
БІОСЕНСОРИ

BIOSENSORS

УДК 543.553+577.15+543.06

DOI <http://dx.doi.org/10.18524/1815-7459.2017.4.119596>

РОЗРОБКА АМПЕРОМЕТРИЧНОЇ БІОСЕНСОРНОЇ СИСТЕМИ ДЛЯ ОДНОЧАСНОГО ВИМІРЮВАННЯ ПІРУВАТУ І ЛАКТАТУ

Я. В. Топольнікова¹, Д. В. Книжникова², І. С. Кучеренко¹, С. В. Дзядевич^{1,2}, О. О. Солдаткін^{1,2}

¹ Інститут молекулярної біології та генетики НАН України, вул. Заболотного, 150, 03148,
м. Київ, Україна, e-mail: topolnyk.ya@gmail.com

² Київський національний університет імені Тараса Шевченка, вул. Володимирська, 64, 01003,
м. Київ, Україна

РОЗРОБКА АМПЕРОМЕТРИЧНОЇ БІОСЕНСОРНОЇ СИСТЕМИ ДЛЯ ОДНОЧАСНОГО ВИМІРЮВАННЯ ПІРУВАТУ І ЛАКТАТУ

Я. В. Топольнікова, Д. В. Книжникова, І. С. Кучеренко, С. В. Дзядевич, О. О. Солдаткін

Анотація. В роботі описано розробку біосенсорної системи, що складається з двох монобіосенсорів на основі піруватоксидази та лактатоксидази для визначення пірувату та лактату, відповідно. Для іммобілізації ензимів у складі біоселективної мембрани було використано метод захоплення в полімер PVA-SbQ на поверхні амперометричного перетворювача. Як перетворювачі виступали платинові дискові електроди. В роботі було підібрано єдині умови виготовлення та функціонування монобіосенсорів для поєднання їх у біосенсорну систему. Було досліджено оптимальні умови іммобілізації ензимів та параметри буферного розчину для одночасної роботи біосенсорів, зокрема рН, буферну ємність та іонну силу. Перевірено перехресний вплив субстратів та кофакторів на роботу ензимів. Біосенсорна система характеризувалась гарною операційною стабільністю та відтворюваністю відгуків на піруват та лактат. Отримані аналітичні характеристики біосенсорної системи свідчать про можливість її використання для аналізу лактату та пірувату в реальних біологічних рідинах.

Ключові слова: лактат, піруват, біосенсорна система, іммобілізовані ензими, лактатоксидаза, піруватоксидаза

DEVELOPMENT OF AMPEROMETRIC BIOSENSOR SYSTEM FOR SIMULTANEOUS DETERMINATION OF PYRUVATE AND LACTATE

Ya. V. Topolnikova, D. V. Knyzhnykova, I. S. Kucherenko, S. V. Dzyadevych, O. O. Soldatkin

Abstract. This article describes the development of a biosensor system consisting of two monobiosensors based on pyruvate and lactate oxidases for determination pyruvate and lactate, respectively. For the enzymes immobilization in the bioselective membrane, the method of capturing into PVA-SbQ polymer on the surface of amperometric transducer was used. Platinum disk electrodes served as the transducers. The processes of production of both monobiosensors as well as the conditions of their operation were identical, which makes their integration into a single system possible. The conditions of enzymes immobilization and parameters of buffer solution (pH, buffer capacity, ionic strength) were optimized and universalized for simultaneous operation of biosensors. The cross influence of substrates and cofactors on enzymes was examined. The biosensor system is characterized by high degree of operational stability and reproducibility to responses to pyruvate and lactate. The obtained analytical characteristics of the biosensor system testify to the possibility of efficient usage for lactate and pyruvate analyses in real biological fluids.

Keywords: lactate, pyruvate, biosensor system, immobilized enzymes, lactate oxidase, pyruvate oxidase

РАЗРАБОТКА АМПЕРОМЕТРИЧЕСКОЙ БИОСЕНСОРНОЙ СИСТЕМЫ ДЛЯ ОДНОВРЕМЕННОГО ИЗМЕРЕНИЯ ПИРУВАТА И ЛАКТАТА

Я. В. Топольнікова, Д. В. Книжнікова, І. С. Кучеренко, С. В. Дзядевич, А. А. Солдаткін

Аннотация. В работе описана разработка биосенсорной системы, состоящая из двух монобиосенсоров на основе пируватоксидазы и лактатоксидазы для определения пирувата и лактата, соответственно. Для иммобилизации ферментов в биоселективную мембрану был использован метод захвата ферментов в полимер PVA-SbQ на поверхности амперометрического преобразователя. В качестве преобразователей выступали платиновые дисковые электроды. В работе подобраны единые условия изготовления и функционирования монобиосенсоров для объединения в единую биосенсорную систему. Были подобраны оптимальные условия иммобилизации ферментов, параметры буферного раствора, такие как pH, буферная емкость и ионная сила, для одновременной работы биосенсоров. Также было проверено перекрестное влияние субстратов и кофакторов на ферменты. Биосенсорная система характеризовалась хорошей операционной стабильностью и воспроизводимостью откликов на лактат и пируват. Полученные аналитические характеристики биосенсорной системы свидетельствуют о возможности ее успешного использования для анализа лактата и пирувата в реальных биологических образцах.

Ключевые слова: лактат, пируват, биосенсорная система, иммобилизованные ферменты, лактатоксидаза, пируватоксидаза

1. ВСТУП

Піруват – це органічна кислота, що є одною з ключових молекул у багатьох біохімічних шляхах. Піруват утворюється як кінцевий продукт гліколізу, і за аеробних умов може бути далі окиснений до ацетил-коензиму А, який вступає в цикл Кребса. Лактат утворюється з пірувату в процесі анаеробного гліколізу, та є маркером гіпоксії в клітинах, тканинах та біологічних рідинах. Так, продукція лактату зростає при станах, за яких збільшується інтенсивність анаеробного метаболізму внаслідок гіпоксії – наприклад геморагічному шоку, емболії, дихальних розладах. Тривала гіпоксія спричиняє патологічні процеси на всіх рівнях функціонування біологічного організму, а гіпоксія мозку є остаточною причиною смерті. Підвищення рівня лактату виникає також при порушенні роботи системи кліренсу лактату – розладів печінки, нирок, цукровому діабеті [1].

