
БІОСЕНСОРИ

BIOSENSORS

УДК: 543.06 + 577.15 + 543.553

DOI <http://dx.doi.org/10.18524/1815-7459.2018.2.136887>

МАСИВ ФЕРМЕНТНИХ БІОСЕНСОРІВ ДЛЯ ВИЗНАЧЕННЯ КОНЦЕНТРАЦІЙ НЕЙРОТРАНСМІТЕРІВ ТА МЕТАБОЛІТІВ

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

¹Інститут молекулярної біології та генетики НАН України,
вул. Заболотного, 150, 03148, м. Київ, Україна

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

e-mails: didukh.d@gmail.com, kucherenko.i.s@gmail.com, alex_sold@yahoo.com, topolnyk.ya@gmail.com, melonika5@gmail.com, dzyad@yahoo.com, a_soldatkin@yahoo.com

МАСИВ ФЕРМЕНТНИХ БІОСЕНСОРІВ ДЛЯ ВИЗНАЧЕННЯ КОНЦЕНТРАЦІЙ НЕЙРОТРАНСМІТЕРІВ ТА МЕТАБОЛІТІВ

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

Анотація. Метою даної роботи була перевірка можливості створення масиву ферментних біосенсорів для одночасного визначення шістьох речовин у водних розчинах. Ферменти, селективні до глутамату, глюкози, холіну, ацетилхоліну, лактату та пірувату, були іммобілізовані на поверхнях амперометричних перетворювачів. Досліджено вплив рН, іонної сили та буферної ємності розчину на відгуки біосенсорів; оптимізовано умови одночасної роботи всіх біоселективних елементів. Отримано дані про відсутність перехресного впливу субстратів всіх використаних ферментативних систем; показана висока селективність біосенсорів і відсутність впливу інтерферуючих речовин на їх роботу. Створений масив біосенсорів мав хорошу відтво-

рюваність відгуків та стабільність при зберіганні. Використання однакових перетворювачів і схожих умов іммобілізації ферментів роблять біосенсорний масив перспективним для масового виготовлення. Біосенсорний масив придатний для одночасного, швидкого та простого визначення речовин у водних зразках.

Ключові слова: амперометричний перетворювач, масив біосенсорів, глюкоза, глутамат, холін, ацетилхолін, лактат, піруват

AN ARRAY OF ENZYME BIOSENSORS FOR THE DETERMINATION OF CONCENTRATIONS OF NEUROTRANSMITTERS AND METABOLITES

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

Abstract. The purpose of this work was to test the possibility of creating an array of enzyme biosensors for the simultaneous determination of six substances in aqueous solutions. Enzymes, selective for glutamate, glucose, choline, acetylcholine, lactate and pyruvate, were immobilized on the surfaces of amperometric transducers. The influence of pH, ionic strength and buffer capacity of the solution on the response of biosensors was studied; the conditions of simultaneous operation of all bioselective elements were optimized. High selectivity of biosensors and absence of influence of interfering substances on their work was found. The created array of biosensors had good reproducibility of responses and storage stability. The use of identical transducers and similar conditions of immobilization of enzymes make the biosensor array promising for mass production. The biosensor array is suitable for simultaneous, rapid and simple determination of substances in aqueous samples.

Keywords: amperometric transducer, array of biosensors, glucose, glutamate, choline, acetylcholine, lactate, pyruvate

МАССИВ ФЕРМЕНТНЫХ БИОСЕНСОРОВ ДЛЯ ОПРЕДЕЛЕНИЯ КОНЦЕНТРАЦИЙ НЕЙРОТРАНСМИТТЕРОВ И МЕТАБОЛИТОВ

Д. Ю. Кучеренко, И. С. Кучеренко, О. О. Солдаткин, Я. В. Топольникова, Д. В. Книжникова, С. В. Дзядевич, А. П. Солдаткин

Аннотация. Целью данной работы была проверка возможности создания массива ферментных биосенсоров для одновременного определения шести веществ в водных растворах. Ферменты, селективные к глутамату, глюкозе, холину, ацетилхолину, лактату и пирувату, были иммобилизованы на поверхностях амперометрических преобразователей. Исследовано влияние pH, ионной силы и буферной емкости раствора на отклики биосенсоров; оптимизированы условия одновременной работы всех биоселективных элементов. Получены

данные об отсутствии перекрестного влияния субстратов; показана высокая селективность биосенсоров и отсутствие влияния интерферирующих веществ на их работу. Созданный массив биосенсоров имел хорошую воспроизводимость откликов и стабильность при хранении. Использование одинаковых преобразователей и похожих условий иммобилизации ферментов делают биосенсорный массив перспективным для массового изготовления. Биосенсорный массив пригоден для одновременного, быстрого и простого определения веществ в водных образцах.

