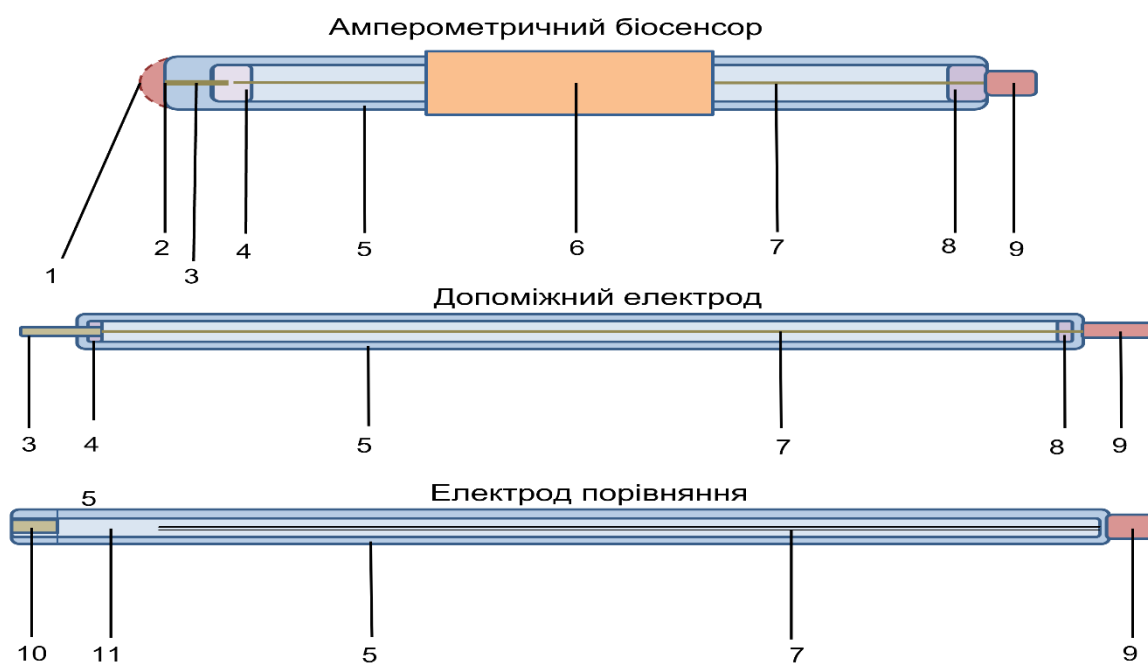


Рис. 2.1. Схематичне зображення амперометричного електроду на основі платинового дроту діаметром 0,4 мм: 1 – біоселективний елемент; 2 – робоча поверхня; 3 – платиновий дріт; 4 – електричне з'єднання за допомогою легкоплавкого сплаву Вуда; 5 - скляний корпус електроду; 6 – пластиковий чохол; 7 – внутрішній срібний провідник 8 – епоксидна смола; 9 – контактна площа стандартного типу; 10 – напівпроникна мембрана; 11 – внутрішній розчин електроду (3 мМ KCl)

В ході експерименту використовувалася триелектродна схема амперометричного аналізу (схематичне зображення приведено на рис. 2.2), яка включала: робочий сенсор (платиновий дисковий електрод), допоміжний платиновий електрод та хлор-срібний (Ag/AgCl) електрод порівняння. На робочий сенсор наносилась біоселективна мембрана і на його поверхні відбувалися цільові процеси, а саме він слугував анодом, на поверхні якого окиснювався пероксид водню. Допоміжний електрод необхідний для замикання електричного кола у якості катоду; він має значно більшу робочу поверхню, на якій під дією прикладеної напруги відбувається процес відновлення речовин в робочому розчині, за величиною еквівалентний процесу окиснення на робочому електроді. Електрод порівняння характеризується постійним оновленням поверхні, що запобігає накопиченню речовин, здатних змінювати його потенціал, унаслідок чого він виконує роль номінального нуля, відносно якого визначається коректне значення потенціалу, прикладеного до робочого електрода. Всі електроди підключались до 8-канального PalmSens мультиплексора (який давав можливість проводити вимірювання одночасно на 8 робочих електродах) та потенціостату PalmSens (Palm Instruments BV, Нідерланди). Відстань між всіма електродами була однаковою і складала близько 5 мм.

Всі вимірювання проводились за кімнатної температури у 25 мМ HEPES буфері, рН 7,4, за постійного потенціалу +0,6 В відносно Ag/AgCl електрода порівняння, якщо не вказано інше.

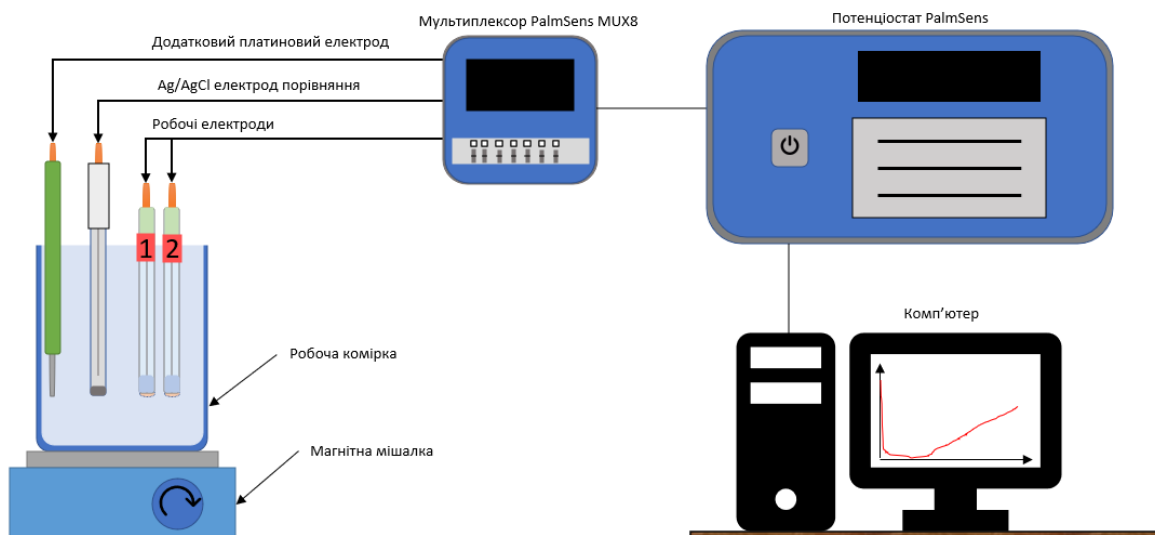


Рис. 2.2. Схема експериментальної установки для амперометричних вимірювань

2.3 Формування додаткових напівпроникних мембран на основі ПФД

Покращення селективності амперометричних сенсорів до проміжного аналіту, пероксиду водню, досягалось шляхом застосування додаткової напівпроникної мембрани на основі м-фенілендіаміну, яка формувала сіткоподібну структуру, яка ускладнювала доступ великих електроактивних молекул до поверхні електроду. Для формування цієї мембрани відшліфовані та очищені за допомогою спирту електроди по черзі занурюють в захищену від світла комірку з 4 мМ розчином м-фенілендіамін в 5 мМ ФБ та електрополімеризують методом циклічної вольтаметрії (0-1000 мВ, 50 мВ/сек). Робиться 10-20 циклів, допоки вольтамперограми майже не будуть відрізнятися одна від одної, що свідчить про повне покриття поверхні електрода шаром полі(м-фенілендіаміну) (ПФД). Після цього електроди відмивались від незв'язаних молекул полімеру в робочому буфері протягом 10 хвилин.

2.4 Процедура дослідження морфології поверхні електродів методом скануючої електронної мікроскопії

Морфологію поверхні платинових електродів на різних етапах модифікації досліджували методом скануючої електронної мікроскопії (СЕМ) з використанням мікроскопа JSM-35 (JEOL, Японія). Дослідження проводили для немодифікованих платинових електродів, електродів з нанесеною напівпроникною ПФД мембраною, а також електродів з іммобілізованими ензимами. Отримані СЕМ-мікрофотографії використовували для якісної та напівкількісної оцінки однорідності розподілу ПФД мембрани по поверхні електрода, структури та товщини мембранного покриття.

Підготовка зразків. Перед СЕМ-аналізом модифіковані електроди висушували при кімнатній температурі протягом 24 годин у темному приміщенні для видалення залишків вологи та стабілізації поверхневих структур. Немодифіковані платинові електроди використовували безпосередньо після стандартної процедури очищення (механічне полірування оксидом алюмінію, промивання дистильованою водою, висушування на повітрі за кімнатної температури).

Умови зйомки. Зображення отримували при прискорювальній напрузі 25 кеВ (стандартний режим) або при знижених напругах 4 кеВ та 10 кеВ для детального аналізу поверхневої структури мембран. Використання різних енергій електронного пучка дозволяло варіювати глибину проникнення електронів та оптимізувати контрастність зображення для різних типів покриттів.

Геометрія зйомки. Для кожного зразка проводили дві серії знімків у різних геометричних конфігураціях:

- кут нахилу 0° — поверхня зразка розташована перпендикулярно до напрямку електронного зонду, що забезпечувало отримання фронтальних зображень з максимальною роздільною здатністю деталей поверхні;

- кут нахилу 60° — зразок нахилений на 60° від перпендикулярного розташування відносно електронного пучка, що дозволяло візуалізувати профіль та товщину нанесених покриттів, а також оцінити рельєф поверхні.

2.5 Формування біоселективного елементу на основі ГлОкс

Біоселективний елемент на основі ГлОкс був сформований шляхом іммобілізації ензиму за допомогою ковалентної поперечної зшивки безпосередньо на поверхні електроду. В якості зшиваючого агента було використано ГА. Комерційний ліофілізований ензим перед роботою був підготовлений у вигляді гелю, який містив 8% ГлОкс (близько 0,56 одиниць активності на мкл), 4% БСА та 10% гліцерину у 100 мМ ФБ, рН 6,5. Гліцерин був необхідний для стабілізації ензиму, сповільнення висихання гелю, покращення адгезії мембрани та її еластичності. БСА виконував функцію інертного білку, який забезпечував додаткові сайти зв'язування для ГА та сприяв рівномірності та щільності утвореної сітчастої тривимірної структури.

Для формування біоселективного елементу ензимний гель безпосередньо перед нанесення змішували з водним розчином ГА (0,5%) в співвідношенні 1:2. Отриману суміш об'ємом 40-50 нл одразу наносили на робочу поверхню електроду і висушували на повітрі за кімнатної температури (25°C) протягом 35 хвилин. Далі біосенсор відмивали від незв'язаних компонентів біоселективної мембрани в робочому буфері (20 мМ HEPES, рН 7,4) протягом 10 хвилин, з триразовою зміною буферу.

2.6 Формування біоселективного елементу на основі ПОкс

Біоселективний елемент на основі ПОкс був сформований шляхом фізичної іммобілізації ензиму за допомогою включення в полімер в ході фотополімеризації. В якості фотополімеру було використано PVA-SbQ.

Комерційний ліофілізований ензим перед роботою був розчинений буферним розчином для формування гелю, який містив 4,86 одиниць активності на мкл ПОкс (близько 13,9 %), 5% БСА та 10% гліцерину у 25 мМ HEPES, pH 7,4. Гліцерин виконував таку саму роль, як і в мембрані на основі ГлОкс. БСА використовувався для підвищення щільності мембрани та зменшення вимивання ензиму з неї під час експлуатації сенсора.

Для формування біоселективного елементу ензимний гель безпосередньо перед нанесення змішували з водним розчином (19,8%) в співвідношенні 1:2, таким чином суміш містила 1,62 одиниць активності на мкл ПОкс, 16,7 г/л БСА, 33,3 г/л гліцерину та 13,2 г/л PVA-SbQ. Отриману суміш об'ємом 150 нл на кожен електрод одразу наносили на робочу поверхню і полімеризували у УФ лампі (365 нм, потужність 40 Вт, Vilber, Китай) за кімнатної температури (25°C) до досягнення опромінення в 2,4 Дж (близько 8 хвилин). Далі біосенсор відмивали від незв'язаних компонентів біоселективної мембрани в робочому буфері (25 мМ HEPES, pH 7,4) протягом 10 хвилин, з триразовою зміною буферу.

Альтернативні методи формування біоселективного елементу на основі ПОкс включали:

- в краплі ГА 0,5% (співвідношення ензимний гель:ГА становило 1:2) при кімнатній температурі протягом 15-30 хвилин та при 4 °C протягом 2-6 годин;
- в насичених парах ГА (об'єм ензимного гелю на один сенсор становив 50-70 нл) в ексикаторі протягом 10-25 хвилин при кімнатній температурі.

2.7 Методика біосенсорного вимірювання АЛТ та АСТ

Вимірювання проводилися за кімнатної температури у відкритій комірці об'ємом 2 мл, при постійному перемішуванні та постійному потенціалі +600 мВ відносно Ag/AgCl електрода порівняння, що відповідає потенціалу

окиснення пероксиду водню H_2O_2 на платиновому аноді. Робочим буфером слугував 20/25 мМ HEPES, pH 7,4. Концентрація реагентів в коміріці задавалась додаванням аліквот концентрованих розчинів. Черговість внесення реагентів в комірку була стандартизована у наступному порядку: Fe^{2+} , ТПФ, Mg^{2+} , аланін, аспартат, α -КТ, ПФ. Аналіт (трансаміназа або зразок) вносився в комірку після стабілізації базової лінії для зменшення похибки вимірювання.

Усі дослідження проводились щонайменше у 3 повторях, а дані, наведені в роботі, є середнім значенням. Всі розрахунки проводились в програмі OriginLab (версії OriginPro 8.5 та OriginPro 2024).

Вміст трансаміназ в робочій коміріці розраховувався в одиницях активності на літр (Од.акт./л). За умови максимального завантаження всіх молекул ензиму (для цього необхідне уникнення лімітування реакції внаслідок нестачі субстратів) реакція протікає безперервно, а концентрація продуктів в розчині лінійно зростає. Зростання концентрації продуктів трансаміназ спричиняє зростання навантаження біоселективного елементу, що спричиняє зростання швидкості утворення електроактивного продукту (H_2O_2). Взаємодія електроактивного продукту з електродом спричиняє зростання сили струму в системі. Таким чином, вміст трансаміназ в розчині та швидкість зростання сили струму пропорційні одна одній у деякому діапазоні. Відповідно, в якості відгуку біосенсора взято різницю значень сили струму протягом 60 сек (нА/хв).

2.8 Підготовка зразків сироватки крові для біосенсорного аналізу

Оскільки дана система призначена для визначення як нормального 15-35 Од.акт./л АЛТ або АСТ, так і патологічного (більше 2000 Од.акт./л як АЛТ, так і АСТ) рівня трансаміназ у сироватці крові, необхідно було перевірити роботу біосенсора у зазначеному діапазоні концентрацій. Придбана сироватка містила нормальний вміст трансаміназ, відповідно, необхідно було штучно підвищити вміст трансаміназ в умовах лабораторії, що і було виконано.

Попередня пробопідготовка зразків не є обов'язковою для практичного застосування розробленого біосенсора. Штучне підвищення активності трансаміназ у сироватці крові виконувалося лише у зв'язку з відсутністю зразків із патологічно підвищеними значеннями АЛТ та АСТ і використовувалося з метою підтвердження принципової можливості роботи біосенсора з такими зразками.

2.9 Методика біосенсорного вимірювання вмісту трансаміназ у сироватці крові

Під час роботи з біологічними зразками об'єм робочої комірки становив 1 мл. Розведення зразку під час аналізу становило 1:9, відповідно на одне вимірювання необхідно було 100 мкл сироватки. Процедура біосенсорного аналізу зразків сироватки крові була наступна:

- біосенсор занурювали у вимірювальну комірку з робочим буфером, вносили всі необхідні субстрати та очікували стабілізації базової лінії;
- у комірку вносили аліквоту зразку та кожні 100 секунд послідовно вводили 3 аліквоти модельного розчину трансамінази. Таким чином, було отримано 4 відгуки біосенсора у вигляді $\Delta nA/xv$.

Було використано два методи обрахунку вмісту трансаміназ у зразках:

- за допомогою калібрувальної кривої (рис. 2.3а): лінійна ділянка попередньо отриманої калібрувальної кривої залежності величини відгуку біосенсора від вмісту трансамінази описувалася рівнянням прямої, потім у це рівняння підставлялась величина відгуку біосенсора на зразок і розраховувався вміст трансамінази у робочій комірці.
- за допомогою методу стандартних додавань (рис. 2.3б): з 4 отриманих в ході експерименту відгуків біосенсора будувався графік, де 1 точка – реакція біосенсора на зразок сироватки крові з

вмістом трансамінази, прирівняним до нуля, а 2, 3 та 4 точки – реакції біосенсора на модельну трансаміназу. Отримані дані екстраполювались для встановлення значення точки перетину побудованої лінії з віссю абсцис. Дана точка відповідає вмісту трансамінази у робочій комірці.

Отримане значення множилось на 10 для обрахунку вмісту трансамінази в зразку з урахуванням розведення. Обидва методи було порівняно між собою та з відомим доданим вмістом трансаміназ для визначення оптимального методу обрахунку.

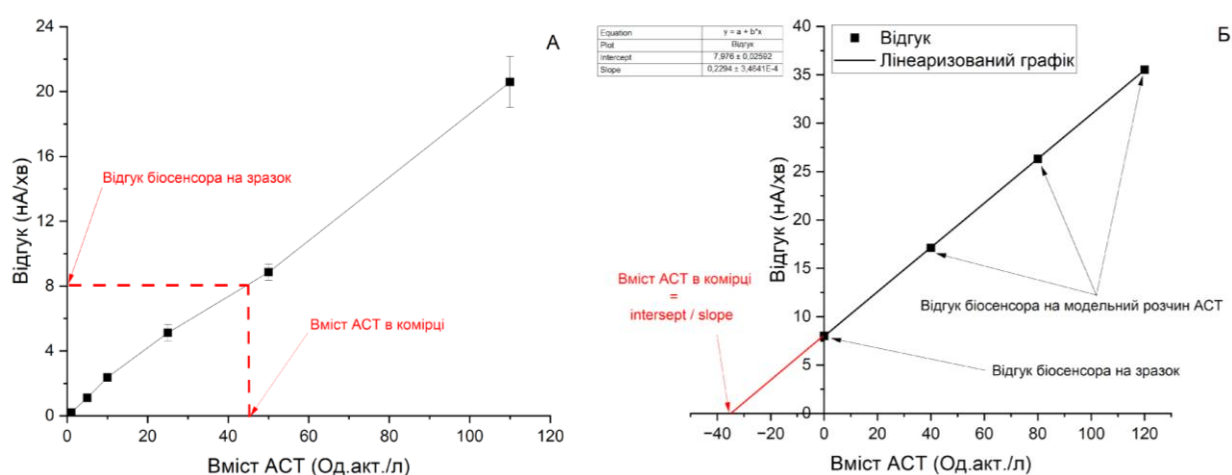


Рис. 2.3. Принцип обрахунку вмісту трансаміназ в зразку за допомогою калібрувальної кривої (а) та методу стандартних додавань (б) на прикладі біосенсора для вимірювання АСТ

2.10 Методика спектрофотометричного вимірювання вмісту трансаміназ у сироватці крові

Референсні вимірювання вмісту трансаміназ в сироватці крові було виконано за допомогою спектрофотометрії. Вимірювання проводилися на спектрофотометрі SPECORD 50 PLUS виробництва Analytik Jena (Німеччина) в одноразових кюветах Plastibrand® (Німеччина) об'ємом 1 мл при кімнатній температурі в робочому буфері (25 мМ HEPES, pH 7,4). Для одного аналізу потрібно було 300 мкл сироватки: 100 мкл для контрольного вимірювання

оптичної густини, 100 мкл для вимірювання активності АСТ та 100 мкл для вимірювання активності АЛТ.

Принцип детекції базувався на каскаді ензиматичних реакцій за участю ГлОкс, ПерОкс та хіноімінового барвника і був наступним:

- Відповідна трансаміназа (АЛТ рис. 2.4.1а чи АСТ рис. 2.4.1б) в присутності відповідних субстратів каталізує реакцію трансамінування, що призводить до утворення глутамату;
- глутамат окиснюється ГлОкс з утворенням перекису водню (рис. 2.4.2);
- пероксид водню бере участь у реакції ПерОкс;
- ПерОкс каталізує реакцію конденсації між ЕНСРТ та 4-аміноантипірином, що призводить до утворення хіноімінового барвника (рис. 2.4.3);
- хіноіміновий барвник інтенсивно поглинає світло з максимумом поглинання при 552 нм (коефіцієнт поглинання 36,88 Ф/мкМ [161]).

Таким чином, швидкість утворення барвника корелює з вмістом трансамінази. Вміст трансамінази визначався за зміною оптичної густини з часом (Δ одиниця оптичної густини/хв) при максимумі поглинання барвника 552 нм.

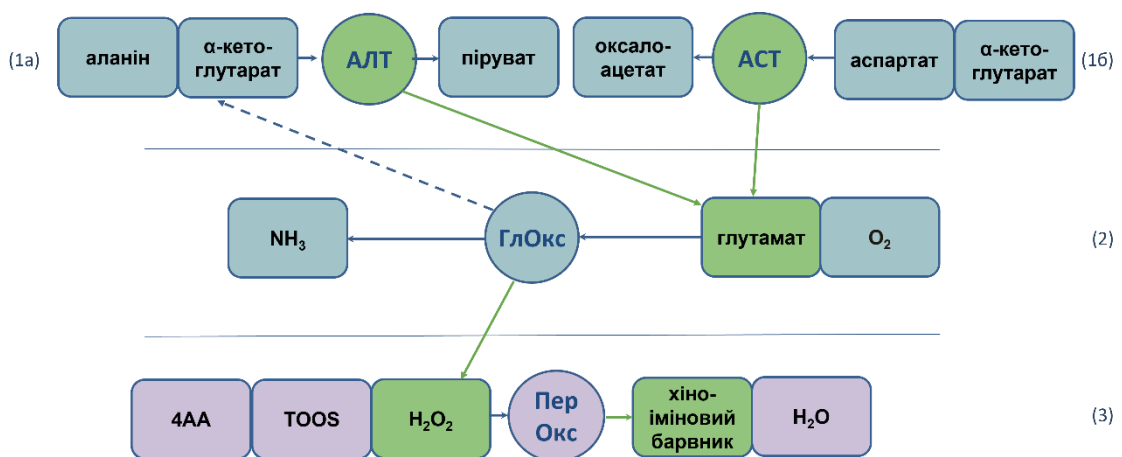


Рис. 2.4. Каскади ензиматичних реакцій, що лежать в основі спектрофотометричного визначення АСТ та АЛТ. Зелений колір позначає аналіт та проміжні аналіти

Процедура вимірювання була наступна:

- для вимірювання активності АСТ готувався свіжий робочий розчин з реагентами в таких концентраціях, щоб після внесення зразку кінцевий вміст реагентів у кюветі становив 8 мМ аспартату, 2 мМ α -КГ, 0,25 Од.акт./мл ГлОкс, 2420 Од.акт./мл ПерОкс, 0,66 мМ EHSPТ, 0,48 мМ 4-аміноантипірину. Для вимірювання активності АЛТ замість аспартату додавали 100 мМ аланіну, всі інші реагенти були в такій самій концентрації.
- 100 мкл зразка змішували з 900 мкл робочого розчину з реагентами;
- зміни оптичної густини зразка вимірювали через різницю оптичної густини через 15 та 16 хвилин після змішування, що дозволяло збільшити концентрацію барвника до мінімальної межі визначення приладу та виходу всіх реакцій на стаціонарну (лінійну) фазу. Відгук реєстрували у вигляді Δ оптичної густини за хвилину.

Для розрахунку активності ензиму в кюветі, отриманий відгук підставляли в рівняння прямої, що описувало попередньо отриману калібрувальну криву залежності зміни оптичної густини від вмісту трансамінази в кюветі. Розраховане значення множилось на 10 для обрахунку вмісту трансамінази в зразку з урахуванням розведення.

Виміряні значення вмісту трансаміназ в зразках були порівняні з біосенсорними вимірюваннями та отримано коефіцієнти кореляції.

РОЗДІЛ 3

РЕЗУЛЬТАТИ І ОБГОВОРЕННЯ

3.1 Принцип функціонування біосенсорної системи

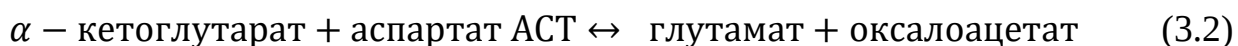
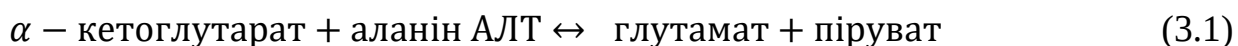
3.1.1 Аналіз ензиматичних та фізико-хімічних реакцій, що лежать в основі функціонування біосенсорної системи. На першому етапі розробки біосенсорної системи необхідно було проаналізувати наявні методи біосенсорної детекції, оцінити їх переваги та недоліки стосовно поставленої задачі, визначити можливі комбінації біоселективних матеріалів та обрати найбільш вдалі комбінації для створення дизайну біосенсорної системи для селективного та чутливого визначення активності АСТ і АЛТ.

Біосенсорні технології фундаментально діляться на 2 категорії за принципом детекції – оптичні та електрохімічні. Оптичні біосенсиори (колориметричні, флуориметричні, на основі поверхневого плазмонного резонансу), незважаючи на високу чутливість та можливість візуалізації результатів, мають суттєві обмеження для клінічного застосування: вимагають стандартизованих умов детекції (контрольоване освітлення, термостатування), додаткових хромогенних або флуорогенних реагентів, чутливі до оптичних властивостей зразка (каламутність, гемоліз, ліпемія), мають одноразові чутливі елементи.

Електрохімічні біосенсиори позбавлені цих недоліків: вони не залежать від оптичних характеристик проби, легко мініатюризуються, мають низьку собівартість виготовлення тощо. Проте різні електрохімічні підходи також не позбавлені своїх недоліків, зокрема потенціометрія характеризується високою чутливістю до флуктуацій іонної сили та рН зразка. Електрохімічна імпедансна спектроскопія потребує складної математичної обробки та

високочастотного обладнання, що ускладнює створення простих діагностичних систем. Вольтамперометричні методи забезпечують детальну інформацію про електродні процеси, але вимагають сканування потенціалу, що збільшує час аналізу (3–10 хв) та ризик деградації біоселективного елемента. Амперометрія виявилася оптимальним вибором, незважаючи на її чутливість до електроактивних інтерферентів, присутніх у біологічних зразках. Метод забезпечує простоту апаратного оформлення, швидкісний відгук, вимірювання в реальному часі без інкубаційного періоду та можливість створення багатоканальних систем. Саме амперометрична детекція була покладена в основу розробленої біосенсорної системи для одночасного визначення АСТ та АЛТ.

Відомо, що для реєстрації біохімічних процесів за допомогою амперометрії необхідна зміна концентрації певної електроактивної речовини в ході цих процесів або протікання окисно-відновних реакцій. Проте процес трансамінації, каталізований АЛТ (3.1) і АСТ (3.2), не залучає жодної речовини з сильними електрохімічними властивостями. Відповідно, для успішної амперометричної детекції активності трансаміназ було вирішено використати додаткову ензим-каталізовану реакцію окиснення одного з учасників реакції АЛТ та АСТ.



Наприклад, аспартат (субстрат АСТ) окиснюється ензимом L-амінооксидаза, проте даний ензим доволі неспецифічний і може окиснювати ряд інших амінокислот, зокрема і аланін (субстрат АЛТ) [162]. Через це L-амінооксидаза не використовується при виборі конфігурації біосенсорів. α -кетоглутарат (субстрат обох трансаміназ, α -КГ) слугує субстратом для окисного декарбоксилювання великим мультиензимним мітохондріальним комплексом [163], який також важко використати в практичній біосенсориці

через його складність. Піруват (продукт АЛТ) окиснюється піруватоксидазою (ПОкс) з утворення електроактивного пероксиду водню, що можна легко зареєструвати амперометрично. Оксалоацетат (продукт АСТ) може бути залучений в реакцію малатдегідрогенази та електроактивного НАДН. Водночас, використання малатдегідрогенази для визначення активності АСТ ускладнюється необхідністю диференціації сигналу від фонові активності присутніх у сироватці крові ендogenous дегідрогеназ, що знижує специфічність детекції. Крім того, оксалоацетат також можна перетворити в піруват за допомогою оксалоацетатдекарбоксилази з подальшим окисненням за допомогою піруватоксидази, проте мультиензимні біосенсиори зазвичай характеризуються зміною кінетики реакції та значним сповільненням сигналу. Зрештою, глутамат окиснюється глутаматоксидазою (ГлОкс) також з утворенням пероксиду водню, що також легко реєструється амперометрично.

Відповідно, в даній роботі було вирішено зосередитись на ензиматичних системах, що є найбільш перспективними для амперометричної детекції, а саме ГлОкс та ПОкс, які продукують легкодетектований амперометрично перекис водню. Біоселективний елемент на основі ГлОкс дозволить вимірювання обох трансаміназ, а біоселективний елемент на основі ПОкс забезпечить альтернативну і диференційну детекцію АЛТ. Таким чином в основі роботи запропонованої біосенсорної системи лежатиме два каскади реакції, кожен з яких має 3 етапи (рис. 3.1):

1. У робочому буфері вільно плаваючі трансамінази послідовно каталізують реакції дезамінування аспартату/аланіну та амінування α -КГ, що призводить до утворення оксалоацетату/пірувату та глутамату відповідно;

2. У ензиматичній мембрані біосенсора (на чутливій ділянці амперометричного перетворювача) утворений глутамат/піруват окиснюється іммобілізованою глутаматоксидазою/піруватоксидазою;

3. Безпосередньо на поверхні платиногового диска відбувається анодний розпад пероксиду водню (продукт біоселективного елемента) під дією

прикладеного потенціалу з утворенням електронів, що призводить до зміни сили струму, яку, в свою чергу, реєструється амперометрично.

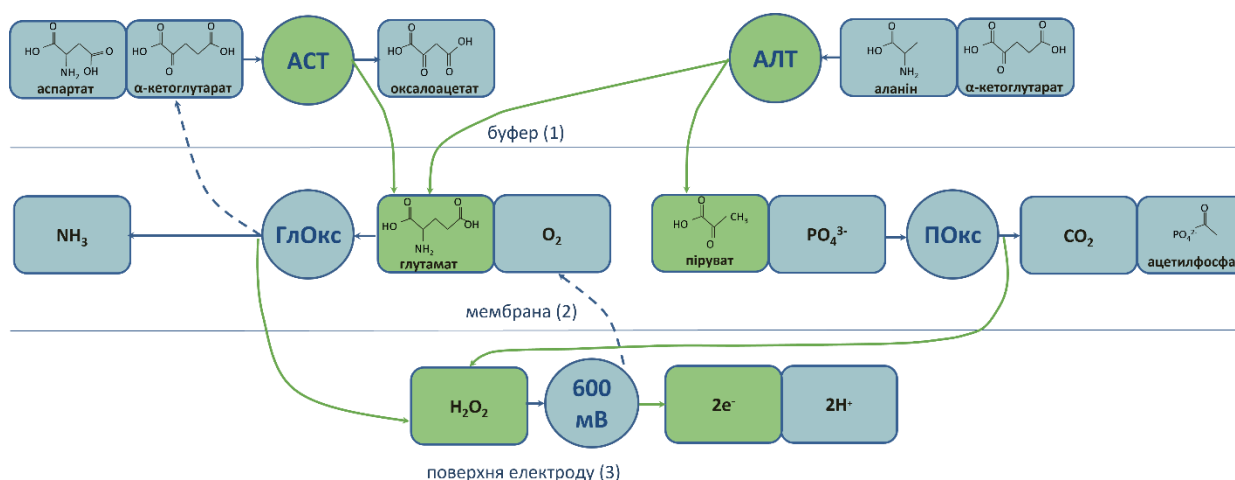


Рис. 3.1. Каскад ензиматичних та електрохімічних реакцій, що лежать в основі функціонування біосенсорної системи для визначення АСТ і АЛТ. Зелений колір позначає аналіт та проміжні аналіти

Таким чином, в результаті безперервної роботи трансаміназ відбувається постійне формування проміжного аналіту (глутамату/пірувату) в робочому розчині. Внаслідок пасивної дифузії в запропонованій біосенсорній системі біоселективний елемент не в змозі окиснювати проміжний аналіт з тою ж швидкістю, з якою трансаміназа його виробляє, відповідно, спостерігається лінійне зростання концентрації глутамату/пірувату в робочому розчині. При підвищенні концентрації проміжного аналіту в робочому розчині спостерігається більш активний каталізаційний процес в біоселективній мембрані, відповідно, більш активне продукування електроактивного проміжного аналіту. Більш активне продукування проміжного аналіту корелює з вищою силою струму в системі. Таким чином, отриманий сигнал виглядатиме як поступове лінійне зростання сили струму з часом, при чому швидкість цього зростання прямо корелюватиме з вмістом трансамінази в аналізованому розчині (рис. 3.2). Відповідно, в якості відгуку біосенсорної

системи використовуватиметься швидкість зростання сили струму за одиницю часу ($\Delta I/\text{хв}$).

Під час проведення типового експерименту передбачалась наступна процедура: під'єднували біосенсор до амперометричної системи вимірювання, очікували стабілізації базової лінії біосенсора, потім у вимірювальну комірку додавали аліквоти субстратів та кофакторів трансаміназ (аспартату, аланіну, піридоксальфосфату та α -КГ) та іммобілізованих ензимів в складі біоселективного елементу (йони фосфату, магнію, тіамінпірофосфату), очікували стабілізації базової лінії, а потім вносили аліквоту трансамінази. Після введення ензиму спостерігалось збільшення сили струму в системі. Для підвищення точності отриманих результатів використовувалась математична лінеаризація сигналу в обраному часовому діапазоні.

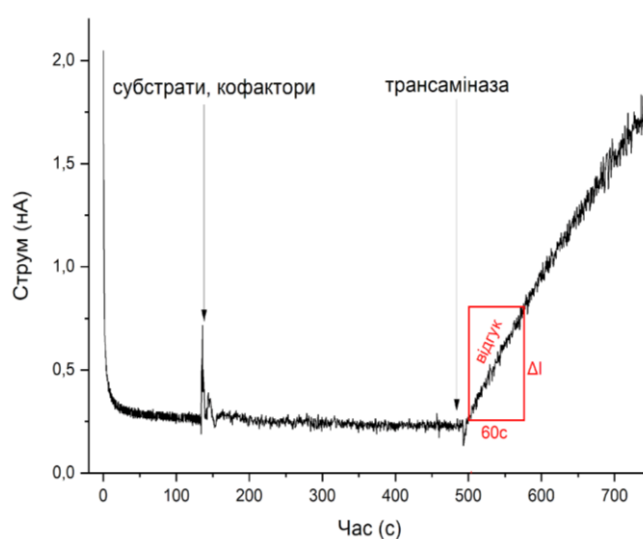


Рис. 3.2. Типова реакція біосенсора на введення трансамінази у вимірювальну комірку

3.1.2 Покращення характеристик амперометричних сенсорів. Під час амперометричних вимірювань зміни струму відбуваються внаслідок окиснення або відновлення речовини на електроді під дією прикладеного потенціалу. Оптимальний потенціал повинен бути достатнім для каталізу цільової реакції, проте достатньо низьким для уникнення неселективних відгуків, поверхневого забруднення електрода оксидами та формування радикалів [164-165]. Методом циклічної вольтамперометрії встановлено оптимальний потенціал окиснення H_2O_2 на платиновому електроді відносно хлорсрібного електрода порівняння: +0,6В. За цього потенціалу отримано калібрувальну криву з межею детекції 0,77 мкМ H_2O_2 та лінійним діапазоном 0,77-2000 мкМ. Відтворюваність відгуків на 100 мкМ H_2O_2 (n=10) становила RSD = 1,96%, що підтверджує придатність системи для створення ензимного біосенсора.

Підібраний робочий потенціал в +0,6В є відносно високим і спричиняє окиснення великої кількості різноманітних електроактивних речовин, наявних в розчині. Особливо це суттєво при роботі з зразками сироватки крові, оскільки там містяться інтерференти, які спричинятимуть хибнопозитивний відгук. Такими речовинами зокрема є сечова кислота, ряд амінокислот, аскорбінова кислота, лимонна кислота, лактат і т.д. З метою уникнення неспецифічних реакцій було використано додаткову напівпроникну ПФД мембрану, яка покращувала селективність амперометричного електрода до пероксиду водню. Фенілендіамін – це ароматична діамінова сполука, яка в полімеризованому стані утворює тривимірну нанорозмірну сітчасту структуру. Ця структура фізично блокує доступ великих молекул до поверхні електрода, відповідно, вони не досягають зони напруженості електричного поля і не окиснюються під його дією. На відміну від великих молекул, пероксид водню вільно потрапляє до зарядженої поверхні електрода, оскільки пори сформованої мембрани мають достатній розмір для його дифузії.

ПФД мембрана була сформована шляхом електрополімеризації мономерів м-фенілендіаміну безпосередньо на поверхні електрода. Процес

електрополімеризації протікає внаслідок циклічної зміни потенціалів методом циклічної вольтамперометрії. Циклічна зміна потенціалів дозволяє забезпечити рівномірність формування плівки та контролювання її товщини. Ідентичність вольтамперограм слугує ознакою, що поверхня вже рівномірно вкрита мембраною і додаткове нарощування полімеру не змінює характеристик електроду (рис. 3.3).

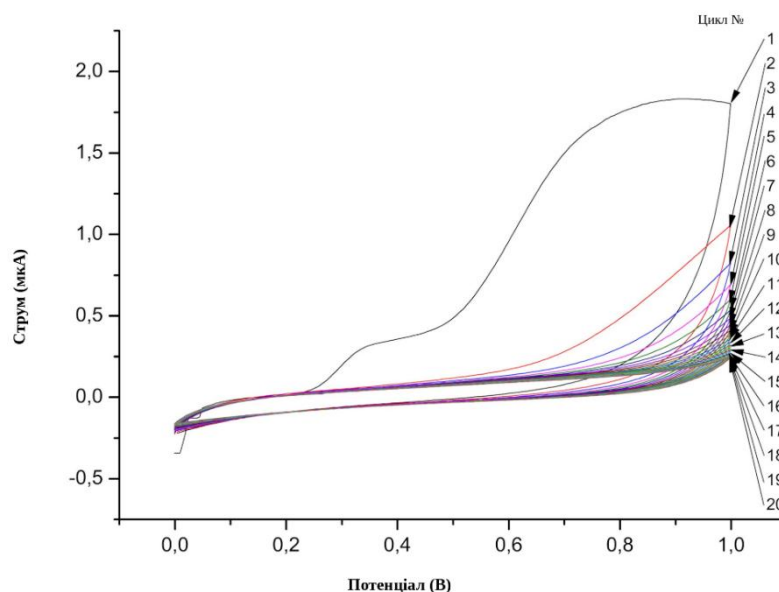


Рис. 3.3. Вольтамперограми електрополімеризації м-фенілендіаміну на поверхні робочого електроду. Склад робочого розчину: 4 мМ м-фенілендіаміну, 10 мМ ФБ, рН 6,4. Параметри циклічної вольтамперометрії: 0-900 мВ, 20 циклів, 50 мВ/сек

Оскільки існує кілька ізомерів фенілендіаміну (орто-, мета- та пара-) необхідно було обрати такий, що забезпечить найкращі аналітичні характеристики електроду. Для вибору оптимального ізомеру було створено електроди з ПФД мембранами на основі різних ізомерів фенілендіаміну та проведено порівняння властивостей утворених електродів. Селективність та чутливість отриманих електродів відносно цільової молекули (H_2O_2) порівнювали з чутливістю до електроактивних інтерферентів (аскорбінова кислота, цистеїн, сечова кислота, ацетамінофен, дофамін та аспарагін).

Отримані результати свідчать про те, що серед проаналізованих ізомерів найкращу комбінацію характеристик селективність-чутливість показав електрод з мембраною на основі мета-ізомеру (рис. 3.4а), оскільки ортоізомер не забезпечував достатньої селективності відносно інтерферентів, а параізомер блокував доступ всіх молекул до поверхні сенсора, в тому числі пероксиду водню.

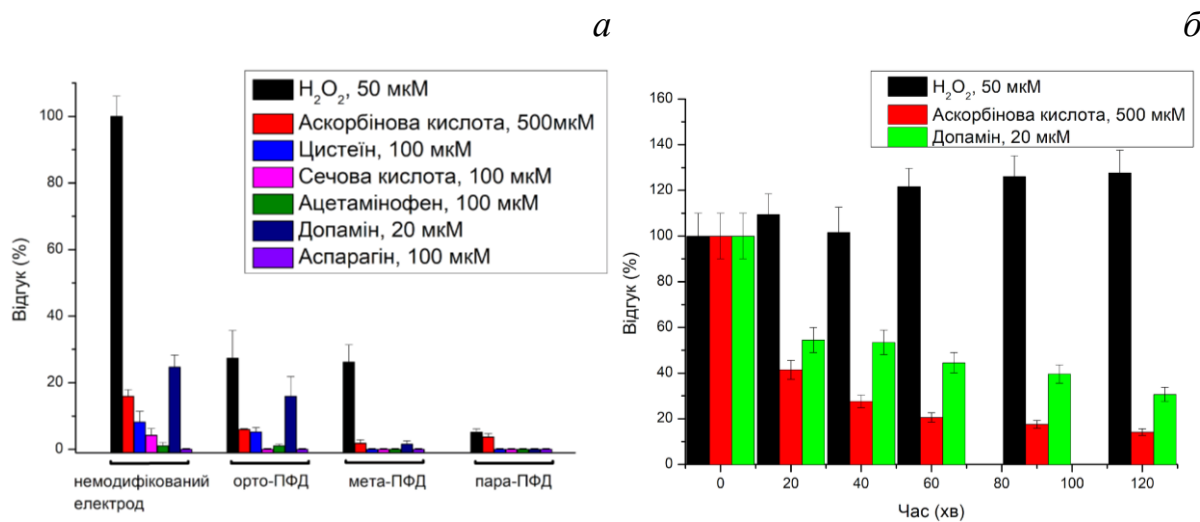


Рис. 3.4. Порівняння відгуків амперометричного перетворювача (покритого полімерними мембранами на основі різних ізомерів фенілендіаміну) на пероксид водню та ряд електроактивних речовин (а). Стабільність м-ПФД мембрани протягом 2 годин (б). Відгуки на речовини були нормалізовані відносно початкової відгуку на конкретну речовину після формування ПФД. Вимірювання проводились в 10 мМ ФБ

Крім того відомо, що характеристики полімерних мембран можуть змінюватися з часом, відповідно, одразу після формування було проведено дослідження експлуатаційної стабільності ПФД мембрани. Для цього протягом 2 годин перевіряли зміну розміру відгуку отриманого сенсора на пероксид водню та інтерференти. Було виявлено (рис. 3.4б), що протягом цього часу чутливість біосенсора до пероксиду водню збільшилася приблизно на 25%, а чутливість до інтерферентів зменшилась на 70-80%. Таку поведінку,

ймовірно, можна пояснити стабілізацією мембрани: незв'язані мономери вимиваються і покращують доступ перексиду водню, при цьому самі полімерні ланцюги ущільнюються і покращують селективність.