Концентрація пірувату у крові у нормі складає від 40-50 до 100 мкмоль/л [1], [2]. Підвищення рівня пірувату виникає як при підвищеному його утворенні при посиленні аеробних процесів, так і при недостатній утилізації в піруватдегідрогеназному комплексі. Однак надлишок пірувату швидко перетворюється в лактат при переважанні анаеробних процесів та ацетил-коензим А - при переважанні аеробних процесів [3]. Тому оцінка концентрації пірувату без врахування рівня супутніх метаболітів не є вагомим діагностичним критерієм.

Рівень лактату у крові у нормі варіює від 0,5 до 2,2 ммоль/л [1]. Під час інтенсивних фізичних навантажень цей показник може досягати 12-25 ммоль/л, однак у нормі він зникає зі швидкістю приблизно 320 ммоль/л×год. [4] переважно завдяки печінковому метаболізму та перетворенню в піруват. Однак при постійній гіперпродукції лактату в тканинах або патологіях системи утилізації, час існування гіперлактатемії набагато більший і саме це є підставою для негативного прогнозу. Тому вимірювання рівня лактату в динаміці використовується в відділеннях реанімації та інтенсивної терапії для оцінки тяжкості стану пацієнта, прогнозу ймовірності шоків станів та колапсу і смертності пацієнтів [5], [6]. Також динаміка рівня лактату в крові використовується для оцінки ефективності лікування, та спостереження адекватності

отриманого лікування в часі. Так, стабільна концентрація лактату в крові більше 5 ммоль/л на фоні тяжкого ацидозу (рН крові менше 7,35) дає прогноз 80% смертності [6].

Підвищена концентрація пірувату спостерігається у випадках дефіциту вітаміну В₁, респіраторного алкалозу (різкого зниження рівня двоокису вуглецю в крові, що супроводжується підвищенням рН), отруєння миш'яком та ртуттю, та патологіях печінки, таких як алкогольний цироз, гепатит, тощо [7]. Також показано збільшення концентрації пірувату у сироватці крові та слині хворих на рак ротової порожнини у 2-2,8 рази. Оцінка концентрації пірувату розглядається як новий метод скринінгу раку [8], [2]. Тоді як тривалий моніторинг лактату застосовується в клінічній практиці невідкладної терапії, моніторинг пірувату до сих пір не впроваджено. Це пов'язано з труднощами, пов'язаними з селективністю методу, оскільки клінічна концентрація пірувату є низькою, а концентрація електроактивних інтерферуючих речовин достатньо висока і перевищує концентрацію пірувату.

В даний час вимірювання концентрації лактату в лабораторній діагностиці переважно обмежується стандартними фотометричними та колориметричними методами. Це найдавніші та найдешевші методи, які, проте, мають низьку чутливість та селективність порівняно з ензиматичними методами. Дуже часто для визначення лактату в клініці, зокрема в відділеннях реанімації, використовують методи, що використовують ензиматичну реакцію лактатдегідрогенази, при якій утворюється НАДН. Концентрація НАДН вимірюється методами спектрофотометрії за довжини хвилі 340 нм, що корелює з концентрацією лактату у плазмі [7].

Визначення пірувату натомість у клінічній практиці переважно здійснюється разом з визначенням інших метаболітів – лактат, аланін, ацетил-коензим А. Крім того, концентрація пірувату в біологічних рідинах є відносно низькою порівняно з іншими метаболітами, тому метод повинен не лише мати високу чутливість, а й стійкість до численних інтерферуючих речовин. Тому переважаючими для визначення пірувату є ензиматичні методи, також хороші результати показує рідинна хроматографія та ЯМР.

Для застосування у клінічній діагностиці необхідна висока селективність, швидкість та простота вимірювання, а також мінімальний час на підготовку проби або відсутність такої підготовки. Цим умовам найкраще відповідають електрохімічні біосенсиори. Слід принагідно зауважити, що саме електрохімічні біосенсиори мають високу селективність та одну з найкращих чутливостей порівняно з іншими методами визначення біологічно значимих молекул.

На сьогодні відома низка біосенсорів для вимірювання лактату та пірувату, як у харчовій промисловості, так і для клінічної діагностики. Так, Monošik *et al.* розробили амперометричний біосенсор з використанням одношарових вуглецевих нанотрубок для вимірювання концентрації лактату у вині та харчових продуктах [9]. Gajović *et al.* розробили біосенсор для визначення пірувату у сироватці крові на основі рекомбінантної піруватоксидази [7]. Електроактивна поверхня мікроелектрода була збільшена шляхом електроосадження черні платини. Однак систем чи мультибіосенсорів для одночасного вимірювання концентрацій лактату та пірувату, які були б апробовані при роботі з сироваткою крові, досі не було описано.

Тому метою даної роботи була розробка амперометричної біосенсорної системи для одночасного визначення лактату та пірувату для подальшого застосування у клінічній діагностиці.

2. МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ

Матеріали

В роботі використовували лактатоксидазу (ЛЮД) із *Pedococcus sp.* (КФ 1.1.3.2) з активністю 35 од. акт. мг⁻¹, лактат натрію, піруватоксидазу (ПОД) з *Aerococcus sp.* (КФ 1.2.3.3) з активністю 54 од. акт. мг⁻¹, піруват натрію, бичачий сироватковий альбумін, фотополімер полівінілалкоголь, що містить стирилпіридинові групи (PVA-SbQ), 25% водний розчин глутарового альдегіду, Mg(NO₃)₂ та HEPES виробництва Sigma–Aldrich Chimie. Використовувався тіамінпірофосфат (ТПФ) виробництва «Biofarma» (ліофілізат для приготування розчинів для ін'єкцій). Інші неорганічні сполуки, що використовувалися в роботі, були вітчизняного виробництва та мали ступінь чистоти «хч» та «чда».

Мікрочастинки силікаліту були синтезовані штучно за методикою, описаною в попередній роботі [10].

Конструкція амперометричних перетворювачів

Платинові дискові електроди виготовлялись в нашій лабораторії за наступною технологією: шматочок платинового дроту діаметром 0,5 мм і довжиною 3 мм поміщався в звужений з одного боку скляний капіляр з зовнішнім діаметром 3,5 мм, після чого звужений кінець капіляру із платиною у середині герметизувався запаюванням в полум'ї пальника. Електричне з'єднання платини з провідником у вигляді срібного дроту забезпечувалось низько-температурним запаюванням за допомогою сплаву Вуда. Відкритий кінець електроду заповнювався епоксидною смолою, частина провідника знаходилась в середині капіляру, а частина залишалась ззовні, до нього в свою чергу припаювався мідний контакт, необхідний для з'єднання з вимірювальною установкою. Перед першим використанням, робоча частина електроду зі впаяною платиною проходила механічну обробку на наждачному папері та за допомогою алюмінієвої пасти. При необхідності, робоча поверхня платинового електрода поновлювалася за допомогою повторного шліфування.