Ключевые слова: амперометрический преобразователь, массив биосенсоров, глюкоза, глутамат, холин, ацетилхолин, лактат, пируват

ВСТУП

Одночасне визначення концентрації декількох речовин у зразках за допомогою швидкого, надійного та простого методу є бажаним для наукових досліджень та прикладних завдань. Біосенсори є простими у використанні і дешевими приладами, які здатні забезпечити швидкий і досить точний аналіз концентрації речовин. За потреби, біосенсори можуть бути використані для безперервного моніторингу концентрації в реальному часі, наприклад, шляхом поєднання біосенсорів із мікродіалізоною системою чи використання в *in vivo* аналізах [1]. Безумовною перевагою біосенсорів є можливість об'єднання декількох біосенсорів у масиви або мультибіосенсори, що дає змогу одночасно визначати декілька речовин в одному зразку.

Для біологічних досліджень значний інтерес має визначення концентрації нейротрансмітерів та метаболітів. Глутамат та ацетилхолін є найважливішими збуджуючими нейротрансмітерами у нервовій системі. Тому визначення їх концентрації у міжклітинній рідині мозку є актуальною потребою для фармакології та нейрохімії [2], [3]. Холін є попередником у синтезі ацетилхоліну, тому при нестачі холіну виникає ряд нервових розладів [4], [5]. Моніторинг рівня холіну і ацетилхоліну є важливим для виявлення нейродегенеративних захворювань, таких як нервово-м'язові захворювання, хвороба Альцгеймера, міастенія, порушення холінергічної нейротрансмісії [6], [7].

Глюкоза є головним джерелом енергії для функціонування мозку, і займає важливе місце у фізіології мозку. При багатьох хворобах відбуваються порушення мозкового метаболізму глюкози [8]. Піруват утворюється з глюкози як

кінцевий продукт гліколізу, і за аеробних умов може бути далі окиснений до ацетил-коензиму А, який вступає в цикл Кребса. Підвищення рівня пірувату виникає як при підвищеному його утворенні при посиленні аеробних процесів, так і при недостатній утилізації за допомогою піруватдегідрогеназного комплексу. Однак надлишок пірувату швидко перетворюється в лактат при переважанні анаеробних процесів, або ацетил-КоА при переважанні аеробних [9]. Концентрація лактату зростає при гіпоксії, а також при порушеннях системи його утилізації (печінки та нирок). Хоча лактат вважається кінцевим метаболітом у тваринному організмі, існують дані про використання лактату у мозку як джерела енергії та залучення його до інших процесів, через що роль лактату має бути досліджена більш детально [10], [11]. Тому для отримання більш повної картини процесів, що відбуваються в організмі, важливо проводити одночасну оцінку концентрацій глюкози, пірувату та лактату.

Визначення концентрації глюкози, глутамату та лактату є важливим для розуміння динаміки енергетичного балансу мозку [12], [13]. Одночасний моніторинг глюкози, лактату та глутамату є корисним для досліджень енергетичних процесів та комунікації нейронів у мозку [14].

Тому метою нашої роботи було розробити масив біосенсорів для одночасного вимірювання концентрації нейротрансмітерів (глутамату, ацетилхоліну) та метаболітів (глюкози, лактату, пірувату, холіну) у зразках біологічних рідин.

Сучасні методи визначення даних речовин зазвичай базуються на високоефективній рідинній хроматографії або капілярному електрофорезі, а також спектрофотометрії [15]–

[17]. Втім, одночасне визначення декількох речовин даними методами неможливо, і необхідно проводити визначення кожної речовини окремо.