Таким чином, після модифікації амперометричного перетворювача ПФД мембраною чутливість сенсора до електроактивних інтерферентів (на прикладі аскорбінової кислоти та цистеїну) знизилась на 2 порядки зі збереженням чутливості до перексиду водню (рис. 3.5). Після побудови калібрувальної кривої відгуків сенсора з ПФД мембраною на різні концентрації перексиду водню було визначено, що його лінійний робочий діапазон становив 0,65–750 мкМ перексиду водню, а мінімальна межа визначення – 650 нМ. Отримані результати більш ніж задовольняють вимоги до параметрів електрохімічного перетворювача для розробки біосенсорів.

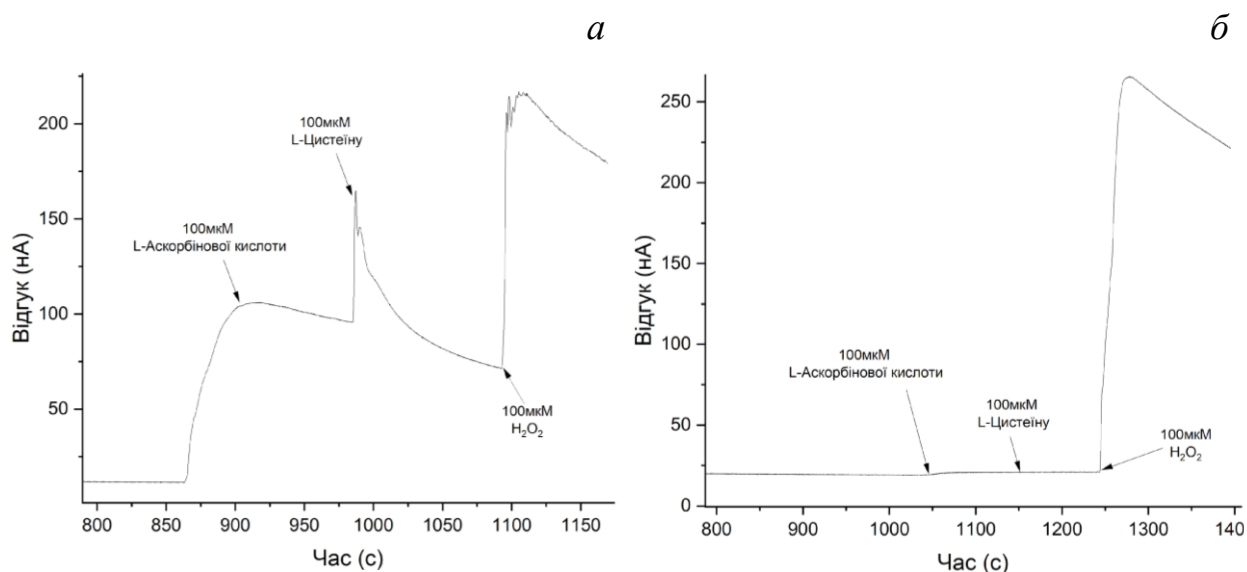


Рис. 3.5. Реакції електрода без (а) та з (б) ПФД мембраною на додавання інтереферуючих речовин

Для підтвердження формування полімерної плівки внаслідок описаної процедури поверхня електрода була досліджена за допомогою скануючої електронної мікроскопії. Аналіз полірованої поверхні електрода показав однорідну текстуру металу (рис. 3.6). Аналіз електрода з нанесеною ПФД-мембраною показав тонкий органічний шар, що покриває весь поперечний

переріз електрода, включаючи як платиновий диск, так і навколишній скляний капіляр. Цей шар (зазвичай менше 1 мкм та близько 2 мкм у точках локального потовщення) став частково видимим при знижених енергіях електронів 10 кеВ та 4 кеВ (рис. 3.6).

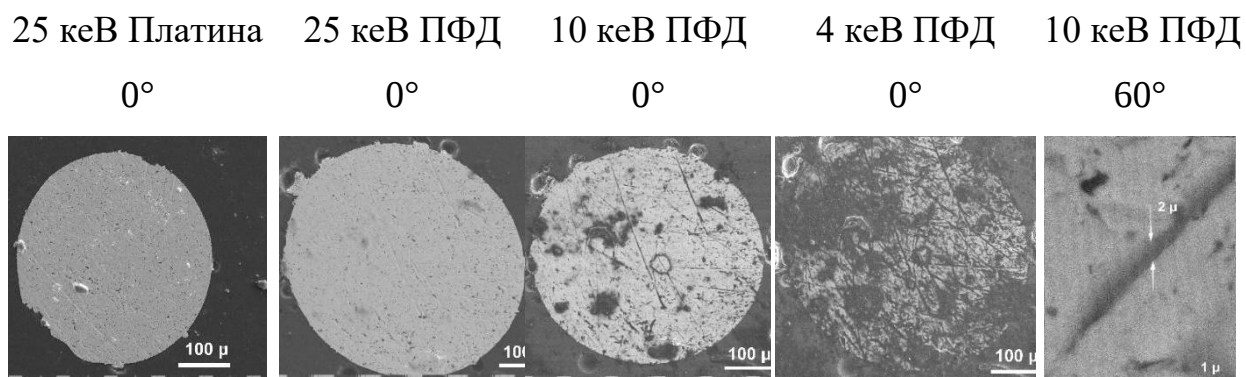
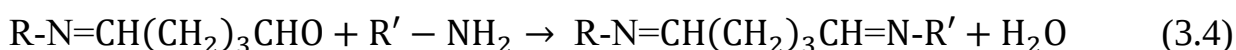
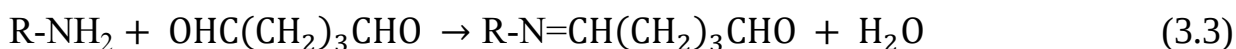


Рис. 3.6. СЕМ-зображення полірованого платинового дискового електрода з та без ПФД мембрани під дією електронного пучку різної енергії та наближене фото, яке демонструє локальне потовщення мембрани

3.2 Розробка АСТ-чутливого біосенсора на основі ГлОкс

Як було вже сказано на початку, запропонований принцип АСТ-чутливого біосенсора базується на біоселективній ГлОкс-каталізованій біохімічній реакції окиснення глутамату з утворенням пероксиду водню та його подальшим розкладанням на поверхні електроду. Відповідно, необхідно було розробити процедуру створення біоселективного елемента на основі ГлОкс, підібрати оптимальні параметри робочого буфера, дослідити аналітичні характеристики біосенсора та його стабільність.

3.2.1 Розробка процедури формування біоселективної мембрани на основі ГлОкс. Аналітичні характеристики біосенсора сильно залежать від стану біоселективної мембрани. Цей параметр суттєво впливає на чутливість, лінійний діапазон роботи, селективність та стабільність біосенсора. Стан біоселективної мембрани в свою чергу в основному залежить в умов її формування, тобто від процесу іммобілізації біоселективного матеріалу на робочій поверхні амперометричного перетворювача. При створенні даного біосенсора іммобілізацію біоматеріалу проводили шляхом ковалентної поперечної зшивки між ензимом ГлОкс та додатковими молекулами нейтрального білка БСА. Процес іммобілізації забезпечується здатністю зшиваючого агента ГА до зв'язування з аміногрупами білків з формуванням основи Шиффа. Основа Шиффа – це сполука з подвійним зв'язком між С та N, де азот зв'язаний з арильною або алкільною групою (3.3), яка в свою чергу здатна реагувати з аміногрупами також з утворенням основи Шиффа (3.4).



3.2.1.1 Підбір оптимальних умов іммобілізації (концентрацій зшиваючого агенту та ГлОкс, тривалість процедури). Оскільки процедура іммобілізації ензиму безпосередньо впливає на характеристики біосенсора, необхідно було підібрати оптимальний вміст компонентів в біоселективній мембрані, зокрема, концентрацію іммобілізуючого агенту.

Для цього було перевірено роботу біосенсора в залежності від концентрації ГА в біоселективній мембрані (0,007-2,3%). Результати вимірювань показали, що найбільшою чутливістю біосенсор характеризується при іммобілізації ензиму з використанням стокових концентрацій ГА 0,5% та 0,1% (рис. 3.7a). Більш високі концентрації зшиваючого агенту призводили до надлишкової іммобілізації ензиму, а менші

концентрований ГА не закріплював ензим достатньо щільно, в наслідок чого він вимивався з біоселективної мембрани впродовж роботи.

Такий великий розкид величин відгуку біосенсора в стані ензиматичного насичення субстратом можна пояснити ступенем взаємодії компонентів робочого гелю з ГА в ході реакцій (3.3) та (3.4). Зокрема, при недостатній кількості зшиваючого агенту більшість зшивок формується між окремими молекулами білку, формуючи невеликі кластери, не пов'язані один з одним. Внаслідок цього більша частина ензиму або не іммобілізується взагалі і його незв'язані молекули вимиваються з біоселективної мембрани під час промивки, або під час промивки вимиваються цілі кластери. А при надлишку ГА під час іммобілізації утворюється більше, ніж необхідно, поперечних зшивок, що призводить до необоротних змін в третинній структурі ГлОкс, змінюючи форму активного центру і негативно впливаючи на роботу ензиму. Експериментальні дані підтверджують прогнозований дзвоноподібний характер зміни чутливості біосенсору до глутамату при використанні різних концентрацій ГА під час іммобілізації (рис. 3.7а стовпчаста діаграма).

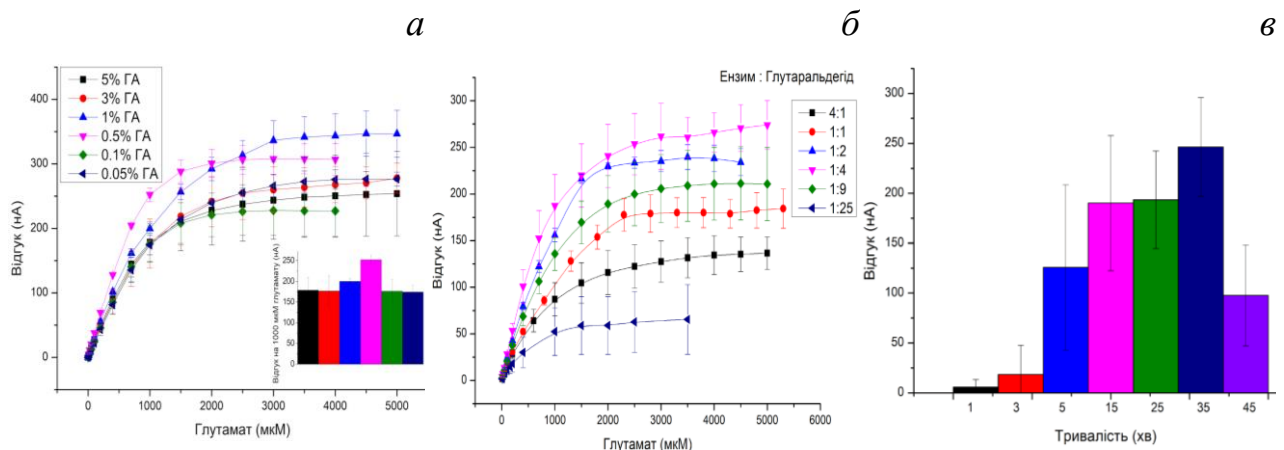


Рис. 3.7. Залежність величини відгуку та форми калібрувальних кривих біосенсора від концентрації ГА при іммобілізації (а) при співвідношенні ензимний гелі: водний розчин ГА - 1:2 та тривалості іммобілізації 25 хвилин. Калібрувальні криві визначення глутамату при різному співвідношенні об'ємів розчинів ензиму та ГА (б) при концентрації ГА 0,5% та тривалості

іммобілізації 25 хвилин. Залежність величини відгуку біосенсора від тривалості іммобілізації ензиму при співвідношенні гель:ГА 1:2 та концентрації ГА 0,5% (в). Концентрація глутамату на стовпчастих діаграмах – 1000 мкМ

Вміст ензиму в біоселективній мембрані також є достатньо критичним параметром, оскільки саме ГлОкс забезпечує протікання біохімічних реакцій, які уможливають електрохімічну детекцію активності АСТ. Для визначення впливу концентрації ГлОкс в біоселективній мембрані на чутливість біосенсора було перевірено різні співвідношення об'ємів ензимного гелю (8%) та водного розчину ГА (0,5%) під час іммобілізації, внаслідок чого концентрація ензиму в мембрані коливалась від 0,3% до 6,4%. Аналіз калібрувальних кривих отриманих біосенсорів показав, що оптимальний вміст ГлОкс в мембрані становить 2,67%, тобто при співвідношенні ензимного гелю з водним розчином ГА 1:2, оскільки саме таке співвідношення забезпечує найдовший лінійний діапазон та найменшу похибку (рис. 3.7б).

Ще одним важливим параметром при створенні біосенсора є тривалість іммобілізації. Вона суттєво впливає на якість біоселективної мембрани, адже за недостатній час ковалентні зшивки не встигнуть утворитися, а за надлишкового часу хімічна активність ГА призведе до незворотних змін в конформаційній структурі ГлОкс, що негативно позначиться на роботі біосенсора. Тому вибір тривалості іммобілізації проводився на основі аналізу експериментальних даних, враховуючи величину відгуку біосенсора та відтворюваність процедури приготування біосенсора. Для цього було проведено по 4-6 іммобілізацій з тривалістю від 1 до 45 хвилин. Дослідження показало, що при іммобілізації ГлОкс в ГА протягом 35 хвилин спостерігалось найкраще поєднання чутливості до глутамату та відтворюваності цієї чутливості між процедурами іммобілізації, відповідно, саме такий час був обраний як оптимальний (рис. 3.7в).

3.2.1.2 Оцінка ефективності та стабільності біоселективного елементу на основі ГлОкс. Оскільки визначення АСТ здійснюватиметься через реєстрацію глутамату, оцінка ефективності роботи біоселективного елементу є необхідним кроком: його параметри впливатимуть на можливість роботи з аналітом (АСТ) та аналітичні характеристики загальної біосенсорної системи, як результату всього дисертаційного дослідження.

Оскільки при перетворенні однієї молекули глутамату утворюється одна молекула пероксиду водню (розділ 1.3.2.1.1 реакція (1.3), порівняння відгуків біосенсора на ці дві речовини дозволяє оцінити загальну ефективність іммобілізації. Аналіз калібрувальних кривих показав (Додаток Г), що чутливість біосенсора до глутамату була лише вдвічі нижчою порівняно з перексидом водню, що, враховуючи дифузійні обмеження, свідчить про успішну іммобілізацію ензиму.

Окрім оцінки загальної ефективності іммобілізації необхідно також було дослідити інші характеристики розробленого біосенсора, зокрема лінійний діапазон вимірювання проміжного аналіту (від 5-700 мкМ глутамату), межі робочого діапазону (2-2000 мкМ), чутливість до проміжного аналіту (250 нА/мМ), мінімальна межа визначення (2 мкМ). Отримана межа визначення глутамату свідчить, що при низьких концентраціях аналіту необхідно буде проводити триваліше вимірювання для отримання достовірного результату. Наприклад, 1 од.акт./л АСТ за 1 хвилину утворить 1 мкМ глутамату, що лежить за межами робочого діапазону вимірювання проміжного аналіту. Проте у разі проведення більш довготривалого вимірювання (хоча б 2 хвилини) буде отримано достовірний сигнал нА/2хв, що може бути математично перерахований в стандартну одиницю вимірювання, а саме, нА/хвилину. Відповідно, за рахунок збільшення часу біосенсорного аналізу можна значно зменшувати границю визначення АСТ та розширювати лінійний діапазон роботи біосенсора. Обмеження лінійного діапазону на 700 мкМ глутамату дозволяє передбачити, що лінійний діапазон визначення АСТ також не перевищить 700 од.акт./л. Час відгуку на глутамат при цьому становив 5-20

с, що своєю чергою свідчить про необхідність затримки у 20 секунд між внесенням розчину АСТ в комірку та початком реєстрації сигналу, оскільки саме стільки часу максимально треба біоселективній мембрані для стабілізації відгуку.

Також критичною характеристикою біосенсора є стабільність його біоселективної мембрани. Будь-які зміни активності або структури ензиматичного шару безпосередньо впливають на відгук до глутамату, а отже, і на точність та відтворюваність визначення АСТ. Згідно з нашими дослідженнями, відносне стандартне відхилення відгуків на глутамат при повторних вимірюваннях становило не більше 4% (рис. 3.8а). А відносне стандартне відхилення відгуків біосенсорів на глутамат в рамках дослідження відтворюваності іммобілізації не перевищувало 9,5% (рис. 3.8б).

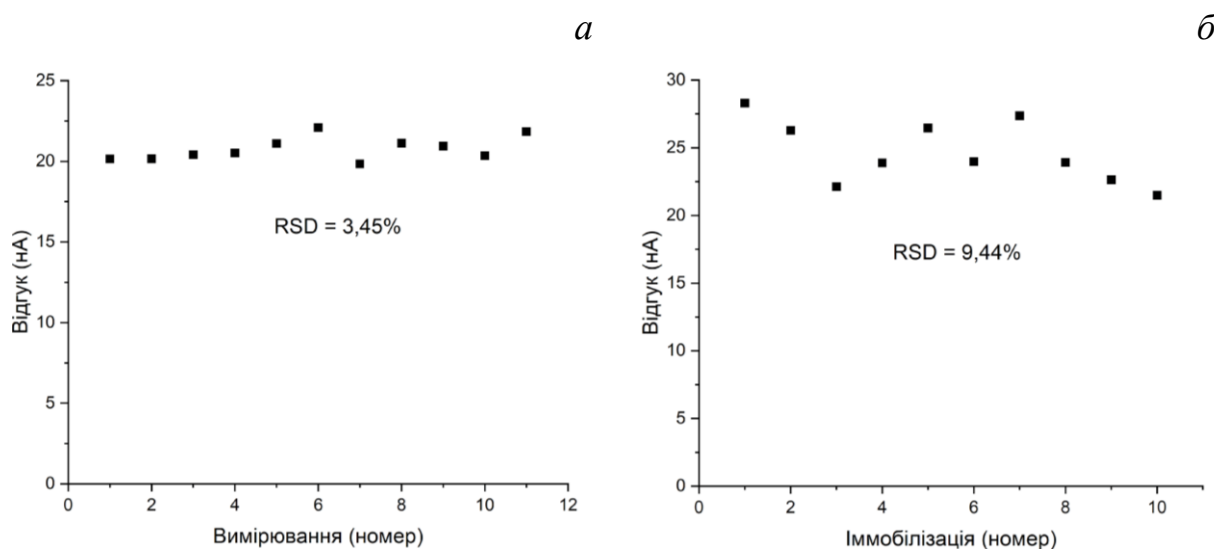


Рис. 3.8. Відтворюваність відгуків біосенсора на 100 мкМ глутамату протягом 11 вимірювань (а). Відтворюваність процедури приготування біосенсора (б)

Для перевірки операційної стабільності біоселективної мембрани отримували 8-12 відгуків біосенсора на 50 мкМ глутамату протягом одного дня, потім кілька днів біосенсор зберігали в сухому місці при температурі -18°C, а після цього знову отримували відгуки біосенсора на ту ж концентрацію

глутамату. Результати дослідження показали, що розроблений біосенсор залишався стабільним протягом усього періоду вимірювань (11 днів) (рис. 3.9а).

Також була перевірена стабільність біосенсора під час зберігання, і було виявлено, що при зберіганні сенсорів при температурі -18°C протягом 65 днів залишкова активність становила 70% (рис. 3.9б). Ці результати свідчать про можливість використання біосенсора після тривалого зберігання, але за умови його додаткового калібрування.

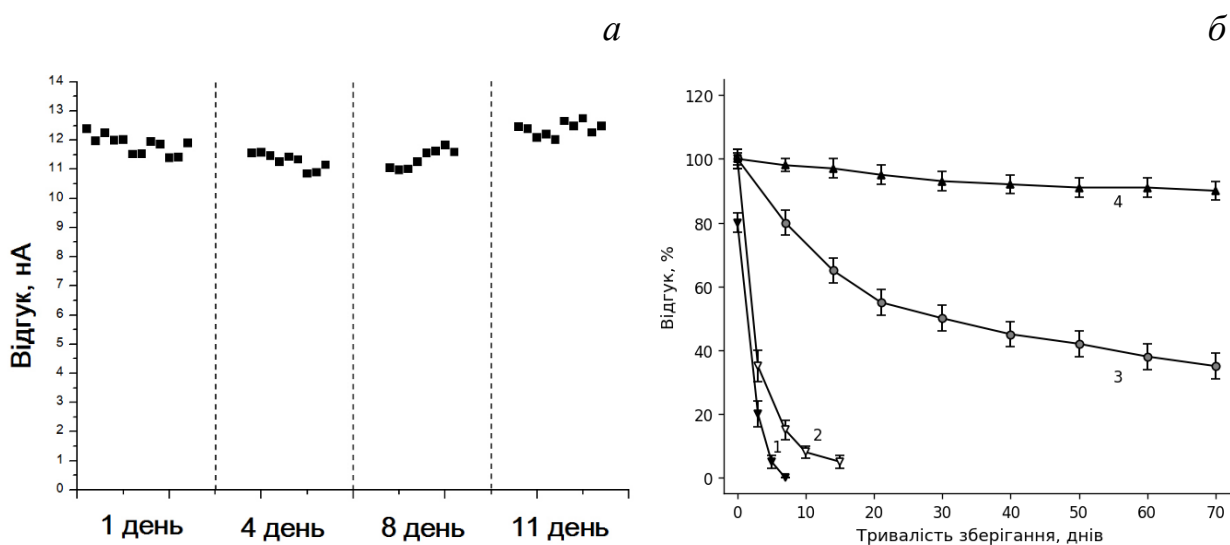


Рис. 3.9. Операційна стабільність біоселективної мембрани на основі ГлОкс (а), концентрація глутамату – 50 мкМ. Вплив умов зберігання глутамат-чутливого біосенсора на величину відгуку (б): сухе зберігання при $+25^{\circ}\text{C}$ (1), у буфері HEPES при $+25^{\circ}\text{C}$ (2), сухе зберігання при $+4^{\circ}\text{C}$ (3), сухе зберігання при -18°C (4). Концентрація глутамату становить 100 мкМ

3.2.2 Вивчення впливу параметрів робочого середовища на функціонування розробленого біосенсора

3.2.2.1 Дослідження впливу температури середовища на функціонування біосенсора. Відомо, що температура середовища впливає на швидкість утворення ензим-субстратного комплексу і, в свою чергу, швидкість протікання ензиматичної реакції. Відповідно, необхідно було дослідити вплив температури робочого розчину на функціонування біосенсора. Було показано, що біосенсор на основі глутаматоксидази дуже чутливий до змін цієї характеристики середовища (рис. 3.10а). За підвищення температури від 25°C до 45°C величина відгуку біосенсора зростає на 80%, а при подальшому підвищенні температури від 45°C до 80°C величина відгуку біосенсора стрімко спадає. Така залежність свідчить про теплову денатурацію білкової частини іммобілізованого ензиму, аж до її повного руйнування. Оскільки визначення АСТ у розробленій системі базується на реєстрації глутамату як продукту ензиматичної реакції, зміна чутливості біосенсора до глутамату при варіюванні температури безпосередньо відображається на чутливості до АСТ. Таким чином, температурно зумовлені зміни відгуку глутамат-чутливого елемента пропорційно впливають на аналітичні характеристики сенсора щодо АСТ.

Для того, щоб довести, що дана залежність зумовлена саме впливом температури на біоселективний елемент біосенсора, а не на фізичний перетворювач, було досліджено вплив температури на функціонування голого платинового електроду. З рисунку 3.10б видно, що при збільшенні температури від 25°C до 80°C базовий рівень сигналу амперометричного сенсора рівномірно зростає, в той час як відгук біосенсора на проміжний аналіт зростає до певної температури, а потім падає. Це підтверджує суттєвий вплив температури саме на ензимну мембрану. Таким чином, бажана робоча температура середовища становить 25-35°C.

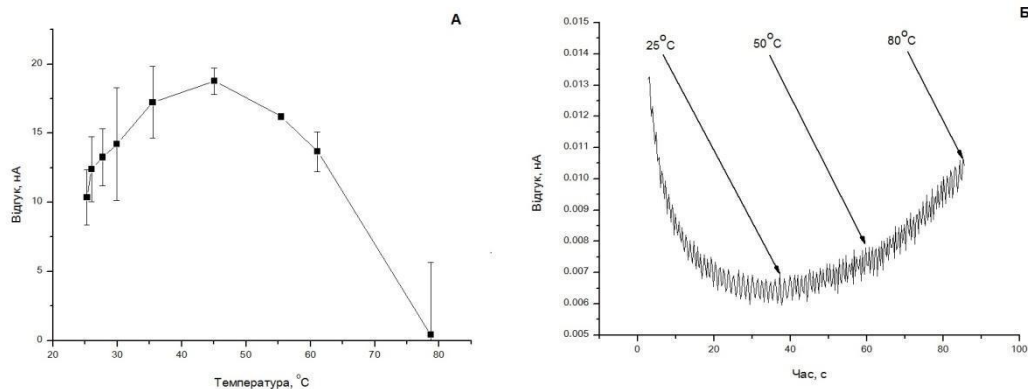


Рис. 3.10. Залежність величини відгуку біосенсора від температури робочого розчину (а) та зміна сигналу амперометричного перетворювача при підвищенні температури (б). Концентрація глутамату – 100 мкМ

3.2.2.2 Вибір буферної системи та вивчення впливу буферної ємності на функціонування біосенсора на основі ГлОкс. Для ефективної роботи будь-якого ензиму в складі біоселективного елементу необхідне стабільне робоче середовище. Це досягається шляхом використання відповідної буферної системи, яка забезпечує постійний рН навіть під час аналізу складних біологічних зразків. Розроблений біосенсор призначений для роботи з біологічними рідинами з рН 7–8 (наприклад, кров). Крім того, відомо, що оптимум рН глутаматоксидази лежить в діапазоні 7,0-7,4 [166]. Відповідно, використаний буфер повинен мати відповідний робочий діапазон рН.

В якості робочого буфера було обрано HEPES, оскільки цей буфер має мінімальний вплив на зміну йонної сили розчину за рахунок нейтрального заряду молекули HEPES і, відповідно, не впливає на активність ензиму. HEPES відзначається високою стабільністю за різних температур, не розкладається та не взаємодіє з киснем, що важливо для ензимів, що каталізують окиснення. Також, на відміну від фосфатного буферу, HEPES не зв'язує бівалентні іони металів (Mg^{2+} , Mn^{2+}) та стабілізує коензим ТПФ [167], що необхідні для роботи біоселективного елементу на основі ПОкс, використаного в подальшій роботі для вимірювання активності АЛТ (розділ 3.3.2.2).

Дослідивши поведінку електродів після іммобілізації ГлОкс, було підтверджено, що ензим в складі даного біосенсора може працювати в широкому діапазоні рН (рис. 3.11а), а найвищі відгуки реєструються в межах рН = 7-9. Тому, для подальшої роботи було обрано рН 7,4 для забезпечення максимальної чутливості біосенсора та відповідності рН між робочим середовищем та зразками сироватки крові.

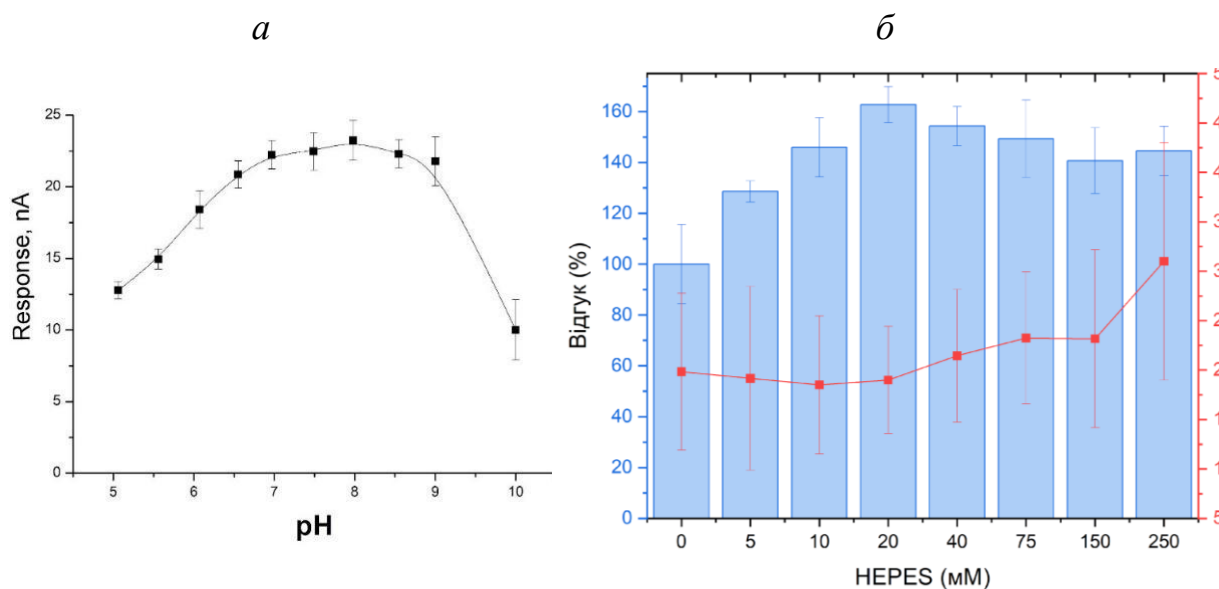


Рис. 3.11. Залежність величини відгуків біосенсора на основі ГлОкс від рН робочого буферного розчину (а). Концентрація глутамату - 100 мкМ, HEPES буфер. Залежність величини відгуку біосенсора (стовпці) та швидкості відгуку (лінія) для біосенсора на основі ГлОкс від концентрації буфера (б)

Оптимізація концентрації буфера є критично важливою для забезпечення стабільного рН у ході протікання електрохімічних реакцій у робочому середовищі біосенсора. Експериментально встановлено, що оптимальна концентрація HEPES-буфера для ГлОкс-біосенсора становила 20 мМ (рис. 3.11б), оскільки саме при цій концентрації спостерігалася найкраща комбінація величини та швидкості відгуку біосенсора.

Підвищення концентрації буфера понад оптимальне значення призводило до негативних ефектів: при 150 мМ HEPES спостерігалася

уповільнення часу відгуку на 21% та зниження величини сигналу на 13% порівняно з оптимумом 20 мМ. Така поведінка біосенсора пояснюється зростанням іонної сили розчину, що призводить до електростатичного екранування взаємодії між негативно зарядженим глутаматом та позитивно зарядженими залишками активного центру ензиму (Arg124, Arg305) [168-169]. Водночас, відносно невеликий масштаб цих змін (лише 13% навіть при 7-кратному перевищенні концентрації оптимуму) свідчить про високу стабільність іммобілізованої ГлОкс та раціональність обраної конструкції біоселективної мембрани, що забезпечує стабільну роботу біоселективної системи в широкому діапазоні умов.

3.2.2.3 Перевірка впливу вмісту білку та іонної сили розчину на функціонування біосенсора на основі ГлОкс. В усіх біологічних рідинах присутні молекули білку, часто у високих концентраціях. Ці молекули поступово осідають на біоселективну мембрану біосенсора за рахунок взаємодій різного характеру (водневі, електростатичні, гідрофобні, адсорбційні, тощо), фізично блокуючи пори всередині мембрани та погіршуючи її проникні властивості. В результаті дифузія субстрату та кофакторів до активного центру ензиму ускладнюється, що призводить до зниження величини й точності відгуку. У випадку визначення АСТ, де сигнал формується через утворення та подальшу реєстрацію проміжного аналіту глутамату, такі масообмінні обмеження безпосередньо зменшують чутливість сенсора та можуть спричиняти заниження вимірюваної активності ензиму в зразках біологічних рідин.

Для оцінки можливості застосування даного біосенсора при роботі з складними біологічними матрицями було досліджено вплив вмісту білка в аналізованому розчині на аналітичні параметри біосенсора. Результати дослідження продемонстровано на рис. 3.12. Як модель наявності білків в розчині було використано різні концентрації БСА. Присутність 3% БСА в робочому розчині мала негативний вплив (зменшення відгуку на 12-18%) на

чутливість біосенсора до глутамату. Враховуючи концентрацію білка в сироватці крові людини приблизно 120 г/л [170] та 10-кратне розведення зразка під час біосенсорного аналізу, очікуваний вплив білків сироватки на продуктивність біосенсора оцінювався на рівні 10% падіння величини відгуку на проміжний аналіт, хоча цей показник можна зменшити за рахунок сильнішого розведення зразку. Однак слід підкреслити, що цей ефект посилюється поступово, а не проявляється одразу, тому вимірювання зразків шляхом порівняння відгуків із попередньо отриманою калібрувальною кривою залишається можливим. Крім того, промивання біосенсору між вимірюваннями видаляє значну кількість адсорбованих білків з мембрани і відновлює аналітичні характеристики біосенсора.

Окрім білкових молекул, в сироватці крові та інших біологічних рідинах міститься значна кількість йонів, яка може впливати на роботу різноманітних складових біосенсора. Проаналізувавши поведінку біосенсора в присутності різних концентрацій NaCl, було встановлено, що збільшення іонної сили розчину не спричиняє змін в чутливості розробленого біосенсора до глутамату.

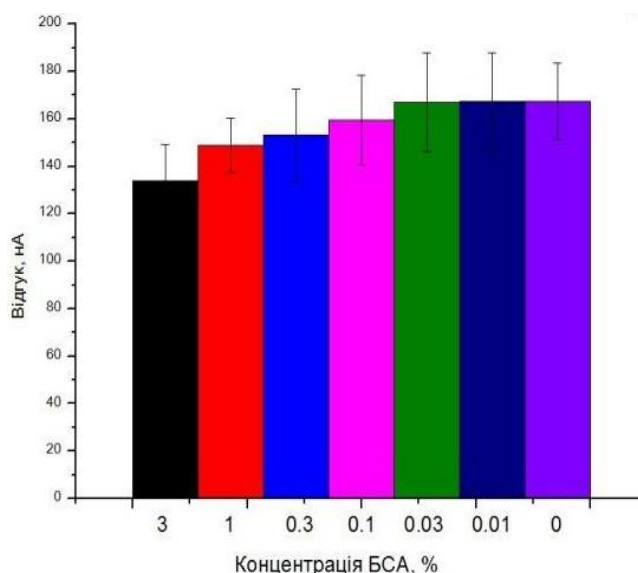


Рис. 3.12. Залежність величини відгуку біосенсора від присутності білка в робочій комірці. Концентрація глутамату – 1000 мкМ

3.2.2.4 Вивчення селективності розробленого біосенсора відносно можливих інтерферентів. В біологічних матрицях окрім білків присутня також значна кількість інтерферентів різної природи – як електроактивні так і неелектроактивні. Ці інтерференти можуть каталізувати неселективний відгук біосенсора або впливати на величину селективного відгуку. Для забезпечення точних вимірювань необхідно враховувати селективність електрохімічного перетворювача та селективність біоселективного матеріалу відносно проміжного аналіту.

Для амперометричних сенсорів електроактивні домішки є критичною загрозою для точності вимірювань. Вони можуть окиснюватися або відновлюватися на робочому електроді, створюючи додатковий електричний сигнал, який має різний прояв:

- зростання сили струму через окиснення інтерферентів на електроді, що імітує збільшення концентрації проміжного аналіту і спричиняє завищені результати;
- падіння сили струму внаслідок відновлення інтерферентів на електроді, що спричиняє занижені результати;
- стрибкоподібне зростання/спадання сили струму з пролонгованим поверненням сили струму до базового рівня внаслідок зниження концентрації інтерферентів в комірці, що накладається на пролонговане зростання сили струму внаслідок роботи ензиматичного каскаду біосенсора та модифікує отриманий відгук, спричиняючи хибні результати.

Для уникнення спотворення результатів вимірювань активності АСТ електроактивними сполуками було запропоновано використовувати додаткову ПФД мембрану, яка фізично блокує дифузію високомолекулярних та позитивнозаряджених молекул до поверхні електрода (розділ 3.1.2 Покращення селективності платинових сенсорів за допомогою додаткової мембрани на основі ПФД). Після модифікації поверхні сенсорів додатковою полімерною мембраною було підтверджено, що типові компоненти

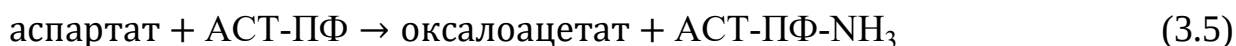
біологічних рідин —сечова кислота, ЕДТА, глюкоза, лимонна кислота, бензойна кислота, азид натрію, солі Na^+ , K^+ та Ca^{2+} — у концентраціях до 1 мМ не викликали жодного відгуку біосенсора та не впливали на реєстрацію сигналу від глутамату або АСТ. Цей результат свідчить про ефективну блокуючу здатність ПФД-мембрани щодо небажаних електрохімічних процесів на електроді.

Другим фактором, що визначає селективність, є специфічність ензиматичної мембрани. Оскільки детекція АСТ здійснюється через вимірювання швидкості утворення глутамату, критично важливо встановити наскільки вибірковою є ГлОкс щодо інших амінокислот. Було досліджено вплив вільних амінокислот та встановлено, що аспарагін, глутамін, аспарагінова кислота та гістидин спричиняли відгуки у 50–100 разів менші за відгук на ту саму концентрацію глутамату. Чутливість до цих амінокислот обумовлена неідеальною селективністю ГлОкс та наявністю у препараті комерційного ензиму слідових кількостей інших оксидаз, зокрема оксидази L-амінокислот. Водночас інші амінокислоти не викликали жодного сигналу. Таким чином, навіть у випадку їхньої присутності в зразку вони не спричиняють значимого впливу на точність реєстрації концентрації проміжного аналіта (табл. 3.1). Крім того, важливо підкреслити, що аналітичний сигнал розробленого АСТ-чутливого біосенсора залежить не лише від миттєвої концентрації глутамату, а тим більше від швидкості її зміни у часі, відповідно, вплив сторонніх амінокислот зменшується, адже їхня концентрація з часом не змінюється і вони не спричиняють зміни сили струму з часом.

**Дослідження селективності розробленого біосенсора відносно можливих
інтерферентів**

Речовина, 1 мМ	Відгук, нА	Речовина, 1 мМ	Відгук, нА	Речовина, 1 мМ	Відгук, нА
ЕЛЕКТРОАКТИВНІ					
Аскорбінова кислота	2,00	Цистеїн	0	Сечова кислота	0
Допамін	1,20	Лимонна кислота	0		
НЕЕЛЕКТРОАКТИВНІ					
ЕДТА	0	CaCl ₂	0	ПФ	0
KCl	0	Глюкоза	0	Ацетамінофен	0
NaN ₃	0	NaCl	0	α- кетоглутарат	0
Бензойна кислота	0				
АМІНОКИСЛОТИ					
Глутамат	175,00	Аспартат	0,30	Гістидин	0,20
Аспарагін	0,90	Лейцин	0,05	Тирозин	0,15
Глутамін	0,35	Валін	0	Метіонін	0,10
Аргінін	0	Ізолейцин	0	Аланін	0
Треонін	0	Серин	0	Пролін	0

3.2.3 Вибір оптимальних концентрацій коензиму та субстратів АСТ для роботи біосенсора. Враховуючи, що запропонований біосенсор визначає активність АСТ опосередковано, на основі динаміки концентрації продукту реакції, вкрай важливо забезпечити роботу ензиму з максимально можливою швидкістю. Зрозуміло, що для роботи ензиму необхідні субстрати, які будуть брати участь в хімічній реакції, також зрозуміло, що для досягнення максимальної продуктивності необхідно, щоб ензиматична реакція не зупинялась, тобто кожна наявна молекула ензиму в кожний момент часу брала участь в перетворенні субстрату в продукт. За оптимальних умов будь-який ензим має деяку максимальну швидкість протікання реакції, тобто за 1 хвилину він зможе утворити максимальну кількість продукту. Таким чином, для досягнення цього максимуму необхідно взяти субстрат у надлишку відносно ензиму, щоб час його надходження до активного центру був мінімальний. Проте, якщо в реакції бере участь 2 і більше субстратів, що з'єднуються з одним активним центром, їх надлишок може викликати конкурентне інгібування, внаслідок чого, швидкість протікання реакції знизиться. АСТ має один активний центр та 2 субстрати, що приєднуються за принципом “пінг-понг” (механізм подвійного заміщення) (3.5, 3.6), тобто по чергово. Крім того, ці субстрати мають різні коефіцієнти спорідненості до активного центру ензиму, відповідно, існує загроза конкурентного інгібування ензиму субстратами при їх неоптимальному співвідношенні. Ось чому так важливо визначити оптимальні концентрації цих речовин в розчині задля найкращої роботи біосенсора.



У дослідженні було визначено оптимальне співвідношення субстратів (рис. 3.13). Спочатку підбирали концентрацію аспартату, потім визначали оптимальну концентрацію α -КГ в присутності підібраної концентрації

аспартату і таким чином визначали оптимальне співвідношення концентрацій обох субстратів. Це співвідношення становило 4 до 1 (у цьому випадку 4 мМ аспартату до 1 мМ α -КГ). Цю різницю можна пояснити сильнішим комплексом АСТ- α -КГ та тим, що концентрація α -КГ частково відновлюється завдяки роботі ГлОкс (розділ 1.3.2.1.1 реакція (1.3)).