Методика вимірювання

Використовувалась триелектродна схема амперометричного аналізу. Робочі амперометричні перетворювачі на основі платинових дискових електродів, допоміжний платиновий електрод та Ag/AgCl електрод порівняння (хлорсрібний) підключались до потенціостату PalmSens (Palm Instruments BV, Нідерланди). 8-ми канальний пристрій (CH-8 multiplexer, Palm Instruments BV, Нідерланди), що підключався до потенціостату, дозволяв отримувати сигнали одночасно з 8 робочих електродів, проте зазвичай до нього були підключені 2-3 робочі електроди. Відстань між допоміжним платиновим електродом та усіма робочими біосенсорами в процесі вимірювання була однаковою і складала приблизно 5 мм. Виміри проводили за кімнатної температури у відкриті

тій вимірвальній комірці об'ємом 2 мл при постійному перемішуванні та при постійному потенціалі +0,6 В відносно Ag/AgCl електрода порівняння. В якості робочих буферів використовували 25 мМ НЕРЕС, рН 7,4, та 50 мМ фосфатний буфер, рН 6,5, до яких, за необхідності, додавали кофактори піруватоксидази – іони магнію, ТПФ та іони фосфорної кислоти. Усі дослідження проводились щонайменше у трьох повторностях.

Методика нанесення біоселективних мембран

Біоселективні елементи біосенсорів отримували шляхом іммобілізації ензимів і допоміжних речовин на поверхню амперометричного перетворювача. Вихідний розчин для іммобілізації лактатоксидази містив 8 % (тут і далі – масова частка) ЛОД, 4 % БСА, 10 % гліцеролу в 100 мМ фосфатному буфері, рН 6,5. Вихідний розчин для іммобілізації піруватоксидази містив 20% ПОД, 5% БСА, 10% гліцеролу в 100 мМ фосфатному буфері, рН 6,5. Гліцерол додавали, щоб стабілізувати ферменти впродовж їх іммобілізації та запобігти передчасному висиханню краплі і поліпшити адгезію мембрани до поверхні перетворювача.

Нами було використано 3 методики іммобілізації ензимів. Після кожної іммобілізації, біосенсори відмивали в робочому буферному розчині від незв'язаних компонентів біоселективної мембрани.

Іммобілізація шляхом поперечного зшивання за допомогою глутарового альдегіду

Вихідний розчин, що містив ензими, змішували з 0,7% або 0,3% водним розчином глутарового альдегіду (зшиваючого агенту) у пропорції 1:1. Одразу після цього суміш наносили на робочі поверхні перетворювачів та висушували протягом 40 хв. на повітрі за кімнатної температури.

Іммобілізація шляхом адсорбції на поверхні силікалітних частинок

Перед проведенням адсорбції проводили модифікацію поверхні перетворювачів силіка-

літом. Для цього використовували 10 % суспензію силікаліту у дистильованій воді. Невеликий об'єм (0,165 мкл) розчину силікаліту наносили на чутливу частину електрода, після чого перетворювач нагрівали до 100°C впродовж 5 хв. у термостаті. Така температура не впливала на силікаліт та на робочі характеристики перетворювача. В результаті цього, на перетворювачах формувався шар силікаліту. Потім на чутливу область наносили розчин ензиму та очікували 15 хв. для адсорбції ензиму на силікаліті.

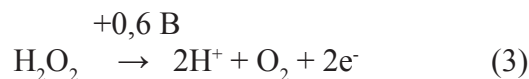
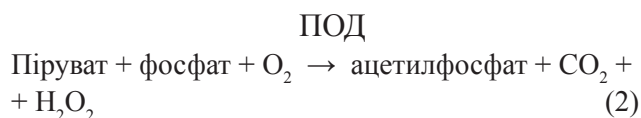
Іммобілізація шляхом захоплення ензиму в фотополімері PVA-SbQ

Вихідний розчин, що містив ензими, змішували з 13,3 % водним розчином PVA-SbQ у пропорції 1:1. Одразу після цього суміш наносили на чутливу поверхню перетворювача і опромінювали її ультрафіолетом протягом 20 хв. за допомогою УФ лампи КФ-4М для формування мембран.

3. РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Принцип роботи біосенсорної системи

Пропонована біосенсорна система складається з двох близьких за конструкцією амперометричних біосенсорів, які відрізняються лише ензимом в складі біоселективного елементу. Біосенсор для визначення лактату містить лактатоксидазу, а біосенсор для визначення пірувату – піруватоксидазу. Принцип роботи біосенсорів базуються на наступних реакціях:



У випадку біосенсора для визначення лактату, лактатоксидаза окиснює лактат до пірувату і при цьому утворюється пероксид водню (реакція 1). При роботі біосенсора для визначення

пірувату, піруват і фосфат перетворюються на ацетилфосфат за допомогою піруватоксидази (реакція 2) і при цьому теж утворюється перексид водню. При прикладанні позитивного потенціалу до амперометричних перетворювачів, на які нанесено відповідні ферменти, утворений перексид водню розщеплюється згідно реакції (3) з утворенням електронів, які і реєструються за допомогою амперометричних перетворювачів та формують відгук біосенсорів. Приклад реальних відгуків біосенсорної системи наведено на Рис. 1.

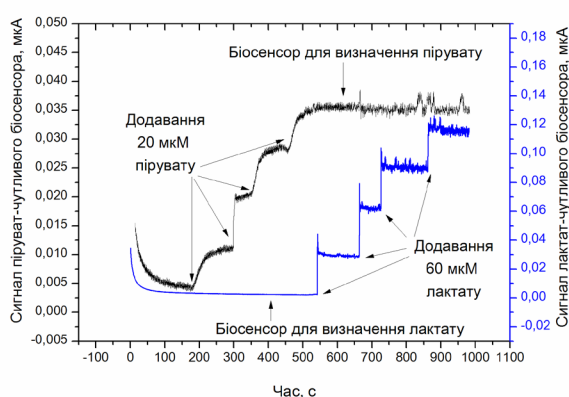


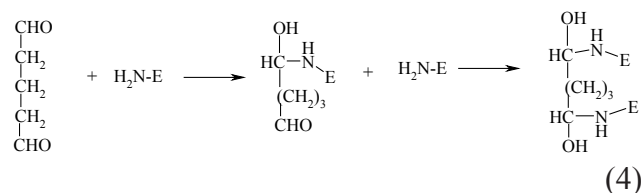
Рис. 1. Типові відгуки біосенсорів для визначення пірувату і лактату на додавання субстратів. Вимірювання проводились у 25 мМ HEPES буфері, рН 7,4, у присутності 125 мкМ Mg^{2+} , 500 мкМ ТПФ, 20 мМ іонів фосфорної кислоти; за постійного потенціалу +0,6 В відносно Ag/AgCl електрода порівняння.