На сьогодні описано декілька масивів біосенсорів та мультибіосенсорів, що здатні визначати деякі з вищезгаданих речовин, проте жоден з масивів не здатен одночасно визначати всі речовини. Zhang та Wan розробили масив амперометричних біосенсорів на основі скловуглецевих дискових електродів та іммобілізованих на їх поверхню оксидаз [14]. Біосенсори були призначені для визначення глюкози, лактату, глутамату та гіпоксантину і мали високу чутливість. Втім, селективність біосенсорів до інтерферентів було досліджено недостатньо (показано відсутність впливу лише аскорбінової та сечової кислот), і немає даних стосовно зберігання біосенсорів. В іншій роботі Yao та Okano запропонували масив амперометричних біосенсорів для визначення глутамату, ацетилхоліну та дофаміну, який базувався на платинових дискових електродах та іммобілізованих на їх поверхню ферментах [2]. Дофамін визначався неселективно за допомогою електроду з нанесеною нафіоновою мембраною. Була добре досліджена селективність біосенсорів, а зберігання біосенсорів не перевіряли. Інший підхід був застосований при створенні мультибіосенсора для визначення холіну, глюкози, глутамату, лактату, лізину та сечової кислоти в роботі [18]. Ферменти були іммобілізовані на поверхню скловуглецевих електродів, а детектували люмінесценцію, що виникала під час окиснення перекису водню. Втім, селективність до інтерферуючих речовин та зберігання біосенсорів не було досліджено.

В даній роботі, описується масив амперометричних біосенсорів, призначений для одночасного визначення глюкози, лактату, пірувату, глутамату, холіну та ацетилхоліну. Запропонований масив може бути використаний для дослідження зразків крові або інших фізіологічних рідин. Також можливе поєднання масиву з мікродіалізною системою для вимірювань концентрації речовин в тканинах в реальному часі.

МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ

Матеріали

В роботі використовувались наступні ферменти: глутаматоксидаза (ГЛОД, ЕС 1.4.3.11) з *Streptomyces sp.* (рекомбінантна) з активністю 7 од.акт./мг фірми Yamasa Corporation (Японія), глюкозооксидаза (ГОД, ЕС 1.1.3.4) з *Aspergillus niger* з активністю 272 од.акт./мг фірми Genzyme (Великобританія), а також лактатоксидаза (ЛОД, ЕС 1.1.3.2) з *Pedococcus sp.* з активністю 35 од.акт./мг, піруватоксидаза (ПОД, ЕС 1.2.3.3) з *Aerococcus sp.* з активністю 54 од.акт./мг, холінооксидаза (ХО, ЕС 1.1.3.17) з *Alcaligenes sp.* з активністю 15 од.акт./мг та ацетилхолінестераза (АХЕ, ЕС 3.1.1.7) з *Electrophorus electricus* з активністю 426 од.акт./мг фірми Sigma-Aldrich (США).

Сироватковий альбумін бика (БСА, фракція V), гліцерол, *m*-фенілендіамін, НЕРЕС, 25% водний розчин глутарового альдегіду, фотополімер на основі полівінілалкоголю, що містив стирилпіридинові групи (PVA-SbQ), нітрат магнію, лактат натрію, піруват натрію, хлорид ацетилхоліну, хлорид холіну, глутамат натрію, аскорбінова кислота, дофамін та сечова кислота були виготовлені фірмою Sigma-Aldrich (США). Тіамінпірофосфат (ТПП), у формі ліофілізату для ін'єкцій, був отриманий від фірми Біофарма (Україна), а KH_2PO_4 – від фірми Хелікон (РФ). Інші сполуки, що використовувались в роботі, були вітчизняного виробництва та мали ступінь чистоти «х.ч.».

Будова амперометричних перетворювачів

Всі біосенсори в складі масиву містили однакові амперометричні перетворювачі на основі платинових дискових електродів. Перетворювачі виготовлялись у нас в лабораторії згідно з раніше описаним алгоритмом [19], [20]. Чутлива частина перетворювача містила платиновий дріт діаметром 0,4 мм, запаятий у кінці скляного капіляра; поверхню періодично поновлювали шліфуванням абразивним папером та мікрочастинками оксиду алюмінію розміром 0,1 мкм та 0,05 мкм. Перед виготовленням біосенсори, поверхню очищували етанолом.

Модифікація амперометричних перетворювачів фенілендіаміном

Запропонований масив біосенсорів призначений для роботи з біологічними зразками, які можуть містити низку електроактивних сполук (аскорбінову кислоту, цистеїн, та ін.). Ці речовини можуть окислюватись на поверхні перетворювача і призводити до хибних результатів біосенсора. Одним з підходів для запобігання цього є нанесення на чутливу поверхню перетворювача напівпроникних мембран перед іммобілізацією біоматеріалу. Такі мембрани можуть обмежувати дифузію великих молекул до поверхні і запобігати їх окисненню.