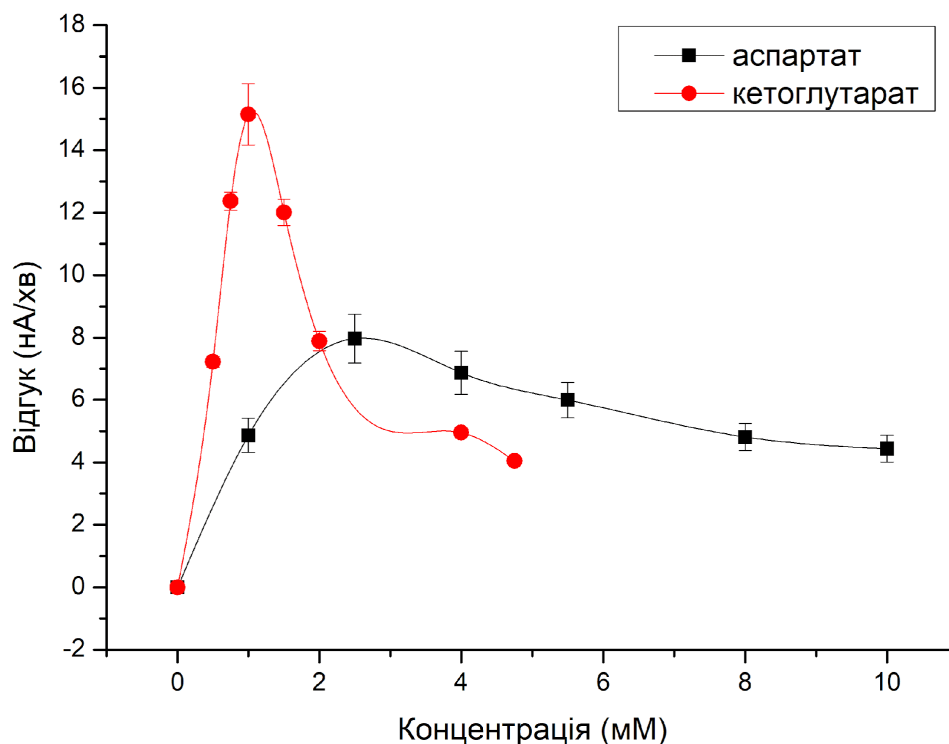


Рис. 3.13. Залежність величини відгуку біосенсора на 100 Од.акт./л АСТ від концентрації аспартату та α -КГ в розчині

Однак, на забезпечення максимальної ефективності роботи ензиму впливає не лише ймовірність отримання субстратів у правильному порядку (співвідношенні), але й швидкість їх надходження. Субстрати доставляються до активного центру шляхом пасивної дифузії; відповідно, для прискорення цього процесу необхідно збільшити їх концентрацію. Як вже зазначалось, надмірний вміст субстратів може призвести до гальмування ензиматичної реакції. Тому оптимальні концентрації субстратів були визначені при збереженні їх оптимального співвідношення 4:1 (рис. 3.14а). Як видно з результатів експерименту, такими оптимальними концентраціями були 6-8 мМ аспартату та, відповідно, 1,5-2 мМ α -КГ.

Оскільки існує ймовірність того, що при використанні біосенсора для аналізу зразків сироватки крові доведеться використовувати метод «стандартних добавок» замість методу з використанням калібрувальної кривої, то крім величини відгуку важливу роль відіграє також тривалість лінійності цього відгуку на АСТ. Загалом, спостерігається тенденція до подовження тривалості лінійності відгуку зі збільшенням концентрації субстратів АСТ (рис. 3.14а синій графік). Для роботи було вирішено використовувати концентрації 8 мМ аспартату та 2 мМ α -КГ, оскільки такі концентрації дозволяють отримати найкраще співвідношення між величиною відгуку та тривалістю лінійного діапазону (рис. 3.14б).

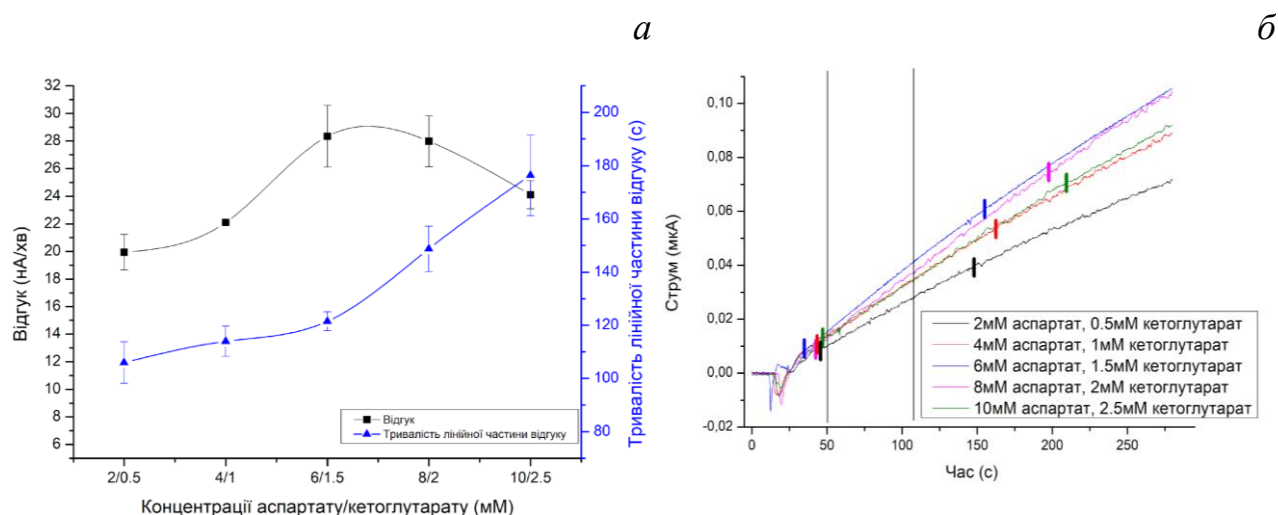


Рис. 3.14. Залежність величини та тривалості лінійної частини відгуку біосенсора на 100 Од.акт./л АСТ від концентрацій субстратів (а). Типові відгуки біосенсора на введення 100 Од.акт./л АСТ у вимірювальну комірку за наявності різних концентрацій субстратів (б). Вертикальні лінії на 50 та 110 секундах позначають межі зняття відгуку, невеликі вертикальні лінії додатково позначають початок та кінець лінійності відгуку

Згідно з літературними даними, АСТ працює у присутності коензиму піридоксальфосфату (ПФ). ПФ діє як проміжний акцептор аміногрупи між послідовними взаємодіями активного центру АСТ із субстратами. Враховуючи це, було вирішено дослідити вплив різних концентрацій ПФ у робочому буфері на величину відгуків розробленого біосенсора на введення

АСТ (рис. 3.15). Очікуваним результатом було підвищення ефективності роботи АСТ та, відповідно, збільшення величини відгуку у присутності ПФ. Експериментальні дані показали, що присутність ПФ у концентрації більше 100 мкМ спричиняла зменшення величини відгуку на АСТ. Це можна пояснити тим, що висока концентрація ПФ прискорює швидкість обміну молекулами коензиму між ензимом та розчином (3.7).



Таким чином, ПФ з аміногрупою від'єднується від активного центру АСТ, тим самим блокуючи перебіг реакції (3.6), під час якої утворюється проміжний аналіт цього біосенсора – глутамат. При концентраціях менше 100 мкМ ПФ викликає збільшення відгуку біосенсора на АСТ, але його ефект менший, ніж очікувалося (близько 12%).

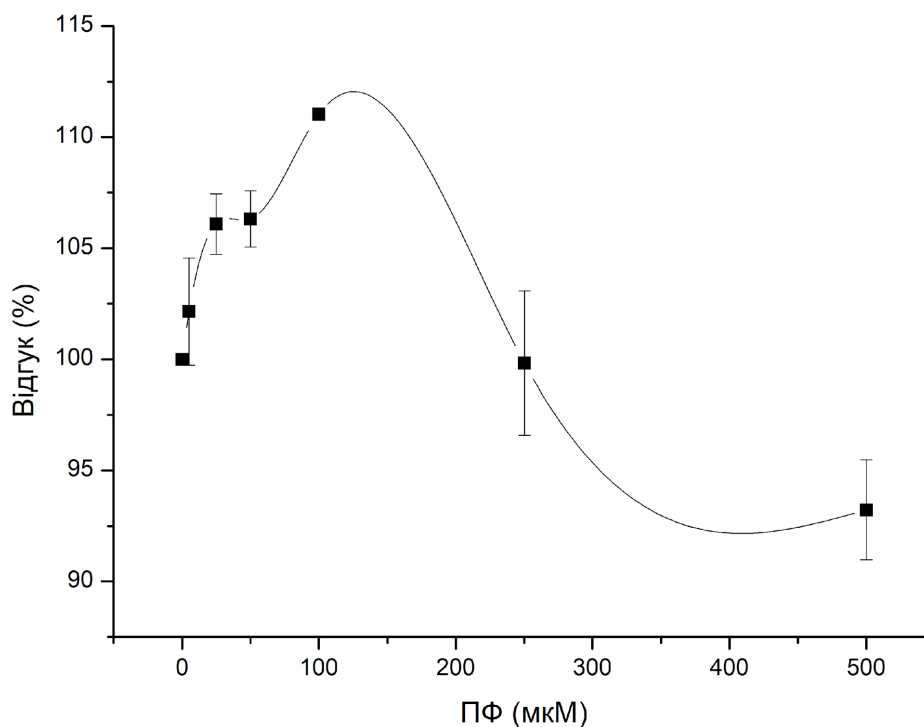


Рис. 3.15. Залежність величини відгуку біосенсора на 100 Од.акт./л АСТ від концентрації ПФ у вимірювальній комірці. Концентрації субстратів у розчині становлять 8 мМ аспартату та 2 мМ α-КГ

3.2.4 Вивчення аналітичних характеристик розробленого біосенсора при аналізі АСТ. Аналітичні характеристики (таблиця 3.2) АСТ-чутливого біосенсора були ретельно досліджені для оцінювання його потенціалу до застосування з біологічними зразками. Аналіз калібрувальної кривої (Додаток Д) показав, що, враховуючи рівень шуму та дрейф базової лінії, мінімальною межею визначення розробленого біосенсора є 1 од.акт./л АСТ. Проте за потреби цей показник можна знизити за рахунок тривалішого вимірювання, а саме: для цієї роботи для розрахунку відгуку було обрано часовий діапазон 1 хвилина, в той час як біосенсор давав лінійний відгук протягом 2,5 хвилин, тобто теоретично межу детекції можна знизити в 2,5 рази.

Лінійний діапазон розробленого біосенсора становить 1-110 од.акт./л АСТ, а динамічний – 1-500 од.акт./л АСТ. Як вже згадувалось вище, вміст АСТ в крові здорової людини становить 10-40 од.акт./л [71], а в разі патологій зростає інколи в 5-50 разів [7-12,14,72]. Відповідно, враховуючи запропоноване розведення зразку в 10 разів під час вимірювання, розроблений біосенсор цілком спроможний до детекції як нормальних, так і патологічних рівнів АСТ в межах свого лінійного діапазону. Для математичного обрахування вмісту АСТ в невідомому зразку шляхом порівняння величини отриманого відгуку з калібрувальною кривою, лінійний діапазон цієї кривої було описано за допомогою рівняння прямої, де ΔI – відгук біосенсора, а C – концентрація АСТ у вимірювальній комірці (таблиця 3.2).

Таблиця 3.2

Аналітичні характеристики розробленого біосенсора для визначення АСТ

Характеристика біосенсора	Значення
Чутливість до АСТ	8,04 нА/хв на 50 од.акт./л
Лінійний діапазон	1,0-120,0 од.акт./л
Динамічний діапазон	1,0-500,0 од.акт./л

Характеристика біосенсора	Значення
Мінімальна межа визначення	1,0 од.акт./л
Рівняння прямої лінійної ділянки калібрувальної кривої	$\Delta I = 0,19107 \cdot C + 0,04933$
Тривалість відгуку на АСТ	1,0 хв
Тривалість лінійної ділянки відгуку	2,5 хв
Тривалість аналізу	10,0 хв

3.2.5 Дослідження стабільності АСТ-чутливого біосенсора на основі ГлОкс. Для точного вимірювання вмісту АСТ в аналізованому зразку за допомогою біосенсора потрібна висока відтворюваність його відгуків. Тому було вирішено оцінити цей параметр для біосенсора, розробленого в цій роботі. Для досягнення цієї мети було проведено 10 вимірювань однакової активності АСТ в розчині протягом одного робочого дня. Було визначено, що середньоквадратичне відхилення відповідей біосенсора на АСТ становило 14,1%. (рис. 3.16а).

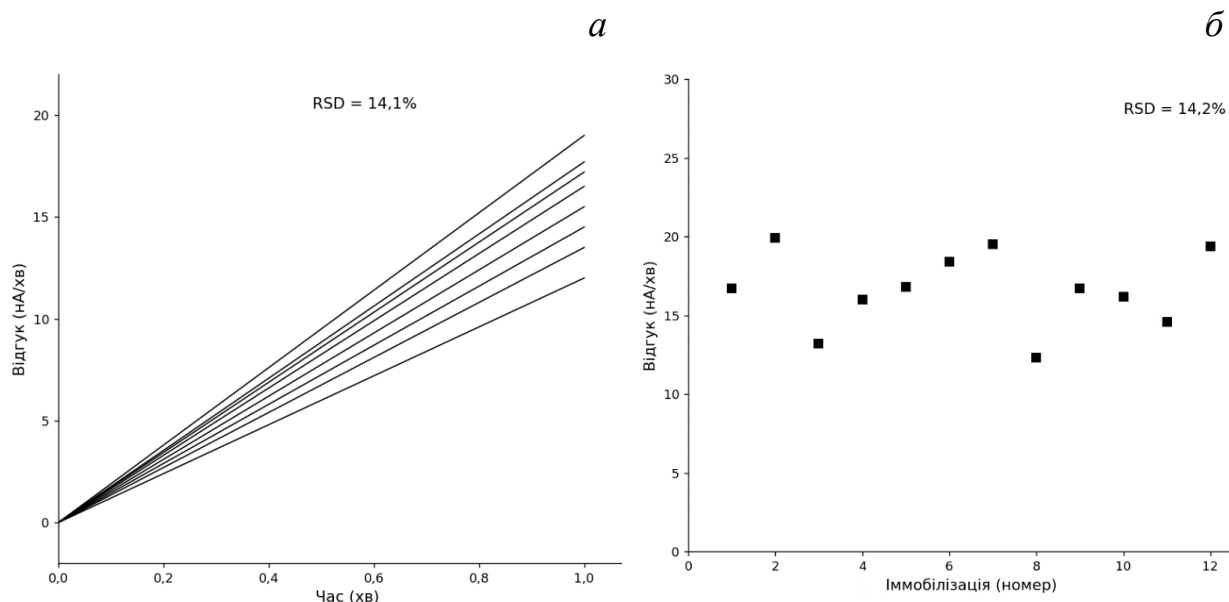


Рис. 3.16. Відтворюваність сигналів біосенсора на додавання АСТ до вимірювальної комірки (а). Відтворюваність сигналів біосенсора на

додавання АСТ при різних іммобілізаціях (б). Концентрації реагентів: АСТ 100 Од.акт./л., 8 мМ аспартату, 2 мМ α -КГ

Ще одним важливим параметром, що впливає на можливість подальшої надійності та практичної придатності розробленого біосенсора, є відтворюваність процедури приготування ензимного біосенсора. Цей параметр оцінює розбіжність у чутливості до АСТ в партії виготовлених біосенсорів. Для оцінки цього параметру було створено 12 біосенсорів з використанням ідентичної процедури виготовлення. Була перевірена чутливість цих біосенсорів до АСТ та розрахована похибка їх виготовлення. Середнє статистичне відхилення відгуків становило 14,2% (рис. 3.16б), що пов'язано з ручним нанесенням мембран на поверхню перетворювача, яке може спричинити різницю в товщині та однорідності біоселективної мембрани. Перехід на автоматизований процес нанесення мембран може підвищити відтворюваність процедури

3.3 Розробка АЛТ-чутливого біосенсора

Аланінамінотрансфераза (АЛТ, КФ 2.6.1.2) каталізує реакцію (рис. 3.17, розділ 1.1 реакція (1.1) трансамінування між L-аланіном та α -КГ з утворенням пірувату та L-глутамату за участі коензиму піридоксальфосфату. Для розробки амперометричного біосенсора для визначення активності АЛТ необхідно було обрати оптимальну ензимну систему детекції, підібрати концентрації субстратів (L-аланіну та α -КГ), коензиму (піридоксальфосфату), а також оптимізувати умови робочого середовища. В даній роботі було вирішено розробити АЛТ-чутливий біосенсор на основі ГлОкс (з детекцією через проміжний аналіт глутамат) та на основі ПОкс (з детекцією через проміжний аналіт піруват) та визначити який з варіантів біореакційної системи краще підходить для створення системи біосенсорів для одночасного визначення активності АСТ і АЛТ (рис. 3.17).

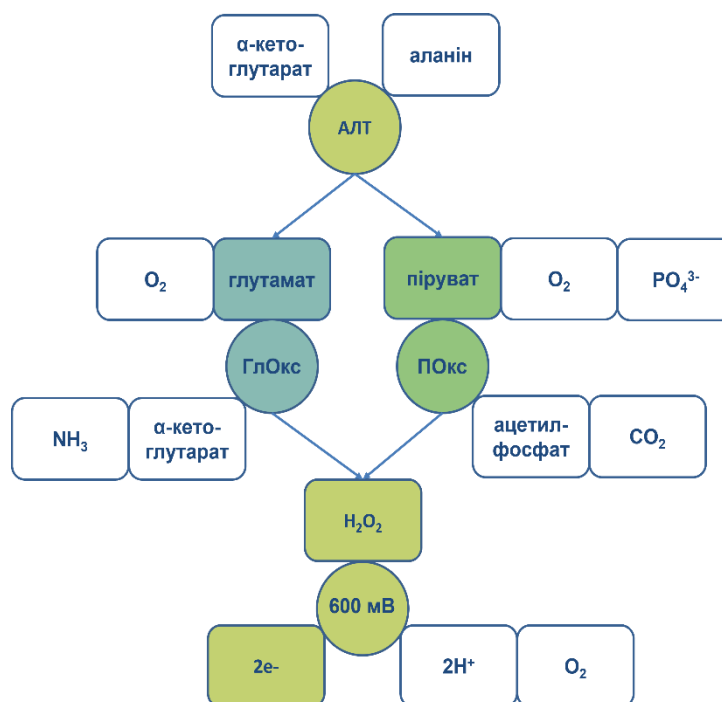


Рис. 3.17. Принцип роботи біоселективного елементу АЛТ-чутливого біосенсора на основі ГлОкс та ПОкс

3.3.1 Розробка та оптимізація АЛТ-чутливого біосенсора на основі ГлОкс. Спочатку було розроблено АЛТ-чутливий біосенсор на основі ГлОкс. АЛТ каталізує подібну до АСТ реакцію трансамінування, з однією лише відмінністю: донором аміногрупи замість аспартату виступає аланін (рис. 3.17, розділ 1.1 реакція (1.1) з перетворенням на піруват в процесі дезамінування. При цьому акцептором аміногрупи в обох випадках виступає α -КГ, відповідно, обидва ензими мають спільний продукт – глютамат. Завдяки цьому конструкція АЛТ-чутливого біосенсора максимально подібна до АСТ-чутливого біосенсора (розробка якого наведено у попередньому розділі 3.2), а для отримання робочого біосенсора необхідні мінімальні модифікації, що є доволі універсальним в разі обмежених ресурсів медзакладу або виробництва.

3.3.1.1 Вибір процедури формування біоселективної мембрани на основі ГлОкс та складу робочого буферного розчину. Біоселективний матеріал в даному біосенсорі використано такий самий, що і в попередньо описаному біосенсорі для детекції АСТ, - глутаматоксидаза, обладнання та умови середовища також спільні для обох біосенсорів, що дозволяє припустити, що оптимальна процедура іммобілізації біоселективного матеріалу на поверхні електроду буде однаковою для обох біосенсорів. Відповідно, була використана підібрана в попередньому розділі процедура формування біоселективної мембрани (розділ 3.2.1), а саме: ковалентна перехресна зшивка, концентрація ГА 0,5%, співвідношення гелів ензим:ГА 1:2, тривалість 35 хвилин. Вплив буферу на біоселективну мембрану також був аналогічним до попередніх досліджень (розділ 3.2.2).

3.3.1.2 Підбір оптимальних концентрацій коензиму та субстратів АЛТ для біосенсорного аналізу. Структура АЛТ та реакція, яку вона каталізує максимально подібні до АСТ. Відповідно, при розробці біосенсора для детекції АЛТ необхідно зважати на ті самі обмеження: необхідність забезпечення максимальної навантаженості ензиму, неоднакові коефіцієнти спорідненості субстратів до активного центру, імовірність субстратного інгібування тощо. Відповідно, було вирішено підібрати оптимальні концентрації субстратів для найкращого функціонування біосенсора на основі ГлОкс для визначення вмісту АЛТ.

Оскільки для визначення АЛТ використовувався той самий ГлОкс-біосенсор, що й для АСТ, основні параметри робочого середовища залишалися незмінними (рН 7,4, HEPES 20 мМ, тощо) (розділ 3.2.2). Для встановлення впливу концентрації аланіну на величину відгуків біосенсора було обрано базову концентрацію другого субстрату α -КГ на рівні 1 мМ. Додатково кофактор ПФ не вносили в робочий розчин, оскільки теоретично його вміст у комерційному препараті ензиму повинен бути на рівні, достатньому для забезпечення роботи АЛТ. В ході досліджень встановлено, що відгук

біосенсора зростав до 5 мМ аланіну, після чого спостерігалось зниження сигналу (рис. 3.18а), ймовірно, внаслідок вже згаданого субстратного інгібування або осмотичного ефекту [171]. Оптимальний діапазон становив 3-5 мМ, тому для подальших вимірювань обрано концентрацію аланіну 4 мМ.

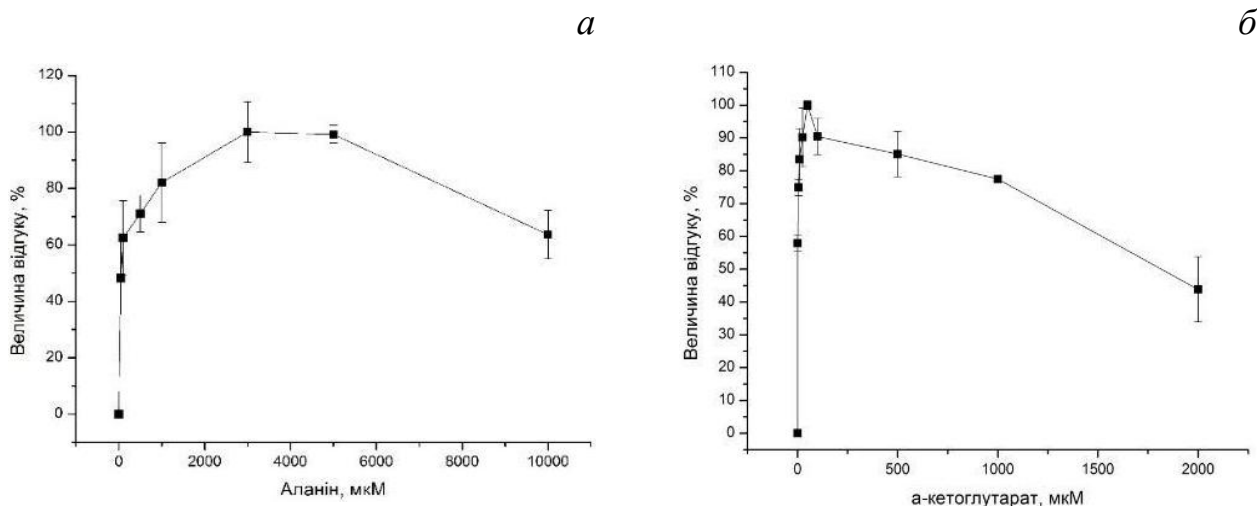


Рис. 3.18. Залежність відгуку біосенсора на основі ГлОкс від концентрації аланіну (а) при концентрації α -КГ 4 мМ. Залежність відгуку біосенсора від концентрації α -КГ (б) при концентрації аланіну 4 мМ. Концентрація АЛТ – 100 Од.акт./л. На обох графіках за 100% взято максимальний відгук біосенсора на 100 Од.акт./л АЛТ

Наступний експеримент було присвячено вибору оптимальної концентрації α -КГ для досягнення найкращої чутливості біосенсора на основі ГлОкс при визначенні активності АЛТ в розчині. Отримані експериментальні дані демонстрували різкий спад чутливості біосенсора до АЛТ при підвищенні вмісту α -КГ більше 50 мкМ (рис. 3.18б). Це свідчить про його високу спорідненість до ензиму, в результаті чого висока енергія зв'язків не дозволяє вільного розриву системи АЛТ- α -КГ. Це призводить до того, що ензим не може дезамінувати коензим і перенести аміногрупу на α -КГ, що, в свою чергу, сповільнює протікання реакції. Крім того, α -КГ також утворюється в якості продукту окиснення глутамату, що поновлює його кількість в робочому розчині. Таким чином, теоретичне оптимальне співвідношення аланіну до α -КГ (70:1, 28 мМ аланіну та 0,4 мМ α -КГ згідно літературних джерел [172])

досить близько збігається з отриманим в ході експериментів, хоча самі концентрації значно нижчі (80:1, 4 мМ аланіну та 0,05 мМ α -КГ). Відповідно, для подальшої роботи використовувалось 4 мМ аланіну та 0,05 мМ α -КГ.

Всі аміотрансферази мають схожий механізм реакції і, відповідно, всі потребують наявності простетичної групи – активної форми вітаміну В або піридоксаль-5-фосфату (ПФ). ПФ діє як проміжний переносник аміногруп в активному центрі аміотрансфераз [173-174]. Він зазнає оборотних перетворень між своєю альдегідною формою (яка може приймати аміногрупу) і амінованою формою (яка може віддавати свою аміногрупу α -кетокислотам). ПФ ковалентно зв'язаний з активним сайтом ензиму через альдімінний зв'язок (основа Шиффа) з ϵ -аміногрупою на залишку лізину [175]. Хімічна роль ПФ полягає в наступному: в ході трансамінування альдімінний зв'язок ПФ з ензимом замінюється на такий самий, але з α -аміногрупою амінокислоти, один протон на субстраті видаляється і залишається вільна електронна пара на вуглеці, тобто утворюється карбаніон. Цей проміжний продукт дуже нестабільний і утворюється з малою швидкістю. ПФ забезпечує сильно спряжену структуру (акцептор електронів), яка дозволяє делокалізувати негативний заряд, стабілізуючи карбаніони. Після цього послідовно утворюються хіноїдний проміжний продукт та кетимін. Останній розпадається на нову α -кетокислоту та амінований ПФ. Наступний етап трансамінування починається з приєднання другого субстрату до комплексу АЛТ-ПФ-NH₂, а саме α -кетокислоти α -КГ, і процес йде в обернену сторону з утворенням нової амінокислоти (глутамату) та ПФ [176-178].

Оскільки ПФ є коензимом АЛТ, тобто не виснажується в ензиматичній реакції, було передбачено, що для оптимальної роботи біосенсора не потрібна висока концентрація ПФ у робочій комірці. Також було передбачено, що надлишок ПФ може призвести до погіршення ефективності ензиму через підвищений обмін молекулами між середовищем та комплексом АЛТ-ПФ, що перериватиме протікання 2-го етапу реакції АЛТ. Експериментальні дані

підтвердили передбачену залежність і показали, що оптимальна концентрація ПФ у робочій комірці становить 50 мкМ (рис. 3.19).

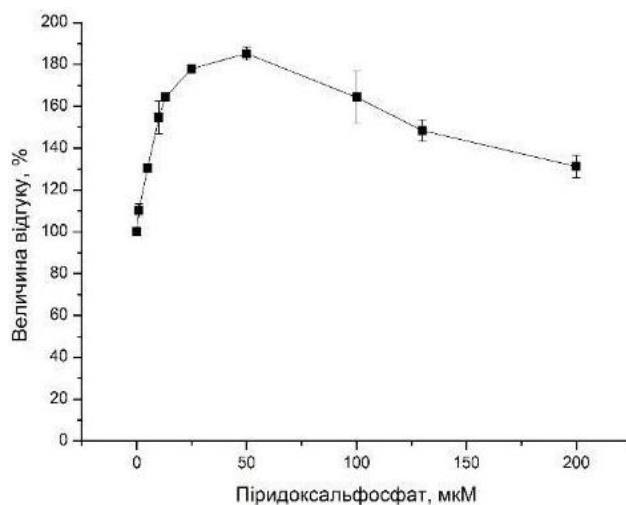


Рис. 3.19. Залежність відгуку біосенсора від концентрації ПФ в робочій комірці. Концентрація аланіну — 4 мМ, α -КГ — 50 мкМ, АЛТ — 100 Од.акт./л. За 100% взято величину відгуку біосенсора на 100 Од.акт./л АЛТ без коензиму

3.3.1.3 Дослідження аналітичних характеристик АЛТ-чутливого біосенсора на основі ГлОкс. Розроблений АЛТ-чутливий біосенсор на основі ГлОкс характеризувався широким лінійним діапазоном визначення активності АЛТ (10-500 Од.акт./л). В додатку 4 показано калібрувальну криву біосенсора для визначення активності АЛТ, з якої видно, що чутливість становила 0,26 нА/хв на 50 Од.акт./л АЛТ. Калібрувальну залежність описано рівнянням лінійної регресії $I = bC + a$, де I — відгук біосенсора (нА/хв), C — активність аланінамінотрансферази (Од.акт./л), a — вільний коефіцієнт, b — чутливість біосенсора (нА·л/Од.акт.). Мінімальна межа визначення, розрахована за критерієм 3σ (де σ — шум базової лінії), становила 2,5 Од.акт./л. Тривалість вимірювання після виходу на лінійний інтервал становила 290 с. Тривалість усього аналізу, враховуючи промивання, первинну стабілізацію базової лінії та стабілізацію базової лінії після введення субстратів, становила близько 10 хвилин. Всі аналітичні характеристики наведено в таблиці 3.3.

**Аналітичні характеристики розробленого біосенсора на основі ГлОкс
для визначення АЛТ**

Характеристика біосенсора	Значення
Чутливість до АЛТ	0,26 нА/хв на 50 од.акт./л
Лінійний діапазон	10,0-500,0 од.акт./л
Динамічний діапазон	1,0-500,0 од.акт./л
Мінімальна межа визначення	2,5 од.акт./л
Рівняння прямої лінійної ділянки калібрувальної кривої	$\Delta I = 0,00454 \cdot C + 0,03346$
Тривалість відгуку на АЛТ	1,0 хв
Тривалість лінійної ділянки відгуку	290 сек
Тривалість аналізу	10,0 хв

3.3.1.4 Дослідження стабільності АЛТ-чутливого біосенсора на основі ГлОкс. Важливим аспектом характеризації розробленого біосенсора є всебічна оцінка його стабільності, яка включає дослідження операційної стабільності (відтворюваність сигналів протягом безперервних вимірювань), стабільності при зберіганні та відтворюваності процедури приготування сенсора. Ці параметри визначають практичну придатність біосенсора для рутинного біохімічного аналізу.

Спочатку було досліджено відтворюваність сигналів біосенсорів протягом безперервних вимірювань в умовах, наближених до реальної аналітичної практики. Експеримент проводили при кімнатній температурі з інтервалом між вимірюваннями 30 хвилин. Між послідовними вимірюваннями біосенсор знаходився в електрохімічній комірці з робочим буферним розчином при постійному перемішуванні. Після кожного вимірювання систему промивали тим же буферним розчином для видалення залишків субстратів та продуктів реакції. Для оцінки відтворюваності було отримано серію з 9 послідовних відгуків на стандартний розчин АЛТ з активністю 100

Од.акт./л (рис. 3.20а). Встановлено, що відносне стандартне відхилення (RSD) становило 7,66%.

Для оцінки операційної стабільності розробленого біосенсора було проведено серію безперервних вимірювань протягом 3 днів. Експеримент полягав у періодичному (кожні півтори години) внесенні стандартного розчину АЛТ активністю 100 Од.акт./л у робочу комірку з реєстрацією відгуку біосенсора. Між вимірюваннями сенсор залишався у робочій комірці з буферним розчином за умов постійного перемішування (рис. 3.20б). Отримані результати продемонстрували, що зниження чутливості відбувалося переважно протягом першого дня, після чого сигнал біосенсора стабілізувався. Через 3 доби тестування залишкова чутливість біосенсора становила $89 \pm 3\%$ від початкової чутливості, що лежить майже в межах похибки вимірювання. Проте, за умови щоденного використання, бажано проводити додаткові калібрування біосенсора перед початком роботи.

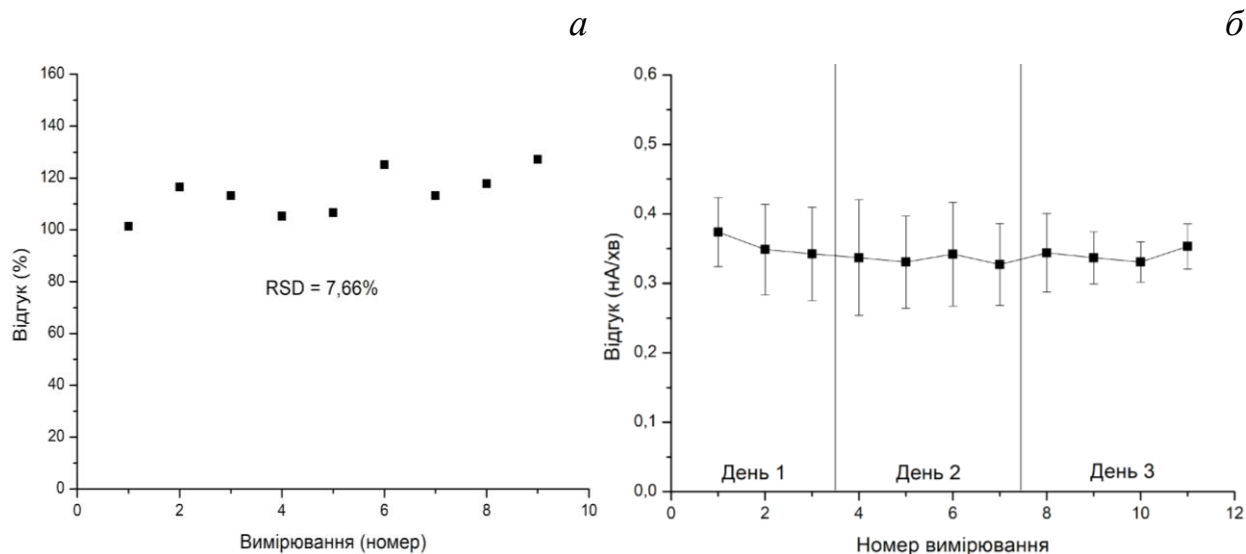


Рис. 3.20. Відтворюваність відгуків розробленого біосенсора протягом доби (а). Операційна стабільність розробленого біосенсора (б). Концентрація аланіну – 4 мМ, α -КГ – 50 мкМ, ПФ – 50 мкМ, АЛТ – 100 Од.акт./л

3.3.1.5 Дослідження роботи АЛТ-чутливого біосенсора на основі ГлОкс в присутності АСТ. Оскільки даний біосенсор розроблявся як складова частина більш складної біосенсорної системи для одночасного визначення АЛТ та АСТ, необхідно було перевірити здатність розробленого біосенсора працювати в присутності АСТ. Оскільки він має однаковий принцип роботи з АЛТ, існує велика імовірність його впливу на функціонування розробленого біосенсора. Тому було вирішено перевірити даний аспект. Перевірка здійснювалась двома способами: послідовним внесенням в робочий розчин субстратів, АЛТ, а потім АСТ (рис. 3.21а), та навпаки – субстрати, АСТ та АЛТ (рис. 3.21б). В першому випадку після додавання АСТ в робочу комірку з біосенсором чутливим до АЛТ спостерігалось явне збільшення кута нахилу прямої, що відповідала силі струму в системі. А в другому – присутність в комірці субстратів та АСТ не спричиняла відгуку системи, але після внесення АЛТ швидкість зростання сили струму в системі була більша, порівняно з додаванням до комірки лише АЛТ.

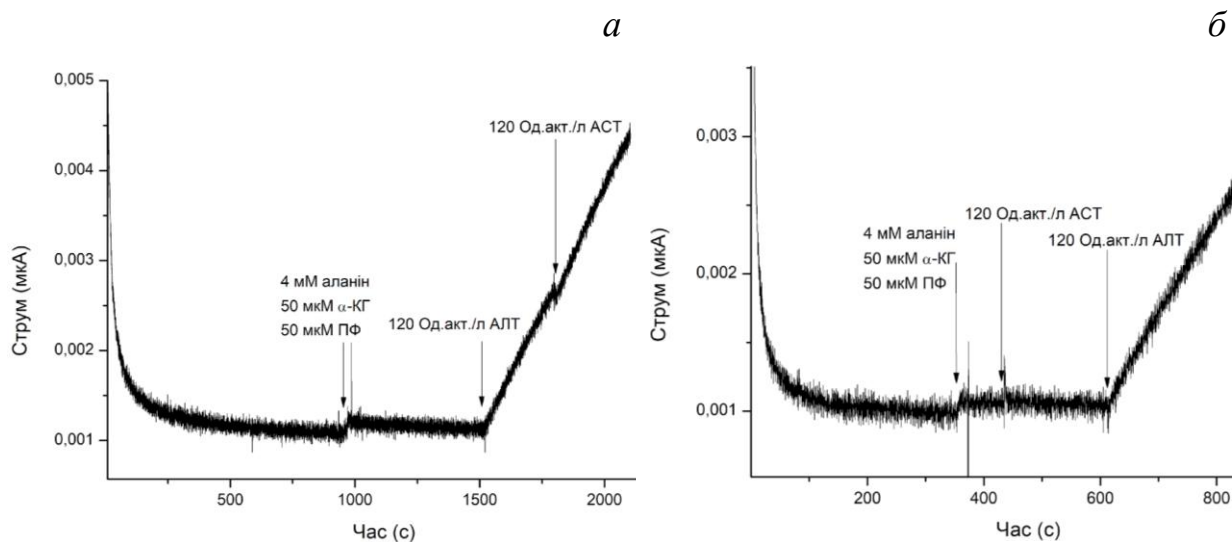


Рис. 3.21. Сигнали біосенсора на введення 120 Од.акт./л АЛТ, а потім 120 Од.акт./л АСТ (а) та 120 Од.акт./л АСТ, а потім 120 Од.акт./л АЛТ (б), за присутності субстратів та коензиму (4 мМ аланіну, 50 мкМ α -КГ, 50 мкМ ПФ)

Таким чином, в ході експерименту ми спостерігали зростання відгуків АЛТ-чутливого біосенсора на 10% в присутності АСТ (рис. 3.22). Оскільки цей показник знаходився в межах похибки вимірювання, ефект, спричинений присутністю АСТ у розчині, було вирішено вважати прийнятним для нормального функціонування біосенсора в складних біологічних розчинах. У майбутньому, коли цей біосенсор буде працювати в складі біосенсорної системи вплив АСТ та визначення АЛТ можна буде математично врахувати.

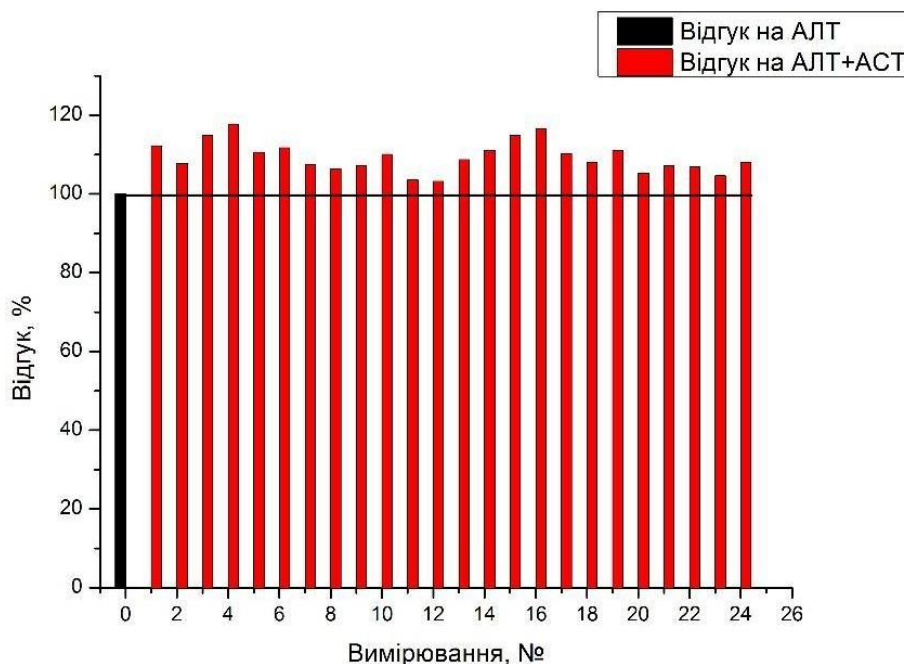


Рис. 3.22. Вплив присутності 120 Од.акт./л АСТ на величину відгуків АЛТ-чутливого біосенсора на 100 Од.акт./л АЛТ. За 100% взято величину відгуку біосенсора на 100 Од.акт./л АЛТ. Концентрація аланіну – 4 мМ, α -КГ – 50 мкМ, ПФ – 50 мкМ

Зростання відгуків можна пояснити спільним другим етапом роботи цих ензимів та наявністю в робочому розчині мобільного коензиму. По завершенню першого етапу (рис. 3.23-1) ПФ-NH₂ може від'єднатися від АЛТ. Якщо після цього ПФ-NH₂ приєднується до АСТ, то остання починає другий етап трансамінування – перенесення аміногрупи з коензиму на α -КГ (рис. 3.23-2). При цьому, звільнений від коензиму АЛТ повторює перший етап. Таким чином, загальна швидкість трансамінування зростає. Але, вірогідність

приєднання ПАФ до АСТ досить низька, оскільки в розчині в надлишку знаходяться субстрати реакції, тобто α -КГ приєднається до АЛТ швидше, ніж від'єднається ПФ-NH₂.