Дослідження можливості іммобілізації біоселективних елементів біосенсорів в однакових умовах

Нами було проведено порівняння ефективності трьох різних способів іммобілізації. Оскільки лактатоксидаза більш стабільна і невибаглива до умов іммобілізації ніж піруватоксидаза, вибір оптимальних умов іммобілізації проводився для піруватоксидази, після чого було перевірено роботу лактатоксидази у вибраних умовах.

Спершу було перевірено іммобілізацію ензимів методом поперечного зшивання глутаровим альдегідом. Біфункціональний агент глутаровий альдегід містить дві альдегідні групи, які вступають в реакцію з вільними аміногрупами

білків при нейтральному рН. Для іммобілізації ензиму використовується зшивання молекул ензиму та БСА за допомогою глутарового альдегіду, з утворенням полімерної мембрани:

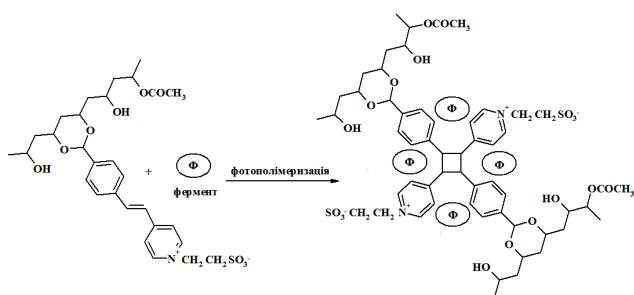


Між глутаровим альдегідом та аміногрупами білків утворюються ковалентні зв'язки, які стійкі до змін рН та температури. Тому ензим іммобілізується досить міцно, проте при цьому змінюється структура ензиму і відповідно знижується його активність. Також можливе просторове блокування активних центрів ензимів. До недоліків даного методу іммобілізації можна віднести і токсичність зшиваючого агента.

Цей метод був ефективним для іммобілізації лактатоксидази, однак при роботі з піруватоксидазою він показав низьку активність ензиму після іммобілізації.

Тому наступним був випробуваний метод іммобілізації на основі адсорбції ензиму на мікрочастинках силікаліту. Спочатку на перетворювач наносили шар силікаліту, після чого молекули ензиму адсорбувались на поверхні силікаліту. Даний метод є значно кращим для іммобілізації низько стабільних ензимів, бо при адсорбції майже не відбувається порушення тривимірної структури ензиму. Проте і міцність іммобілізації є невисокою.

Третім використаним методом іммобілізації була інкапсуляція ензиму у фотополімерній мембрані на основі PVA-SbQ. В цьому методі відбувається захоплення ензиму в сітку полімеру, яка утворюється від час фотополімеризації мономерів. PVA-SbQ – це розчинний фотополімер, який під впливом ультрафіолетового світла полімеризується та утворює сітку, в яку захоплює молекули ензиму (реакція 5). Цей метод є не агресивним і сприяє кращому збереженню нативної структури ензиму у порівнянні з ковалентним зшиванням.



(5)

Порівняння характеристик біосенсорів, отриманих трьома методами іммобілізації піруватоксидази, приведені в Табл. 1. Як видно з таблиці, метод інкапсуляції ензиму в PVA-SbQ показав високу чутливість, широкий лінійний діапазон та низький рівень шуму порівняно з іншими методами. Крім того, при іммобілізації ензиму за участю PVA-SbQ біосенсор після 2 годин безперервної роботи майже не втратив активності порівняно з біосенсорами, виготовленими за іншими методами іммобілізації. Тому для іммобілізації піруватоксидази надалі було використано метод іммобілізації за участю PVA-SbQ.

Після цього було перевірено ефективність методу іммобілізації за участю PVA-SbQ для біосенсора на основі лактатоксидази. Робочі характеристики біосенсорів суттєво не відрізнялись від біосенсорів на основі лактатоксидази, іммобілізованої глутаровим альдегідом. Однак оскільки піруватоксидаза більш чутлива до умов іммобілізації, було обрано оптимальний варіант іммобілізації для цього ензиму. Тому для іммобілізації в однакових умовах нами було обрано іммобілізацію ензимів за участю PVA-SbQ.

Залежність роботи біосенсорів від рН буферного розчину

Як відомо, кожен ензим має рН-оптимум своєї роботи. Відповідно, для оптимізації роботи біосенсорної системи необхідно було підібрати такий діапазон рН робочого буфера, при якому іммобілізовані лактатоксидаза та піруватоксидаза будуть працювати з найбільшою ефективністю.

Таблиця 1

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

| Аналітичні характеристики біосенсора | Метод іммобілізації | | | |
|--|---------------------|---------------------|-------------------------|----------------------|
| | Зшивання ГА (0,15%) | Зшивання ГА (0,35%) | Адсорбція на силікаліті | Захоплення в PVA-SbQ |
| Чутливість, нА/мМ | 23,6 | 2,9 | 11,5 | 23,7 |
| Лінійний діапазон роботи, мМ | 0,16-4 | 0,31-11 | 0,08-6,7 | 0,01-5 |
| Мінімальна межа визначення, мкМ | 9 | 170 | 6,0 | 5,1 |
| Верхня межа динамічного діапазону роботи, мМ | 11,1 | 17,0 | 8,1 | 6,8 |
| Шум базової лінії, нА | 0,11 | 0,13 | 0,06 | 0,095 |
| Погрішність вимірювання, % | 16,78 | 55,43 | 11,68 | 6,2 |
| Дрейф базової лінії, мкМ/хв | 0,02 | 0,07 | 0,05 | 0,005 |
| Величина відгуку біосенсора після 2 годин безперервної роботи, % | 48,82 | 70,97 | 83,61 | 90,2 |

Як відомо, рН-оптимум для вільних та іммобілізованих ензимів може суттєво відрізнятися у кислу або лужну сторони. Оскільки ми застосовуємо іммобілізацію у шарі полімеру, а літературні дані для використовуваних нами ензимів лактатоксидази та піруватоксидази переважно стосувались ковалентного зшивання, необхідно було перевірити чи є суттєва залежність відгуку біосенсора від зміни рН буферу, принаймні у діапазоні, який очікується для реальних зразків.