Простим та ефективним методом нанесення додаткових мембран є електрополімеризація молекул на поверхні електроду при прикладенні потенціалу. Внаслідок цього формується плівка з певним розміром пор. З-поміж широкого класу окси- та аміноароматичних речовин, які здатні до електрополімеризації, в біосенсорах найчастіше використовують ізомери фенілендіаміну [21], [22]. В даних дже-релах було проведено ряд порівняльних досліджень щодо властивостей полімерних мембран на основі полі(фенілендіаміну) (ПФД), отриманих з різних мономерів. В результаті виявилось, що найкращою селективністю характеризувались перетворювачі, модифіковані полімерною плівкою на основі мета-фенілендіаміну. Відповідно, в нашій роботі цю речовину і було використано в якості мономеру для створення додаткової мембрани на поверхні платиногового електроду. Чистий робочий електрод, допоміжний електрод та електрод порівняння занурювали у 5 мМ розчин *m*-фенілендіаміну у 10 мМ калій-фосфатному буфері, рН 7,4, після чого отримували 10-15 циклічних вольтамперограм (без перемішування розчину). Параметри вольтамперограм: початковий потенціал 0 В, кінцевий потенціал +0,9 В, швидкість зміни потенціалу 20 мВ на секунду, крок зміни потенціалу 5 мВ. Мембрану наносили почергово на кожен перетворювач, оскільки потенціостат не дозволяв отримувати циклічні вольтамперограми одночасно на декількох електродах. Після цього, перетворювачі висушували і поверх ПФД мембрани іммобілізували ферменти.

Виготовлення біоселективних елементів біосенсорів

Біоселективні елементи біосенсорів (за винятком біосенсора для визначення пірувату) отримували шляхом ковалентної іммобілізації ферментів і допоміжних речовин на поверхню амперометричних перетворювачів. Зшиваючим агентом виступав глутаровий альдегід, який формує ковалентні зв'язки з аміногрупами ферменту та білків-носіїв.

Вихідний розчин для виготовлення глутамат-чутливого біосенсора містив 8% (тут і дали – масова частка) ГлОД, 4% БСА та 10% гліцерину в 100 мМ фосфатному буфері, рН 6,5. Цей розчин змішували з 0,4% водним розчином глутарового альдегіду в співвідношенні 1:1 і одразу наносили на чутливу поверхню перетворювача, після чого перетворювач висушували протягом 40 хв за кімнатної температури. Після іммобілізації біосенсор розмішували у робочій комірці і відмивали від незв'язаних компонентів біомембрани робочим буфером.

Іммобілізація ферментів при створенні інших біосенсорів (за виключенням біосенсора для визначення пірувату) проводилась за аналогічною процедурою, проте концентрація глутарового альдегіду та час іммобілізації були іншими і були підібрані раніше для кожного біосенсора.

Розчин для створення біосенсора для визначення глюкози містив 5 % ГОД, 3 % БСА, 10 % гліцерину у 20 мМ фосфатному буфері, рН 6,5. Концентрація розчину глутарового альдегіду становила 0,4 %, час іммобілізації складав 40 хв.

Розчин для створення біосенсора для визначення холіну містив 8 % ХО, 4 % БСА, 10 % гліцерину у 100 мМ фосфатному буфері, рН 6,5. Концентрація розчину глутарового альдегіду становила 1,6 %, час іммобілізації складав 10 хв.

Розчин для створення біосенсора для визначення лактату містив 8 % ЛОД, 4 % БСА, 10 % гліцерину у 100 мМ фосфатному буфері, рН 6,5. Концентрація розчину глутарового альдегіду становила 1 %, час іммобілізації складав 40 хв.

Для створення біосенсора для визначення ацетилхоліну проводили дві послідовні іммобілізації – спершу наносили АХЕ, а потім ХО.

Розчин, що містив 0,5 % АХЕ, 5 % БСА, 10 % гліцерину у 100 мМ фосфатному буфері, рН 6,5, змішували з 1 % розчином глутарового альдегіду і наносили на перетворювачі на 10 хвилин. Після цього, розчин, що містив 8 % ХО, 4 % БСА, 10 % гліцерину у такому ж буфері, змішували з 1,6 % розчином глутарового альдегіду і іммобілізували протягом 10 хв.

Розчин для створення біосенсора для визначення пірувату містив 20% ПОД, 5% БСА, 10% гліцеролу в 100 мМ фосфатному буфері, рН 6,5. Його 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 біоселективної мембрани.

Методика вимірювання

Шість амперометричних біосенсорів, допоміжний платиновий електрод та хлорсрібний

електрод порівняння були під'єднані до потенціостату PalmSens (Palm Instruments BV, The Netherlands) через восьмиканальний мультиплексом СН-8 цього ж виробника. Вимірювання проводили за кімнатної температури у відкритій вимірювальній комірці об'ємом 4 мл за постійного перемішування і при прикладеному потенціалі +0,6 V відносно електрода порівняння (методика "amperometric detection", або хроноамперометрія).