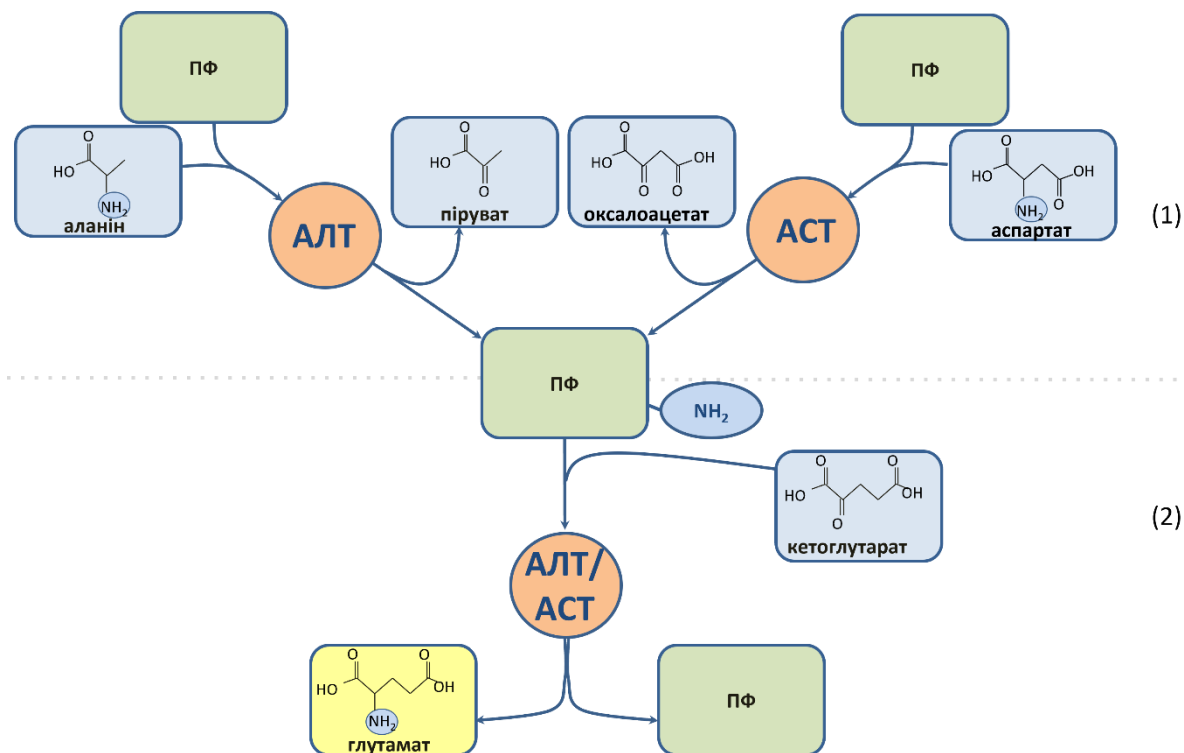


Рис. 3.23. Схема ензиматичних реакцій, що каталізуються трансаміназами. ПФ – піридоксальфосфат, АЛТ – аланінамінотрансфераза, АСТ – аспаратамінотрансфераза

3.3.2 Розробка АЛТ-чутливого біосенсора на основі ПОкс. Оскільки АЛТ-чутливий біосенсор на основі ГлОкс вимагатиме додаткової математичної обробки результатів для розрахунку вмісту кожної з трансаміназ в зразку при одночасному вимірюванні, було вирішено розробити альтернативний АЛТ-чутливий сенсор з іншим проміжним аналітом та порівняти їх перспективність до включення в біосенсорну систему для одночасної детекції АСТ і АЛТ. Для цього було використано ПОкс, яка каталізує реакцію між піруватом та фосфат-іонами за участі кофакторів ТПФ та іонів магнію (розділ 3.3 рис. 3.17).

3.3.2.1 Розробка процедури формування біоселективної мембрани на основі ПОкс

3.3.2.1.1 Вибір методу іммобілізації, підбір оптимальної концентрації PVA-SbQ та умов іммобілізації. Іммобілізація компонентів біоселективного елемента безпосередньо впливає на ефективність будь-якого біосенсора, тому було вирішено обрати методику, за яких біосенсор працюватиме найкраще. Спочатку розглядалася ковалентна зшивка за допомогою ГА, оскільки цей метод іммобілізації зазвичай утворює міцні зв'язки та стабільну мембрану. А саме, були протестовані варіанти іммобілізації ПОкс в краплі ГА при кімнатній температурі та при 4 °C, в парах ГА при кімнатній температурі, тощо). Однак отримані результати були незадовільними: ензиматична активність різко зменшувалась після іммобілізації, сама процедура була невідтворювана, і стабільності роботи не спостерігалось. Тому був обраний більш м'який метод, а саме захоплення у фотополімер PVA-SBQ. Захоплення включає формування *in situ* полімерної матриці навколо молекул ензиму, фізично обмежуючи їх рух. Цей метод дає дещо менш механічно стабільну мембрану, але уникає змін конформації білка та деформації активного центру, що особливо актуально для менш стабільної ПОкс.

Для формування найстабільнішої мембрани біосенсора досліджували різні концентрації фотополімеру, співвідношення ензим-фотополімер та потужність застосованого ультрафіолетового випромінювання під час іммобілізації. При виборі оптимальної концентрації фотополімеру найвищі відгуки біосенсора на високі концентрації пірувату та найдовший динамічний діапазон були досягнуті при концентрації PVA-SbQ – 26,4% (рис. 3.24a), але висока в'язкість суміші ускладнює процес іммобілізації та збільшує імовірність формування неоднорідної мембрани та погіршення відтворюваності процедурами іммобілізації. Тому було вирішено надалі використовувати нижчу концентрацію PVA-SbQ (19,8%), за якої нанесення суміші для іммобілізації більш рівномірне, а на низьких концентраціях

пірувату спостерігались найвищі відгуки незважаючи на коротший динамічний діапазон роботи.

Дослідження впливу кількості енергії, випроміненої УФ-лампами в ході іммобілізації, на величину відгуків біосенсора на основі ПОкс (рис. 3.24б) продемонструвало дзвоноподібну залежність з чітким оптимумом на 2,4 Дж/см² (отриманих протягом 8 хв). Менша кількість випроміненої енергії не забезпечувала формування достатньої кількості полімерних ланцюгів PVA-SbQ для утримання ензиму на поверхні електроду, що спричиняло його швидке вимивання та низьку стабільність біосенсора. Кількість випроміненої енергії більша за 2,4 Дж/см² негативно впливала на активність ензиму, знижуючи ефективність його роботи.

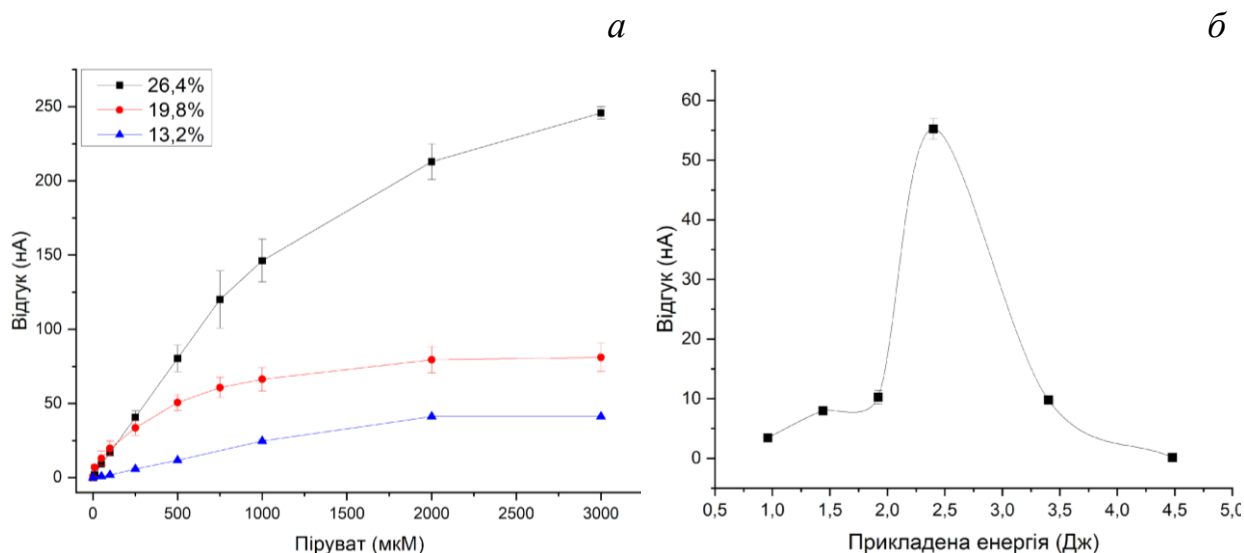


Рис. 3.24. Порівняння калібрувальних кривих біосенсора на основі ПОкс іммобілізованого за різних концентрацій PVA-SbQ (а). Залежність величини відгуку біосенсора від прикладеної енергії УФ-лампи під час іммобілізації ензиму (б). Концентрація пірувату становила 100 мкМ. Концентрація фосфат-іонів становила 5 мМ, ТПФ - 2 мМ, магнію - 0,5 мМ. Вимірювання проводили в 25 мМ HEPES

3.3.2.1.2 Оцінка біоселективної мембрани на основі ПОкс.

Аналогічно до біосенсора на основі ГлОкс, в АЛТ-чутливому біосенсорі на основі ПОкс вимірювання відбувається через проміжний аналіт – піруват. Відповідно, необхідно було оцінити ефективність біоселективного елементу.

Для цього було визначено та проаналізовано аналітичні характеристики (табл. 3.4) біосенсора відносно проміжного аналіту. Межа виявлення пірувату становила 0,25 мкМ, що дозволяє визначати концентрацію пірувату в розведених зразках біологічних рідин. Лінійний діапазон розробленого біосенсора становив від 1 до 750 мкМ (Додаток Е), а чутливість до пірувату – 573 нА/мМ. Такі характеристики дозволяють припустити, що чутливість біосенсора на основі ПОкс при вимірюванні АЛТ буде трохи вищою порівняно з біосенсором на основі ГлОкс.

Таблиця 3.4

Аналітичні характеристики розробленого АЛТ-чутливого біосенсора на основі ПОкс відносно проміжного аналіту – пірувату

Характеристика біосенсра	Значення
Чутливість	$573 \pm 8,74$ нА/мМ
Лінійний діапазон	1 – 750 мкМ
Межа виявлення	0,25 мкМ
Динамічний діапазон	0,25 – 2000 мкМ
Рівняння прямої лінійної ділянки калібрувальної кривої	$\Delta I = 0,6567 \cdot C + 0$
Відтворюваність іммобілізації (RSD)	9,0 %
Відтворюваність сигналу (RSD)	4,9 %
Шум базової лінії	$0,45 \pm 0,15$ нА

Оскільки для будь-якого аналітичного приладу, зокрема і біосенсору, ключовими аналітичними параметрами є точність і повторюваність результатів, було вирішено дослідити відтворюваність величини відгуків

розробленого біосенсора при безперервній роботі (рис. 3.25а). Середнє квадратичне відхилення відгуків біосенсора на проміжний аналіт склало 4,9%. Стабільність роботи біосенсора протягом кількох днів зі зберіганням в сухому вигляді при $+8^{\circ}\text{C}$ між днями також було перевірено (рис. 3.25а).

Аналогічно до відтворюваності відгуків біосенсора, відтворюваність іммобілізації біологічного матеріалу відіграє ключову роль не лише для надійності сенсора, але й для масштабованості та комерційного впровадження технології, оскільки вона забезпечує стабільність сигналу та дозволяє проводити повторні вимірювання з мінімальною варіабельністю. Після оцінки 10 різних сенсорів було встановлено, що середнє квадратичне відхилення відгуків між іммобілізаціями становило 9% (рис. 3.25б), що є достатньо високим показником. Таку різницю можна пояснити змінами зовнішніх умов під час іммобілізації (температури, вологості тощо) та ручним нанесенням мембрани на поверхню перетворювачів, що не дозволяє забезпечити максимально рівномірні умови під час іммобілізації ензимів.

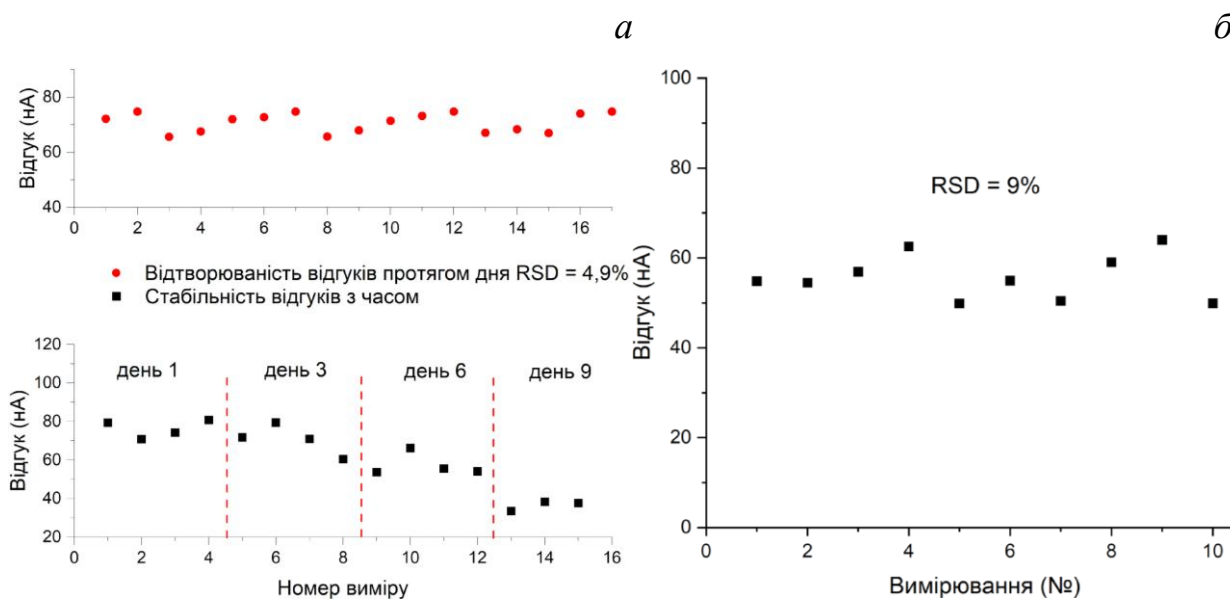


Рис. 3.25. Відтворюваність та стабільність відгуків біосенсора на основі ПОкс за умови безперервної роботи (а). Відтворюваність процедури іммобілізації біосенсорів на основі ПОкс (б). Концентрація пірувату становила 100 мкМ, фосфат-іонів - 5 мМ, ТПФ - 2 мМ, магнію - 0,5 мМ

3.3.2.2 Дослідження впливу параметрів робочого середовища на роботу АЛТ-чутливого біосенсора на основі ПОкс. Як вже згадувалось в попередніх розділах, для оптимальної роботи біосенсора важливим фактором є параметри робочого буферу, оскільки саме в ньому протікають біохімічні реакції та забезпечується необхідні конформації реагентів та процеси пасивної дифузії. До параметрів робочого буфера можна віднести тип буферу, буферну ємність, рН, іонну силу, температуру, концентрацію білку у розчині, насиченість киснем та іншими газами тощо.

3.3.2.2.1 Дослідження впливу буферної ємності, рН та йонної сили розчину на функціонування біосенсора на основі ПОкс. Важливим параметром будь якого буферу є його буферна ємність, що дозволяє підтримувати сталий рН реакційної суміші навіть під час аналізу складних біологічних зразків, забезпечуючи правильну конформацію активного центру ензиму та найбільш доступну іонізовану форму субстратів. Оскільки для розробленого раніше АСТ-чутливого біосенсора було встановлено оптимальні умови роботи з використанням HEPES-буфера (розділ 3.2.2.2), для АЛТ-біосенсора також обрано цей тип буферної системи з метою забезпечення уніфікованих умов вимірювання, що є критично важливим для подальшого об'єднання обох біосенсорів у єдину систему одночасної детекції активностей АСТ та АЛТ.

Дослідження впливу концентрації буфера на роботу біосенсора на основі ПОкс показала, що найвищі відгуки спостерігалися при 100 мМ. Це пов'язано з необхідністю підтримувати сталий рН та йонну силу в ході ензиматичної реакції, оскільки біоселективний елемент взаємодіє з великою кількістю заряджених молекул. Також концентрований буфер може краще елімінувати вплив активних форм кисню, що утворюються в результаті активності ензиму. Однак, для подальшої роботи було вирішено використовувати буфер з концентрацією HEPES 25 мМ. При цьому значенні концентрації HEPES було отримано значно швидшу стабілізацію сигналу після внесення аналіту та

найменшу похибку вимірювання, зберігаючи при цьому достатньо високу величину відгуку (91,5%, рис. 3.26а). Збільшення часу реакції при вищих концентраціях буфера (до 540% при 200 мМ) можна пояснити надмірною буферною ємністю, яка перешкоджає формуванню проміжних форм реагентів, необхідних для каталізу в активному центрі ПОкс.

Іншим ключовим параметром для ензимних біосенсорів є рН, оскільки він впливає на конформацію та активність ензимів через іонізацію функціональних груп білка. Для роботи зі зразками сироватки крові було обрано рН 7,4 (відповідає фізіологічному рН 7,35-7,45). Дослідження залежності відгуку ПОкс-біосенсора від рН (рис. 3.26Бб) підтвердило, що за рН 7,4 відгуки є близькими до максимальних, що задовольняє вимоги для визначення АЛТ у зразках сироватки крові.

Крім того відомо, що в крові наявна велика кількість вільних іонів (282,5 мМ/л) [179], які можуть впливати на рН, конформацію ензиму та константи зв'язування субстратів, тому було досліджено вплив іонної сили на роботу ПОкс-біосенсора. Аналіз відгуків у присутності NaCl (10-200 мМ) показав, що висока концентрація іонів спричиняла суттєве зниження сигналу — до 40,7% при 100 мМ NaCl [180]. Проте, враховуючи 10-кратне розведення зразків крові перед аналізом, очікуване падіння відгуку при роботі зі зразками крові не перевищуватиме 12,6%, що є прийнятним для аналітичних цілей.

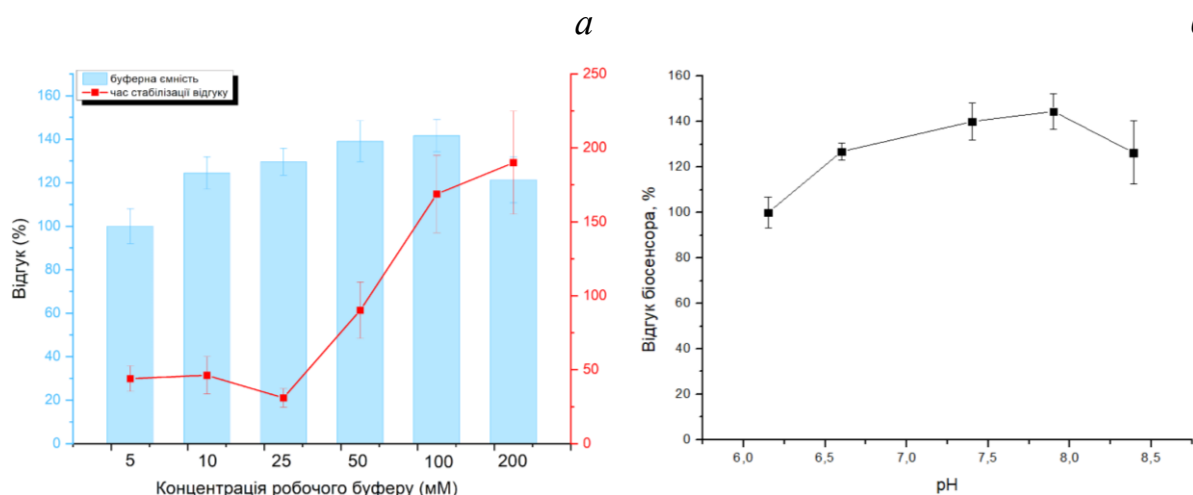


Рис. 3.26. Залежність величини (стовпці) та швидкості (крива) відгуку біосенсора на піруват при різній буферній ємності робочого розчину (а). Концентрація фосфат-іонів становить 5 мМ, ТРР – 2 мМ, магнію – 0,5 мМ, пірувату – 300 мкМ. Залежність величини відгуків біосенсора на основі ПОкс від рН буферного розчину (б). Концентрація пірувату – 1 мМ, інші реагенти в тому ж складі

3.3.2.2.2 Аналіз впливу білку в розчині на біосенсорні вимірювання.

Вплив білкових молекул на функціонування біосенсорів було описано в розділі 3.2.2.3 Вплив вмісту білку в матриці на функціонування біосенсора на основі ГлОкс. Відповідно до високої значимості питання, АЛТ-чутливий біосенсор на основі ПОкс також було досліджено відносно цього параметру. Отримані результати (рис. 3.27) демонструють, що наявність молекул БСА в робочому розчині в концентрації 1% спричиняє падіння відгуків біосенсора на проміжний аналіт на 39%, що є значущим. Проте, даний вплив сильніше проявляється на високих концентраціях аналіту, що можна зменшити за рахунок розведення. До того ж, цей вплив іонної сили може бути нівельований застосуванням методу стандартних додавань або методу пропорції під час аналізу зразків сироватки.

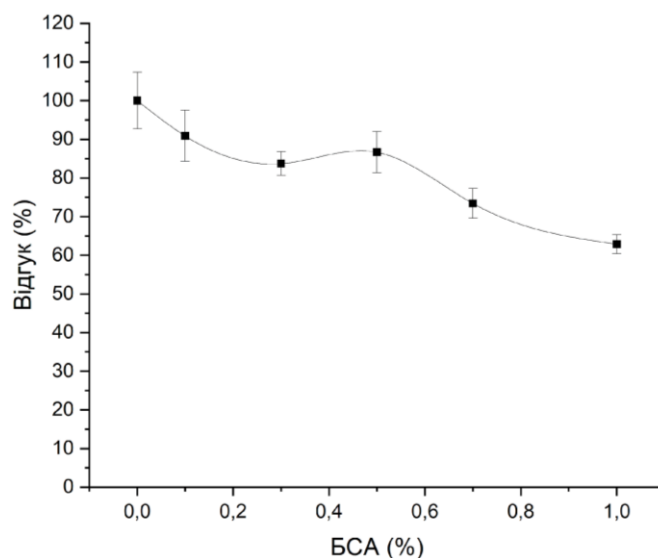


Рис. 3.27. Вплив білка на величину відгуку біосенсора на основі РОх. Концентрація фосфат-іонів становить 5 мМ, ТПФ – 2 мМ, магнію – 0,5 мМ, пірувату – 100 мкМ

3.3.2.2.3 Дослідження селективності АЛТ-чутливого біосенсора на основі ПОкс. Детальний аналіз впливу інтерферентів на відгук ензиматичних амперометричних біосенсорів та механізмів їхнього відсікання напівпроникними мембранами наведено раніше в розділах 3.1.2 та 3.2.2.4 при характеристиці АСТ-чутливого біосенсора. В результаті дослідження селективності розробленого біосенсора на основі ПОкс для визначення активності АЛТ, було отримано відгук на допамін на рівні 20% відгуку на піруват, незначні відгуки на аскорбінову кислоту та цистеїн (до 2%) та відсутність реакції на ряд інших речовин (рис. 3.28). З урахуванням визначення лінійної, а не моментальної, зміни сили струму з часом в якості відгука біосенсора на АЛТ, можна знехтувати даним впливом електроактивних речовин.

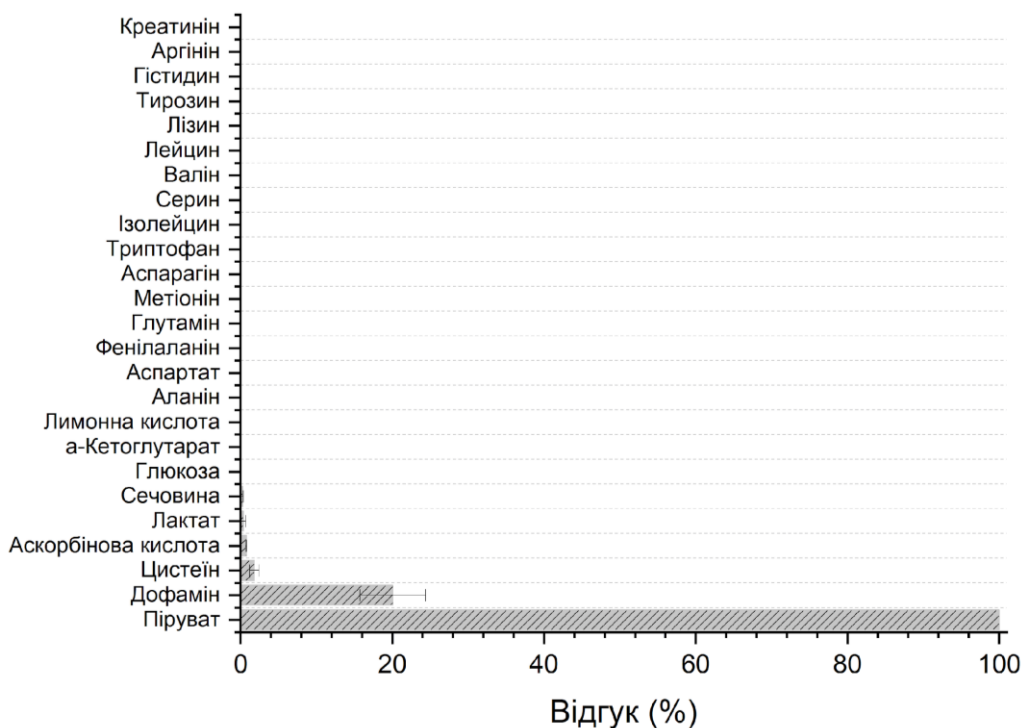


Рис. 3.28. Селективність біосенсора на основі ПОкс відносно проміжного аналіту (пірувату) в присутності різних інтерферентів в концентрації 100 мкМ. Концентрація фосфат-іонів становить 5 мМ, ТПФ – 2 мМ, магнію – 0,5 мМ, пірувату – 100 мкМ

3.3.2.3 Вибір оптимальних концентрацій коензиму, кофактору і косубстрату ПОкс для біосенсорного вимірювання. Як відомо з описаного вище принципу роботи АЛТ-чутливого біосенсора на основі ПОкс (розділ 3.3.2), ензиматична реакція окиснення пірувату (розділ 1.3.2.1.1 реакція (1.5)) вимагає участі додаткових субстратів (фосфат іони), коензимів (тіамінпірофосфат (ТПФ) і флавінаденіндинуклеотид (ФАД)) та кофакторів (іони магнію).

Для максимально ефективного і коректного визначення концентрації аналіту ензиматичним біосенсором необхідно забезпечити максимальну швидкість ензиматичної реакції, що лежить в основі роботи цього біосенсору на основі ПОкс. Для цього необхідно підібрати оптимальний вміст усіх учасників ензиматичної реакції, оскільки їх надлишок або дефіцит може

спричинити лімітування реакції. Тому наступним завданням нашої роботи був вибір оптимальних концентрацій субстратів, коензимів і кофакторів ПОкс.

ФАД – це коензим ПОкс, який бере участь у різних окисно-відновних реакціях. У цьому випадку ФАД є акцептором електронів, що утворюється в результаті декарбоксилювання пірувату [181], а також опосередковано бере участь в асоціації комплексу Mg^{2+} -ТПФ у місцях зв'язування ензиму [182]. Оскільки ми використовували ПОкс, пов'язаний з ФАД, не було потреби оптимізувати цей параметр.

Іони фосфату є одним з ключових компонентів біосенсора як косубстрат ПОкс. Було проаналізовано залежність відгуків біосенсора на основі ПОкс від концентрації фосфатів (рис. 3.29). Показано, що оптимум становить 5 мМ фосфатів, про що свідчить найбільша чутливість біосенсора до пірувату. При збільшенні концентрації фосфат-іонів вище 5 мМ спостерігалось інгібування ензиматичної реакції. Це інгібування можна пояснити зв'язуванням іонів магнію вільними фосфат-іонами, що зменшує кількість доступного магнію для взаємодії з ТПФ, а також загальним інгібуванням активності ензимів за наявності високої концентрації вільних іонів у робочому розчині.

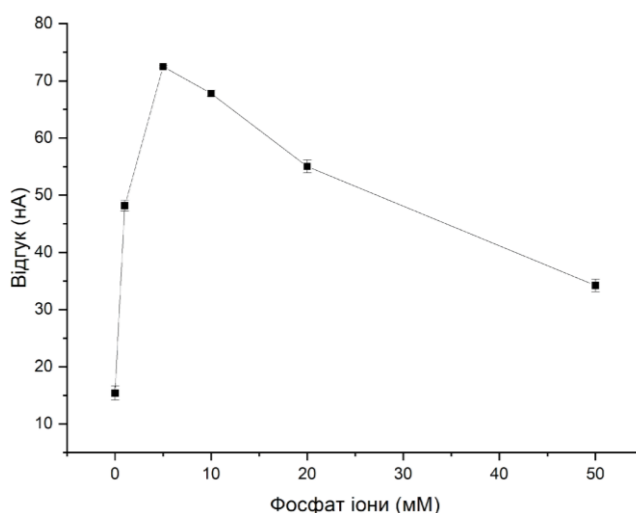


Рис. 3.29. Залежність величини сигналів біосенсора від концентрації іонів фосфату в розчині. Концентрація пірувату - 1 мМ, тіаміну пірофосфату - 2 мМ, іонів магнію - 0,5 мМ

Коензим тіамініпрофосфат (ТПФ) зв'язується з активним центром ПОкс через пірофосфатний фрагмент за участю іона Mg^{2+} , який забезпечує правильну орієнтацію коензиму відносно субстрату [183]. Для визначення оптимальної концентрації ТПФ було порівняно величини відгуку біосенсора на внесення пірувату при різних концентраціях ТПФ (0,05-5 мМ) у розчині. Збільшення відгуків біосенсора на піруват спостерігалось при зростанні концентрації ТПФ до 2 мМ (рис. 3.30). Оптимум концентрацій ТПФ лежав в межах 0,25-2 мМ, а при подальшому підвищенні концентрації ТПФ спостерігалось падіння величини відгуку біосенсора. Це свідчить про інгібування реакції ПОкс, яке можна пояснити конкуренцією комплексів Mg^{2+} -ТПФ та нативним ТПФ (який не має зв'язку з Mg^{2+} і не може служити ефективним коензимом) за місця зв'язування на ПОкс. Відповідно, для подальших експериментів було використано 2 мМ ТПФ.

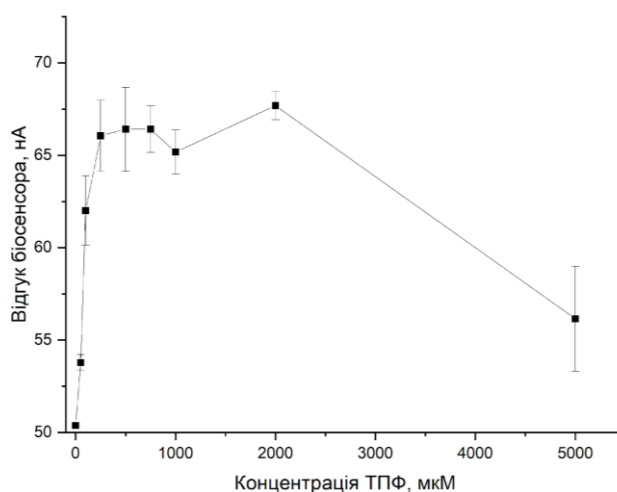


Рис. 3.30. Залежність величини сигналів біосенсора від концентрації ТПФ. Концентрація пірувату - 1 мМ, концентрація фосфат-іонів – 5 мМ, іонів магнію – 0,5 мМ

Роль іонів магнію для протікання ензиматичної реакції полягає у зв'язуванні з ТПФ та утворенні комплексу Mg^{2+} -ТПФ. Цей комплекс є «справжнім» коензимом, що бере участь у реакції. Нестача магнію може перешкоджати утворенню достатньої кількості комплексів Mg^{2+} -ТПФ для

зв'язування з ензимом. Отже, брак магнію призведе до зниження ефективності роботи ПОкс, зниження продукції H_2O_2 та, відповідно, зниження чутливості та скорочення лінійного діапазону роботи біосенсора. Після вивчення впливу магнію на продуктивність біосенсора було показано (рис. 3.31), що оптимальна концентрація Mg^{2+} становить 0,5 мМ.

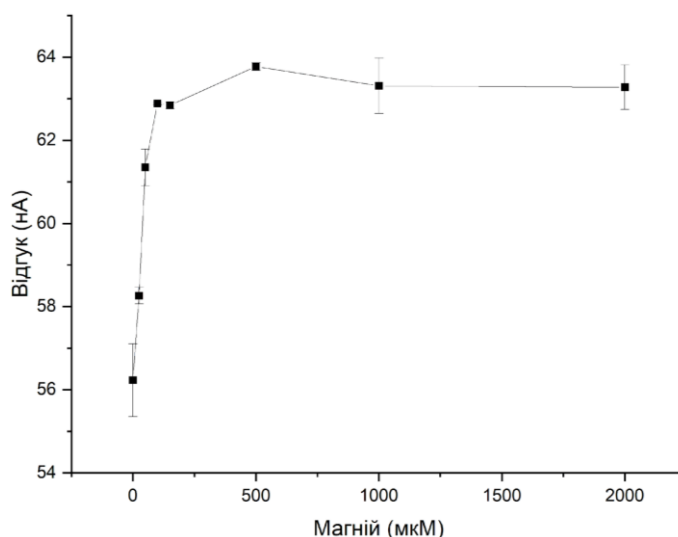


Рис. 3.31. Залежність величини відгуку біосенсора від концентрації Mg^{2+} . Концентрація пірувату – 1 мМ, концентрація фосфат-іонів – 5 мМ, тіаміну пірофосфату – 2 мМ

3.3.2.4 Вибір концентрації коензиму та субстратів для біосенсорного визначення АЛТ. Оскільки АЛТ є мультисубстратним ензимом з одним активним центром, вибір оптимальних концентрацій субстратів є критичним для забезпечення максимальної чутливості біосенсора. Згідно з літературними даними, константи Міхаеліса вільного АЛТ для L-аланіну та α -КГ становлять відповідно 28 мМ та 0,4 мМ, що визначає співвідношення приблизно 70:1 [172].

В рамках експериментального дослідження оптимального співвідношення концентрацій субстратів АЛТ для роботи біосенсора на основі ПОкс було проведено серію вимірювань з варіюванням концентрацій L-аланіну (0-15 мМ) та α -КГ (0-5,5 мМ) при фіксованій активності АЛТ 100

Од. акт./л. Встановлено, що оптимальним співвідношенням концентрацій субстратів (рис. 3.32а) для АЛТ-чутливого біосенсора на основі ПОкс є 8:1 (аланін: α -КГ). Потім був проведений підбір оптимальної концентрації субстратів при збереженні співвідношення 8:1 та встановлено, що найвищі відгуки біосенсора на АЛТ спростерігаються при 16 мМ та 2 мМ аланіну та α -КГ, відповідно (рис. 3.32б).

Таку відмінність між оптимумами концентрацій субстратів відомих з літератури (28 мМ та 0,4 мМ) та отриманих в ході наших експериментів (16 мМ та 2 мМ) можна пояснити тим, що для належного функціонування ПОкс потрібні додаткові реагенти, а саме Mg^{2+} та ТПФ, які не були використані при оцінці констант Міхаеліса вільної АЛТ. Відомо, що іони магнію утворюють комплекси з органічними сполуками, в тому числі центральними метаболітами (зокрема, глутамат, аспартат та мурашина кислота [184]). Утворені комплекси знижують доступність субстратів (в основному, α -КГ) та їх спорідненість до активного центру АЛТ, змінюючи кінетику реакції та оптимальні концентрації субстратів.

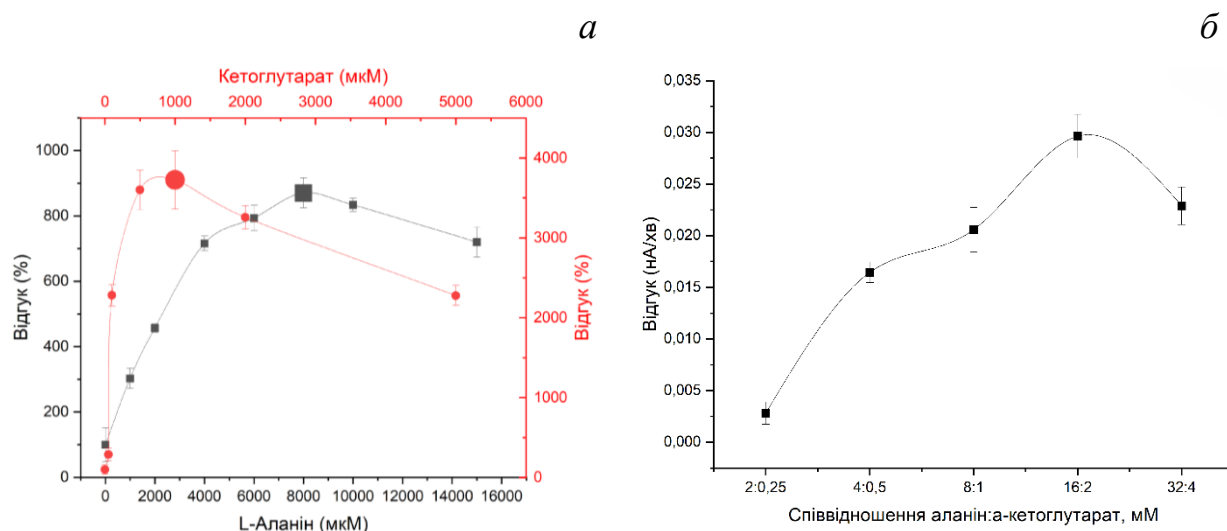


Рис. 3.32. Залежність величини відгуків АЛТ-чутливого біосенсора на основі ПОкс від концентрацій аланіну та α -КГ співвідношення (а). Залежність величини відгуків АЛТ-чутливого біосенсора на основі ПОкс біосенсора від концентрацій субстратів АЛТ при сталому співвідношенні 8:1 (б)

Коензим піридоксальфосфат (ПФ) є необхідним коензимом реакції трансамінування, аналогічно до його ролі в реакції АСТ (детально описано в розділі 3.2.3). Для визначення його оптимальної концентрації було проведено серію вимірювань з поступовим збільшенням концентрації у робочому розчині від 0 до 300 мкМ. Встановлено, що оптимальна концентрація ПФ становить 10 мкМ, проте ефект від присутності кофактора в розчині на роботу біосенсора був слабковираженим (<10% приросту сигналу порівняно з його відсутністю, рис. 3.33). Це свідчить про достатній вміст ендogenous ПФ у комерційному препараті АСТ, тому подальші дослідження проводили без додавання кофактора.

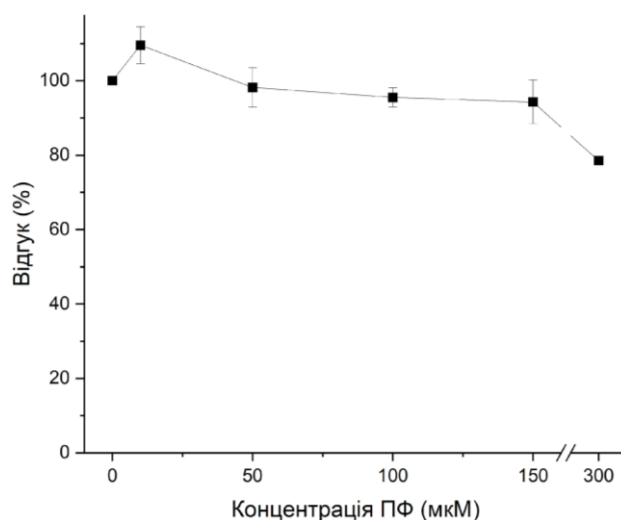


Рис. 3.33. Вплив концентрації кофактору ПФ на величину відгуку АЛТ-чутливого біосенсора на основі ПОкс. Концентрація фосфат-іонів – 5 мМ, тіаміну пірофосфату – 2 мМ, іонів магнію – 0,5 мМ, аланіну – 16 мМ, а-КГ – 2 мМ

3.3.2.5 Дослідження аналітичних характеристик біосенсора на основі ПОкс для визначення активності АЛТ. Для оцінки аналітичних характеристик розробленого АЛТ-чутливого біосенсора на основі ПОкс було проведено вимірювання з послідовним внесенням аліквот стандартного розчину АЛТ у робочу комірку з буферним розчином HEPES, що містив оптимізовані концентрації субстратів. На основі отриманих результатів було побудовано калібрувальну криву визначення вмісту АЛТ в розчині (Додаток Ж).

Аналітичні характеристики розробленого біосенсора визначались за стандартними процедурами. Межа біосенсорної детекції, розрахована за критерієм 3σ (де σ – шум базової лінії), становила 1 Од.акт./л АЛТ. Діапазон визначення за рівнянням Хілла активності АЛТ становив 1-500 Од.акт./л. Тривалість лінійності відгуку біосенсора становив більше 130 секунд. Тривалість одного повного аналізу, включаючи промивання робочої комірки, стабілізацію базової лінії та власне вимірювання, становила близько 10 хвилин. Такий діапазон роботи дозволяє визначати як нормальні, так і патологічні рівні АЛТ в сироватці крові. Крім того, так само, як і в АСТ-чутливому біосенсорі на основі ГлОкс нижню межу детекції можна зменшити (розділ 3.2.4) шляхом більш тривалого вимірювання, зокрема 2 хв замість 1 хв. Всі аналітичні характеристики наведені в таблиці 3.5.

Таблиця 3.5

Аналітичні характеристики АЛТ-чутливого біосенсора на основі ПОкс

Характеристика біосенсора	Значення
Чутливість	$0,74 \pm 0,04$ нА/хв на 50 Од.акт./л
Лінійний діапазон	1,0-500,0 Од.акт./л
Динамічний діапазон	1,0-500,0 Од.акт./л
Мінімальна межа визначення	1,0 Од.акт./л
Рівняння Хілла калібрувальної кривої	$\Delta I = V_{\max} \cdot I = \frac{38,55 \cdot C^{0,707}}{13038^{0,707} + C^{0,707}}$

Характеристика біосенсора	Значення
Шум базової лінії	0,3 нА
Дрифт базової лінії	0,2 нА/хв
Час відгуку	1,0 хв
Тривалість лінійної ділянки відгуку	>136 сек
Тривалість аналізу	10,0 хв

3.3.2.6 Дослідження стабільності біосенсора на основі ПОкс для визначення активності АЛТ. Як зазначалося раніше при характеристизації ГЛОкс-біосенсорів, дослідження відтворюваності виготовлення, стабільності відгуку та операційної стійкості є критично важливими параметрами для оцінки практичної придатності біосенсорних систем. Ці параметри визначають не лише аналітичну надійність біосенсора, але й економічну доцільність його практичного застосування в рутинному аналізі.