Тому нами було визначено оптимальне значення рН робочого буферу для обох ензимів у іммобілізованому стані. Для цього було проведено вимірювання величини відгуку біосенсора у розчинах із змінним рН (Рис. 2). Для цього було використано багатокомпонентний ("полімікс") буфер (50 мМ NaH_2PO_4 ; 50 мМ тетраборату натрію; 50 мМ тріс; 50 мМ лимонної кислоти) із різним значення рН. Піруватоксидаза була іммобілізована в полімері PVA-SbQ, лактатоксидаза – ковалентним зшиванням глутаровим альдегідом.

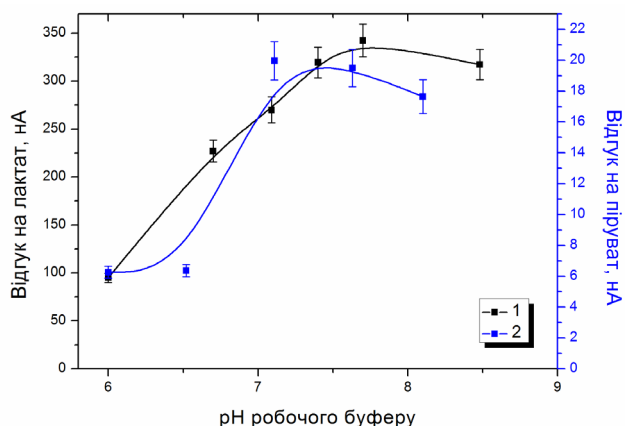


Рис. 2. Крива залежності відгуку монобіосенсорів для визначення лактату (1) та пірувату (2) від рН розчину. Біосенсор на основі піруватоксидази працював у 50 мМ багатокомпонентному буфері, з додаванням 125 мкМ Mg^{2+} , 500 мкМ ТПФ, та 7,5 мМ пірувату. Біосенсор для лактатоксидази – в такому ж буфері, без додавання Mg^{2+} та ТПФ, з 1 мМ лактату.

Оптимум для іммобілізованої в PVA-SbQ піруватоксидази склав від 7,1 до 8,1. Оптимальний діапазон значень рН для лактатоксидази починався від 7, досягаючи піку близько 7,7. Але оскільки біосенсорна система призначалась для вимірювання сироватки крові, було

вирішено надалі працювати з розчином рН 7,4 який відповідає фізіологічному. Таким чином оптимальні характеристики біосенсорів включають весь діапазон значення рН крові, як в фізіологічному, так і в патологічних станах, який коливається від 7,3 до 7,5.

Вплив буферної ємності на роботу біосенсорної системи

Оскільки біологічним системам у важких патологічних станах властива зміна буферного балансу, а характеристики робочого розчину є одним з факторів, що можуть впливати на роботу біосенсорної системи, потрібно було знайти оптимальний діапазон буферної ємності робочого розчину, щоб її коливання не впливали на одночасну роботу кожного з біосенсорів в складі системи. Було показано (Рис. 3), що відгуки біосенсорів практично не залежать від концентрації буферного розчину при концентраціях буферу більше 4 мМ. Тому обидва біосенсори та система, що з них складається, можуть використовуватись для вимірювання зразків з різною буферною ємністю.

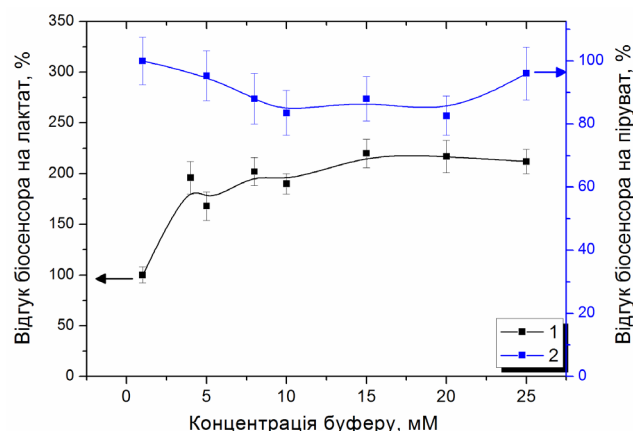


Рис. 3. Залежність відгуку монобіосенсора на основі лактатоксидази (1) та піруватоксидази (2) від концентрації буферного розчину. Концентрації субстратів: 0,5 мМ лактату та 1 мМ пірувату. Вимірювання проводились буфері HEPES різних концентрацій, рН 7,4, у присутності 125 мкМ Mg^{2+} , 500 мкМ ТПФ, 20 мМ іонів фосфорної кислоти за постійного потенціалу +0,6 В відносно Ag/AgCl електрода порівняння.

Вплив іонної сили на роботу біосенсорної системи

У реальних біологічних зразках, зокрема в сироватці крові, присутня велика кількість іонів, зокрема K^+ , Na^+ , Mg^{2+} , Cl^- , інші іони органічних та неорганічних кислот та ін. Також іонний склад крові може суттєво змінюватись під час різних фізіологічних та особливо патологічних процесів. Тому нами було проведено дослідження стабільності відгуків біосенсорів в умовах різної іонної сили розчину.

Експеримент проводили додаванням до робочої комірки концентрованих розчинів $NaCl$ різного об'єму (Рис. 4). Концентрації $NaCl$ вибирались з врахуванням можливих варіантів розведення реальних біологічних зразків.

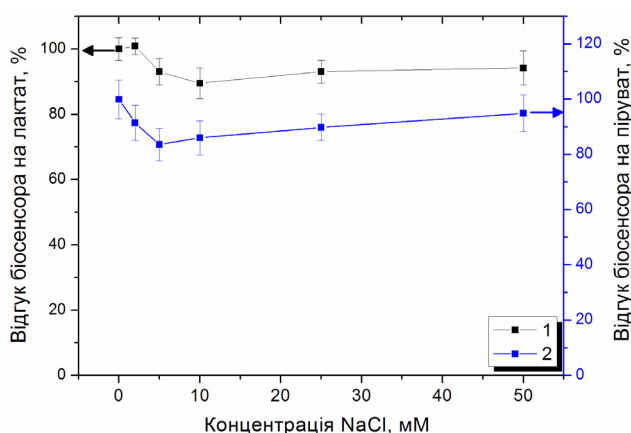


Рис. 4. Залежність величини відгуків монобіосенсорів на основі лактатоксидази (1) та піруватоксидази (2) від іонної сили розчину. Концентрація лактату становила 1 мМ, пірувату – 1 мМ. Вимірювання проводились у 25 мМ $HEPES$ буфері, рН 7,4, у присутності 125 мкМ Mg^{2+} , 500 мкМ ТПФ, 20 мМ іонів фосфорної кислоти; за постійного потенціалу +0,6 В відносно $Ag/AgCl$ електрода порівняння.