В якості робочого буфера використовували 25 мМ HEPES буфер, рН 7,4. Для роботи піруват-чутливого біосенсора до робочого буфера додавали кофактори ПОД – іони магнію (120 мкМ), ТПП (500 мкМ) та іони фосфорної кислоти (20 мМ KH_2PO_4). Концентрації субстратів у робочій комірці задавали шляхом додавання аліквот концентрованих розчинів субстратів (1-50 мМ). Всі вимірювання проводили щонайменше у трьох повторностях; результати на графіках представлені у вигляді

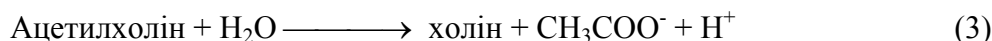
ГлОД



ГОД



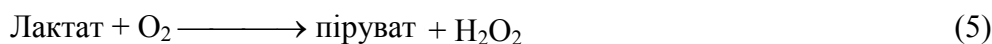
АХЕ



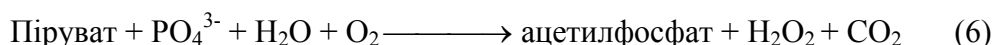
ХО



ЛОД



ПОД



+600 мВ



середнього значення вимірювань \pm середньоквадратичне відхилення.

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Принцип роботи масиву біосенсорів

В основі роботи масиву біосенсорів лежать ферментативні реакції, що протікають в біоселективних мембранах біосенсорів. Біосенсор для визначення глутамату працює на основі реакції (1); біосенсор для визначення глюкози – на основі реакції (2); біосенсор для визначення ацетилхоліну – на основі реакцій (3,4); біосенсор для визначення холіну – на основі реакції (4); біосенсор для визначення лактату – на основі реакції (5); біосенсор для визначення пірувату – на основі реакції (6). В результаті реакцій (1-6) відбувається окиснення субстратів (глутамату, глюкози, ацетилхоліну, холіну, лактату та пірувату) і утворення електрохімічно-активного перекису водню. При прикладанні позитивного потенціалу на електроді відбувається реакція розкладу перекису водню (7), в результаті якої утворюються електрони. Ці електрони безпосередньо реєструються за допомогою амперометричного перетворювача.

Вплив буферної ємності на відгуки біосенсорів

Властивості розчину, в якому проводять вимірювання, впливають на роботу біосенсорів. Зокрема, зміна концентрації робочого буферу або додавання біологічного зразку до біосенсорної комірки автоматично призводить до зміни буферної ємності, що може впливати на роботу біосенсорів. Тому було вирішено дослідити, як зміняться відгуки масиву біосенсорів при різних концентраціях буферного розчину (Рис. 1, А).

Як бачимо, величини відгуків всіх біосенсорів практично не змінювались зі збільшенням концентрації буферу. Швидкість відгуків теж залишилась однаковою. Це дає можливість використовувати пропонувані масив біосенсорів в біологічних зразках, що характеризуються різними буферними ємностями.