Відтворюваність вимірювань досліджували протягом серії з семи послідовних вимірювань 100 Од.акт./л АЛТ на одному біосенсорі з інтервалом 30 хв (рис. 3.34а). Отримане значення $RSD = 2,9\%$ підтверджує високу стабільність відгуку та відсутність суттєвої деградації ензиму протягом тривалої експлуатації, що є критично важливим для серійних аналізів.

Відтворюваність процедури виготовлення біосенсора оцінювали шляхом порівняння відгуків семи незалежно виготовлених електродів на стандартний розчин АЛТ (100 Од.акт./л) (рис. 3.34б). Встановлено відносне стандартне відхилення $RSD = 13,88\%$, що є прийнятним показником для ензимних біосенсорів, виготовлених вручну, і свідчить про задовільну відтворюваність процедури іммобілізації ПОкс.

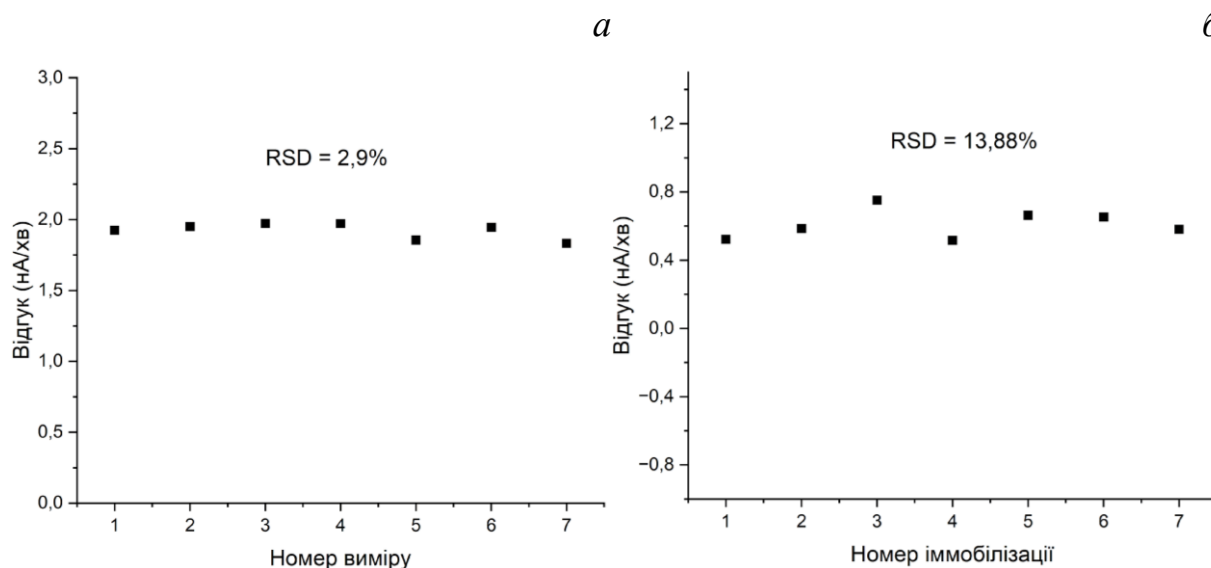


Рис. 3.34. Відтворюваність сигналів біосенсора на 100 Од.акт./л АЛТ (а). Відтворюваність процедури приготування АЛТ-чутливого біосенсора на основі ПОкс (б). Концентрація АЛТ – 50 Од.акт./л, фосфат-іонів – 5 мМ, тіаміну пірофосфату – 2 мМ, іонів магнію – 0,5 мМ, аланіну – 16 мМ, α -КГ – 2 мМ

Операційну стабільність біосенсора досліджували протягом 9 днів з проведенням щоденних вимірювань (рис. 3.35). Спостерігалось зниження чутливості переважно протягом перших трьох днів (~26% втрати активності), після чого відгук стабілізувався на рівні ~1,8 нА/хв. Така поведінка є типовою для іммобілізованих ензимних систем і пояснюється вимиванням слабо адсорбованих молекул ензиму з подальшим досягненням стабільного стану. Збереження ~67% початкової активності після 9 днів підтверджує високу операційну стабільність розробленого біосенсора.

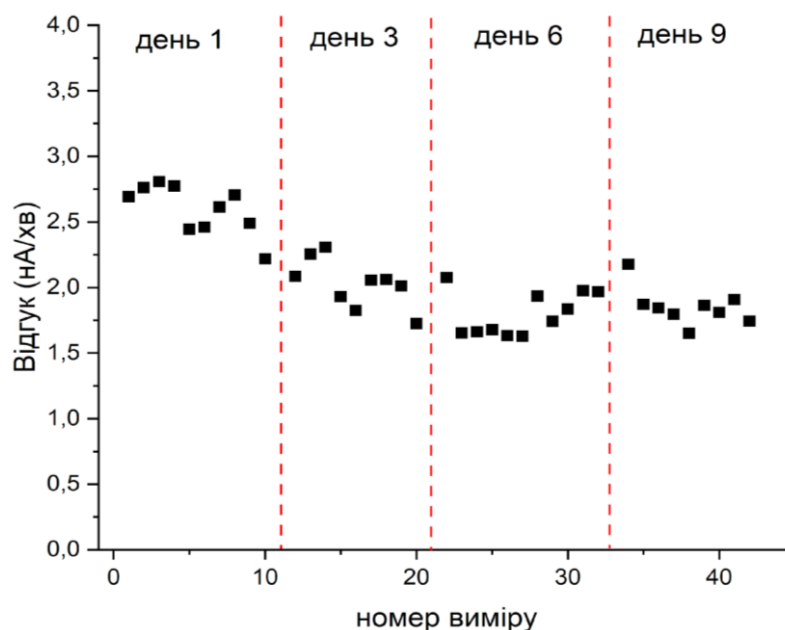


Рис. 3.35. Стабільність сигналів біосенсора на додавання 100 Од.акт./л АЛТ до вимірювальної комірки при зберіганні в сухому стані при температурі +8°C. Концентрація фосфат-іонів – 5 мМ, тіаміну пірофосфату – 2 мМ, іонів магнію – 0,5 мМ, аланіну – 16 мМ, α-КГ – 2 мМ

3.3.3 Порівняння двох АЛТ-чутливих біосенсорів на основі різних ензимних систем. Для обґрунтованого вибору варіанту АЛТ-чутливого біосенсора, який буде інтегровано в біосенсорну систему для одночасного визначення активності АЛТ та АСТ, необхідно було провести комплексне порівняння обох розроблених варіантів (на основі ГлОкс та на основі ПОкс) за усіма ключовими параметрами: аналітичними характеристиками, стабільністю, селективністю, складом робочого розчину, відтворюваністю виготовлення та здатністю до диференціації сигналів від АЛТ та АСТ тощо.

Зокрема, аналіз відгуків на проміжний аналіт, що відтворюваність іммобілізації (ПОкс 9%, ГлОкс 12%), так само, як і відтворюваність відгуків (ПОкс 4.9%, ГлОкс 5%) в обох біоселективних елементах приблизно однакові. При цьому, біосенсор на основі ГлОкс вимагає тривалішого процесу (35 хвилин проти 8 хвилин) та роботи з токсичним летким реагентом (ГА), на відміну від біосенсора на основі ПОкс.

При порівнянні складу робочих розчинів обох варіантів біосенсорів було встановлено, що біосенсор на основі ГлОкс потребує значно нижчих концентрацій субстратів АЛТ та взагалі не вимагає додаткових субстратів біоселективного матеріалу (на відміну від ПОкс, який вимагає додаткових йонів фосфату, магнію та тіамінпірофосфату), що робить процедуру аналізу простішою та більш економічно вигідною. Оптимальна буферна ємність та рН у обох систем були близькі одна до одної, проте біосенсор на основі ГлОкс демонстрував дещо швидші відгуки (близько 20 с проти близько 40 с на ПОкс-біосенсорі). Біосенсор на основі ГлОкс продемонстрував також дещо кращу стабільність величини відгуків в присутності білкових молекул в розчині (15% падіння чутливості до АЛТ для біосенсора на основі ГлОкс в присутності 1% білку в розчині, проти 39% падіння чутливості до АЛТ для біосенсора на основі ПОкс). Аналіз аналітичних характеристик обох варіантів АЛТ-чутливих біосенсорів (табл. 3.6) показав, що біосенсор на основі ПОкс має нижчу межу детекції, ширший лінійний діапазон, вищу чутливість, кращу відтворюваність відгуків та процедури іммобілізації, хоч і трохи гіршу стабільність при зберіганні.

Але головною відмінністю використаних біоселективних систем є їх здатність диференціювати сигнали від АЛТ і АСТ. Біосенсор на основі ГлОкс в якості проміжного аналіту використовує глутамат, який є продуктом роботи як АЛТ, так і АСТ. Це дозволяє застосовувати дану біоселективну мембрану для детекції обох трансаміназ. Проте через цю особливість даний сенсор не може розрізняти сигнали від них. В той час, як біосенсор на основі ПОкс селективно визначає вміст АЛТ, оскільки в якості проміжного аналіту використовується піруват, який продукується лише в результаті роботи АЛТ. Через таку особливість АЛТ-чутливий біосенсор на основі ГлОкс демонструє 10% зростання величини відгуків в присутності АСТ.

Таким чином, для подальшої адаптації в складі біосенсорної системи для одночасної детекції АЛТ і АСТ було вирішено використовувати варіант АЛТ-чутливого біосенсора на основі ПОкс.

Таблиця 3.6

Порівняння аналітичних характеристик розроблених біосенсорів для визначення АЛТ на основі ПОкс і ГлОкс

Характеристика	АЛТ-чутливого біосенсора	ПОкс біосенсор	ГлОкс біосенсор
Чутливість	$0,74 \pm 0,04$ нА/хв на 50 Од.акт./л	$0,26 \pm 0,004$ нА/хв на 50 Од.акт./л	
Лінійний діапазон	1,0-500,0 Од.акт./л	10,0-500,0 Од.акт./л	
Динамічний діапазон	1,0-500,0 Од.акт./л	2,5-500,0 Од.акт./л	
Мінімальна межа визначення	1,0 Од.акт./л	2,5 Од.акт./л	
Рівняння прямої лінійної ділянки калібрувальної кривої	$\Delta I = 0,00724 \cdot C + 0,03835$	$\Delta I = 0,00454 \cdot C + 0,03346$	
Тривалість лінійної ділянки відгуку	>136 сек	290 сек	
Відтворюваність відгуків на АЛТ	RSD = 2,9%	RSD = 7,6%	
Стабільність відгуків на АЛТ	77% через 3 дні	89% через 3 дні	
Потреба в додаткових реагентах	ТПФ, фосфат йони, йони магнію	Не потребує	
Оптимальний вміст аланіну	8 мМ	4 мМ	
Оптимальний вміст кетоглутарату	2 мМ	50 мкМ	
Вміст ПФ	10 мкМ (+10% чутливості)	50 мкМ (+80% чутливості)	
Здатність диференціювати сигнали від АСТ та АЛТ	Здатний	Не здатний	
Вплив 1% білку	-39% чутливості	-15% чутливості	

3.4 Розробка біосенсорної системи для одночасного визначення вмісту АСТ і АЛТ

У попередніх розділах було детально описано розробку та оптимізацію двох типів моносенсорів для визначення трансаміназ: АЛТ-чутливого біосенсора на основі ПОкс та біосенсора на основі ГлОкс, здатного визначати як АСТ, так і АЛТ через детекцію спільного продукту обох трансаміназних реакцій — глутамату. Кожен з цих біосенсорів продемонстрував гарні аналітичні характеристики, проте клінічна діагностика захворювань печінки та серцево-судинної системи вимагає одночасного визначення активності обох ензимів з подальшим розрахунком коефіцієнта де Рітіса, який має найбільш важливе діагностичне значення. Подальша робота полягала у створенні на основі вже запропонованих монобіосенсорів єдиної біосенсорної системи для одночасного аналізу активності АСТ та АЛТ. Відповідно, треба було виконати наступні ключові завдання:

- Дослідження перехресного впливу монобіосенсорів один на одного та забезпечення стабільності відгуків при одночасній роботі;
- Об'єднання розроблених монобіосенсорів у єдину біосенсорну систему з уніфікованими умовами вимірювання (рН, склад буфера, температура, концентрації субстратів);
- Розробка процедури вимірювання сироватки крові та алгоритму обробки даних для розрахунку активностей АСТ та АЛТ з урахуванням індивідуальних калібрувальних характеристик обох сенсорів в складі системи;
- Апробація біосенсорної системи при визначенні активності АЛТ та АСТ в зразках сироватки крові з верифікацією отриманих результатів референсним спектрофотометричним методом.

3.4.1 Дослідження перехресного впливу монобіосенсорів та їх об'єднання в єдину біосенсорну систему. Для забезпечення коректної роботи обох біосенсорів у складі єдиної системи необхідно було узгодити умови їх функціонування, зокрема склад робочого розчину. Оскільки обидва моносенсиори (АСТ-чутливий на основі ГлОкс та АЛТ-чутливий на основі ПОкс) були оптимізовані незалежно один від одного, їх оптимальні параметри робочого середовища дещо відрізнялись. Основним завданням оптимізації було визначення спільних концентрацій субстратів та кофакторів трансаміназ та інших компонентів робочого розчину, за яких обидва біосенсиори зберігають достатню чутливість до ензимів та широкий діапазон визначення.

Базові характеристики робочого розчину для обох монобіосенсорів були майже однакові, тому для подальшої роботи системи використовувався 25 мМ HEPES, рН 7,4. Оптимальний вміст спільного субстрату обох трансаміназ – α -КГ – для обох монобіосенсорів був на одному рівні (2 мМ). Впливу інших субстратів (аланіну на ГлОкс сенсор та аспартату на ПОкс сенсор) на поведінку та чутливість моносенсорів до цільових аналітів не спостерігалось. Внесення кофактору піридоксальфосфату в аналізоване середовище було визнано недоцільним, оскільки за концентрації 10 мкМ він спричиняє лише незначне зростання відгуку (до 10% на ПОкс сенсорі та менше 2% на ГлОкс, порівняно з відсутнім ПФ), в той час як підвищення концентрації до 100 мкМ (оптимум концентрації ПФ для ГлОкс сенсора) підвищувало чутливість менше ГлОкс сенсора приблизно на 11% та спричиняло падіння чутливості ПОкс сенсора на 5 %.

Для адекватної роботи біосенсорної системи необхідно також було перевірити перехресний вплив кофакторів та косубстратів ензимів в складі монобіосенсорів на функціонування один одного. Для цього було перевірено роботу біосенсора на основі ГлОкс в присутності йонів магнію та фосфату, тіамінпірофосфату та пірувату (в концентраціях попередньо підібраних для найкращої роботи ПОкс) та показано, що ці речовини не спричиняють ні відгуку, ні змін у величині відгуку розробленого біосенсора. При цьому, за

відсутності аланіну в комірці, АЛТ також не спричиняв змін у поведінці біосенсора на основі ГлОкс. В свою чергу змін в роботі АЛТ-чутливого біосенсора на основі ПОкс в присутності аспартату, глутамату та АСТ (субстрати біосенсора на основі ГлОкс) також не спостерігалось.

Після підтвердження відсутності перехресного впливу компонентів робочого розчину монобіосенсиори було об'єднано в єдину біосенсорну систему. Обидва електроди розміщували в одній вимірювальній комірці та підключали до багатоканального мультиплексора, що дозволяло одночасно знімати сигнали з кожного біосенсора. Потенціостат працював у режимі хроноамперометрії при фіксованому потенціалі, а мультиплексор забезпечував комутацію між робочими електродами при спільному додатковому електроді та електроді порівняння.

Проте фізичне об'єднання монобіосенсорів в єдину систему не є достатньою умовою її коректної роботи — необхідним етапом є підтвердження адекватного функціонування обох біосенсорів одночасно в присутності обох трансаміназ у спільному розчині, оскільки клінічні зразки містять як АСТ, так і АЛТ одночасно. З цією метою для кожного монобіосенсора було проведено серію експериментів. Для біосенсора з біоселективним елементом на основі ПОкс було отримано калібрувальну криву на АЛТ окремо, калібрувальну криву на АЛТ в присутності біосенсора з біоселективним елементом на основі ГлОкс та калібрувальну криву на АЛТ в присутності біосенсора з біоселективним елементом на основі ГлОкс, АСТ та аспартату. Аналогічно для біосенсора з біоселективним елементом на основі ГлОкс: калібрувальну криву на АСТ окремо, калібрувальну криву на АСТ в присутності ПОкс-біосенсора та калібрувальну криву на АСТ в присутності біосенсора з біоселективним елементом на основі ПОкс та АЛТ. Порівняння калібрувальних кривих, отриманих у різних умовах вимірювання, показало, що чутливість та діапазон визначення кожного біосенсора залишаються незмінними незалежно від присутності другого біосенсора, другої трансамінази та її субстратів.

3.4.2 Забезпечення одночасного вимірювання вмісту трансаміназ в модельних розчинах та аналітичні характеристики розробленої біосенсорної системи. Після об'єднання моносенсорів в єдину систему необхідно було розробити протокол процедури визначення кожної з трансаміназ у розчині. Критичною проблемою була неможливість прямої диференціації сигналів від АСТ та АЛТ за допомогою ГлОкс-сенсора, оскільки обидві трансаміназні реакції продукують глутамат. Для вирішення цього завдання було розроблено спеціалізовану багатоетапну процедуру послідовного внесення реагентів з математичним розрахунком активності кожної трансамінази окремо. Протокол вимірювання складався з наступних кроків (схематично представлено на рис. 3.36а):

- **Внесення субстратів та кофакторів.** У вимірювальну комірку вносили робочий буферний розчин, α -КГ (2 мМ), аспартат (8 мМ), фосфат-іони (5 мМ), тіамін пірофосфат (2 мМ), іони магнію (0,5 мМ) після чого очікували стабілізації базової лінії. Аланін для роботи АЛТ спеціально поки не додавався.
- **Визначення активності АСТ.** Вносили аналізований зразок, що містив АСТ та АЛТ. Активація АСТ-реакції призводила до утворення глутамату, що реєструвалося ГлОкс-біосенсором. ПОкс-біосенсор залишався інертним, оскільки реакція АЛТ не активувалась через брак аланіну, відповідно, піруват не утворювався. Швидкість зростання сигналу ГлОкс-біосенсора $(\Delta I/\Delta t)_1$ пропорційна активності АСТ у зразку.
- **Визначення активності АЛТ.** Після досягнення лінійної ділянки відгуку на АСТ (через ~ 3 хв) вносили аланін (16 мМ), що активувало АЛТ-реакцію. При цьому спостерігалось одночасне зростання відгуків обох біосенсорів: ГлОкс-біосенсор реагував на глутамат від АЛТ- та АСТ-реакцій, а ПОкс-біосенсор — специфічно на піруват від АЛТ-реакції. Швидкість зростання сигналу ПОкс-біосенсора $(\Delta I/\Delta t)_2$ пропорційна активності АЛТ.

Вміст трансаміназ в робочій комірці обраховували за допомогою попередньо отриманих калібрувальних кривих відгуків біосенсорної системи (рис. 3.36б).

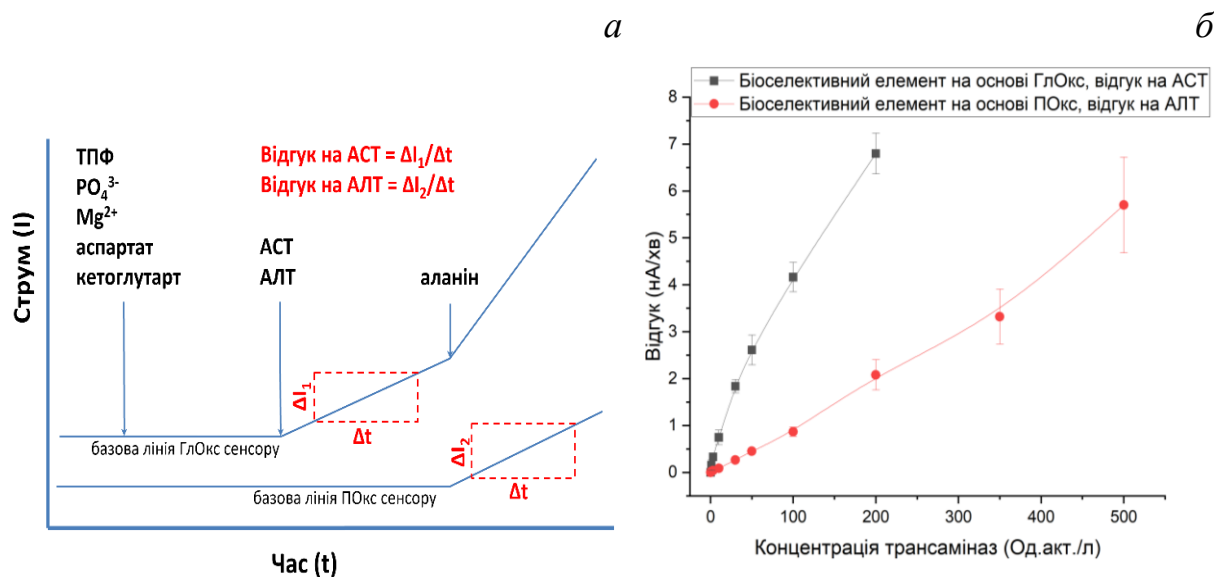


Рис. 3.36. Процедура внесення реагентів в робочу комірку для одночасного вимірювання вмісту АСТ та АЛТ за допомогою біосенсорної системи (а). Калібрувальні криві біосенсорної системи на різні активності трансаміназ (б). Концентрація аспартату становить 8 мМ, α -КГ – 2 мМ, аланіну – 16 мМ, фосфат-іонів – 5 мМ, тіаміну пірофосфату – 2 мМ, іонів магнію – 0,5 мМ

На основі попередньо отриманих калібрувальних кривих та верифікації розробленої системи було досліджено аналітичні характеристики розробленої біосенсорної системи для одночасної детекції вмісту АСТ та АЛТ (табл. 3.7).

Таблиця 3.7

Аналітичні характеристики біосенсорної системи для одночасної детекції активності АЛТ та АСТ

Характеристика	Значення
Чутливість до АСТ	4,39 нА/хв на 100 Од.акт./л
Чутливість до АЛТ	0,94 нА/хв на 100 Од.акт./л
Діапазон детекції АСТ	1 - 200 Од.акт./л

Характеристика біосенсора	Значення
Діапазон детекції АЛТ	1 - 500 Од.акт./л
Мінімальна межа визначення АСТ	1 Од.акт./л
Мінімальна межа визначення АЛТ	1 Од.акт./л
Загальна тривалість аналізу	12 хв
Коефіцієнт кореляції при вимірюванні АСТ	0,989
Коефіцієнт кореляції при вимірюванні АЛТ	0,994

3.4.3 Апробація біосенсорної системи при вимірюванні вмісту трансаміназ в сироватці крові. Перш ніж проводити апробацію запропонованої системи при роботі з біологічними зразками, необхідно було обрати оптимальну методику біосенсорного вимірювання, яка забезпечуватиме достатню точність та відтворюваність результатів для визначення активності обох трансаміназ одночасно. В роботі було протестовано та проаналізовано два методи визначення АЛТ та АСТ в біологічних зразках (процедури описані в розділі 3.9):

- Метод калібрувальної кривої дозволяє швидко проаналізувати зразок, однак він не враховує вплив матриці зразку на реакцію біосенсора та деякої зміни аналітичних характеристик біосенсора під час його тривалого використання. Крім того, цей метод вимагає побудови самої калібрувальної кривої перед аналізом, що ускладнює процедуру аналізу.
- Метод стандартних додавань вимагає більше часу для одного аналізу та додаткових розрахунків, проте він має перевагу у врахуванні матричних ефектів та потенційного виснаження біоселективного елемента біосенсора при багаторазовому використанні. Крім того, при використанні даного методу немає потреби попередньо витратити час на побудову калібрувальної кривої і подальші підкалібрування системи.

Відповідно, було вирішено порівняти ці біосенсорні методи для нашої біосенсорної системи та обрати оптимальний. Для цього зразки сироватки

крові з відомою концентрацією трансаміназ були протестовані за допомогою обох методів. На рисунку 3.37 показано порівняння результатів обох біосенсорних методів з відомими концентраціями трансаміназ, введеними в сироватку (методика збагачення зразків наведена в розділі 2.8).

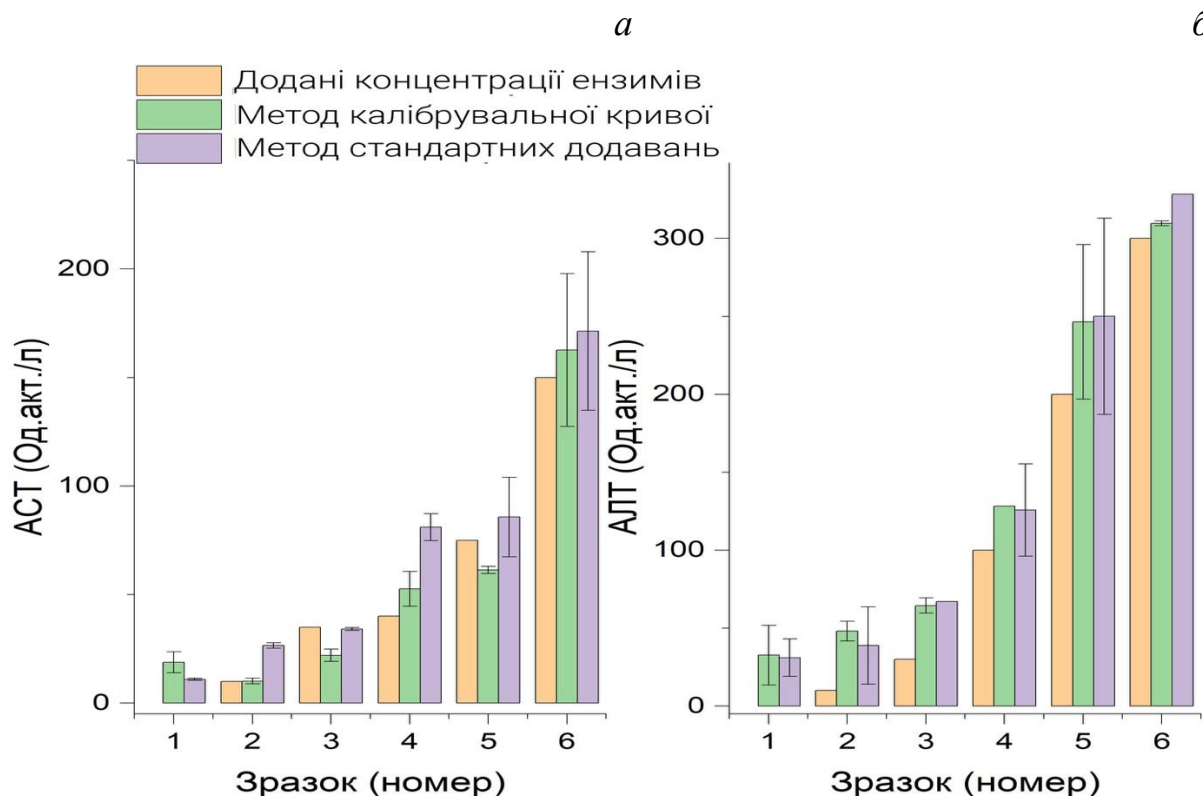


Рис. 3.37. Порівняння результатів двох методів біосенсорного аналізу вмісту АСТ (а) та АЛТ (б) у зразках сироватки крові. Концентрація аспартату становить 8 мМ, α -КГ – 2 мМ, аланіну – 16 мМ, фосфат-іонів – 5 мМ, тіаміну пірофосфату – 2 мМ, іонів магнію – 0,5 мМ

Метод стандартних додавань (див. розділ 2.9) показав дещо завищені результати вмісту АСТ (рис. 3.37а), що можна пояснити короткою тривалістю лінійності відгуку біосенсора на АСТ. Через коротку лінійність відгуку на внесення модельного розчину АСТ є нижчими; відповідно, в результаті математичних обрахунків отримається завищене значення вмісту АСТ. Тому для подальшої роботи зі зразками сироватки крові для вимірювання АСТ було

вирішено використовувати біосенсорний метод на основі калібрувальної кривої.

Для визначення АЛТ обидва методи продемонстрували гарну точність і узгодженість результатів, хоча у порівнянні з доданими концентраціями трансаміназ результати визначення обома методами давали трохи завищені значення через наявність в зразку базового рівня АСТ та АЛТ (рис. 3.37б). Проте метод стандартних додавань виявився дещо точнішим при низьких концентраціях АЛТ. Крім того, враховуючи, що АЛТ визначається другим етапом процедури (після АСТ), метод стандартних додавань дозволяє нівелювати прогресуюче забруднення біоселективного елементу адсорбованими речовинами зі зразку та можливе субстратне виснаження α -КГ в процесі вимірювання.

У результаті проведених експериментів було встановлено, що активність АСТ необхідно визначати за калібрувальним графіком, тоді як для визначення АЛТ у зразках сироватки доцільно застосовувати метод стандартних додавань. Відповідно, процедура одночасного вимірювання вмісту АСТ та АЛТ за допомогою розробленої біосенсорної системи (рис. 3.36а) доповнювалася четвертим кроком: після активації АЛТ-реакції внесенням аланіну та обрахунку відгуку біосенсора послідовно додавали в аналізоване середовище три аліквоти стандартного концентрованого розчину АЛТ для застосування методу стандартних додавань.

3.4.4 Вивчення кореляції між біосенсорними та референсними вимірюваннями сироватки крові. Останнім етапом розробки біосенсорної системи для одночасної детекції активності АСТ і АЛТ було підтвердження можливості її роботи зі зразками сироватки крові людини в умовах, наближених до реальної клінічної практики.

Для цього було проведено серію біосенсорних вимірювань збагачених біологічних зразків, що охоплювали як нормальні (6–40 Од.акт./л для АСТ і 30–50 Од.акт./л для АЛТ), так і патологічні (до 180 Од.акт./л для АСТ і до 300

Од.акт./л для АЛТ) рівні активності трансаміназ. Отримані біосенсорні результати були верифіковані шляхом порівняння з результатами референсного спектрофотометричного методу вимірювання.

У таблиці 3.8 зібрано результати аналізу активності АСТ та АЛТ з використанням обох методів вимірювання для кожного індивідуального зразка сироватки крові, що дає змогу безпосередньо порівняти біосенсорні та спектрофотометричні дані в широкому діапазоні концентрацій аналіту. Аналіз наведених даних свідчить про близькість результатів, отриманих двома методами, для переважної більшості зразків, що вказує на адекватність біосенсорного підходу як альтернативи класичному ензиматично-колориметричному визначенню.

Таблиця 3.8

Порівняння результатів аналізу вмісту трансаміназ у зразках сироватки крові за допомогою біосенсорного та спектрофотометричного методів

Зразки сироватки крові	Біосенсор, Од.акт./л		Спектрофотометр, Од.акт./л	
	АСТ	АЛТ	АСТ	АЛТ
Зразок №1	5,9 ± 0,3	32,7 ± 3,9	7,0 ± 0,8	32,6 ± 5,3
Зразок №2	9,3 ± 0,5	48,1 ± 6,3	8,0 ± 0,9	59,6 ± 20,3
Зразок №3	52,6 ± 8,0	64,5 ± 4,9	45,4 ± 5,3	82,8 ± 34,7
Зразок №4	61,3 ± 1,6	128,3 ± 29,6	72,3 ± 8,4	163,9 ± 6,2
Зразок №5	88,1 ± 12,8	246,4 ± 49,5	90,8 ± 10,6	256,5 ± 6,2
Зразок №6	142,3 ± 49,8	309,6 ± 38,0	166,8 ± 19,5	356,9 ± 3,6

Використовуючи отримані результати також було побудовано графіки кореляції двох методів аналізу активності АСТ та АЛТ (рисунок 3.38). Значення коефіцієнта кореляції Пірсона становило $R = 0,989$ при детекції АСТ та $R = 0,994$ при детекції АЛТ, що є досить високими показниками та свідчить

про сильний лінійний зв'язок між результатами біосенсорного та контрольного методів вимірювання в досліджуваному діапазоні активностей обох ензимів.

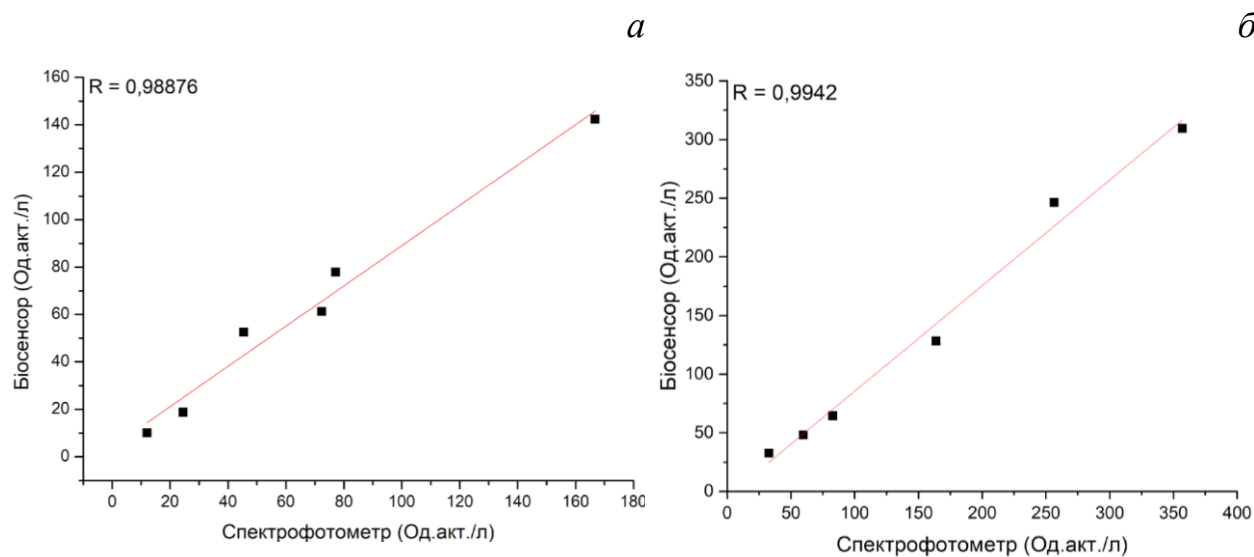


Рис. 3.38. Кореляція результатів вимірювання вмісту АСТ (а) та АЛТ (б) біосенсорним та спектрофотометричним способами

Таким чином, проведені дослідження дозволили підтвердити здатність розробленої біосенсорної системи вибірково та достовірно визначати активність трансаміназ як при фізіологічних, так і при патологічних рівнях АСТ і АЛТ у сироватці крові.

За результатами досліджень опубліковані наступні наукові праці:

1. Д. О. Мруга, Є. Р. Ваховський, С. В. Дзядевич, О. О. Солдаткін. Розробка мультиензимної біосенсорної системи для одночасного визначення активності аланінамінотрансферази та аспаратамінотрансферази. *Sensor Electronics and Microsystem Technologies* 2026 в друці.
2. D. Mruga, Y. Vakhovskyi, V. Bakhmat, V. Pyeshkova, S. Dzyadevych, O. Soldatkin. Evaluation of Two Enzyme-Based Amperometric Biosensor Designs for Alanine Aminotransferase Determination in Biological Fluids. *Micromachines* 2025, 16(10), 1168. <https://doi.org/10.3390/mi16101168>
3. D. Mruga, Vakhovsky, S.V. Dzyadevych, O.O. Soldatkin. Development and

- comparison of two alanine aminotransferase-sensitive biosensors based on pyruvate oxidase and glutamate oxidase. *Biopolymers and Cell* 2025. Vol. 41, No. 3. <https://doi.org/10.7124/bc.000AD9>
4. Y. Vakhovskiy, D. Mruga, O. Ustinov, A. Di Costanzo Mata, O. Soldatkin, S. Dzyadevych. Design and Optimization of Biosensor for Pyruvate Quantification. *Electroanalysis*, 2025; 37:e70064. <https://doi.org/10.1002/elan.70064>
 5. D. Mruga, Berketa K., Dzyadevych S., Soldatkin O. Biosensors for transaminase detection: Their diversity and trends – A comprehensive review. *Trends in analytical chemistry* 2025, Volume 193, 118460. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2025.118460>
 6. Д. О. Мруга, Є. Р. Ваховський, С. В. Дзядевич, О. О. Солдаткін. Розробка та оптимізація мультифункціонального біосенсора для визначення концентрації пірувату та/або активності АЛТ у водних зразках. *Sensor Electronics and Microsystem Technologies* 2025, Т.22, № 1, 26-37. <https://doi.org/10.18524/1815-7459.2025.1.325653>
 7. D. Mruga, S. Dzyadevych, O. Soldatkin. Development and optimisation of the biosensor for aspartate aminotransferase blood level determination. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 2025 Volume 417, 721–731. <https://doi.org/10.1007/s00216-024-05682-2>
 8. D. Mruga, K. Berketa, A. Sverstiuk, V. Martsenyuk, A. Klos-Witkowska, Yu. Palianytsia, S. Dzyadevych, O. Soldatkin. Amperometric biosensor based on glutamate oxidase to determine AST activity. *Sensors* 2024, 24(24), 7891. <https://doi.org/10.3390/s24247891>
 9. D. Mruga, S. Dzyadevych, O. Soldatkin. High-selective alanine transaminase-sensitive biosensor based on nanosize semipermeable poly-metaphenylenediamine membrane. *Applied nanoscience* 2023, Volume 13, 6939–6949. <https://doi.org/10.1007/s13204-023-02810-9>

Патенти

1. Мруга Д.О., Солдаткін О.О., Дзядевич С.В., Солдаткін О.П. Біосенсорна система для аналізу аспаратамінотрансферази. Патент на винахід №

129239. № заявки a202204677; заявл. 09.12.2022; опубл. 19.02.2025 бюл. № 8/2025. <https://sis.nipo.gov.ua/uk/search/detail/1842537/>
2. Мруга Д.О., Солдаткін О.О., Дзядевич С.В., Солдаткін О.П. Амперометрична біосенсорна система для визначення активності аспартатамінотрансферази у водних зразках. Патент на корисну модель № 153303. № заявки u202204678; заявл. 09.12.2022; опубл. 14.06.2023, бюл. № 24/2023. <https://sis.nipo.gov.ua/uk/search/detail/1743479/>
 3. Солдаткін О.О., Мруга Д.О., Дзядевич С.В., Солдаткін О.П. Біосенсорна система для визначення активності аланініамінотрансферази. Патент на винахід № 125811. № заявки a202007542; заявл. 26.11.2020; опубл. 08.06.2022, бюл. № 23/2022. <https://sis.nipo.gov.ua/uk/search/detail/1691484/>
 4. Солдаткін О.О., Мруга Д.О., Дзядевич С.В., Солдаткін О.П. Амперометрична біосенсорна система для визначення активності аланінамінотрансферази у водних зразках. Патент на корисну модель № 147481. № заявки u202007543; заявл. 26.11.2020; опубл. 12.05.2021, бюл. № 19/2021. <https://sis.nipo.gov.ua/uk/search/detail/1593308/>

Тези доповідей на наукових конференціях

1. Ваховський Є., Мруга Д., Дзядевич С., Солдаткін О. Мультианалітна біосенсорна система для визначення активності аланінамінотрансферази та аспартатамінотрансферази. Шевченківська весна: досягнення в науках про життя, 08-10 квітня 2026 року, в друці.
2. Mruga D.O., Vakhovskyi Y.R., Dzyadevych S.V., Soldatkin O.O. Multienzyme biosensor system for simultaneous detection of AST and ALT activities. XX Всеукраїнська конференція молодих вчених Інституту молекулярної біології і генетики НАН України - 26-27 травня 2026, Київ, Україна, в друці.
3. Ваховський Є., Мруга Д., Дзядевич С., Солдаткін О. Розробка та оптимізація біосенсора на основі іммобілізованої піруватоксидази для визначення активності аланінамінотрансферази. XXII Міжнародна наукова конференція студентів і аспірантів, присвячена 90-річчю кафедри мікробіології біологічного факультету Львівського національного університету імені

Івана Франка Львів, 15–17 квітня 2026 року

4. Мруга Д. О., Ваховський Є. Р., Дзядевич С. В., Солдаткін О. О. Мультиензимна біосенсорна система для одночасного визначення активності аланінамінотрансферази та аспартатамінотрансферази в біологічних рідинах. Проблеми та досягнення сучасної біотехнології: матеріали VI міжнародної наук.-практ. конф. (27 березня 2026 р., м. Харків). – Електрон. дані. – Х. : НФаУ, 2026. – 473 с.
5. Mruga D.O., Vakhovskyi Y. R., Dzyadevych S.V., Soldatkin O.O. Development of an amperometric biosensor for the detection of alanine aminotransferase activity. XIX Всеукраїнська конференція молодих вчених Інституту молекулярної біології і генетики НАН України - 20-21 травня 2025, Kyiv, Ukraine, p. 28
6. Мруга Д. О. Ваховський Є. Р. Дзядевич С. В. Солдаткін О. О. Laboratory prototype of electrochemical biosensor for the quantitative analysis of alanine aminotransferase activity. Актуальні проблеми біохімії та Біотехнології, 5-6 травня 2025, Київ, Україна
7. Мруга Д. О. Ваховський Є. Р. Дзядевич С. В. Солдаткін О. О. Розробка амперометричного біосенсора на основі піруватоксидази для визначення пірувату. Молодь і поступ біології: збірник тез доповідей XXI Міжнародної наукової конференції студентів і аспірантів (м. Львів, 28 квітня – 1 травня 2025 р.). – Львів: Галич-Прес, 2025. – 384 с.
8. Мруга Д. О. Ваховський Є. Р. Дзядевич С. В. Солдаткін О. О. Розробка амперометричного біосенсора на основі піруватоксидази для визначення пірувату. Шевченківська весна: досягнення в науках про життя / Advancements in life sciences : електрон. зб. тез XXII Міжнар. наук. конф. студ. та мол. вчених (м. Київ, 23–25 квітня 2025 р.) – Київ : ВПЦ "Київський університет", 2025. – 476 с.
9. S. Dzyadevych, V. Arkhypova, D. Mruga, O. Soldatkin. Electrochemical enzyme biosensors for medical application. Biogenext, 17-20 September 2024, Kyiv, Ukraine

- 10.D. Mruga, Ye. Vakhovskyi, S. Dzyadevych, O. Soldatkin. Development, optimization, and comparison of two versions of ALT-sensitive biosensor based on glutamate oxidase and pyruvate oxidase. Biogenext, 17-20 September 2024, Kyiv, Ukraine
- 11.D. Mruga, S. Dzyadevych, O. Soldatkin. Development and probation of the amperometric biosensor for determining the ast activity level in blood serum samples. XVIII All-Ukrainian Conference of Young Scientists of the Institute of Molecular Biology and Genetics of the NAS of Ukraine 21-22 May 2024, Kyiv, Ukraine, p. 39
- 12.D. Mruga, K. Berketa, S. Dzyadevych, O. Soldatkin. Development of amperometric biosensor for pyruvate concentration and alt activity analysis. XXV International Conference for Students, PhD Students and Young Scientists «Modern Chemistry Problems» 15-17 May 2024, Kyiv, Ukraine, p. 33
- 13.D. Mruga, K. Berketa, O. Soldatkin. Electrochemical biosensor based on pyruvate oxidase for detection of pyruvate and ALT activity. Schevchenkivska vesna, 24-26 April 2023, Kyiv, Ukraine, p. 193-194
- 14.D. Mruga, O. Soldatkin, N. Jaffrezic-Renault, A. Errachid. Amperometric biosensor based on pyruvate oxidase for selective ALT measurement. IX Congress of Ukraine biophysical society, 30 October - 2 November 2023, Kyiv, Ukraine. Ukr.
- 15.D. Mruga, O. Soldatkin, S. Dzyadevych, A. Soldatkin. Development of AST-sensitive amperometric enzyme biosensor. International research and practice conference 'NANOTECHNOLOGY AND NANOMATERIALS' NANO-2023, 16-19 August 2023, Bukovel, Ukraine, p. 338
- 16.D. Mruga, O. Soldatkin, S. Dzyadevych, A. Soldatkin. Development of aspartate aminotransferase sensitivity biosensor based on glutamate oxidase. Deuxièmes Rencontres Capteurs de l'Université Bourgogne Franche Comté. 24-25 Novembre 2022, Dijon, France, p. 28.