Значної розбіжності відгуків біосенсора при різних концентраціях $NaCl$ не спостерігалось. Це свідчить про можливість використання даного біосенсора для аналізу біологічних рідин, що характеризуються варіабельною іонною силою.

Перехресний вплив субстратів біосенсорів на роботу біосенсорної системи

Як відомо з літератури, піруватоксидаза не проявляє субстратної специфічності до лактату,

а лактатоксидаза – до пірувату. Тим не менш, оскільки біоселективні елементи біосенсорної системи повинні працювати одночасно в одному і тому ж середовищі та за однакових умов, нами було проаналізовано перехресний вплив субстратів монобіосенсорів на величину їх відгуків. Було показано, що на відгук біосенсора для визначення пірувату не впливає наявність лактату (2 мМ) у вимірювальній комірці. Аналогічно, наявність пірувату (2 мМ) не впливає на роботу біосенсора для визначення лактату.

Крім того, оскільки біосенсор для визначення пірувату потребує застосування кофакторів, а саме іонів фосфорної кислоти, іонів магнію та тіамінпірофосфату, було також перевірено їх вплив на монобіосенсор для визначення лактату. Для цього було отримано калібрувальні криві для визначення лактату у чистому буфері, а також у буфері з додаванням кофакторів (Рис. 5). Калібрувальні криві були однакові незалежно від наявності чи відсутності кофакторів, тому можна зробити висновок, що наявність у робочому буфері кофакторів піруватоксидази не впливає на відгук біосенсора для визначення лактату.

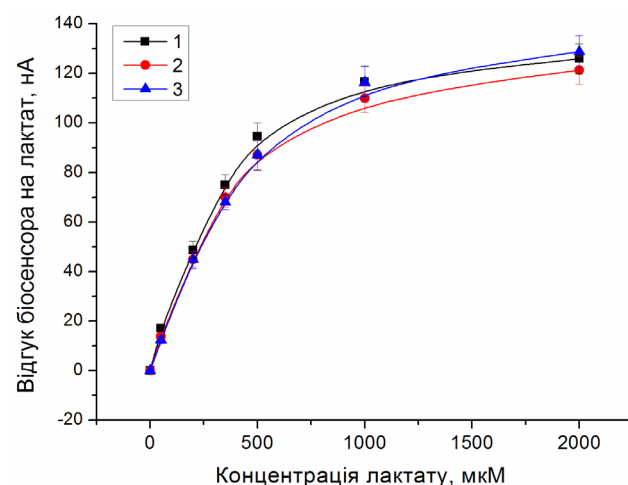


Рис. 5. Калібрувальні криві для визначення лактату біосенсора на основі лактатоксидази, отримані: (1) в 25 мМ буфері $HEPES$, рН 7,4; (2) в 25 мМ буфері $HEPES$, рН 7,4 з додаванням 20 мМ іонів фосфорної кислоти; (3) в 25 мМ буфері $HEPES$ з додаванням 20 мМ іонів фосфорної кислоти, 125 мкМ Mg^{2+} та 500 мкМ ТПФ. Вимірювання проводились за постійного потенціалу +0,6 В відносно $Ag/AgCl$ електрода порівняння.

Таким чином, при поєднанні в систему для одночасної роботи, субстрати та кофактори одного монобіосенсора не впливають на роботу іншого монобіосенсора, а отже, біосенсори можуть працювати в складі системи в однакових умовах та єдиному буферному розчині.

Відтворюваність та операційна стабільність відгуків біосенсорів

Важливим показником роботи біосенсорів є відтворюваність відгуків. Тому ми отримували відгуки на субстрати протягом кількох годин безперервної роботи. Одне вимірювання відгуку займало 5 хв., проміжок між ними – 4-5 хв., за цей час біосенсори відмивали від субстратів, кілька разів змінюючи робочий буфер. Помітного падіння відгуків за 20 вимірювань не відбувалось; відносне середньоквадратичне відхилення відгуків на лактат в середньому становило 5,0 %, а на піруват – 6,2 %. Таким чином, біосенсорна система відтворювано працювала з модельними розчинами субстратів.

Також важливим показником роботи біосенсорної системи є можливість використання її протягом тривалого часу. Термін роботи біосенсора обмежується переважно терміном зберігання біоселективного елемента, оскільки фізична частина біосенсора може зберігатися практично необмежений час. Поступово іммобілізовані ензими втрачають активність, що зрештою призводить до втрати чутливості біосенсора до субстратів. Тому наступним етапом нашої роботи було визначення операційної стабільності біосенсорної системи. Протягом дня ми отримували 3 відгуки на відповідні субстрати. У перерві між вимірюваннями біосенсори зберігались в сухому стані при +4°C. Результати експериментів протягом 14 днів представлені на Рис. 6.

Було показано, що монобіосенсор для вимірювання лактату не втратив активності після 14 днів зберігання в сухому стані при +4 °С, тоді як біосенсор для вимірювання пірувату на 14 день зберігає 82,3% активності. Це свідчить про необхідність калібрування біосенсорів після зберігання протягом періоду більшого ніж два тижні, а також про гіршу стабільність піруватоксидази у порівнянні з лактатоксидазою.