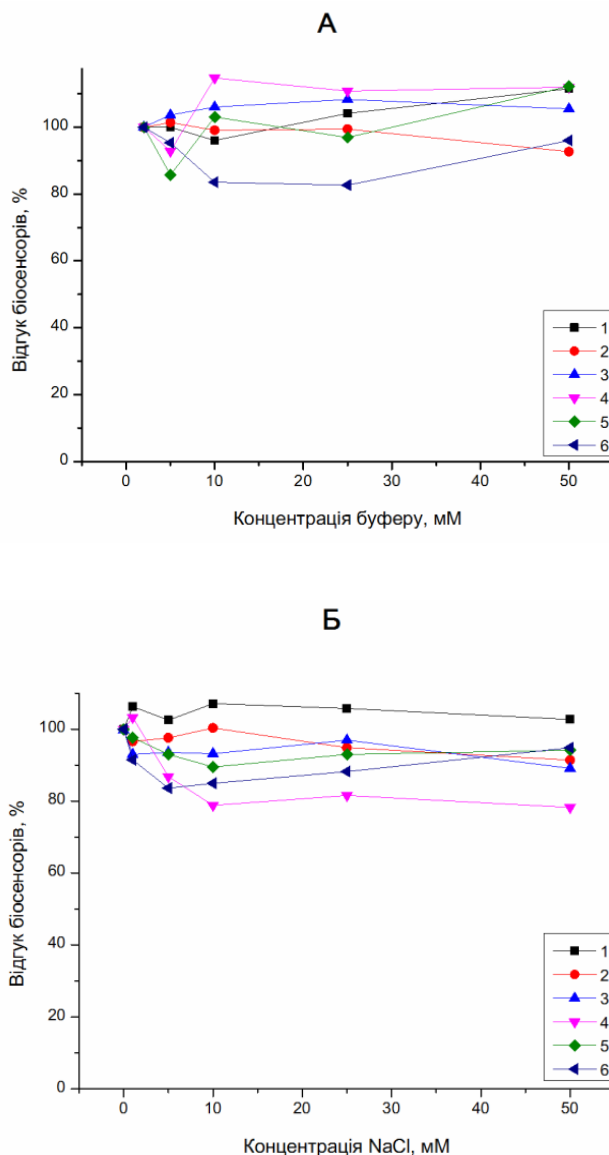


Рис. 1. Залежність величини відгуків масиву біосенсорів від буферної ємності (А) та іонної сили (Б) розчину. Показано відгуки на наступні субстрати: глутамат (1), глюкозу (2), холін (3), ацетилхолін (4), лактат (5), піруват (6). Вимірювання проводились у HEPES буфері з різними концентраціями, рН 7,4, за постійного потенціалу +0,6 В відносно Ag/AgCl електрода порівняння. Відгуки нормалізовано відносно першого значення для кожного біосенсора.

Вплив іонної сили буферного розчину на роботу біосенсорів

Іонна сила є однією з основних характеристик зразку, яка також може впливати на роботу біосенсорів. В розчині можуть бути присутніми іони металів, а також іони органічних та неорганічних кислот, які є в біологічних рідинах. Іонна сила розчину змінюється також залежно від концентрації буферного розчину.

Тому було вирішено дослідити роботу біосенсорів в залежності від різних значень іонної сили. В якості джерела іонів було використано розчин NaCl, який додавали до робочої комірки в різних аліквотах, щоб отримати в робочому буфері концентрації від 0 мМ до 50 мМ. Далі отримували відгуки біосенсорів на відповідні субстрати.

Результати дослідження представлено на Рис. 1, Б. Як бачимо, значних змін відгуків біосенсорів при наявності в робочій комірці різних концентрацій NaCl не спостерігалось, що є типовим для амперометричних біосенсорів. Це свідчить про можливість використання даного масиву біосенсорів в біологічних зразках, що характеризуються різною іонною силою.

Вплив рН буферу на роботу біосенсорів

Будь-який фермент характеризується робочим діапазоном рН і оптимальним значенням рН. За даними виробників, оптимальне значення рН для роботи ГЛОД становить 7-9; ГОД – 5,5 (4-7); ХО – 8,0-8,5; АХЕ – 8,0; ЛОД – 6,5; ПОД – 6,7. Проте рН-оптимум ферментів часто змінюється після іммобілізації і зсувається в більш лужну чи кислотну область. Інколи, робочий діапазон рН стає суттєво ширшим після іммобілізації ферменту [23]. В нашому випадку біосенсори містять ферменти з різними рН оптимумами, тому на початку роботи було необхідно визначити найкраще рН для одночасної роботи всіх біосенсорів.