РОЗДІЛ 4

АНАЛІЗ І УЗАГАЛЬНЕННЯ РЕЗУЛЬТАТІВ ДОСЛІДЖЕНЬ

4.1 Клінічне значення трансаміназ та необхідність point-of-care діагностики

Як зазначено в розділі 1.1, АЛТ та АСТ є ключовими біомаркерами ураження печінки, міокарда та скелетних м'язів, тому їх визначення має принципове значення як для первинної діагностики, так і для динамічного моніторингу стану пацієнта. Референтні значення активності АЛТ становлять 7-56 Од.акт./л (чоловіки) і 7-45 Од.акт./л (жінки), для АСТ – 10-40 Од.акт./л, хоча конкретні норми варіюють залежно від лабораторії та методу вимірювання [68]. Підвищення у 3-5 разів вище верхньої межі норми свідчить про гострий гепатит або медикаментозне ураження печінки; перевищення норми у 10 і більше разів характерне для гострого вірусного чи ішемічного гепатиту або передозування ацетамінофену [9-12, 188].

Необхідність одночасного визначення обох трансаміназ зумовлена тим, що лише сумісний аналіз обох трансаміназ дозволяє встановити природу ураження: ізольоване підвищення АСТ при нормальному АЛТ вказує на патологію міокарда чи скелетних м'язів, комбіноване — на гепатоцелюлярне ушкодження [189]. Додатковим диференційно-діагностичним критерієм слугує коефіцієнт де Рітиса (АСТ/АЛТ): значення > 2 характерне для алкогольної хвороби печінки, < 1 — для неалкогольного жирового гепатозу або вірусного гепатиту [190].

Особливу актуальність швидка діагностика набуває в умовах обмежених ресурсів або термінового прийняття клінічних рішень. Системи point-of-care (POC) тестування особливо актуальні при скринінгу гепатотоксичності на тлі

прийому статинів, протитуберкульозних засобів або антиретровірусної терапії; моніторингу функції печінки у первинній ланці та відділеннях невідкладної допомоги; терапевтичному моніторингу після трансплантації печінки; а також у регіонах з обмеженим доступом до лабораторій і в польових умовах при надзвичайних ситуаціях.

4.2 Обмеження існуючих методів

Традиційні спектрофотометричні методи визначення активності трансаміназ забезпечують високу точність і відтворюваність, проте мають низку суттєвих операційних обмежень. Зокрема, вони потребують точного дозування кількох реагентів у строгій послідовності з дотриманням проміжків часу між додаваннями, що підвищує ризик людської похибки та ускладнює автоматизацію в умовах малих лабораторій. Також вони вимагають попередньої термостатованої інкубації реагентів при 37 °C протягом 1–30 хв та інколи подальшої інкубації реакційної суміші, а окремі набори із фенілгіدразином чутливі до світла та придатні після розведення лише 2 години. Разом з тим, до сьогодні стандартні лабораторні підходи вимагають проведення двох окремих тестів для визначення АЛТ та АСТ, що подвоює витрати реагентів, час аналізу та навантаження на персонал, а тривалість повного аналітичного циклу для обох ензимів може досягати 180 хв (табл. 4.1).

**Порівняння аналітичних характеристик відомих біосенсорних систем
для одночасної детекції АСТ та АЛТ та комерційних методів їх детекції**

Поси ланн я	Біоселективний матеріал	Метод детекції	Діапазон визначення, Од.акт./л	(Інкубува ння) час відгуку, хв
Біосенсорні системи				
Ця робо та	АЛТ: ПОкс АСТ: ГЛОкс	СА	АЛТ: 1-500 АСТ: 1-200	1
[50]	АЛТ: ПОкс + ПерОкс + 4ААП + DHBS АСТ: метиловий зелений + цистеїн сульфенова кислота	UV-Vis	Теоретична робота	Теоретичн а робота (15)
[51]	АЛТ: ПОкс + ПерОкс + DAOS АСТ: ПОкс + ОАД + ПерОкс + DAOS	PhR 630	АЛТ 4-350 АСТ 4-250	2
[52]	АЛТ: ПОкс + Au/LDO + TMB АСТ: ГЛОкс + Au/LDO + TMB	UV-Vis шкала сірого	АЛТ 7-200 АСТ 10-150 Смартфон ALT 10-180 АСТ 15-150	(30)
[53]	Комерційний колориметричний набір	UV-Vis інтенсивність кольорів	АЛТ 50-1000 АСТ 10-800	(3)

Продовж. табл. 4.1

Пос ила ння	Біоселективний матеріал	Метод детекції	Діапазон визначення, Од.акт./л	(Інкубув ання) час відгуку, хв
[54]	АЛТ: ЛДГ АСТ: МДГ	UV-Vis інтенсивність RGB кольорів	АЛТ 5,38-86,1 АСТ 5,4-91,2	АЛТ 7 АСТ 6
[55]	АЛТ: ПОкс АСТ: метиловий зелений + цистеїн сульфенова кислота	UV-Vis інтенсивність RGB кольорів	АЛТ 0-125 АСТ 0-105	АЛТ: 4 АСТ: 1
[56]	АЛТ: ПОкс + ПерОкс + 4ААП + DHBS АСТ: метиловий зелений + цистеїн сульфенова кислота	UV-Vis інтенсивність кольорів	В крові: АЛТ 40-200 АСТ 40-200	15
Комерційні набори				
[27]	АСТ: МДГ	UV-Vis 340 кювета	1,75-600	(1+1+1)
[28]	АСТ: МДГ	UV-Vis 340 кювета	4,69-500	(1+1+1)
[29]	АЛТ: фенілгідразон	UV-Vis 510 планшет	0,75-72,3	(30 + 20 + 15)
[30]	АЛТ: ЛДГ	UV-Vis 340 кювета	до 400	(2) 3
[34]	АЛТ: 2,4- динітрофенілгідразин	UV-Vis 505 кювета	7,2-325	(5+30+20+ 5)
[35]	АСТ: 2,4- динітрофенілгідразин	UV-Vis 505 кювета	7,2-350	(5+30+20+ 5)

Продовж. табл. 4.1

Посилання	Біоселективний матеріал	Метод детекції	Діапазон визначення, Од.акт./л	(Інкубування) час відгуку, хв
[36]	АЛТ: N/A	UV-Vis 570→610 планшет	10-1000	(60-120)
[37]	АЛТ: фенілгідазин	UV-Vis 510 планшет	0,75-72,3	(30 + 20 + 15)
[88]	АЛТ: ПОкс	Fluor 535→587 планшет	0,01-50	(3) 60
[89]	АСТ: N/A	Fluor 540→590 планшет	2-150	20-30 при 37°C або 60 при RT

Примітки: 1. DHBS — 3,5-дихлор-2-гідроксибензолсульфонова кислота. 2. DAOS — N-етил-N-(2-гідрокси-3-сульфопропіл)-3,5-диметоксіанілін. 3. TMB — тетраметилбензидин. 4. Au/LDO — подвійний оксид кобальту та алюмінію, декорований золотом. 5. RT — кімнатна температура. 6. N/A — не вказано. 7. значення в дужках () — час інкубації.

Сучасні оптичні біосенсорні системи для одночасної детекції трансаміназ (табл. 4.1) частково скорочують час аналізу, однак мають власні обмеження. Зокрема, вони забезпечують лише напівкількісне визначення ензимів, а оптичні характеристики зразка (мутність, гемоліз, ліпемія) можуть суттєво спотворювати результати аналізу. Наприклад, встановлено, що концентрація пірувату понад 0,2 мМ або аскорбінової кислоти понад 3 мг/дл призводять до хибно завищених та хибно занижених результатів визначення АЛТ відповідно [56]. Цільна кров, що зберігалася понад 6 годин, генерує штучно підвищені показники АЛТ унаслідок вивільнення лактату з

еритроцитів та його перетворення на піруват [56]. Крім того, паперові мікрофлюїдні пристрої потребують стабільного джерела освітлення у закритому детекційному боксі [52-54], а смартфон-орієнтований аналіз зображень вносить додаткову суб'єктивність, зумовлену умовами освітлення [50].

4.3 Переваги розробленої біосенсорної системи для одночасної детекції АЛТ та АСТ

Розроблена амперометрична система усуває значну частину цих обмежень. Електрохімічна детекція нечутлива до оптичних характеристик зразка; відсутність хромогенних реагентів спрощує процедуру та знижує вартість аналізу, а платинові перетворювачі допускають багаторазове використання на відміну від одноразових паперових систем. Крім того, амперометричний сигнал розробленої біосенсорної системи є кількісним, а межа детекції 1 Од.акт./л для обох ензимів є кращою більшості оптичних систем (2,5–50 Од.акт./л).

Послідовне введення реагентів дещо ускладнює експлуатацію, проте залишається простішим за багатоетапне змішування у ручних колориметричних наборах. Загальний час виконання аналізу становить 12 хв для обох аналітів — порівняно з 15 хв для паперових мікрофлюїдних систем, хоча найшвидший час окремого вимірювання (від 3 до 5 хвилин) пропонує кінетична спектрофотометрія. Оптичні біосенсиори забезпечують максимальну портативність завдяки візуальному зчитуванню без використання приладів, тоді як електрохімічна система вимагає мініатюрного потенціостата, що робить її краще придатною для мобільних клінік або невеликих медичних центрів, ніж для індивідуального домашнього використання; разом із тим вона значно перевершує лабораторні аналізатори за портативністю та дозволяє проводити тестування безпосередньо на місці забору проби.

Таким чином, електрохімічна біосенсорна система займає високопродуктивну нішу між напівкількісними оптичними сенсорами та дорогими лабораторними аналізаторами, поєднуючи кількісну точність із портативністю та доступною вартістю.

4.4 Методологічна новизна розробленої системи

Розроблена біосенсорна система є першою електрохімічною системою для одночасного визначення активності АЛТ та АСТ. Її новизна полягає у поєднанні піруватоксидази (ПОкс) для детекції АЛТ та глутаматоксидази (ГлОкс) для детекції АСТ в рамках єдиної амперометричної платформи — на відміну від усіх відомих мультианалітичних систем (табл. 4.1), що базуються виключно на оптичних методах із хромогенними субстратами (ТМВ, DAOS, 4ААП+DHBS тощо) або іншими ензимними парами (ЛДГ і МДГ).

Ключовою відмінністю є не лише вибір ензимної пари, а й розроблена процедура послідовного внесення реагентів до електрохімічної комірки, яка розділяє реакції трансаміназ у часі та забезпечує чистий незалежний сигнал на відповідну трансаміназу. А саме, такий підхід усуває неселективний сигнал від АЛТ на першому сенсорі та реалізує справжній мультианалітичний аналіз без хромогенних реагентів-посередників.

4.5 Перспективи розвитку та впровадження

За результатами проведених досліджень розпочато метрологічну атестацію та впровадження розробленої в даній роботі біосенсорної системи: затверджено методику вимірювання активності АСТ (Додаток З), методика біосенсорного вимірювання АЛТ перебуває в стадії оформлення, систему впроваджено в ТОВ «Укрмедсерт» (Додаток И). Для повноцінного клінічного впровадження необхідні стандартизація виготовлення біосенсорів, розширення валідаційних досліджень для point-of-care діагностики.

Перспективні напрями продовження досліджень охоплюють:

- автоматизацію послідовної доставки реагентів для подальшого спрощення робочого навантаження оператора та для переведення системи до повністю автономного клінічного застосування;
- мініатюризацію біосенсорної системи із застосуванням screen-printed електродів та мікрофлюїдних систем придатних до роботи в тому числі з цільною кров'ю;
- інтеграцію з бездротовими системами передачі даних та штучним інтелектом для автоматизованої інтерпретації результатів;
- створення імплантованих або носимих систем безперервного моніторингу трансаміназ;
- дослідження можливості визначення трансаміназ у альтернативних біологічних рідинах (слина, піт) для неінвазивного моніторингу;
- розробку мультианалітичних біосенсорних панелей комплексної оцінки стану пацієнта для призначення екстреного лікування із включенням тропоніну т, лактату, γ -глутамілтрансферази, лужної фосфатази, білірубіну та інших маркерів;
- вдосконалення стратегій подовження терміну зберігання та операційної стабільності біосенсорів до 6–12 місяців.

Незважаючи на окреслені перспективи подальшого розвитку системи, слід підкреслити, що вже на поточному етапі вона демонструє достатній рівень для практичного застосування: визначення активності АЛТ, АСТ та їхнього співвідношення в реальних клінічних зразках крові хворих із патологіями печінки та серця — що переконливо підтверджується результатами, представленими в цій дисертаційній роботі.

Успішне впровадження такої системи сприятиме підвищенню доступності біохімічної діагностики та матиме значний практичний ефект для охорони здоров'я, насамперед в умовах децентралізації медицини та зростаючих вимог до оперативної діагностики в первинній ланці.

ВИСНОВКИ

У дисертаційній роботі розроблено, оптимізовано та адаптовано амперометричну біосенсорну систему для одночасного визначення активності аланінамінотрансферази та аспартатамінотрансферази у сироватці крові для застосування в клінічній діагностиці захворювань печінки та серцево-судинної системи.

1. Розроблено та оптимізовано конструкції трьох типів ензиматичних амперометричних моносенсорів: АЛТ-чутливі біосенсиори на основі піруватоксидази (ПОкс) та глутаматоксидази (ГлОкс) та АСТ-чутливий біосенсор на основі ГлОкс, зокрема процедуру модифікації амперометричних перетворювачів додатковою напівпроникною мембраною на основі ПФД, процес іммобілізації ензимів (поперечна ковалентна зшивка ГлОкс та включення в фотополімер ПОкс). Вивчено вплив параметрів розчину (тип буферу, його концентрація, рН, вміст субстратів та кофакторів ПОкс, вміст субстратів АЛТ та АСТ) на функціонування розроблених монобіосенсорів та обрано його оптимальний склад для подальшої роботи біосенсорів.

2. Проведено детальну порівняльну характеристику двох варіантів АЛТ-чутливих біосенсорів (на основі ПОкс та ГлОкс) та показано перевагу біосенсора на основі ПОкс за чутливістю до цільового ензиму, специфічністю функціонування та перспективністю до використання в більш складній системі.

3. Оптимізовані та адаптовані для одночасної роботи АСТ- та АЛТ-чутливі моносенсиори об'єднано в єдину амперометричну біосенсорну систему зі спеціальною процедурою послідовного внесення субстратів для диференціювання сигналів на зміну активності АЛТ та АСТ в розчині. Всебічно досліджено параметри функціонування біосенсорної системи в модельних та біологічних рідинах та вивчено її аналітичні характеристики: лінійні діапазони визначення становлять 1–500 Од.акт./л для АЛТ (мінімальна межа визначення = 1 Од.акт./л) та 1–200 Од.акт./л для АСТ (мінімальна межа визначення = 1 Од.акт./л). Діапазони вимірювання охоплюють клінічно

значимі концентрації ензимів за норми та патології.

4. Створено протокол застосування та здійснено апробацію розробленого лабораторного прототипу біосенсорної системи при одночасній детекції активності АЛТ та АСТ у зразках сироватки людини. Достовірність результатів вимірювання активності трансаміназ у сироватці крові біосенсорним методом підтверджено високою кореляцією з референсним спектрофотометричним методом: коефіцієнти кореляції становили $R=0,994$ для АЛТ та $R=0,989$ для АСТ.

5. Характеристики розробленої системи порівнянно з відомими розробками, доведено її переваги та визначено перспективи практичного застосування для: експрес-діагностики функціонального стану печінки та серця в умовах клінічних лабораторій, моніторингу ефективності лікування пацієнтів та створення портативних point-of-care пристроїв.

СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

1. Goetz, L. H.; Schork, N. J. Personalized medicine: motivation, challenges, and progress. *Fertility and Sterility* **2018**, 109 (6), 952–963. DOI: 10.1016/j.fertnstert.2018.05.006.
2. Ennezat, P.-V.; Cosgrove, S.; Bouvaist, H.; Maréchaux, S.; Guerbaai, R.-A.; Jemtel, T. L.; Andréjak, M.; Vital-Durand, D. From evidence-based medicine to personalized medicine, with particular emphasis on drug-safety monitoring. *Archives of Cardiovascular Diseases* **2017**, 110 (6–7), 413–419. DOI: 10.1016/j.acvd.2017.01.011.
3. Garzón, V.; Bustos, R.-H.; Pinacho, D. G. Personalized Medicine for antibiotics: The role of nanobiosensors in therapeutic drug monitoring. *Journal of Personalized Medicine* **2020**, 10 (4), 147. DOI: 10.3390/jpm10040147.
4. Momper, J. D.; Wagner, J. A. Therapeutic drug monitoring as a component of personalized medicine: Applications in Pediatric drug development. *Clinical Pharmacology & Therapeutics* **2013**, 95 (2), 138–140. DOI: 10.1038/clpt.2013.227.
5. Tamber, S. S.; Bansal, P.; Sharma, S.; Singh, R. B.; Sharma, R. Biomarkers of liver diseases. *Molecular Biology Reports* **2023**, 50 (9), 7815–7823. DOI: 10.1007/s11033-023-08666-0.
6. Shen, J.; Zhang, J.; Wen, J.; Ming, Q.; Zhang, J.; Xu, Y. Correlation of Serum Alanine Aminotransferase and Aspartate. Available online: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC4443194/> (accessed 2025-02-22)
7. Liu, X.; Liu, P. Elevated AST/ALT Ratio is Associated with All-Cause Mortality in Patients with Stable Coronary Artery Disease: A Secondary Analysis Based on a Retrospective Cohort Study. *Sci. Rep.* **2022**, 12 (1), 9231. DOI: 10.1038/s41598-022-13355-2
8. Djakpo, D. K.; Wang, Z. Q.; Shrestha, M. The Significance of Transaminase Ratio (AST/ALT) in Acute Myocardial Infarction. *Arch. Med. Sci. Atheroscler. Dis.* **2020**, 5 (1), 279–283. DOI: 10.5114/amsad.2020.103028
9. Tong, M. J.; El-Farra, N. S.; Grew, M. I. Clinical Manifestations of Hepatitis

- A: Recent Experience in a Community Teaching Hospital. *J. Infect. Dis.* **1995**, 171 (Supplement_1), S15–S18. DOI: 10.1093/infdis/171.Supplement_1.S15
10. Vinholt Schiodt, F.; Davern, T. J.; Shakil, A.; et al. Viral Hepatitis-Related Acute Liver Failure. *Am. J. Gastroenterol.* **2003**, 98 (2), 448–453. DOI: 10.1111/j.1572-0241.2003.t01-1-07223.x
 11. Anderson, F. H.; Zeng, L.; Rock, N. R.; Yoshida, E. M. An Assessment of the Clinical Utility of Serum ALT and AST in Chronic Hepatitis C. *Hepatol. Res.* **2000**, 18 (1), 63–71. DOI: 10.1016/s1386-6346(99)00085-6
 12. Khattab, H.; Fouad, A.; Hamza, M.; et al. Relation of ALT and AST Levels to the Histopathological Changes in Liver Biopsies of Patients with Chronic Hepatitis C Genotype 4. *Arab J. Gastroenterol.* **2015**, 16 (2), 50–53. DOI: 10.1016/j.ajg.2015.06.004
 13. Zhang, Lx.; Lv, Y.; Xu, A. M.; et al. The Prognostic Significance of Serum Gamma-Glutamyltransferase Levels and AST/ALT in Primary Hepatic Carcinoma. *BMC Cancer* **2019**, 19, 841. DOI: 10.1186/s12885-019-6011-8.
 14. Giannini, E. G.; Testa, R.; Savarino, V. Liver Enzyme Alteration: A Guide for Clinicians. *CMAJ* **2005**, 172 (3), 367–379. DOI: 10.1503/cmaj.1040752.
 15. Cho, G. J.; Kim, H. Y.; Park, J. H.; Ahn, K.; Hong, S.; Oh, M.; Kim, H. Prepregnancy Liver Enzyme Levels and Risk of Preeclampsia in a Subsequent Pregnancy: A Population-Based Cohort Study. *Liver Int.* **2017**, 38 (5), 949–954. DOI: 10.1111/liv.13617.
 16. Chen, L. Z.; Lin, Z. H.; Chen, J.; Liu, S. S.; Shi, T.; Xin, Y. N. Can Elevated Concentrations of ALT and AST Predict the Risk of ‘Recurrence’ of COVID-19? *Epidemiol. Infect.* **2020**, 148, e218. DOI: 10.1017/s0950268820002186.
 17. Mathur, T.; Manadan, A. M.; Thiagarajan, S.; Hota, B.; Block, J. A. Serum Transaminases Are Frequently Elevated at Time of Diagnosis of Idiopathic Inflammatory Myopathy and Normalize with Creatine Kinase. *JCR: J. Clin. Rheumatol.* **2014**, 20 (3), 130–132. DOI: 10.1097/rhu.0000000000000038.
 18. Yadav, D.; Choi, E.; Ahn, S. V.; et al. Incremental Predictive Value of Serum AST-to-ALT Ratio for Incident Metabolic Syndrome: The ARIRANG Study.

- PLoS One* **2016**, 11 (8), e0161304. DOI: 10.1371/journal.pone.0161304.
19. Weibrecht, K.; Dayno, M.; Darling, C.; Bird, S. B. Liver Aminotransferases Are Elevated with Rhabdomyolysis in the Absence of Significant Liver Injury. *J. Med. Toxicol.* **2010**, 6, 294–300. DOI: 10.1007/s13181-010-0075-9.
 20. Zhou, J.; He, Z.; Ma, S.; Liu, R. AST/ALT Ratio as a Significant Predictor of the Incidence Risk of Prostate Cancer. *Cancer Med.* **2020**, 9 (15), 5672–5677. DOI: 10.1002/cam4.3086.
 21. Lee, H.; Choi, Y. H.; Sung, H. H.; Han, D. H.; Jeon, H. G.; Jeong, B. C.; Choi, H. Y. De Ritis Ratio (AST/ALT) as a Significant Prognostic Factor in Patients with Upper Tract Urothelial Cancer Treated with Surgery. *Clin. Genitourin. Cancer* **2017**, 15 (3), e379–e385. DOI: 10.1016/j.clgc.2016.08.023.
 22. Riedl, J. M.; Posch, F.; Prager, G.; et al. The AST/ALT (De Ritis) Ratio Predicts Clinical Outcome in Patients with Pancreatic Cancer Treated with First-Line Nab-Paclitaxel and Gemcitabine: Post Hoc Analysis of an Austrian Multicenter, Noninterventional Study. *Ther. Adv. Med. Oncol.* **2020**, 12. DOI: 10.1177/1758835919900872.
 23. Jamjute, P.; Ahmad, A.; Ghosh, T.; Banfield, P. Liver Function Test and Pregnancy. *J. Matern. Fetal Neonatal Med.* **2009**, 22 (3), 274–283. DOI: 10.1080/14767050802211929.
 24. Song, S.; Zhang, Y.; Qiao, X.; Duo, Y.; Xu, J.; Peng, Z.; Zhao, W. ALT/AST as an Independent Risk Factor of Gestational Diabetes Mellitus Compared with TG/HDL-C. *Int. J. Gen. Med.* **2022**, 15, 115–121. DOI: 10.2147/IJGM.S332946.
 25. An, R.; Ma, S.; Zhang, N.; Lin, H.; Xiang, T.; Chen, M.; Tan, H. AST-to-ALT Ratio in the First Trimester and the Risk of Gestational Diabetes Mellitus. *Front. Endocrinol.* **2022**, 13, 1017448. DOI: 10.3389/fendo.2022.1017448.
 26. Asgharnia, M.; Mirblouk, F.; Salamat, F.; Ashrafkhani, B.; Dirbaz, Z. Predictive Value of Aspartate Aminotransferase and Alanine Aminotransferase Levels in Vaginal Fluid for the Diagnosis of Premature Rupture of Membranes. *Iran. J. Reprod. Med.* **2014**, 12 (4), 269. DOI: PMC4071632.

27. Interchim. AST/GOT Liqui-UV ® Test Procedure No. FT687. <https://www.interchim.fr/ft/F/FT6870.pdf> (accessed 2025-02-22).
28. Linear Chemicals. AST/GOT BR opt. <https://www.linear.es/wp-content/uploads/2018/03/1109000I-Rev.-02.pdf> (accessed 2025-02-22)
29. ThermoFisher Scientific. Alanine Aminotransferase (ALT/GPT) Activity Assay Kit. <https://assets.thermofisher.com/TFS-Assets%2FBD%2Fmanuals%2FEEA001-manual-metabolic-final.pdf> (accessed 2025-02-22)
30. Medichem Middle East. SGPT/ALT Kinetic UV method based on IFCC recommendations. http://www.medichem-me.com/Method/english/SGPT_ALT.pdf (accessed 2025-02-22)
31. Linear Chemicals. ALT/GPT BR opt. <https://www.linear.es/wp-content/uploads/2018/03/1105000I-Rev.-02.pdf> (accessed 2025-02-22)
32. Tian, D.; Xiang, W.; Wang, H.; Jiang, W.; Li, T.; Yang, M. Optical Assay Using B-Doped Core–Shell Fe@BC Nanozyme for Determination of Alanine Aminotransferase. *Microchim. Acta* **2022**, 189 (4). DOI: 10.1007/s00604-021-05056-w
33. Sigma Aldrich. AST Activity Assay Kit. <https://www.sigmaaldrich.com/FR/fr/product/sigma/mak055> (accessed 2025-02-22)
34. Biolabo. ALT GPT Colorimetric method. <https://www.biolabo.fr/pdfs/noticesE/biochimieE/AT-92027.pdf> (accessed 2025-02-22)
35. Biolabo. AST GOT Colorimetric method. <https://www.biolabo.fr/pdfs/noticesE/biochimieE/AT-92025.pdf> (accessed 2025-02-22)
36. AmpLite® Colorimetric Alanine Aminotransferase Assay Kit *Blue Color* | AAT BioQuest. (n.d.). <https://docs.aatbio.com/products/protocols/kit/protocol-for-amplite-colorimetric-alanine-aminotransferase-assay-kit-blue-color-version-rra90.pdf> (accessed 2025-02-22)

37. Abbexa.com. (n.d.). <https://www.abbexa.com/alanine-transaminase-alt-assay-kit-1?srsId=AfmBOoraNJQSosHTrDSXJhq-CU1cnPiKHhC3rPmgZTZ1ke334BM6VfrW> (accessed 2025-02-22)
38. Zappacosta, F.; Sannia, G.; Savoy, L.; Marino, G.; Pucci, P. Post-Translational Modifications in Aspartate Aminotransferase from *Sulfolobus solfataricus*. *Eur. J. Biochem.* **1994**, 222 (3), 761–767. DOI: 10.1111/j.1432-1033.1994.tb18922.x
39. Yan, X.; Li, X.; Zhang, C.; Xu, Y.; Cooks, R. G. Ambient ionization mass spectrometry measurement of aminotransferase activity. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **2017**, 28, 1175–1181. DOI: 10.1007/s13361-016-1591-x
40. Li, L.; Wang, M.; Chen, S.; et al. A urinary metabonomics analysis of long-term effect of acetochlor exposure on rats by ultra-performance liquid chromatography/mass spectrometry. *Pestic. Biochem. Phys.* **2016**, 128, 82–88. DOI: 10.1016/j.pestbp.2015.09.013
41. De Raad, M.; Koper, K.; Deng, K.; Bowen, B. P.; Maeda, H. A.; Northen, T. R. Mass spectrometry imaging-based assays for aminotransferase activity reveal a broad substrate spectrum for a previously uncharacterized enzyme. *J. Biol. Chem.* **2023**, 299, 102939. DOI: 10.1016/j.jbc.2023.102939
42. Carunchio, V.; Castellano, P.; Girelli, A.; Messina, A. Simultaneous assay for aspartate aminotransferase and guanase in human serum by high-performance liquid chromatography. *J. Chromatogr. B: Biomed. Sci. Appl.* **1997**, 689, 305–311. DOI: 10.1016/S0378-4347(96)00353-2
43. Kim, H. J.; Kim, S. Y.; Shin, S. P.; Yang, Y. J.; Bang, C. S.; Baik, G. H.; Kim, D. J.; Ham, Y. L.; Choi, E. Y.; Suk, K. T. Immunological Measurement of Aspartate/Alanine Aminotransferase in Predicting Liver Fibrosis and Inflammation. *Korean J. Intern. Med.* **2019**, 35 (2), 320–330. DOI: 10.3904/kjim.2018.214
44. Jeong, S. Y.; Kim, K. J.; Kim, D. J.; Oh, S. W.; Choi, E. Y. Sandwich ELISA for Measurement of Cytosolic Aspartate Aminotransferase in Sera from Patients with Liver Diseases. *Clin. Chem.* **2003**, 49 (5), 826–829. DOI:

10.1373/49.5.826

45. Kim, H. J.; Oh, S. W.; Kim, D. J.; Choi, E. Y. Abundance of Immunologically Active Alanine Aminotransferase in Sera of Liver Cirrhosis and Hepatocellular Carcinoma Patients. *Clin. Chem.* **2009**, 55 (5), 1022–1025. DOI: 10.1373/clinchem.2008.102996
46. Tripathi, P.; Bala, L., Saxena; R., Yachha; S. K., Roy, R.; Khetrapal, C. L. ¹H NMR spectroscopic study of blood serum for the assessment of liver function in liver transplant patients. *J Gastrointestin Liver Dis.* **2009**, 18 (3), 329–336. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19795028>
47. Letertre, M. P. M.; Giraudeau, P.; De Tullio, P. Nuclear magnetic resonance spectroscopy in Clinical metabolomics and Personalized Medicine: Current challenges and Perspectives. *Frontiers in Molecular Biosciences* **2021**, 8. DOI: 10.3389/fmolb.2021.698337.
48. Ghazizadeh, E.; Naseri, Z.; Deigner, H.-P.; Rahimi, H.; Altintas, Z. Approaches of wearable and implantable biosensor towards of developing in precision medicine. *Frontiers in Medicine* **2024**, 11, 1390634. DOI: 10.3389/fmed.2024.1390634.
49. Tyler, J.; Choi, S. W.; Tewari, M. Real-time, personalized medicine through wearable sensors and dynamic predictive modeling: A new paradigm for clinical medicine. *Current Opinion in Systems Biology* **2020**, 20, 17–25. DOI: 10.1016/j.coisb.2020.07.001.
50. Chinnappan, R.; Mir, T. A.; Alsalameh, S.; Makhzoum, T.; Alzhrani, A.; Al-Kattan, K.; Yaqinuddin, A. Low-Cost Point-of-Care Monitoring of ALT and AST is Promising for Faster Decision Making and Diagnosis of Acute Liver Injury. *Diagnostics* **2023**, 13, 2967. DOI: 10.3390/diagnostics13182967
51. Sang, J.; et al. Portable dual-channel blood enzyme analyzer for point-of-care liver function detection. *Analyst* **2023**, 148, 6020–6027. DOI: 10.1039/D3AN01432K
52. Liu, X.; Mei, X.; Yang, J.; Li, Y. Hydrogel-Involved colorimetric platforms based on layered double oxide nanozymes for Point-of-Care detection of Liver-

- Related biomarkers. *ACS Appl. Mater. Interfaces* **2022**, 14, 6985–6993. DOI: 10.1021/acsami.1c21578
53. Baek, S. H.; Park, C.; Jeon, J.; Park, S. Three-Dimensional Paper-Based Microfluidic Analysis Device for Simultaneous Detection of Multiple Biomarkers with a Smartphone. *Biosensors* **2020**, 10, 187. DOI: 10.3390/bios10110187
 54. Wang, L.; Chu, H.; Tsai, J.; Yang, J. Aspartate Aminotransferase and Alanine Aminotransferase Detection on Paper-Based Analytical Devices with Inkjet Printer-Sprayed Reagents. *Micromachines* **2016**, 7, 1. DOI: 10.3390/mi7010009
 55. Liang, W.-H.; Chu, C.-H.; Yang, R.-J. Bio-sample detection on paper-based devices with inkjet printer-sprayed reagents. *Talanta* **2015**, 145, 6–11. DOI: 10.1016/j.talanta.2015.06.029
 56. Pollock, N. R.; Rolland, J. P.; Kumar, S.; Beattie, P. D.; Jain, S.; Noubary, F.; Wong, V. L.; Pohlmann, R. A.; Ryan, U. S.; Whitesides, G. M. A paper-based multiplexed transaminase test for low-cost, point-of-care liver function testing. *Sci. Transl. Med.* **2012**, 4, 152. DOI: 10.1126/scitranslmed.3003981
 57. Mu, X.; Qi, L.; Qiao, J.; Zhang, H.; Ma, H. Study on alanine aminotransferase kinetics by microchip electrophoresis. *Anal. biochem* **2012**, 421(2), 499-505. DOI: 10.1016/j.ab.2011.11.037
 58. Bergmeyer, H. U.; Scheibe, P.; Wahlefeld, A. W. Optimization of methods for aspartate aminotransferase and alanine aminotransferase. *Clin. Chem.* **1978**, 24(1), 58-73. DOI: 10.1093/clinchem/24.1.58
 59. Borkum, J. M. The Tricarboxylic Acid Cycle as a Central Regulator of the Rate of Aging: Implications for Metabolic Interventions. *Adv. Biol.* **2023**, 7 (7), 2300095. DOI: 10.1002/adbi.202300095
 60. Fukui-Kawaura, S.; Kawahara, T.; Araki, Y.; Nishimura, R.; Uemura, K.; Namura, K.; Mizuno, N.; Yao, M.; Uemura, H.; Ikeda, I. A Higher De Ritis Ratio (AST/ALT) is a Risk Factor for Progression in High-Risk Non-Muscle Invasive Bladder Cancer. *Oncotarget* **2021**, 12 (9), 917–922. DOI:

10.18632/oncotarget.27944

61. Yassuda Filho, P.; Bracht, A.; Ishii-Iwamoto, E. L.; et al. The Urea Cycle in the Liver of Arthritic Rats. *Mol. Cell Biochem.* **2003**, 243, 97–106. DOI: 10.1023/A:1021695625457
62. PubChem. Glucose-Alanine Cycle. PubChem. Available online: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/pathway/PathBank:SMP0000127>
63. Dong MH, Bettencourt R, Barrett-Connor E, Loomba R. Alanine aminotransferase decreases with age: the Rancho Bernardo Study. *PloS one.* **2010**;5(12e):14254
64. Elinav E, Ben-Dov IZ, Ackerman E, Kiderman A, Glikberg F, Shapira Y, Ackerman Z. Correlation between serum alanine aminotransferase activity and age: an inverted U curve pattern. *American J. of Gasrtoent.* **2005**;100(10):2201-2204
65. Dong MH, Bettencourt R, Brenner DA, Barrett-Connor E, Loomba R. Serum levels of alanine aminotransferase decrease with age in longitudinal analysis. *Clin. Gastroent. and Hepat.* **2012**;10(3):285-290
66. Clark JM, Brancati FL, Diehl AM. The prevalence and etiology of elevated aminotransferase levels in the United States. *The American J. of Gastroent.* **2003**;98(5):960-967
67. Pan J-J, Qu H-Q, Rentfro A, McCormick JB, Fisher-Hoch SP, Fallon MB. Prevalence of metabolic syndrome and risks of abnormal serum alanine aminotransferase in Hispanics: a population-based study. *PloS one.* **2011**;6(6e):21515
68. Prati, D.; Taioli, E.; Zanella, A.; et al. Updated Definitions of Healthy Ranges for Serum Alanine Aminotransferase Levels. *Ann. Intern. Med.* **2002**, 137 (1), 1–10. DOI: 10.7326/0003-4819-137-1-200207020-00006
69. Ndrepepa, G.; Holdenrieder, S.; Cassese, S.; et al. Aspartate Aminotransferase and Mortality in Patients with Ischemic Heart Disease. *Nutr. Metab. Cardiovasc. Dis.* **2020**, 30 (12), 2335–2342. DOI: 10.1016/j.numecd.2020.07.033

70. Liu, Z.; Que, S.; Xu, J.; Peng, T. Alanine Aminotransferase—Old Biomarker and New Concept: A Review. *Int. J. Med. Sci.* **2014**, 11 (9), 925–935. DOI: 10.7150/ijms.8951
71. Ndrepepa, G.; Holdenrieder, S.; Kastrati, A. Prognostic Value of De Ritis Ratio with Aspartate Aminotransferase and Alanine Aminotransferase Within the Reference Range. *Clin. Chim. Acta* **2022**, 538, 46–52. DOI: 10.1016/j.cca.2022.11.005
72. Zhou, W. C.; Zhang, Q. B.; Qiao, L. Pathogenesis of Liver Cirrhosis. *World J. Gastroenterol.* **2014**, 20 (23), 7312. DOI: 10.3748/wjg.v20.i23.7312
73. Glinghammar, N. (). Detection of the mitochondrial and catalytically active alanine aminotransferase in human tissues and plasma. *Int. J. of Mol. Med.* **2009**, 23 (5). DOI: 10.3892/ijmm_00000173
74. Grøstad, M.; Rej, R.; Huseby, N. E. Mitochondrial aspartate aminotransferase determined by “Fast Protein Liquid Chromatography.” *Clin. Chem.* **1990**, 36, 348–350. DOI: 10.1093/clinchem/36.2.348
75. Banks, B. E. C.; Doonan, S.; Flogel, M.; Porter, P. B.; Vernon, C. A.; Walker, J. M.; Crouch, T. H.; Halsey, J. F.; Chiancone, E.; Fasella, P. An Assessment of Some of the Methods Available for the Determination of Molecular Weights of Proteins as Applied to Aspartate Aminotransferase from Pig Heart. *J. Biochem.* **1976**, 71 (2), 469–473. DOI: 10.1111/j.1432-1033.1976.tb11135.x
76. Sampson, E. J.; Hannon, W. H.; McKneally, S. S.; McKenzie, C.; Miller, S. A.; Whitner, V. S.; Burtis, C. A. Column chromatography and immunoassay compared for measuring the isoenzymes of aspartate aminotransferase in serum. *Clin. Chem.* **1979**, 25, 1691–1695. DOI: 10.1093/clinchem/25.10.1691
77. Nealon, D. A.; Rej, R. Quantitation of aspartate aminotransferase isoenzymes after electrophoretic separation. *Anal. Biochem.* **1987**, 161, 64–69. DOI: 10.1016/0003-2697(87)90652-x
78. Raya, A. G.; Zuniga, R. C.; Salodo, E. M.; et al. Isolated elevation of aspartate aminotransferase (AST) in an asymptomatic patient due to macro-AST. *J. Clin. Lab. Anal.* **2019**, 33, e22690. DOI: 10.1002/jcla.22690

79. Garrison, D.; Beattie, J.; Namboodiri, M. A radiochemical microassay for aspartate aminotransferase activity in the nervous system. *Anal. Biochem.* **1988**, 172, 96–103. DOI: 10.1016/0003-2697(88)90416-2
80. Mitsuhiro, O.; Yoshimasa, M. Affinity labeling of aspartate aminotransferase isozymes by bromopyruvate. *J. Biol. Chem.* **1973**, 248, 82–90. DOI: 10.1074/jbc.248.1.82
81. Perales, M.; Sener, A.; Malaisse, W. Radioisotopic Assay of Aspartate and Alanine Aminotransferase. *Clin. Biochem.* **1992**, 25, 105–107. DOI: 10.1016/0009-9120(92)80052-I
82. An, L. Detection of glutamate, glutamine, and glutathione by radiofrequency suppression and echo time optimization at 7 tesla. *Magn. Reson. Med.* **2015**, 73, 451–458. DOI: 10.1002/mrm.25150
83. Hassanpour, S.; Karami, S. Evaluation of hepatic biomarkers in pregnant women with preeclampsia. *Gynecol. Obstet.* **2018**, 8, 487. DOI: 10.4172/2161-0932.1000487
84. Mohammad Raman, M.; Kambiz, H.; Shamileh, R.; Farid, Z.; Abbas, A.; Pooneh, K.; et al. Effect of chloroformic extract of *Cichorium intybus* on liver function tests and serum level of TNF-alpha in obstructive cholestasis in rat. Available online: <http://sjku.muk.ac.ir/article-1-1595-en.html> (accessed 2025-02-22)
85. Relimpio, A.; Iriarte, A.; Chlebowski, J.; Martinez-Carrion, M. Differential scanning calorimetry of cytoplasmic aspartate transaminase. *J. Biol. Chem.* **1981**, 256, 4478–4488. DOI: 10.1016/s0021-9258(19)69460-3
86. Mu, X.; Qi, L.; Qiao, J.; Zhang, H.; Ma, H. Study on Alanine Aminotransferase Kinetics by Microchip Electrophoresis. *Anal. Biochem.* **2012**, 421 (2), 499–505. Epub 2011 Dec 3. DOI: 10.1016/j.ab.2011.11.037
87. Li, T.; Yuan, J.; Yin, J.; Zhang, Z.; Wang, E. Capillary electrophoresis with electrochemiluminescence detection for measurement of aspartate aminotransferase and alanine aminotransferase activities in biofluids. *J. Chromatogr. A* **2006**, 1134, 311–316. DOI: 10.1016/j.chroma.2006.08.088