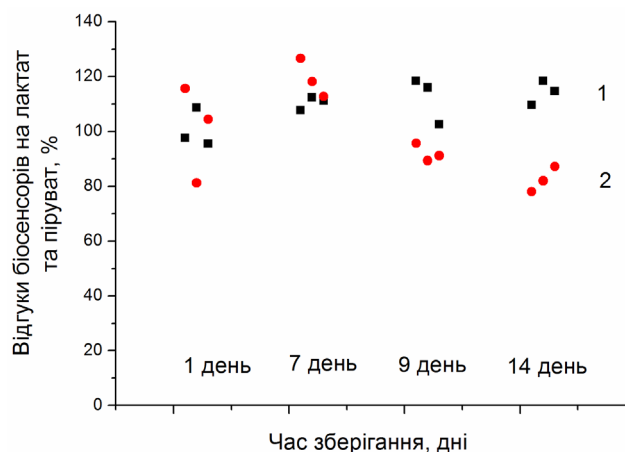


Рис. 6. Стабільність відгуків біосенсорів на основі лактатоксидази та піруватоксидази на 1 мМ лактату та пірувату відповідно протягом 14 днів. Вимірювання проводились у 25 мМ HEPES буфері, рН 7,4, за постійного потенціалу +0,6 В відносно Ag/AgCl електрода порівняння, з додаванням 125 мкМ Mg²⁺, 500 мкМ ТПФ, 20 мМ іонів фосфорної кислоти. Умови зберігання – в сухому стані при +4 °С.

Аналітичні характеристики біосенсорної системи для визначення пірувату та лактату

Після розробки та оптимізації роботи біосенсорної системи необхідно було визначити її основні аналітичні характеристики (Табл. 2). Мінімальна межа вимірювання лактату, яка вимірювалась як концентрація лактату, що призводить до відгуку біосенсора в три рази більшого за величину шуму базової лінії, становила 3 мкМ, мінімальна межа вимірювання пірувату – 5 мкМ. Межа вимірювання несуттєво змінювалась в залежності від конкретного біосенсора. Лінійний діапазон роботи біосенсора для визначення лактату складав від 5 мкМ до 1000 мкМ, чутливість до лактату становила 204 нА/мМ. Лінійний діапазон біосенсора для визначення пірувату складав від 10 мкМ до 5 мМ, чутливість до пірувату становила 24 нА/ мМ.

В подальшому біосенсорну систему планується використовувати для клінічної діагностики концентрації лактату та пірувату в біологічних рідинах, зокрема сироватці крові. Концентрація лактату в крові 0,5 до 2,2 ммоль/л у нормальних умовах, при патологічних станах може зростати до 5-8 ммоль/л, в особливо важких станах до 10-12 ммоль/л.

Основні аналітичні характеристики біосенсорної системи.

| Аналітична характеристика | Біосенсор для визначення пірувату | Біосенсор для визначення лактату |
|---|-----------------------------------|----------------------------------|
| Мінімальна межа визначення субстрату, мкМ | 5 | 3 |
| Лінійний діапазон, мкМ | 10 - 5000 | 5-1000 |
| Відтворюваність (відносна середньоквадратична розбіжність) відгуків біосенсора, % | 6,2 | 5,0 |
| Час аналізу, хв. | 5 | 5 |
| Стабільність при зберіганні, тижні | >2 | >2 |

Концентрація пірувату у крові у нормі складає від 40-50 до 100 мкмоль/л, при патологічних станах зростає до 200-250 мкмоль/л. Тому необхідно було підібрати ту концентрацію розведення біоматеріалу (сироватки крові), при якій можна оцінити концентрацію як лактату, так і пірувату за умов одночасного вимірювання. Оскільки концентрації лактату та пірувату в сироватці крові суттєво відрізняються, нами було вибрано розведення 1:10. При цьому розведенні враховується весь діапазон можливих значень пірувату, та діапазон значень лактату від 0,5 до 10 ммоль/л. При перевищенні концентрації лактату у пробі 10 ммоль/л, слід провести повторне вимірювання з більшим розведенням.

4. ВИСНОВКИ

В роботі розроблено амперометричну біосенсорну систему для одночасного вимірювання концентрацій лактату та пірувату в біологічних рідинах. Для поєднання монобіосенсорів у систему було оптимізовано та уніфіковано методи виготовлення біосенсорів та параметри робочого розчину. Було проведено порівняння ефективності різних способів іммобілізації піруватоксидази. Показано, що зміна параметрів робочого розчину (таких як іонна сила діа-

пазоні 1-50 мМ NaCl та концентрація робочого буферу в діапазоні 2-25 мМ) не впливає на роботу біосенсорної системи. Виявлено, що рН оптимум робочого розчину для роботи іммобілізованих ензимів лежить у діапазоні від 7 до 8 та підходить для вимірювання біологічних зразків. Продемонстровано відсутність перехресного впливу субстратів монобіосенсорів, а також впливу концентрації кофакторів та компонентів буферного розчину.

Біосенсорна система відзначалась високою відтворюваністю відгуків та операційною стабільністю. Лінійний діапазон визначення лактату становив від 5 мкМ до 1000 мкМ, визначення пірувату - від 10 мкМ до 5 мМ, з мінімальною межею визначення лактату – 3 мкМ, пірувату – 5 мкМ. Пропоновану біосенсорну систему в подальшому планується використовувати для вимірювання лактату та пірувату у реальних зразках сироватки крові та адаптувати для використання у клінічній діагностиці.

ПОДЯКА

Робота виконана за фінансової підтримки НАН України в рамках комплексної науково-технічної програми «Сенсорні прилади для медико-екологічних та промислово-технологічних потреб: метрологічне забезпечення та дослідна експлуатація».

СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

- [1]. C. S. Pundir, V. Narwal, and B. Batra. Determination of lactic acid with special emphasis on biosensing methods: A review// *Biosens. Bioelectron.*, 86, pp. 777–790 (2016)
- [2]. M. Bhat, K. V. V. Prasad, D. Trivedi, B. Rajeev, and H. Battur. Pyruvic acid levels in serum and saliva: A new course for oral cancer screening?// *J. Oral Maxillofac. Pathol.*, 20(1), p. 102 (2016)
- [3]. M. Fisher. *Lehninger Principles of Biochemistry*, 3rd edition; By David L. Nelson and Michael M. Cox // *Chem. Educ.*, 6(1), pp. 69–70 (2001)
- [4]. B. Batra, V. Narwal, and C. S. Pundir. An amperometric lactate biosensor based on lactate dehydrogenase immobilized onto graphene oxide nanoparticles-modified pencil graphite electrode// *Eng. Life Sci.*, 16(8), pp. 786–794 (2016)
- [5]. O. Kruse, N. Grunnet, and C. Barfod. Blood lactate as a predictor for in-hospital mortality in patients admitted acutely to hospital: a systematic review// *Scand. J. Trauma. Resusc. Emerg. Med.*, 19(1), p. 74 (2011)
- [6]. Z. Zhang and X. Xu. Lactate Clearance Is a Useful Biomarker for the Prediction of All-Cause Mortality in Critically Ill Patients// *Crit. Care Med.*, 42(9), pp. 2118–2125 (2014)
- [7]. N. Gajovic, G. Binyamin, A. Warsinke, F. W. Scheller, and A. Heller. Operation of a Miniature Redox Hydrogel-Based Pyruvate Sensor in Undiluted Deoxygenated Calf Serum// *Anal. Chem.*, 72(13), pp. 2963–2968 (2000)
- [8]. A. Bhat, M. Bhat, K. Prasad, D. Trivedi, and S. Acharya. Estimation of Pyruvic acid in serum and saliva among healthy and potentially malignant disorder subjects - a stepping stone for cancer screening?// *J. Clin. Exp. Dent.*, pp. e462–e465 (2015)
- [9]. R. Monošík, M. Stred'anský, G. Greif, and E. Šturdík. A rapid method for determination of l-lactic acid in real samples by amperometric biosensor utilizing nanocomposite// *Food Control*, 23(1), pp. 238–244 (2012)
- [10]. I. S. Kucherenko et al. Elaboration of Urease Adsorption on Silicalite for Biosensor Creation// *Electroanalysis*, 24(6), pp. 1380–1385 (2012)