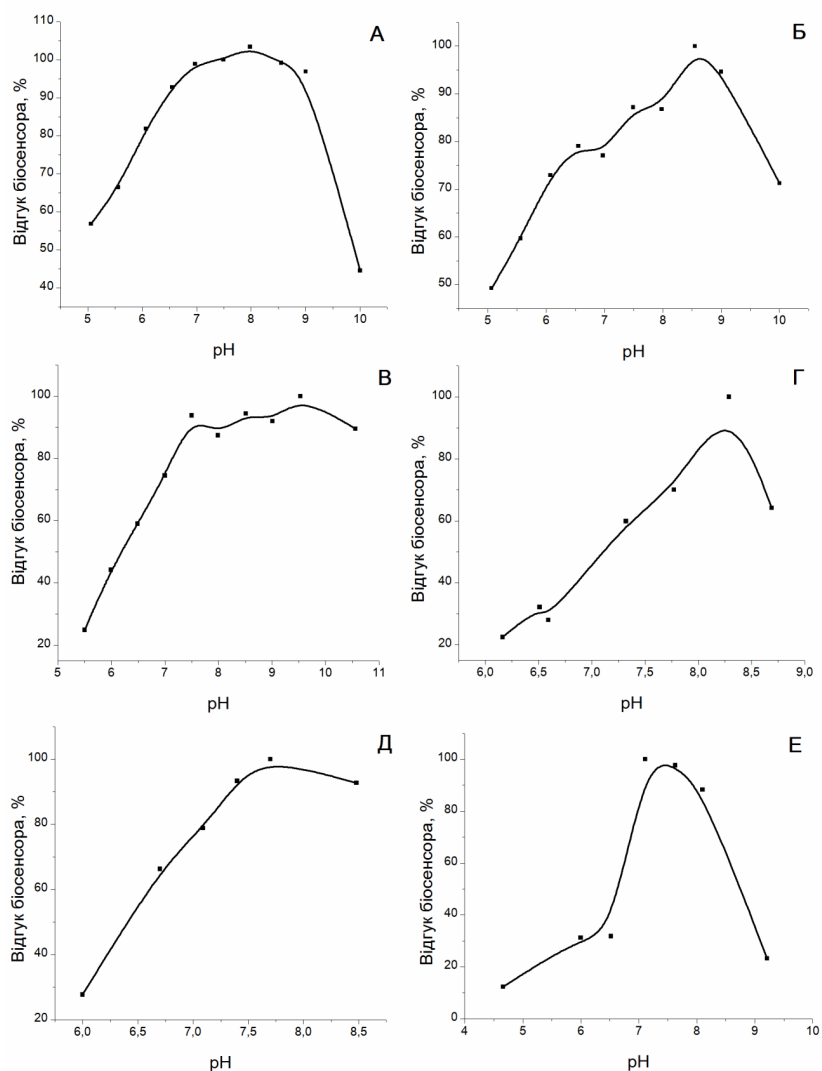


Рис. 2. Залежність величин відгуків масиву біосенсорів від рН буферу. Вимірювання проводили у 5 мМ універсальному буфері, за постійного потенціалу +0,6 В відносно Ag/AgCl електрода порівняння. Показано відгуки на наступні субстрати: глутамат (А), глюкозу (Б), холін (В), ацетилхолін (Г), лактат (Д), піруват (Е). Відгуки нормалізовано відносно максимального значення для кожного біосенсора.

Для проведення експерименту було використано універсальний буфер («полімікс»), що містив тріс-НСІ ($C_4H_{11}O_3N \cdot HCl$), KH_2PO_4 , лимонну кислоту та тетраборат натрію ($Na_2BaO_7 \cdot 10H_2O$) в концентраціях 5 мМ. Цей буфер має приблизно однакову буферну ємність у широкому діапазоні значень рН. Було приготовлено розчини з рН в діапазоні від 4,5 до 10,5, які по чергово поміщали у робочу комірку і отримували відгуки біосенсорів на субстрати. Результати експерименту наведено на Рис. 2. Оптимальне рН для визначення глутамату було 7-9; глюкози – 7,5-9; холіну – 7,5-9,5; ацетилхоліну – 8-8,5; лактату – 7,3-8,5; пірувату – 7-8. Для подальшої роботи було обрано рН 7,4, що відповідає рН крові та інших біологічних рідин і знаходиться в оптимальному діапазоні роботи всіх біосенсорів, за винятком ацетилхолінового. Проте відгуки ацетилхолінового біосенсора при рН 7,4 є достатніми для роботи і те, що рН не відповідає оптимальному рівню, не становить проблеми.

Відтворюваність відгуків масиву біосенсорів

Запропонований масив біосенсорів призначений для багаторазових вимірювань, тому було досліджено відтворюваність відгуків біосенсорів впродовж декількох годин безперервної роботи. Гарна відтворюваність відгуків є важливим показником якості роботи біосенсорів. Для точного вимірювання концентрацій субстратів в розчині, відгуки відповідних біосенсорів повинні бути практично однаковими впродовж роботи, особливо, якщо потрібно вимірювати малі концентрації сполук.

Біосенсори весь час знаходились у робочому буфері, що постійно перемішувався. Одне вимірювання субстрату займало 3 – 5 хв., проміжок між вимірюваннями складав близько 10 хв.; за цей час біосенсори відмивали від субстратів, кілька разів змінюючи робочий буфер. Концентрації субстратів були вибрані з лінійної ділянки калібрувальних кривих для всіх перевірених біосенсорів.