88. Elabscience. Alanine Aminotransferase (ALT/GPT) Activity Fluorometric Assay Kit. https://file.elabscience.com/Manual/biochemical_kits/E-BC-F038-Elabscience.pdf (accessed 2025-02-22)
89. Aspartate Aminotransferase Activity Assay Kit (Fluorometric) (ab138878) | Abcam. (2023, August 8). <https://www.abcam.com/en-us/products/assay-kits/aspartate-aminotransferase-activity-assay-kit-fluorometric-ab138878> (accessed 2025-02-22)
90. Sigma Aldrich. ALT Activity Assay. <https://www.sigmaaldrich.com/FR/fr/product/sigma/mak052> (accessed 2025-02-22)
91. Krishna, N. S.; Pathak, A.; Suneesh, P.; Babu, T. S. Fluorescent Detection of Aspartate Transaminase Using N-Doped Carbon Dots. *Mater. Today Proc.* **2020**, 33, 2396–2401. DOI: 10.1016/j.matpr.2020.06.474
92. Chen, M.; Rong, L.; Chen, X. A Simple and Sensitive Detection of Glutamic-Pyruvic Transaminase Activity Based on Fluorescence Quenching of Bovine Serum Albumin. *RSC Adv.* **2015**, 5 (125), 103557–103562. DOI: 10.1039/c5ra24162f
93. Mruga, D.; Berketa, K.; Dzyadevych, S.; Soldatkin, O. Biosensors for transaminase detection: Their diversity and trends – A comprehensive review. *TrAC Trends in Analytical Chemistry* **2025**, 193, 118460. DOI: 10.1016/j.trac.2025.118460.
94. Mizutani, F.; et al. Determination of Glutamate Pyruvate Transaminase and Pyruvate with an Amperometric Pyruvate Oxidase Sensor. *Anal. Chim. Acta* **1980**, 118 (1), 65–71. DOI: 10.1016/S0003-2670(01)93714-6
95. Huang, X.-J.; et al. Aspartate aminotransferase (AST/GOT) and alanine aminotransferase (ALT/GPT) detection techniques. *Sensors* **2006**, 6, 756–782. DOI: 10.3390/s6070756
96. Yadav, S.; et al. Current Advancement in Biosensing Techniques for Determination of Alanine Aminotransferase and Aspartate Aminotransferase—A Mini Review. *Process Biochem.* **2022**, 114, 71–76. DOI:

10.1016/j.procbio.2022.01.010

97. Yaman, D.; Jimenez, M.; Gonzalez, S. F.; Corrigan, D. Current Trends in Electrochemical Approaches for Liver Biomarker Detection: A Mini-Review. *The Analyst* **2024**, 149, 5156–5164. DOI: 10.1039/d4an01109k
98. Pratt, D. S. Liver Chemistry and Function Tests. In Sleisenger and Fordtran's Gastrointestinal and Liver Disease, 9th ed.; Feldman, M.; Friedman, L. S.; Brandt, L. J., Eds.; Saunders: Philadelphia, **2010**; 1227–1237. DOI: 10.1016/B978-1-4160-6207-3.X0001-7
99. Hirano, K.; et al. Determination of mitochondrial aspartate aminotransferase in serum. *Clin. Chim. Acta* **1986**, 155, 251–262. DOI: 10.1016/0009-8981(86)90245-7
100. Resmi, P.; Kumar, S.; Alageswari, D.; Suneesh, P.; Ramachandran, T.; Nair, B. G.; Babu, T. S. Development of a paper-based analytical device for the colourimetric detection of alanine transaminase and the application of deep learning for image analysis. *Anal. Chim. Acta* **2021**, 1188, 339158. DOI: 10.1016/j.aca.2021.339158
101. Zeng, Y.; Wang, B.; Cheng, J.; Ren, C.; Guo, J.; Liu, R.; Liu, S.; Guo, J. A Miniaturized Liver Function Detection System with Machine Learning Enhancing Strategy. *Biosensors and Bioelectronics* **2025**, 287, 117667. DOI: 10.1016/j.bios.2025.117667
102. Li, S.; Chen, Z.; Yang, F.; Yue, W. Self-template sacrifice and in situ oxidation of a constructed hollow MnO₂ nanozymes for smartphone-assisted colorimetric detection of liver function biomarkers. *Analytica Chimica Acta* **2023**, 1278, 341744. DOI: 10.1016/j.aca.2023.341744
103. Cui, Z.; Ayva, C. E.; Liew, Y. J.; Guo, Z.; Mutschler, R.; Dreier, B.; Fiorito, M. M.; Walden, P.; Howard, C. B.; Ely, F.; Plückthun, A.; Pretorius, C.; Ungerer, J. P.; Buckle, A. M.; Alexandrov, K. mRNA Display Pipeline for Protein Biosensor Construction. *ACS Sensors* **2024**, 9, 2846–2857. DOI: 10.1021/acssensors.3c02471
104. Sha, H.; Yan, B. Dye-functionalized metal–organic frameworks with the

- uniform dispersion of MnO₂ nanosheets for visualized fluorescence detection of alanine aminotransferase. *Nanoscale* **2021**, 13, 20205–20212. DOI: 10.1039/D1NR05376K
105. Tang, Z.; et al. Molecular beacon based bioassay for highly sensitive and selective detection of nicotinamide adenine dinucleotide and the activity of alanine aminotransferase. *Anal. Chem.* **2011**, 83, 2505–2510. DOI: 10.1021/ac102742k
 106. Liu, C.; Qi, L.; Zhang, S.; Wang, X.; Guo, X.; Liu, H.; Shi, X. Color-tunable graphene quantum dots via one-step nitrogen-induced intramolecular charge transfer for in vivo/vitro aminotransferase fluorescence sensing. *Sens. Actuators B: Chem.* **2024**, 418, 136245. DOI: 10.1016/j.snb.2024.136245
 107. Chu, H.-H.; et al. A Nano-Functionalized Real-Time Electrochemiluminescent Biosensor for Alanine Transaminase Assay. *Sci. China Chem.* **2011**, 54, 816–821. DOI: 10.1007/s11426-010-4148-z
 108. Lai, W.; Shi, Y.; Zhong, J.; Zhou, X.; Yang, Y.; Chen, Z.; Zhang, C. A dry chemistry-based electrochemiluminescence device for point-of-care testing of alanine transaminase. *Talanta* **2023**, 256, 124287. DOI: 10.1016/j.talanta.2023.124287
 109. Singh, R.; Wang, Z.; Marques, C.; Min, R.; Zhang, B.; Kumar, S. Alanine aminotransferase detection using TIT-assisted four tapered fiber structure-based LSPR sensor: From healthcare to marine life. *Biosens. Bioelectron.* **2023**, 236, 115424. DOI: 10.1016/j.bios.2023.115424
 110. Wang, Z.; Singh, R.; Marques, C.; Jha, R.; Zhang, B.; Zhang, B.; Kumar, S.; Kumar, S. Taper-in-taper fiber structure-based LSPR sensor for alanine aminotransferase detection. *Opt. Express* **2021**, 29, 43793–43810. DOI: 10.1364/OE.447202
 111. Yadav, S.; Dwivedi, D. K.; Lohia, P.; Singh, Y. Highly Sensitive PCF-SPR RI Sensor for ALT detection: Clinical Application for liver injury diagnosis. *Plasmonics* **2025**. DOI: 10.1007/s11468-025-03130-0
 112. Xuan, G. S.; Oh, S. W.; Choi, E. Y. Development of an Electrochemical

- Immunosensor for Alanine Aminotransferase. *Biosens. Bioelectron.* **2003**, 19, 365–371. DOI: 10.1016/S0956-5663(03)00194-5
113. Jamal, M.; Worsfold, O.; McCormac, T.; Dempsey, E. A Stable and Selective Electrochemical Biosensor for the Liver Enzyme Alanine Aminotransferase (ALT). *Biosens. Bioelectron.* **2009**, 24, 2926–2930. DOI: 10.1016/j.bios.2009.02.032
 114. Mruga, D.; Dzyadevych, S.; Soldatkin, O. High-Selective Alanine Transaminase-Sensitive Biosensor Based on Nanosize Semipermeable Poly-Meta-Phenylenediamine Membrane. *Appl. Nanosci.* **2023**, 13, 6939–6949. DOI: 10.1007/s13204-023-02810-9
 115. Moed, S.; Zaman, M. A Quantitative Electrochemical Assay for Liver Injury. *Biosens. Bioelectron.* **2019**, 131, 204–209. DOI: 10.1016/j.bios.2019.02.032
 116. La Cour, J. B.; Generelli, S.; Barbe, L.; Guenat, O. T. Low-Cost Disposable ALT Electrochemical Microsensors for In-Vitro Hepatotoxic Assessment. *Sens. Actuators B: Chem.* **2016**, 228, 360–365. DOI: 10.1016/j.snb.2016.01.008
 117. Thuy, T. N. T.; Tseng, T. T.-C. A Micro-Platinum Wire Biosensor for Fast and Selective Detection of Alanine Aminotransferase. *Sensors* **2016**, 16 (6), 767. DOI: 10.3390/s16060767
 118. Paraiso, L.; Paula, L.; Franco, D.; Madurro, J.; Madurro, A. Bioelectrochemical Detection of Alanine Aminotransferase for Molecular Diagnostic of the Liver Disease. *Int. J. Electrochem. Sci.* **2014**, 9, 1286–1297. DOI: 10.1016/S1452-3981(23)07795-7
 119. Hsueh, C. J.; Wang, J. H.; Dai, L.; Liu, C. C. Determination of Alanine Aminotransferase with an Electrochemical Nano Ir-C Biosensor for the Screening of Liver Diseases. *Biosensors* **2011**, 1, 107–117. DOI: 10.3390/bios1030107
 120. Li, H.; Guo, Z.; Wang, H.; Cui, D.; Cai, X. An amperometric bienzyme biosensor for rapid measurement of alanine aminotransferase in whole blood. *Sens. Actuators, B Chem.* **2006**, 119, 419–424. DOI:

10.1016/j.snb.2005.12.041

121. Chang, K.-S.; et al. 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**, 481, 199–208. DOI: 10.1016/S0003-2670(03)00093-X
122. Kihara, K.; et al. Determination of glutamate-pyruvate transaminase activity in blood serum with a pyruvate oxidase/poly (vinyl chloride) membrane sensor. *Analytica Chimica Acta* **1984**, 159, 81–86. DOI: 10.1016/S0003-2670(00)84283-X
123. Mruga, D.; Dzyadevych, S.; Soldatkin, O. Development and optimisation of the biosensor for aspartate aminotransferase blood level determination. *Anal. Bioanal. Chem.* **2024**. DOI: 10.1007/s00216-024-05682-2
124. Mruga, D.; Berketa, K.; Sverstiuk, A.; Martsenyuk, V.; Klos-Witkowska, A.; Palianytsia, Y.; Dzyadevych, S.; Soldatkin, O. Amperometric biosensor based on glutamate oxidase to determine AST activity. *Sensors* **2024**, 24, 7891. DOI: 10.3390/s24247891
125. Zhang, M.; Karra, S.; Gorski, W. Electrochemical coupled-enzyme assays at carbon nanotubes. *Anal. Chem.* **2014**, 86, 9330–9334. DOI: 10.1021/ac502687z
126. Guo, Z.; et al. The study of a disposable reagentless biosensor for fast test of aspartate aminotransferase. *Electroanalysis* **2008**, 20, 1135–1141. DOI: 10.1002/elan.200704165
127. Chang, K.; Chen, C. Effect of L-Aspartate concentration on the response of the amperometric L-Glutamate sensor for the measurement of L-Glutamate and aspartate aminotransferase activity in serum. *Anal. Lett.* **2007**, 40, 933–945. DOI: 10.1080/00032710601017821
128. Guo, Z.; et al. Development of enzyme biosensor for amperometric measurement of aspartate aminotransferase. *Rare Metal Mater. Eng.* **2006**, 35, 3. DOI: 10.3390/bios2020234

129. Han, Y. D.; Song, S. Y.; Lee, J. H.; Lee, D. S.; Yoon, H. C. Multienzyme-modified biosensing surface for the electrochemical analysis of aspartate transaminase and alanine transaminase in human plasma. *Anal. Bioanal. Chem.* **2011**, 400, 797–805. DOI: 10.1007/s00216-011-4797-6
130. Song, M.-J.; Yun, D.-H.; Hong, S.-I. An electrochemical biosensor array for rapid detection of alanine aminotransferase and aspartate aminotransferase. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **2009**, 73, 474–478. DOI: 10.1271/bbb.60043
131. Chang, K.; Chang, C.; Chou, S.; Chen, C. Sequential measurement of aminotransferase activities by amperometric biosensors. *Biosens. Bioelectron.* **2007**, 22, 2914–2920. DOI: 10.1016/j.bios.2006.12.001
132. Ohgami, N.; et al. Determination of the activities of glutamic oxaloacetic transaminase and glutamic pyruvic transaminase in a microfluidic system. *Biosens. Bioelectron.* **2007**, 22, 1330–1336. DOI: 10.1016/j.bios.2006.06.007
133. Yun, M.-J.; Min, N.K.; Hong, S.-I. Electrochemical biosensor array for liver diagnosis using silanization technique on nanoporous silicon electrode. *J. Biosci. Bioeng.* **2007**, 103, 32–37. DOI: 10.1263/jbb.103.32
134. Moser, I.; et al. Rapid liver enzyme assay with miniaturized liquid handling system comprising thin film biosensor array. *Sensors Actuators B: Chem.* **1997**, 44, 377–380. DOI: 10.1016/S0925-4005(97)00228-1
135. Compagnone, D.; Federici, G.; Massoud, R.; Santoro, L.; Anichini, M.; Palleschi, G. Analysis for Transaminases in Serum with an Amperometric Glutamate Electrode. *Clin. Chem.* **1992**, 38, 2306–2310. DOI: 10.1093/clinchem/38.11.2306
136. Cooper, J. M.; McNeil, C. J.; Spoors, J. A. Amperometric enzyme electrode for the determination of aspartate aminotransferase and alanine aminotransferase in serum. *Anal. Chim. Acta* **1991**, 245, 57–62. DOI: 10.1016/S0003-2670(00)80201-9
137. Kihara, K.; Yasukawa, E.; Hirose, S. Sequential determination of glutamate-oxalacetate transaminase and glutamate-pyruvate transaminase activities in serum using an immobilized bienzyme-poly (vinyl chloride) membrane

- electrode. *Anal. Chem.* **1984**, 56, 1876–1880. DOI: 10.1021/ac00275a027
138. Ren, H.; Huang, X.; Kim, J.; Choi, Y.; Gu, N. Pt/Au bimetallic hierarchical structure with micro/nano-array via photolithography and electrochemical synthesis: From design to GOT and GPT biosensors. *Talanta* **2009**, 78, 1371–1377. DOI: 10.1016/j.talanta.2009.02.024
 139. Wang, J. H.; Dai, L.; Liu, C. Development of an Electrochemical-Based Aspartate Aminotransferase Nanoparticle Ir-C Biosensor for Screening of Liver Diseases. *Biosensors* **2012**, 2 (2), 234–244. DOI: 10.3390/bios2020234
 140. Samy, Mostafa Ahmed, et al. Application of Molecularly Imprinted Microelectrode as a Promising Point-of-Care Biosensor for Alanine Aminotransferase Enzyme. *Chemosensors* **2023**, 11 (5), 262. DOI: 10.3390/chemosensors11050262
 141. Amiri, A.; Choi, E. Y.; Kim, H. J. Development and Molecular Recognition of Calixcrownchip as an Electrochemical ALT Immunosensor. *J. Inclusion Phenom. Macrocyclic Chem.* **2010**, 66, 185–194. DOI: 10.1007/s10847-009-9702-y
 142. Quan, C.; et al. Alanine Aminotransferase Electrochemical Sensor Based on Graphene@MXene Composite Nanomaterials. *Microchim. Acta* **2024**, 191 (1), 45. DOI: 10.1007/s00604-023-06131-0
 143. Jiang, D.; Li, C.; Liu, T.; Li, L.; Chu, Z.; Jin, W. A Regular Nanostructured Dithiolene Metal Complex Film for Ultrasensitive Biosensing of Liver Enzyme. *Sens. Actuators B: Chem.* **2016**, 241, 1021–1026. DOI: 10.1016/j.snb.2016.10.122
 144. Saygili, E.; Orakci, B.; Koprulu, M.; Demirhan, A.; Ilhan-Ayisigi, E.; Kilic, Y.; Yesil-Celiktas, O. Quantitative Determination of H₂O₂ for Detection of Alanine Aminotransferase Using Thin Film Electrodes. *Anal. Biochem.* **2020**, 591, 113538. DOI: 10.1016/j.ab.2019.113538
 145. Wu, J.; Park, J. P.; Dooley, K.; Crokek, D. M.; West, A. C.; Banta, S. Rapid Development of New Protein Biosensors Utilizing Peptides Obtained via Phage Display. *PLoS ONE* **2011**, 6, e24948. DOI: 10.1371/journal.pone.0024948

146. Her, J.; Pan, T.; Lin, W.; Wang, K.; Li, L. Label-Free Detection of Alanine Aminotransferase Using a Graphene Field-Effect Biosensor. *Sens. Actuators B: Chem.* **2013**, 182, 396–400. DOI: 10.1016/j.snb.2013.03.026
147. Muratore, K. A.; Zhou, D.; Du, J. J.; Chlystek, J. S.; Motesadi, K.; Larsen, E. K.; Molgora, B. M.; Lee, T. C.; Pamarti, S.; Erramilli, S.; Mohanty, P. Alanine Aminotransferase Assay Biosensor Platform Using Silicon Nanowire Field Effect Transistors. *Commun. Eng.* **2023**, 2 (1). DOI: 10.1038/s44172-023-00057-4
148. Kozinetz, A.; Tsymbalyuk, O.; Litvinenko, S. Application of sensor structures based on a photoelectric transducer to determine the activity of aspartate and alanine aminotransferases in blood plasma. *Biomed. Phys. Eng. Express* **2023**, 9, 045016. DOI: 10.1088/2057-1976/acd55b
149. Wooten, M.; Gorski, W. Facilitation of NADH electro-oxidation at treated carbon nanotubes. *Anal. Chem.* **2010**, 82, 1299–1304. DOI: 10.1021/ac902301b
150. He, Y.-N.; Chen, H.-Y. The Kinetics-Based Electrochemical Determination of Serum Glutamate Pyruvate Transaminase Activity with a Gold Microelectrode. *Anal. Chim. Acta* **1997**, 353 (2–3), 319–323. DOI: 10.1016/S0003-2670(97)87792-6
151. Imbriano, A.; Tricase, A.; Macchia, E.; Torsi, L.; Bollella, P. Self-powered logically operated fluorescent detection of hepatitis B virus (HBV). *Analytica Chimica Acta* **2023**, 1252, 341037. DOI: 10.1016/j.aca.2023.341037
152. Chinnappan, R.; Mir, T. A.; Alsalameh, S.; Makhzoum, T.; Adeeb, S.; Al-Kattan, K.; Yaqinuddin, A. APTASensors are conjectured as promising ALT and AST diagnostic tools for the early diagnosis of acute liver injury. *Life* **2023**, 13, 1273. DOI: 10.3390/life13061273
153. Schachinger, F.; Chang, H.; Scheiblbrandner, S.; Ludwig, R. Amperometric Biosensors Based on Direct Electron Transfer Enzymes. *Molecules* **2021**, 26, 4525. DOI: 10.3390/molecules26154525
154. Roy, L.; Buragohain, P.; Borse, V. Strategies for sensitivity enhancement of

- point-of-care devices. *Biosensors and Bioelectronics X* **2021**, 10, 100098. DOI: 10.1016/j.biosx.2021.100098
155. Reddy, N. N.; Raut, P.; Panda, D. K. GSE and GWE Techniques to improve ON (ION) current and Ambipolar conduction of Tunnel FET(TFET) device: A Comprehensive review. *Micro and Nanostructures* **2024**, 191, 207865. DOI: 10.1016/j.micrna.2024.207865
 156. Li, Y.; Cheng, H. Microfluidic Point-of-Care testing device for multiplexed detection of liver function blood markers. *Biomedical Optics Express* **2024**, 15 (10), 5803. DOI: 10.1364/boe.533855
 157. Barfidokht, A.; Gooding, J. J. Approaches Toward Allowing Electroanalytical Devices to be Used in Biological Fluids. *Electroanalysis* **2014**, 26 (6), 1182–1196. DOI: 10.1002/elan.201400097
 158. Alere CholesTech LDX® Analyzer - Get accurate results in 5 minutes | Block Scientific. Block Scientific. https://www.blockscientific.com/alere-cholestechnldx-analyzer-get-accurate-results-in-5-minutes?srsId=AfmBOorTfBNPMBcIY_ZYq3nXTRVT8XELTyPGdgP7aFXi4c082oD4Jk_h. (accessed 2025-07-10)
 159. Reflotron Plus Trainig manual. <https://photos.labwrench.com/equipmentManuals/11023-6326.pdf> (accessed 2025-07-10)
 160. Sena-Torralba, A.; Parrilla, M.; Hernanz-Grimalt, A.; Steijlen, A.; Ortiz-Zapater, E.; Cabaleiro-Otero, C.; López-Riquelme, N.; Cerveró-Ferragut, S.; Maquieira, Á.; De Wael, K.; Morais, S. Integrated 3D-Printed hollow microneedle array and lateral flow immunoassay for Point-of-Care wound healing monitoring. *Analytical Chemistry* **2024**. DOI: 10.1021/acs.analchem.4c05688
 161. Sigma-Aldrich. Available at: <https://www.sigmaaldrich.com/DE/en/technical-documents/protocol/protein-biology/enzyme-activity-assays/assay-procedure-for-pyruvate-oxidase-bacterial>
 162. Geueke, B.; Hummel, W. A new bacterial l-amino acid oxidase with a broad

- substrate specificity: purification and characterization. *Enzyme and Microbial Technology* **2002**, 31 (1–2), 77–87. DOI: 10.1016/s0141-0229(02)00072-8.
163. Starkov, A. A.; Fiskum, G.; Chinopoulos, C.; Lorenzo, B. J.; Browne, S. E.; Patel, M. S.; Beal, M. F. Mitochondrial A-Ketoglutarate dehydrogenase complex generates reactive oxygen species. *Journal of Neuroscience* **2004**, 24 (36), 7779–7788. DOI: 10.1523/jneurosci.1899-04.2004.
 164. Conway, B. E. Electrochemical oxide film formation at noble metals as a surface-chemical process. *Progress in Surface Science* **1995**, 49 (4), 331–452. DOI: 10.1016/0079-6816(95)00040-6.
 165. Noël, J.-M.; Latus, A.; Lagrost, C.; Volanschi, E.; Hapiot, P. Evidence for OH Radical Production during Electrocatalysis of Oxygen Reduction on Pt Surfaces: Consequences and Application. *Journal of the American Chemical Society* **2012**, 134 (5), 2835–2841. DOI: 10.1021/ja211663t.
 166. Hameed, H.A.D.; Ali, E.H. Extraction and purification of extracellular L-glutamate oxidase from *Streptomyces*. *Arch. Razi Inst.* 2021, 76(4), 769–779.
 167. C.M. Ferreira, I.S. Pinto, E.V. Soares, H. M. Soares. (Un) suitability of the use of pH buffers in biological, biochemical and environmental studies and their interaction with metal ions—a review. *RSC Adv.* **2015**, 5(39), pp. 30989–31003.
 168. Record Jr., M.T., Anderson, C.F., Lohman, T.M. "Thermodynamic analysis of ion effects on the binding and conformational equilibria of proteins" // *Quarterly Reviews of Biophysics*, **1978**, 11(2), 103-178.
 169. Zhang, Y., Cremer, P.S. "Interactions between macromolecules and ions: the Hofmeister series" // *Current Opinion in Chemical Biology*, **2006**, 10(6), 658-663.
 170. Cameron, J. M.; Bruno, C.; Parachalil, D. R.; Baker, M. J.; Bonnier, F.; Butler, H. J.; Byrne, H. J. Vibrational spectroscopic analysis and quantification of proteins in human blood plasma and serum. In *Elsevier eBooks*; **2020**; pp 269–314. DOI: 10.1016/b978-0-12-818610-7.00010-4.
 171. Cornish-Bowden, A.. (2012). *Fundamentals of Enzyme Kinetics* 3rd Ed. 10.1016/B978-0-408-10617-7.50013-4.

172. Gruber, W.; Möllering, H.; Perras, L. Isolation, pH-Optima and Apparent Michaelis Constants of Highly Purified Enzymes from Human and Animal Sources. Comparison of Enzymes of Human and Animal Origin, I. *CCLM* **1977**, 15, 565–573.
173. Lehninger A, Nelson D, Cox M (**1993**) Principles of biochemistry 2nd edition // Amino Acid Oxidation and the Production of Urea.
174. Toney M D (**2013**) Encyclopedia of Biological Chemistry // Pyridoxal Phosphate:708–711.].
175. Soniya, K.; Awasthi, S.; Nair, N. N.; Chandra, A. Transamination Reaction at the Active Site of Aspartate Aminotransferase: A Proton Hopping Mechanism through Pyridoxal 5'-Phosphate. *ACS Catalysis* **2019**, 9 (7), 6276–6283. DOI: 10.1021/acscatal.9b00834.
176. Toney, M. D. Aspartate aminotransferase: An old dog teaches new tricks. *Archives of Biochemistry and Biophysics* **2013**, 544, 119–127. DOI: 10.1016/j.abb.2013.10.002.
177. Koper, K.; Han, S.-W.; Pastor, D. C.; Yoshikuni, Y.; Maeda, H. A. Evolutionary origin and functional diversification of aminotransferases. *Journal of Biological Chemistry* **2022**, 298 (8), 102122. DOI: 10.1016/j.jbc.2022.102122.
178. Rudat, J.; Brucher, B. R.; Sylđatk, C. Transaminases for the synthesis of enantiopure beta-amino acids. *AMB Express* **2012**, 2 (1), 11. DOI: 10.1186/2191-0855-2-11.
179. N. Nezafati, F. Moztarzadeh, S. Hesarakı. Surface reactivity and in vitro biological evaluation of sol gel derived silver/calcium silicophosphate bioactive glass. *Biotechnol. Bioprocess Eng.* **2012**, 17, pp. 746–754
180. R. Heyrovská. Equations for Densities and Dissociation Constant of NaCl(aq) at 25 °C from ‘Zero to Saturation’ Based on Partial Dissociation. *J. Electrochem. Soc.* **1997**, 144(7), pp. 2380–2384. DOI: 10.1149/1.1837822
181. E. C. M. Juan, M. M. Hoque, M. T. Hossain, et al., Acta Crystallographica Section F: Structural Biology and Crystallization Communications 63, no. 11

(2007): 900–907.

182. BRENDA enzymes <https://www.brenda-enzymes.org/enzyme.php?ecno=1.2.3.3&UniProtAcc=A9X9K8&OrganismID=161>. (accessed September, 2025)
183. Tittmann, K. Reaction mechanisms of thiamin diphosphate enzymes: redox reactions. *FEBS Journal* **2009**, 276 (9), 2454–2468. DOI: 10.1111/j.1742-4658.2009.06966.x.
184. Case, D. R.; Zubieta, J.; Doyle, R. P. The coordination chemistry of Bio-Relevant ligands and their magnesium complexes. *Molecules* **2020**, 25 (14), 3172. DOI: 10.3390/molecules25143172.
185. Sukhacheva, M. V.; Zhuravleva, N. I. Properties of and prospects for practical use of extracellular L-Glutamate oxidase of streptomycessP. Z-11-6. *Applied Biochemistry and Microbiology* **2004**, 40 (2), 146–150. DOI: 10.1023/b:abim.00000018917.04795.d9
186. Wang, L.; Peng, R.; Tian, Y.; Liu, M.; Yao, Q. Isolation and characterization of a novel l-glutamate oxidase with strict substrate specificity from *Streptomyces diastatochromogenes*. *Biotechnology Letters* **2016**, 39 (4), 523–528. DOI: 10.1007/s10529-016-2269-y.
187. Sedewitz, B., Schleifer, K.H., Götz, F. "Purification and biochemical characterization of pyruvate oxidase from *Lactobacillus plantarum*" // *Journal of Bacteriology*, **1984**, 160(1), 273-278. DOI: 10.1128/jb.160.1.273-278.1984
188. Davern, T. J. Drug-Induced liver Disease. *Clinics in Liver Disease*, **2012**, 16(2), 231–245. DOI: 10.1016/j.cld.2012.03.002
189. Ndrepepa, G. Aspartate aminotransferase and cardiovascular disease—a narrative review. *Journal of Laboratory and Precision Medicine*, **2021**, 6(6). <https://doi.org/10.21037/jlpm-20-93>
190. Botros M, Sikaris KA. The de ritis ratio: the test of time. *Clin Biochem Rev.*, **2013**, 34(3), 117–130. PMID: 24353357

ДОДАТОК А

СПИСОК ПУБЛІКАЦІЙ ЗДОБУВАЧА ЗА ТЕМОЮ
ДИСЕРТАЦІЇ

Статті в наукових виданнях

10. Д. О. Мруга, Є. Р. Ваховський, С. В. Дзядевич, О. О. Солдаткін. Розробка мультиензимної біосенсорної системи для одночасного визначення активності аланінамінотрансферази та аспаратамінотрансферази. *Sensor Electronics and Microsystem Technologies* 2026 в друці. *Особистий внесок здобувача – створення дизайну експериментальної частини, проведення частини експериментальної роботи, підготовка статті до друку.*
11. D. Mruga, Y. Vakhovskyi, V. Bakhmat, V. Pyeshkova, S. Dzyadevych, O. Soldatkin. Evaluation of Two Enzyme-Based Amperometric Biosensor Designs for Alanine Aminotransferase Determination in Biological Fluids. *Micromachines* 2025, 16(10), 1168. <https://doi.org/10.3390/mi16101168> *Особистий внесок здобувача – аналіз даних, проведення частини експериментальної роботи, підготовка статті до друку.*
12. D. Mruga, Vakhovsky, S.V. Dzyadevych, O.O. Soldatkin. Development and comparison of two alanine aminotransferase-sensitive biosensors based on pyruvate oxidase and glutamate oxidase. *Biopolymers and Cell* 2025. Vol. 41, No. 3. <https://doi.org/10.7124/bc.000AD9> *Особистий внесок здобувача – підготовка та аналіз даних, оформлення статті до друку.*
13. Y. Vakhovskyi, D. Mruga, O. Ustinov, A. Di Costanzo Mata, O. Soldatkin, S. Dzyadevych. Design and Optimization of Biosensor for Pyruvate Quantification. *Electroanalysis*, 2025; 37:e70064. <https://doi.org/10.1002/elan.70064> *Особистий внесок здобувача – створення дизайну експериментальної частини, проведення частини експериментальної роботи, аналіз*

результатів, підготовка статті до друку.

- 14.D. Mruga, Berketa K., Dzyadevych S., Soldatkin O. Biosensors for transaminase detection: Their diversity and trends – A comprehensive review. Trends in analytical chemistry 2025, Volume 193, 118460. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2025.118460> *Особистий внесок здобувача – пошук та аналіз літератури, аналіз результатів, підготовка статті до друку.*
- 15.Д. О. Мруга, Є. Р. Ваховський, С. В. Дзядевич, О. О. Солдаткін. Розробка та оптимізація мультифункціонального біосенсора для визначення концентрації пірувату та/або активності АЛТ у водних зразках. Sensor Electronics and Microsystem Technologies 2025, Т.22, № 1, 26-37. <https://doi.org/10.18524/1815-7459.2025.1.325653> *Особистий внесок здобувача – створення дизайну експериментальної частини, проведення більшості експериментальної роботи, аналіз результатів, підготовка статті до друку.*
- 16.D. Mruga, S. Dzyadevych, O. Soldatkin. Development and optimisation of the biosensor for aspartate aminotransferase blood level determination. Analytical and Bioanalytical Chemistry 2025 Volume 417, 721–731. <https://doi.org/10.1007/s00216-024-05682-2> *Особистий внесок здобувача – аналіз літератури, проведення експериментальної роботи, підготовка статті до друку.*
- 17.D. Mruga, K. Berketa, A. Sverstiuk, V. Martsenyuk, A. Klos-Witkowska, Yu. Palianytsia, S. Dzyadevych, O. Soldatkin. Amperometric biosensor based on glutamate oxidase to determine AST activity. Sensors 2024, 24(24), 7891. <https://doi.org/10.3390/s24247891> *Особистий внесок здобувача – аналіз літератури, проведення експериментальної роботи, підготовка статті до друку.*
- 18.D. Mruga, S. Dzyadevych, O. Soldatkin. High-selective alanine transaminase-sensitive biosensor based on nanosize semipermeable poly-metaphenylenediamine membrane. Applied nanoscience 2023, Volume 13, 6939–

6949. <https://doi.org/10.1007/s13204-023-02810-9> *Особистий внесок здобувача – аналіз літератури, проведення експериментальної роботи, підготовка статті до друку.*

Патенти

5. Мруга Д.О., Солдаткін О.О., Дзядевич С.В., Солдаткін О.П. Біосенсорна система для аналізу аспартатамінотрансферази. Патент на винахід № 129239. № заявки a202204677; заявл. 09.12.2022; опубл. 19.02.2025 бюл. № 8/2025. <https://sis.nipo.gov.ua/uk/search/detail/1842537/>
6. Мруга Д.О., Солдаткін О.О., Дзядевич С.В., Солдаткін О.П. Амперометрична біосенсорна система для визначення активності аспартатамінотрансферази у водних зразках. Патент на корисну модель № 153303. № заявки u202204678; заявл. 09.12.2022; опубл. 14.06.2023, бюл. № 24/2023. <https://sis.nipo.gov.ua/uk/search/detail/1743479/>
7. Солдаткін О.О., Мруга Д.О., Дзядевич С.В., Солдаткін О.П. Біосенсорна система для визначення активності аланініамінотрансферази. Патент на винахід № 125811. № заявки a202007542; заявл. 26.11.2020; опубл. 08.06.2022, бюл. № 23/2022. <https://sis.nipo.gov.ua/uk/search/detail/1691484/>
8. Солдаткін О.О., Мруга Д.О., Дзядевич С.В., Солдаткін О.П. Амперометрична біосенсорна система для визначення активності аланінамінотрансферази у водних зразках. Патент на корисну модель № 147481. № заявки u202007543; заявл. 26.11.2020; опубл. 12.05.2021, бюл. № 19/2021. <https://sis.nipo.gov.ua/uk/search/detail/1593308/>

Тези доповідей на наукових конференціях

17. Ваховський Є., Мруга Д., Дзядевич С., Солдаткін О. Мультианалітна біосенсорна система для визначення активності аланінамінотрансферази та аспартатамінотрансферази. Шевченківська весна: досягнення в науках про життя, 08-10 квітня 2026 року, в друці.
18. Mruga D.O., Vakhovskyi Y.R., Dzyadevych S.V., Soldatkin O.O. Multienzyme biosensor system for simultaneous detection of AST and ALT activities. XX Всеукраїнська конференція молодих вчених Інституту молекулярної

- біології і генетики НАН України - 26-27 травня 2026, Київ, Україна, в друці.
- 19.Ваховський Є., Мруга Д., Дзядевич С., Солдаткін О. Розробка та оптимізація біосенсора на основі іммобілізованої піруватоксидази для визначення активності аланінамінотрансферази. XXII Міжнародна наукова конференція студентів і аспірантів, присвячена 90-річчю кафедри мікробіології біологічного факультету Львівського національного університету імені Івана Франка Львів, 15–17 квітня 2026 року
 - 20.Мруга Д. О., Ваховський Є. Р., Дзядевич С. В., Солдаткін О. О. Мультиензимна біосенсорна система для одночасного визначення активності аланінамінотрансферази та аспартатамінотрансферази в біологічних рідинах. Проблеми та досягнення сучасної біотехнології: матеріали VI міжнародної наук.-практ. конф. (27 березня 2026 р., м. Харків). – Електрон. дані. – Х. : НФаУ, 2026. – 473 с.
 - 21.Mruga D.O., Vakhovskyi Y. R., Dzyadevych S.V., Soldatkin O.O. Development of an amperometric biosensor for the detection of alanine aminotransferase activity. XIX Всеукраїнська конференція молодих вчених Інституту молекулярної біології і генетики НАН України - 20-21 травня 2025, Kyiv, Ukraine, p. 28
 - 22.Мруга Д. О. Ваховський Є. Р. Дзядевич С. В. Солдаткін О. О. Laboratory prototype of electrochemical biosensor for the quantitative analysis of alanine aminotransferase activity. Актуальні проблеми біохімії та Біотехнології, 5-6 травня 2025, Київ, Україна
 - 23.Мруга Д. О. Ваховський Є. Р. Дзядевич С. В.Солдаткін О. О. Розробка амперометричного біосенсора на основі піруватоксидази для визначення пірувату. Молодь і поступ біології: збірник тез доповідей XXI Міжнародної наукової конференції студентів і аспірантів (м. Львів, 28 квітня – 1 травня 2025 р.). – Львів: Галич-Прес, 2025. – 384 с.
 - 24.Мруга Д. О. Ваховський Є. Р. Дзядевич С. В. Солдаткін О. О. Розробка амперометричного біосенсора на основі піруватоксидази для визначення пірувату. Шевченківська весна: досягнення в науках про життя /

Advancements in life sciences : електрон. зб. тез XXII Міжнар. наук. конф. студ. та мол. вчених (м. Київ, 23–25 квітня 2025 р.) – Київ : ВПЦ "Київський університет", 2025. – 476 с.

- 25.S. Dzyadevych, V. Arkhypova, D. Mruga, O. Soldatkin. Electrochemical enzyme biosensors for medical application. Biogenext, 17-20 September 2024, Kyiv, Ukraine
- 26.D. Mruga, Ye. Vakhovskyi, S. Dzyadevych, O. Soldatkin. Development, optimization, and comparison of two versions of ALT-sensitive biosensor based on glutamate oxidase and pyruvate oxidase. Biogenext, 17-20 September 2024, Kyiv, Ukraine
- 27.D. Mruga, S. Dzyadevych, O. Soldatkin. Development and probation of the amperometric biosensor for determining the ast activity level in blood serum samples. XVIII All-Ukrainian Conference of Young Scientists of the Institute of Molecular Biology and Genetics of the NAS of Ukraine 21-22 May 2024, Kyiv, Ukraine, p. 39
- 28.D. Mruga, K. Berketa, S. Dzyadevych, O. Soldatkin. Development of amperometric biosensor for pyruvate concentration and alt activity analysis. XXV International Conference for Students, PhD Students and Young Scientists «Modern Chemistry Problems» 15-17 May 2024, Kyiv, Ukraine, p. 33
- 29.D. Mruga, K. Berketa, O. Soldatkin. Electrochemical biosensor based on pyruvate oxidase for detection of pyruvate and ALT activity. Schevchenkivska vesna, 24-26 April 2023, Kyiv, Ukraine, p. 193-194
- 30.D. Mruga, O. Soldatkin, N. Jaffrezic-Renault, A. Errachid. Amperometric biosensor based on pyruvate oxidase for selective ALT measurement. IX Congress of Ukraine biophysical society, 30 October - 2 November 2023, Kyiv, Ukraine. Ukr.
- 31.D. Mruga, O. Soldatkin, S. Dzyadevych, A. Soldatkin. Development of AST-sensitive amperometric enzyme biosensor. International research and practice conference 'NANOTECHNOLOGY AND NANOMATERIALS' NANO-2023, 16-19 August 2023, Bukovel, Ukraine, p. 338

D. Mruga, O. Soldatkin, S. Dzyadevych, A. Soldatkin. Development of aspartate aminotransferase sensitivity biosensor based on glutamate oxidase. Deuxièmes Rencontres Capteurs de l'Université Bourgogne Franche Comté. 24-25 Novembre 2022, Dijon, France, p. 28.