Стаття надійшла до редакції 11.10.2017 р.

UDC 543.553+577.15+543.06

DOI <http://dx.doi.org/10.18524/1815-7459.2017.4.119596>

DEVELOPMENT OF AMPEROMETRIC BIOSENSOR SYSTEM FOR SIMULTANEOUS DETERMINATION OF PYRUVATE AND LACTATE

Ya. V. Topolnikova¹, D. V. Knyzhnykova², I. S. Kucherenko¹, S. V. Dzyadevych^{1,2}, O. O. Soldatkin^{1,2}

¹ Institute of Molecular Biology and Genetics, National Academy of Sciences of Ukraine, Zabolotnogo Street 150, 03148, Kyiv, Ukraine, *e-mail*: topolnyk.ya@gmail.com

² Taras Shevchenko National University of Kyiv, Volodymyrska Street 64, 01003, Kyiv, Ukraine

Summary

Measurement of the lactate and pyruvate levels is of great importance in clinical practice. In particular, it can be used for diagnostics of lactic acidosis during, respiratory alkalosis, and other illnesses. The biosensors are promising devices for the determination of lactate and pyruvate concentration.

Aim. The development of a biosensor system for simultaneous analysis of lactate and pyruvate; selection of optimal conditions for integration of monobiosensors in a single measuring system.

Methods. An amperometric method of analysis was used. Amperometric transducer based on platinum disk electrode, auxiliary platinum electrode and Ag/AgCl reference electrode were connected to PalmSens potentiostat (the Netherlands) by three-electrode measuring circuit. Immobilization of lactate oxidase and pyruvate oxidase on the surface of amperometric transducer was carried out in the PVA-SbQ polymer network.

Results. The biosensor system was characterized by high reproducibility and good operational stability at storage over 14 days. There was no significant effect of changes in ionic strength and buffer capacity of buffer solution on biosensor work. The pH optimum of the working solution for immobilized enzymes was found to range from 7 to 8, which is suitable for measurement in biological samples. The linear range of detection of lactate is 5 μM - 1000 μM , of pyruvate 10 μM - 5 mM, minimum detection limit of lactate - 3 μM , pyruvate - 5 μM .

Conclusions. A biosensor system for the simultaneous determination of lactate and pyruvate concentrations was developed. It can be further used for the substrates detection in real biological fluids.

Keywords: lactate, pyruvate, biosensor system, immobilized enzymes, lactate oxidase, pyruvate oxidase

РОЗРОБКА АМПЕРОМЕТРИЧНОЇ БІОСЕНСОРНОЇ СИСТЕМИ ДЛЯ ОДНОЧАСНОГО ВИМІРЮВАННЯ ПІРУВАТУ І ЛАКТАТУ

Я. В. Топольнікова¹, Д. В. Книжникова², І. С. Кучеренко¹, С. В. Дзядевич^{1,2}, О. О. Солдаткін^{1,2}

¹ Інститут молекулярної біології та генетики НАН України, вул. Заболотного, 150, 03148,
м. Київ, Україна, *e-mail*: topolnyk.ya@gmail.com

² Київський національний університет імені Тараса Шевченка, вул. Володимирська, 64, 01003,
м. Київ, Україна

Реферат

Вимірювання рівня лактату та пірувату є важливим у клінічній практиці, зокрема для діагностики лактатацидозу при невідкладних станах та респіраторного алкалозу. На сьогодні існує багато методик визначення концентрації лактату та пірувату, однак найбільшу точність забезпечують біосенсорні технології, які є високоселективними, не потребують попередньої пробопідготовки, а також працюють в режимі реального часу.

Метою даної роботи була розробка біосенсорної системи для одночасного вимірювання лактату та пірувату, підбір оптимальних умов для поєднання монобіосенсорів у біосенсорну систему для одночасного вимірювання лактату та пірувату.

Методи дослідження. В роботі використовували амперометричний метод аналізу. Амперометричні перетворювачі на основі платинових дискових електродів, допоміжний платиновий електрод та Ag/AgCl електрод порівняння за триелектродною схемою вимірювання під'єднувались до потенціостату PalmSens (Нідерланди). Імобілізація лактатоксидази та піруватоксидази на поверхні амперометричного перетворювача здійснювалась за допомогою імобілізації у сітці полімеру PVA-SbQ.

Результати дослідження. Біосенсорна система характеризувалась високою відтворюваністю та доброю операційною стабільністю при зберіганні протягом 14 днів. Було показано відсутність суттєвого впливу на роботу біосенсора зміни таких параметрів буферного розчину як іонна сила та буферна ємність. Виявлено, що рН оптимум робочого буфера для іммобілізованих ензимів лежить у діапазоні від 7 до 8 та підходить для вимірювання біологічних зразків. Лінійний діапазон визначення лактату становить від 5 мкМ до 1000 мкМ, визначення пірувату – від 10 мкМ до 5 мМ, з мінімальною межею визначення лактату – 3 мкМ, пірувату – 5 мкМ.

Узагальнення та висновки. Розроблено біосенсорну систему для одночасного визначення концентрацій лактату і пірувату, яку можна в подальшому використовувати вимірювання субстратів в реальних біологічних рідинах.

Ключові слова: лактат, піруват, біосенсорна система, іммобілізовані ферменти, лактатоксидаза, піруватоксидаза