ДОДАТОК Б

Таблиця Б.1

**Активність АСТ і АЛТ в сироватці крові та інших біологічних рідинах
людини при ряді патологій**

Патологія або стан організму	Активність АСТ в сироватці, Од.акт./л	Активність АЛТ в сироватці, Од.акт./л	Коефіцієнт де Рітиса (АСТ/АЛТ)	Посилання
Референс (норма)	10-30 у жінок 10-40 у чоловіків	10-30 у жінок 10-40 у чоловіків	0,6-1,15	[71]
Ішемічна хвороба серця	50,98±8,12 (^2,5)	42,31±8,34 (^2)	-	[6]
Стабільна ішемічна хвороба серця	-	-	≥1,4	[7]
Гострий інфаркт міокарда	-	-	≥2	[8]
Гепатит А	982,00 (204,00 - 2384,00)	2362,00 (140,00 - 5677,00)	-	[9]
Гепатит В	2188,00 (166,00 - 11100,00)	1407,00 (50,00-8685,00)	-	[10]
Гепатит С	100,00 - 568,00	87,00 - 581,00	-	[11-12]
Цироз	252,00 ± 666,00	162,00 ± 354,00	-	[72]
Первинна гепатоцелюлярна карцинома печінки	37,00 (26,00 - 55,00)	39,00 (29,00 - 59,00)	-	[13]
Рак простати	20,09	20,08	1,13	[20]
Рак уретри	-	-	≥ 1,15	[21]
Рак підшлункової	30,00 (22,00 - 50,00)	31,00 (21,00 - 55,00)	0,99 (0,78 - 1,24)	[22]
Алкоголізм	200,00	300,00	>2,00	[14]

Патологія або стан організму	Активність АСТ в сироватці, Од.акт./л	Активність АЛТ в сироватці, Од.акт./л	Коефіцієнт де Рітиса (АСТ/АЛТ)	Посилання
Вагітність	6,00 - 32,00	10,00 - 30,00	-	[23]
Прееклампсія	20,09 ± 9,98	17,55 ± 15,49	-	[15]
Гестаційний діабет	15,88 (17,90 - 21,90)	18,00 (13,10 - 25,93)	0,90-1,30	[24-25]
Передчасний розрив плодових оболонок	12,77 ± 10,06 (в вагінальних рідинах)	1,51 ± 3,17 (в вагінальних рідинах)	-	[26]
COVID-19	25,12 ± 18,35	35,19 ± 37,99	0,70	[16]
Міопатія	215,00 (16,00 - 1270,00)	137,00 (10,00 - 62,001)	1,60-2,05	[17]
Метаболічний синдром	28,07 ± 15,89	22,31 ± 14,97	1,26	[18]
Рабдоміоліз	> 40,00	> 40,00	-	[19]

ДОДАТОК В

Таблиця В.1

**Порівняння характеристик та конструкції відомих біосенсорних систем для визначення АСТ, АЛТ,
АСТ/АЛТ та АСТ+АЛТ**

Посилання	Аналіт	Біоселективний матеріал	Метод іммобілізації	Метод детекції	Модифікації сенсора та медіатори	(Меда детекції) Лінійний діапазон, Од.акт./л	Чутливість / час відгуку, с	Стабільність (залишкова активність, %) / похибка	Тип зразку / референсний метод
[101]	<u>АЛТ</u>	ПОкс + ПерОкс + 4ААП + DAOS	Адсорбція на поліетиленсульфоновій мембрані	UV-Vis	ПЕТ-тест-смужки шаруватої структури	(5,47) 6-395	- / 180	- / CV <10%	Кров / автоматичний біохімічний аналізатор
[142]	<u>АЛТ</u>	ПОкс	ГА	SWV	Graphene@MXene композит	(0,16) ≤ 400	12,7 nA (Од.акт./л) ⁻¹ mm ⁻² / -	- / RSD (зразки) <5%	Сироватка / -
[108]	<u>АЛТ</u>	ПОкс + люмінол	Восковий друк	ECL	Друкований електрод на основі вуглецевих чорнил	(1,702) 5-50 логарифмічно 50- 1000	- / 600	- / RSD (зразки) <9%	Сироватка / ECL
[147]	<u>АЛТ</u>	ПОкс	Silanization with APTES	FET	польовий транзистор з кремнієвими нанодротами + APTES + феріціанід	(4,1±0,4) 50-450	- / 160	- / -	- / -
[109]	<u>АЛТ</u>	GO/MWCNTs + НЧЗ + ГлОкс	адсорбція	LSPR	оптоволоконна структура з TiT4T	(4,84) 0-1000	7,5 p.m./(Од.акт./л) / 1200	- / SD = 0,0121	- / -
[114]	<u>АЛТ</u>	ГлОкс	ГА	CA	Платиновий дисковий електрод, ПФД мембрана	(2,5) 10-500	0,5 нА/хв на 100 Од.акт./л / 900	- / RSD = 11%	- / -

Продовж. табл. В1

Посилання	Аналіт	Біоселективний матеріал	Метод іммобілізації	Метод детекції	Модифікації сенсора та медіатори	(Меда детекції) Лінійний діапазон, Одакт./л	Чутливість / час відгуку, с	Стабільність (залишкова активність, %) / похибка	Тип зразку / референсний метод
								RSD (приготування) = 7,6%	
[140]	<u>АЛТ</u>	ПОкс	Включення в 4AP	CV	Pt мікроелектрод з Pt НЧ та 4AAP/піруватом натрію	(2,97) 25-700	- / -	1 місяць, +4°C (90%) / RSD = 0,27-20,1%	Плазма / UV-Vis
[104]	<u>АЛТ</u> <u>молекула</u>	люмінол, оФД, тіопронін	ковалентний (N-hydroxysuccinimide, 1-(3-dimethylaminopropyl)-3-ethylcarbodiimide hydrochloride)	Fluor	MnO ₂ @ZIF-8-люмінол	(0,5) 1-1500	- / 180	- / RSD (сироватка) 2,56-5,02%	Сироватка / -
[100]	<u>АЛТ</u>	2,4-динітрофенілгідразин	Восковий друк	UV-Vis	Паперова смужка	(4,12) 20-140	- / -	- / RSD = 7% RE < 5%	Цільна кров / -
[110]	<u>АЛТ</u>	НЧЗ/MoS ₂ /CeO ₂ /ГлОкс	Адгезія з MPTMS до тіол-функціоналізованого моношару, MUA	LSPR	Оптоволоконна структура з ТІТ конструкцією	(10,61) 10-1000	4,1 пм (Одакт./л) ⁻¹ / 180	- / SD = 0,0145	- / -
[144]	<u>АЛТ</u>	ГлОкс	відсутній	DPV	Система тонкоплівкових Pt електродів	(-) 5-120	- / -	- / -	- / -
[115]	<u>АЛТ</u>	Пруський блакитний	відсутній	CA	Карбоновий електрод	(20,6) 40-1990	1,53 нА (Одакт./л) ⁻¹ мм ² / -	- / -	- / -
[143]	<u>АЛТ</u>	ГлОкс	ГА	DPV	500 нм [TBA]2[Ni(mnt)2] нанокуби на золотому електроді, модифікованому тіолграфеном	(-) 5-140	- / -	> 3 тижні, +4°C (81,4%) / -	- / -

Продовж. табл. В1

Посилання	Аналіт	Біоселективний матеріал	Метод іммобілізації	Метод детекції	Модифікації сенсора та медіатори	(Меда детекції) Лінійний діапазон, Од.акт./л	Чутливість / час відгуку, с	Стабільність (залишкова активність, %) / похибка	Тип зразку / референсний метод
[116]	<u>АЛТ</u>	ГлОкс	ГА	СА	Pt/Pt/Ag друкований електрод, модифікований нафіоновою мембраною, мікрофлюїдна проточна комірка	(1,56 в зразку) 1,6-60	468 пА мін ⁻¹ (Од.акт./л) ⁻¹ / -	> 60 днів / -	Лізат клітин HepG2 (АТСС) (людська карцинома печінки) / -
[117]	<u>АЛТ</u>	ГлОкс	Адсорбція на ОРРy	СА	Мікро-Pt електрод РРy-Nafion	(8,48) 10-900	0,059 нА (Од.акт./л · мм) ⁻¹ / 5	8 тижнів, - 20°C / -	Збагачені зразки / -
[118]	<u>АЛТ</u>	ПОкс	Адсорбція на полі(4АР)	СА	Графітовий електрод з полі(4АР) та 4ААП	(0,000 286) 0,0003 - 3,0 Од.акт./л	- / <200	30 днів, 8±1°C, темрява (97%) / -	- / -
[146]	<u>АЛТ</u>	субстрати	Включення в альгінатний гель	FET	графеновий польовий транзистор	(-) 10-100	0,42 мВ (Од.акт./л) ⁻¹ / -	- / -	- / -
[107]	<u>АЛТ</u>	ПОкс	відсутній	ECL	Базальний платиновий електрод, фериціанід калію та КНТ	(-) 0,00475-350	- / -	- / RSD = 2,5%	Щуряча сироватка / -
[105]	<u>АЛТ</u>	Молекулярна мітка + ЛДГ	відсутній	Fluor	-	(0,25) ≥ 3,13	- / -	- / -	- / -
[119]	<u>АЛТ</u>	ПОкс	відсутній	СА	Поверхнево нанесені срібні чорнила використовувалися як електричний контакт з чорнилами Ir/C	(2,18) 0-597,4	- / 20	- / -	Людська та теляча сироватка / -
[145]	<u>АЛТ</u> <u>молекула</u>	Пептид АЛТ5-8 + фері/фероціанід	Ковалентне зв'язування цистеїну із золотом	QCM EIS	Кварцові та золоті електроди	QCM (60 нг/мл) - EIS (92 нг/мл) -	8,9±0,9 Гц(мг/мл) ⁻¹ / -	- / -	- / -
[141]	<u>АЛТ</u> <u>молекула</u>	Анти-АЛТ-м-антитіло + ПерОкс	Ковалентний (тіолова похідна Calixcrown)	CV ІФА	-	Каліксареновий чіп: (-) 10 нг/мл-1 мкг/мл Імуносенсор: (-) 10 пг/мл-1 мг/мл	Каліксареновий чіп: 0,275 мкА/(мкг/мл) Імуносенсор: 26,3 нА (нг/мл) ⁻¹ / -	- / -	- / -

Продовж. табл. В1

Посилання	Аналіт	Біоселективний матеріал	Метод іммобілізації	Метод детекції	Модифікації сенсора та медіатори	(Меда детекції) Лінійний діапазон, Од.акт./л	Чутливість / час відгуку, с	Стабільність (залишкова активність, %) / похибка	Тип зразку / референсний метод
[113]	<u>АЛТ</u>	ГлОкс	ГА	СА	Pt електрод	(3,29) 10-1000	0,845 нА (Од.акт./л) ⁻¹ / 180	> 6 місяців (79%) / -	- / -
[120]	<u>АЛТ</u>	ГлОкс + ПерОкс	ковалентне (PEGDGE)	СА	планарний Au електрод з полі(4- вінілпіридином), комплексованим з полімерним покриттям Os(2,2'-біпіридин)	-	- / <10	1 місяць (10%) / RSD = 2,9%	Сироватка / -
[121]	<u>АЛТ</u>	ГлОкс	Фотополімер PVA-SbQ	СА	Вуглецевий друкований електрод з осадженим Pd	(-) 8-250	- / 100	> 5 місяців, сухий стан / RSD = 2,6%	- / -
[112]	<u>АЛТ</u>	ПОкс	Адсорбція на нейлоновій мембрані	СА CV	Антитіла проти АЛТ на нейлоновій мембрані на золотому електроді з SAM 2-(4- меркаптобутил)гідроксину	(-) 0,01-100 мкг/мл	11,4 нА (нг/мл) ⁻¹ / -	- / -	- / -
[150]	<u>АЛТ</u>	ЛДГ	відсутній	DPV	Au мікроелектрод	(0,3) 0-200	- / -	- / -	Сироватка / -
[122]	<u>АЛТ</u>	ПОкс	Включення в PBX	СА	Pt-електрод, флюїдна проточна комірка	-	- / <60	> 6 місяців, +4°C (80%) > 1 рік, -20°C (100%) / RSD = 2,4%	Сироватка / UV-Vis
[94]	<u>АЛТ</u>	ПОкс	Адсорбція на пористій ацетилцелюлозній мембрані	СА	Кисневий електрод	(-) 0,5-180 × 10 ⁻³	- / -	> 10 днів > 100 аналізів / RSD = 2,4%,	Сироватка / -
[106]	<u>АСТ</u>	Квантові точки	адсорбція	Fluor	Паперова смужка	(0,065) 2-60	- / -	- / RSD (зразки) < 6%	In vivo в zebrafish / -

Продовж. табл. В1

Посилання	Аналіт	Біоселективний матеріал	Метод іммобілізації	Метод детекції	Модифікації сенсора та медіатори	(Меда детекції) Лінійний діапазон, Од.акт./л	Чутливість / час відгуку, с	Стабільність (залишкова активність, %) / похибка	Тип зразку / референсний метод
[123]	<u>ACT</u>	ГлОкс	ГА	СА	Pt електрод, ПФД мембрана	(1) 0-500	2,37 нА хв ⁻¹ на 10 Од.акт./л / 60	2 місяці, -18°C (70%) / RSD 14,1%	Сироватка / UV-Vis
[103]	<u>ACT</u> <u>молекула</u>	біотинільована мРНК + хімера β-лактамаз- кальмодулін + нітроцефін	афінні взаємодії з Dynabeads, покритими стрептавідином	UV-Vis	-	(0,64 nM) - В зразку: (10) 10-100 nM (3-30 U L ⁻¹)	- / -	- / -	Сироватка / -
[124]	<u>ACT</u>	ГлОкс	ГА	СА	Pt електрод, ПФД мембрана	(1) 1-110	8,56 нА/хв на 50 Од.акт./л / 900	2 місяці, -18°C (70%) / RSD 14,1%	Сироватка / UV-Vis
[125]	<u>ACT</u>	МДГ	відсутній	СА	КНТ/хітозан-модифікований скляний дисковий електрод	(0,01) 0,1-70 1-10 (в зразку)	- / <500	- / RSD = 10%	Імітація сироватки / -
[139]	<u>ACT</u>	ГлОкс	відсутній	СА CV	Чорнило Ir-C було нанесено як робочий та додатковий електроди	(-) 0-250	0,067 нА (Од.акт./л) ⁻¹ / -	- / -	Сироватка / -
[126]	<u>ACT</u>	ГлОкс + ПерОкс	Включення в целюлозну мембрану	СА	триелектродний інтегрований перетворювач	(-) 25-1000	- / 120	60 днів, +4°C (90%) 15 днів, +25°C (90%) / -	Сироватка / -
[127]	<u>ACT</u>	ГлОкс	фотополімер	СА	Pd смужковий електрод	(-) 8-200	- / <400	- / RSD (зразки) = 3,03%	Супернатант сироватки / -
[128]	<u>ACT</u>	ГлОкс	відсутній	СА	тонкоплівковий модифікований електрод з редокс-полімерним шаром Os	(-) 32,5-2000	- / 120	- / RSD = 5%	Сироватка / -

Продовж. табл. В1

Посилання	Аналіт	Біоселективний матеріал	Метод іммобілізації	Метод детекції	Модифікації сенсора та медіатори	(Меда детекції) Лінійний діапазон, Одакт./л	Чутливість / час відгуку, с	Стабільність (залишкова активність, %) / похибка	Тип зразку / референсний метод
[99]	<u>АСТ</u> <u>молекула</u>	ПерОкс-мічене анти-м-АСТ антитіло	Кон'югація	UV-Vis	диск фільтрувального паперу	(10 мкг/л) $\leq$ 250	- / -	- / -	Сироватка / -
[102]	<u>АЛТ / АСТ</u>	АЛТ: ЛДГ + Н-MnO ₂ + ТМБ АСТ: МДГ + Н-MnO ₂ + ТМБ	Альгінатний гель (лише для Н-MnO ₂ та ТМБ)	UV-Vis	центрифужна мікропробірка	Смартфон АЛТ (3,6) 5–180 АСТ (4,9) 5–170	- / 3000	RSD АЛТ 7 днів = 2,56% RSD АСТ 7 днів = 3,71%	Сироватка / комерційний набір
[148]	<u>АЛТ / АСТ</u>	substrates	відсутній	PCS	фотоелектричний перетворювач, легований Au, Gd, Ag, Tb	-	- / -	- / -	- / -
[129]	<u>АЛТ / АСТ</u>	ПОкс + ОАД	Хемісорбція на DTSP	СА	електронно-променево випаровуваний Au електрод	В зразку: АЛТ (25) 43-480 АСТ (20) 30-240	- / 1500	- / АЛТ: R2 = 0,92, АСТ: R2 = 0,94	Зразки на основі людської плазми / -
[130]	<u>АЛТ / АСТ</u>	ГлОкс	Силанізація з APTES	СА	Тонкоплівковий Pt електрод	(-) 1,3-250	АЛТ: 0,145 мкА (Одакт./л) ⁻¹ АСТ: 0,463 мкА (Одакт./л) ⁻¹ / 20	- / RSD <7%	- / -
[138]	<u>АЛТ / АСТ</u>	ГлОкс	ГА	CV	Біметалічна ієрархічна структура Pt/Au з мікро/нано-матричним електродом та мембраною Nafion	АЛТ (-) 20-140 АСТ (-) 20-180	АЛТ: 0,22 мкА на 35 Одакт./л АСТ: 0,08 мкА на 40 Одакт./л / <100	Чудова / чудова	- / -

Продовж. табл. В1

Посилання	Аналіт	Біоселективний матеріал	Метод іммобілізації	Метод детекції	Модифікації сенсора та медіатори	(Меда детекції) Лінійний діапазон, Од.акт./л	Чутливість / час відгуку, с	Стабільність (залишкова активність, %) / похибка	Тип зразку / референсний метод
[131]	<u>АЛТ / АСТ</u>	ГлОкс	фотополімер PVA-SbQ + ГА	СА	комерційна тест-смужка для визначення рівня глюкози (Boehringer-Mannheim) що складається з двох Pd смужкових електродів + нафіонової мембрани	АЛТ (-) 8-250 АСТ (-) 8-200	АЛТ: 0,326 нА/хв (Од.акт./л) ⁻¹ АСТ: 0,259 нА/хв (Од.акт./л) ⁻¹ / <240	- / -	- / -
[132]	<u>АЛТ / АСТ</u>	ГлОкс	ГА	СА	Скляний чіп, мікрофлюїдна система	АЛТ (-) 7-228 АСТ (-) 9-250	- / <600	- / -	- / -
[133]	<u>АЛТ / АСТ</u>	ГлОкс	Силанізація з APTES	СА	Тонкоплівкові електроди Pt з пористою кремнієвою підкладкою	(-) 1,3 – 250	АЛТ: 0,13698 мкА (Од.акт./л) ⁻¹ АСТ:	> 120 днів (85%) / -	- / -
							0,45439 мкА (Од.акт./л) ⁻¹ / <100		
[134]	<u>АЛТ / АСТ</u>	ГлОкс	фотополімер pHEMA	СА	тонкоплівковий сенсор, мікрофлюїдна система	(-) 6-192	АЛТ: 2,27 пА хв ⁻¹ Од.акт. ⁻¹ АСТ: 2,56 пА хв ⁻¹ Од.акт. ⁻¹ / 128	- / -	- / -
[135]	<u>АЛТ / АСТ</u>	ГлОкс	ковалентний (Immobilon- AV афінна мембрана)	СА	Pt електрод, целюлозно-ацетатна та полікарбонатна мембрани	АЛТ (0,2) 1-100 АСТ (0,2)1-100	- / <300	2 місяці, 300 аналізів / АЛТ %CV = 7% АСТ %CV = 6%	Сироватка / UV-Vis

Продовж. табл. В1

Посилання	Аналіт	Біоселективний матеріал	Метод іммобілізації	Метод детекції	Модифікації сенсора та медіатори	(Меда детекції) Лінійний діапазон, Од.акт./л	Чутливість / час відгуку, с	Стабільність (залишкова активність, %) / похибка	Тип зразку / референсний метод
[136]	<u>АЛТ / АСТ</u>	ГлОкс	Пасивна адсорбція	СА	платинованизований карбоновий паперовий електрод	АЛТ (-) ≤ 1200 АСТ (-) ≤ 1400	- / 300	- / АЛТ SD = 17,1 U/l АСТ SD = 13,4 U/l	Сироватка / -
[137]	<u>АЛТ / АСТ</u>	ПОкс + ОАД	Адсорбція на ПВХ	СА	комбінований Pt електрод	АЛТ (-) 8-1600 АСТ (-) 12-1700	- / <240	> 14 days, 400 аналізів (70%) / -	Сироватка / -
[50]	<u>АЛТ + АСТ</u>	АЛТ: ПОкс + ПерОкс + 4ААП + DHBS АСТ: метиленовий зелений + цистеїн сульфоновна кислота	Восковий друк	UV-Vis	паперова мікрофлюїдика	Теоретична робота	Теоретична робота - / 900	Теоретична робота	Теоретична робота
[51]	<u>АЛТ + АСТ</u>	АЛТ: ПОкс + ПерОкс + DAOS АСТ: ПОкс + ОАД + ПерОкс + DAOS	відсутній	PhR	-	АЛТ (3,5) 4-350 АСТ (4,0) 4-250	- / 120	- / RSD <10%	Сироватка / високоточний клінічний біохімічний аналізатор (Roche Cobas C702)
[52]	<u>АЛТ + АСТ</u>	АЛТ: ПОкс + Au/LDO + ТМБ АСТ: ГлОкс + Au/LDO + ТМБ	Включення в агарозний гідрогелевий каркас	UV-Vis	-	АЛТ: (2,56) 7-200 АСТ: (7,5) 10-150 Смартфон АЛТ: (2,56) 10-180 АСТ: (7,5) 15-150	- / 1800	12 годин (> 92,42%) / RSD < 3,64%	Сироватка / комерційний набір
[53]	<u>АЛТ + АСТ</u>	Комерційний колориметричний набір	Адсорбція на фільтрувальному папері	UV-Vis	3D-μPADs	АЛТ (50) 0-1000 АСТ (10) 0-800	- / -	- / %CV < 10%	- / -

Продовж. табл. В1

Посилання	Аналіт	Біоселективний матеріал	Метод іммобілізації	Метод детекції	Модифікації сенсора та медіатори	(Меда детекції) Лінійний діапазон, Од.акт./л	Чутливість / час відгуку, с	Стабільність (залишкова активність, %) / похибка	Тип зразку / референсний метод
[54]	<u>АЛТ</u> + <u>АСТ</u>	АЛТ: ЛДГ АСТ: МДГ	InkJet друк	UV-Vis	паперові тест-смужки	АЛТ (-) 5,38-86,1 АСТ (-) 5,4-91,2	- / <420	- / -	Сироватка / UV-Vis
[55]	<u>АЛТ</u> + <u>АСТ</u>	АЛТ: ПОкс АСТ: метиленовий зелений + цистеїн сульфенова кислота	InkJet друк	UV-Vis	паперові тест-смужки	АЛТ (-) 0-125 АСТ (-) 0-105	- / АСТ: 240 АЛТ: 60	- / -	- / -
[56]	<u>АЛТ</u> + <u>АСТ</u>	АЛТ: ПОкс + ПерОкс + 4- ААР + DHBS АСТ: метиленовий зелений + цистеїн сульфенова кислота	Восковий друк	UV-Vis	паперова мікрофлюїдика	В зразку: АЛТ (-) 40-200 АСТ (-) 40-200	- / 900	11 тижнів, 25°C (92%) / %CV = 2,64- 9,28%	Цільна кров / Roche Modular Analytics System

Примітки: 1. ІФА – імуносенсор. 2. Fluor – флуоресценція. 3. PCF-сенсори – фотонно-кристалічне волокно. 4. ПВХ – полі(вінілхлорид). 5. Н-MnO₂ – порожнистий кубічний нанозим MnO₂ з мультиферментною активністю. 6. КНТ – вуглецеві нанотрубки. 7. DTSP – 3,3'-дитіобіс(N-гідроксисукцинімідний естер пропіонової кислоти). 8. APTES – (3-амінопропіл)триетоксисилан. 9. SAM – самоорганізований моношар. 10. ZIF – цеоліт-імідазолні каркаси. 11. оФД – о-фенілендіамін. 12. рНЕМА – полі(2-гідроксіетилметакрилат). 13. RE – відносна похибка. 14. %CV – коефіцієнт варіації. 15. MPTMS – (3-меркаптопропіл)триметоксисилан. 16. MUA – 11-меркаптоундеканова кислота. 17. OPPy – переокислений поліпірол. 18. DHBS – 3,5-дихлор-2-гідроксибензолсульфенова кислота. 19. 4AP – 4-амінофенол. 20. TIT4T – звуження-в-конусність з чотирма конічними структурами на основі одномодового волокна. 21. GO/MWCNTs – багат шаровий матеріал (гібриди оксиду графену та багатостінних вуглецевих нанотрубок). 22. 3D-μPADs – тривимірні паперові пристрої для мікрофлюїдного аналізу. 23. Au/LDO – подвійний оксид кобальту та алюмінію, декорований золотом. 24. PET – поліетилен терефталат.

ДОДАТОК Г

Кінетична характеристика ГлОкс-біосенсора за рівняннями Міхаеліса-Ментена та Лайнвівера-Бурка

Калібрувальний графік відгуків біосенсора залежно від концентрації глутамату наведено на рис. Г.1. Експериментальні дані успішно описуються класичними рівняннями ензиматичної кінетики:

- Міхаеліса-Ментена $I = \frac{I_{max} * [S_1]}{K_{m1} + [S_1]}$ (рис. Г.1а), де $I_{max}=349$ нА, $K_{m1} = 518$,
 I – вимірний струм, S_1 – концентрація глутамату;
- та Лайнвівера-Бурка $\frac{1}{v} = \frac{K_{m1}}{I_{max}} * \frac{1}{[S_1]} + \frac{1}{I_{max}}$ (рис. Г.1б), де
 $I_{max}=1/\text{intersept}=320$ нА, $K_{m1}=\text{slope} * I_{max}=661$.

Відповідність експериментальних даних рівнянням Міхаеліса-Ментена та Лайнвівера-Бурка підтверджує, що функціонування розробленого біосенсора визначається ензиматичною кінетикою глутаматоксидази без суттєвих дифузійних обмежень у досліджуваному діапазоні концентрацій. Це свідчить про оптимальну товщину біоселективної мембрани та відсутність масообмінних обмежень при транспорті субстрату до активного центру іммобілізованого ензиму.

Порівняння отриманого значення уявної константи Міхаеліса (518-661 мкМ) з літературними даними для вільної глутаматоксидази з *Streptomyces* sp. (340 мкМ) [185] дозволяє оцінити вплив іммобілізації на спорідненість ензиму до субстрату. Спостережуване незначне збільшення K_m є типовим для іммобілізованих ензимів і пояснюється стеричними утрудненнями доступу субстрату до активного центру, локальними змінами мікрооточення ензиму (рН, іонна сила) та конформаційними обмеженнями білкової молекули в іммобілізованому стані.

Співставлення максимальної швидкості реакції ($I_{\max}=320\text{--}349$) іммобілізованої ГлОкс з активністю вільного ензиму ($V_{\max}=420$ [186]) вказує на збереження 76-83% початкової активності після іммобілізації. Цей показник є задовільним для ковалентно іммобілізованих ензимів і підтверджує ефективність обраного методу іммобілізації через глутаровий альдегід, який забезпечує міцне закріплення ензиму при збереженні його каталітичної активності, а також лінійність, відтворюваність і прогнозованість аналітичних характеристик біосенсора.

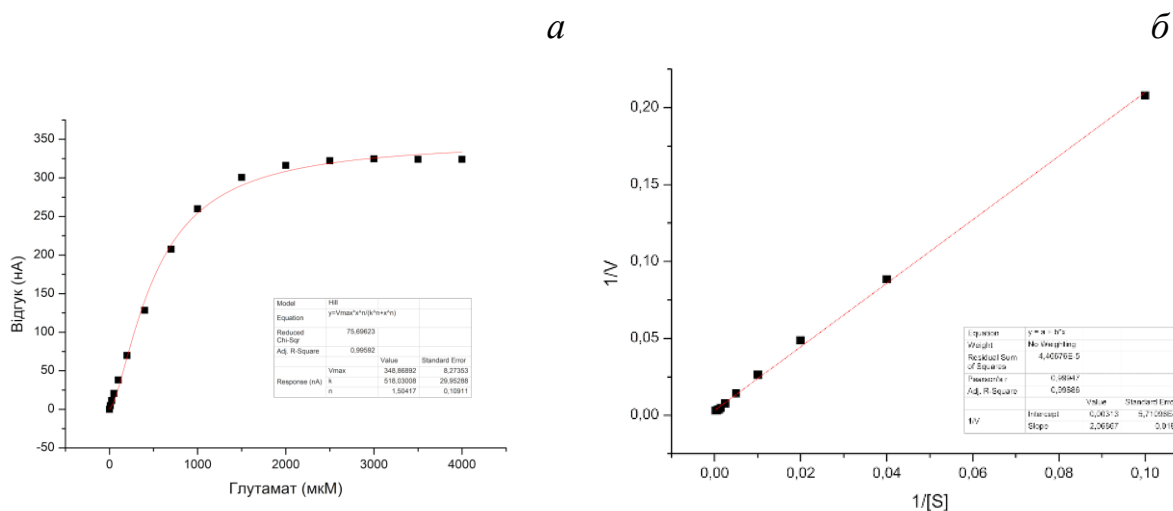


Рис. 1.1. Калібрувальна крива глутамат-чутливого біосенсора та апроксимація експериментальних даних рівнянням Міхаеліса-Ментена (а) та їх лінеаризація у координатах Лайнвівера-Бурка (б)

ДОДАТОК Д

Обґрунтування неможливості повного кінетичного опису АСТ- та АЛТ-чутливого біосенсора за рівнянням Міхаеліса-Ментена

Описати повну криву насичення для АСТ- або АЛТ біосенсора за рівнянням Міхаеліса-Ментена, аналогічно до калібрувального графіка глутамат-чутливого біосенсора, не є можливим через особливості біохімічних процесів, що лежать в основі функціонування даного біосенсора. Зокрема, реакції АСТ та АЛТ є мультисубстратними, тобто залучають два субстрати одночасно, що змінює математичний опис кінетики системи.

Для мультисубстратної реакції трансамінази рівняння швидкості має бути представлене у вигляді:

$$R = \frac{R_{max} * [S_2] [S_3]}{(K_{m2} + [S_2]) (K_{m3} + [S_3])},$$

де R – вимірний відгук на/хв, S_2 – концентрація кетоглутарату, S_3 – концентрація аспартату або аланіну.

Враховуючи фіксоване співвідношення субстратів у робочому розчині, концентрацію одного субстрату можна виразити через інший.

$$R = \frac{R_{max} * 4 * [S_2]^2}{(K_{m2} + [S_2]) (K_{m3} + 4 * [S_2])}.$$

А оскільки субстратом реакції глутаматоксидази, через яку проводиться біосенсорне вимірювання, є продукт реакції трансамінази (глутамат), повну систему з двох ензимів можна описати комбінованим рівнянням:

$$R_{system} = \frac{I_{max} * \frac{R_{max} * 4 * [S_2]^2}{(K_{m2} + [S_2]) (K_{m3} + 4 * [S_2])}}{K_{m1} + \frac{R_{max} * 4 * [S_2]^2}{(K_{m2} + [S_2]) (K_{m3} + 4 * [S_2])}},$$

де $I_{max} = 349$ і $K_{m1} = 518$, розраховані раніше в Додатку Г для глутамат-чутливого біосенсора.

Таким чином рівняння містить три невідомі константи (R_{max1} , K_{m2} , K_{m3}). Оскільки в експериментальній процедурі вимірювання одночасно змінюються концентрації обох субстратів у фіксованому співвідношенні, а наявні експериментальні дані дозволяють отримати лише одну калібрувальну криву (залежність відгуку від активності трансамінази при фіксованих концентраціях субстратів), математично визначити всі три константи із системи неможливо. Для точного визначення кінетичних параметрів знадобилося б провести серію додаткових експериментів з незалежним варіюванням концентрацій α -кетоглутарату та аспартату/аланіну, що виходить за межі завдань даної роботи.

Водночас, отримані лінійні калібрувальні криві в робочому діапазоні концентрацій АСТ (рис. Д.1а) та АЛТ (рис. Д.1б) підтверджують, що біосенсиори функціонують в режимі, близькому до насичення за обома субстратами, що забезпечує стабільність та відтворюваність аналітичних вимірювань.

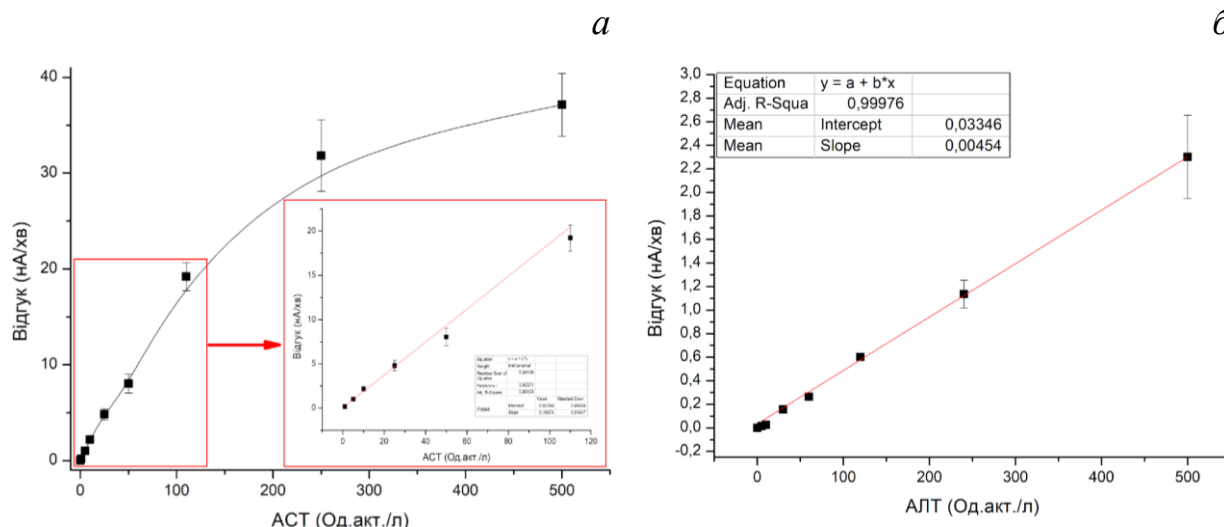


Рис. Д.1. Калібрувальна крива ГлОкс-біосенсора для визначення АСТ та її лінійна ділянка (а). Концентрації субстратів становили 8 мМ аспартату та 2 мМ α -КГ. Калібрувальна крива ГлОкс-біосенсора для вимірювання активності АЛТ (б). Концентрація аланіну становить 4 мМ, α -КГ – 50 мкМ, ПФ – 50 мкМ

ДОДАТОК Е

Кінетична характеристика ПЮкс-біосенсора за рівняннями Міхаеліса-Ментена та Лайнвівера-Бурка

Калібрувальний графік відгуків біосенсора залежно від концентрації пірувату наведено на рис. Е.1. Експериментальні дані успішно описуються класичним рівнянням Міхаеліса-Ментена (рис. Е.1), аналогічно до глутамат-чутливого біосенсора (Додаток Г): $I_{max} = 744$ нА, $K_m = 514$ мкМ, I — вимірний струм, S_I — концентрація пірувату.

Порівняння отриманого значення уявної константи Міхаеліса з літературними даними для вільної піруватоксидази з *Lactobacillus plantarum* ($K_m = 400$ мкМ [187]) дозволяє припустити незначний негативний вплив іммобілізації на спорідненість ензиму до субстрату.

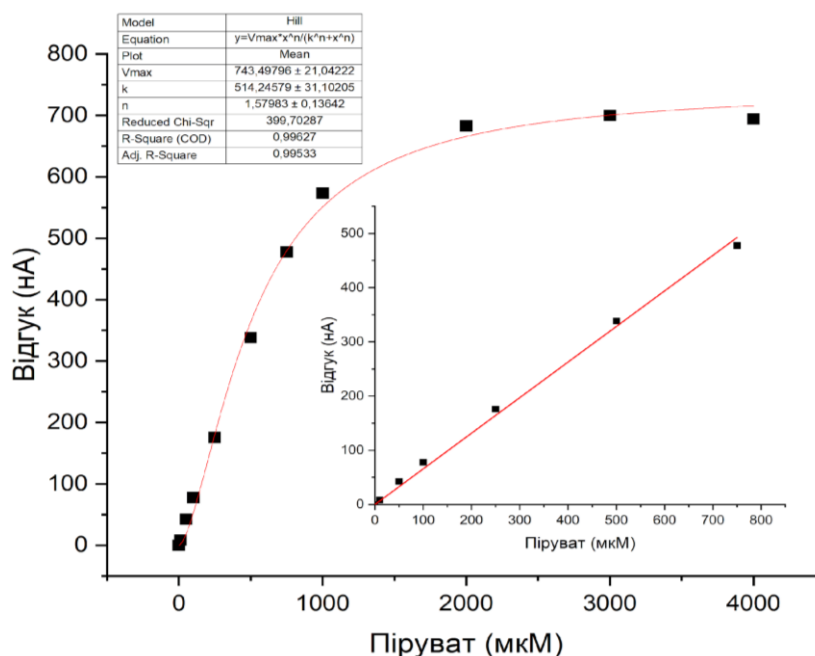


Рис. Е.1. Калібрувальна крива відгуків біосенсора на основі ПЮкс в залежності від концентрації пірувату та її лінійна ділянка

ДОДАТОК Ж

Калібрувальна крива ПОкс-біосенсора для визначення активності АЛТ

На рисунку Ж.1а представлено типовий вигляд амперометрограми, що демонструє ступінчасте прискорення зростання сили струму в системі при послідовному збільшенні активності АЛТ у розчині. На основі отриманих даних було побудовано калібрувальну криву залежності величини відгуку біосенсора від активності АЛТ у робочій комірці (рис. Ж.1б). Опис отриманої кривої за допомогою рівняння Міхаеліса-Ментена знову неможливий, оскільки воно міститиме 3 невідомих константи, так само, як і в системі на основі ГЛОкс.

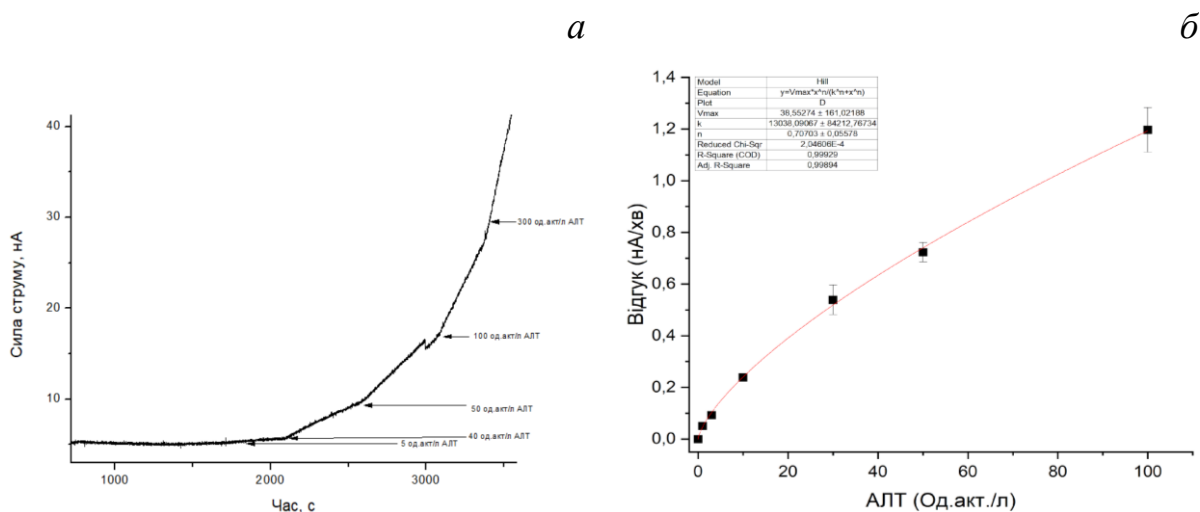


Рис. Ж.1. Типовий вигляд сигналу біосенсора при зміні активності АЛТ в розчині (а). Калібрувальна крива АЛТ-чутливого біосенсора на основі ПОкс (б). Концентрація фосфат-іонів – 5 мМ, тіаміну пірофосфату – 2 мМ, іонів магнію – 0,5 мМ, аланіну – 16 мМ, α-КГ – 2 мМ

ДОДАТОК 3**Обкладинка затвердженої методики по вирюванню рівню АСТ****МІНЕКОНОМІКИ**

ДЕРЖАВНЕ ПІДПРИЄМСТВО
«ВСЕУКРАЇНСЬКИЙ ДЕРЖАВНИЙ НАУКОВО-ВИРОБНИЧИЙ ЦЕНТР
СТАНДАРТИЗАЦІЇ, МЕТРОЛОГІЇ, СЕРТИФІКАЦІЇ ТА ЗАХИСТУ ПРАВ СПОЖИВАЧІВ»
(ДП «УКРМЕТРТЕСТСТАНДАРТ»)

Науково-виробничий інститут вимірювань складу, властивостей і кількості
речовин і матеріалів та оцінки відповідності засобів вимірювальної техніки
(Інститут № 2)

ЗАТВЕРДЖУЮ

В. о. директора інституту № 2
ДП «УКРМЕТРТЕСТСТАНДАРТ»



О.О. Мельников

« 31 » грудня 2025 р.

МЕТРОЛОГІЯ**АСТ У БІОЛОГІЧНИХ РОЗЧИНАХ**

Методика біосенсорного вимірювання активності АСТ та
оцінювання непевності результату вимірювання

МВ 031-36-2025

РОЗРОБЛЕНО

Начальник лабораторії відділу № 36

С.В. Кулик
« 31 » грудня 2025 р.

ДОДАТОК И

Перша сторінка акту впровадження розробленого біосенсора



впровадження науково-методичної розробки

Об'єкт впровадження: Біосенсорна система для одночасного вимірювання активності АЛТ, АСТ та їх співвідношення у біологічних рідинах (керівник розробки: д.б.н., с.н.с. Солдаткін О.О.; головний виконавець: м.н.с. Мруга Д.О.)

Джерело науково-технічної інформації:

Статті:

1. D. Mruga, Y. Vakhovskyi, V. Bakhmat, V. Pyeshkova, S. Dzyadevych, O. Soldatkin. Evaluation of Two Enzyme-Based Amperometric Biosensor Designs for Alanine Aminotransferase Determination in Biological Fluids. *Micromachines* 2025, 16(10), 1168. <https://doi.org/10.3390/mi16101168>
2. D. Mruga, S. Dzyadevych, O. Soldatkin. Development and optimisation of the biosensor for aspartate aminotransferase blood level determination. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 2025 Volume 417, 721–731. <https://doi.org/10.1007/s00216-024-05682-2>
3. D. Mruga, K. Berketa, A. Sverstiuk, V. Martsenyuk, A. Klos-Witkowska, Yu. Palianytsia, S. Dzyadevych, O. Soldatkin. Amperometric biosensor based on glutamate oxidase to determine AST activity. *Sensors* 2024, 24(24), 7891. <https://doi.org/10.3390/s24247891>
4. D. Mruga, S. Dzyadevych, O. Soldatkin. High-selective alanine transaminase-sensitive biosensor based on nanosize semipermeable poly-meta-phenylenediamine membrane. *Applied nanoscience* 2023, Volume 13, 6939–6949. <https://doi.org/10.1007/s13204-023-02810-9>

Патенти:

1. Солдаткін О.О., Мруга Д.О., Дзядевич С.В., Солдаткін О.П. Біосенсорна система для визначення активності аланініамінотрансферази. Патент на винахід № 125811
2. Мруга Д.О., Солдаткін О.О., Дзядевич С.В., Солдаткін О.П. Біосенсорна система для аналізу аспартатамінотрансферази. Патент на винахід № 12923