Результати дослідження відтворюваності відгуків біосенсорів представлено на Рис. 3. Всі біосенсори характеризувалися високою відтворюваністю відгуків; відносно середньо-

квадратичне відхилення відгуків в середньому не перевищувало 5 % (див. Табл. 1). Зміни величини відгуків не відбувалось, що свідчить про можливість ефективного використання масиву біосенсорів для проведення багатьох вимірювань впродовж дня.

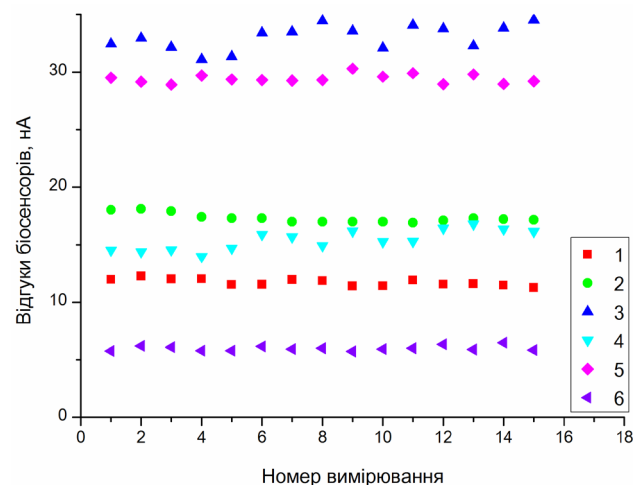


Рис. 3. Відтворюваність відгуків масиву біосенсорів впродовж 15 вимірювань. Концентрації субстратів у комірці: глутамат (1) – 50 мкМ, глюкоза (2) – 100 мкМ, холін (3) – 100 мкМ, ацетилхолін (4) – 100 мкМ, лактат (5) – 50 мкМ та піруват (6) – 250 мкМ. Вимірювання проводились у 5 мМ HEPES буфері, рН 7,4, за постійного потенціалу +0,6 В відносно Ag/AgCl електрода порівняння.

Селективність біосенсорів

Чутливість біосенсорів до інтерферуючих речовин є важливим фактором при роботі з реальними біологічними рідинами. В нашій роботі був використаний безмедіаторний біосенсор з відносно високим робочим потенціалом (+0,6 В відносно Ag/AgCl електрода порівняння), через що на поверхні електрода можливе окиснення ряду електроактивних сполук. Для запобігання цього, на поверхню електрода була нанесена плівка із полі-*m*-фенілендіаміну. Ця плівка пропускала до поверхні електрода перекис водню, проте запобігала дифузії більших молекул. Для підтвердження ефективності плівки, необхідно було перевірити чутливість біосенсорів до поширених електроактивних сполук, а саме до дофаміну (6 мкМ), цистеїну (300 мкМ), аскорбінової кислоти (120 мкМ), сечової кислоти (450 мкМ) та па-

рацетамолу (100 мкМ). Відгуки біосенсорів на всі ці речовини були практично відсутні (< 0,2 нА), що свідчить про високу ефективність захисної плівки.

Крім того, було необхідним перевірити перекресний вплив субстратів, тобто дослідити чутливість кожного біосенсора в складі масиву до субстратів інших біосенсорів. Небажана чутливість біосенсора до чужих субстратів може виникнути в тому випадку, якщо фермент у складі біоселективного елементу біосенсора буде каталізувати розщеплення декількох різних сполук, або якщо біоселективний елемент складається з декількох ферментів (як у випадку біосенсора для визначення ацетилхоліну). З цією метою у робочу комірку додавали глутамат, глюкозу, холін, ацетилхолін, лактат та піруват в концентрації 1 мМ. Було встановлено, що при додаванні кожного субстрату реагує лише відповідний біосенсор, а інші біосенсори не дають відгуку. Єдиним виключенням був біосенсор для визначення ацетилхоліну, який був чутливий не тільки до ацетилхоліну, але і до холіну, оскільки біоселективний елемент біосенсора містить ацетилхолінестеразу та холіноксидазу. Відгук даного біосенсора на

холін становив 109% від відгуку на ацетилхолін. З цієї причини для аналізу реальних зразків слід використовувати одночасно холіновий і ацетилхоліновий біосенсори, щоб можливо було роздільно визначити концентрації холіну та ацетилхоліну. За винятком цього факту, всі біосенсори були селективними до відповідних субстратів і можуть бути використані для аналізу реальних багатокомпонентних зразків.

Аналітичні характеристики масиву біосенсорів

Типові калібрувальні криві біосенсорів для визначення субстратів наведені на Рис. 4, а узагальнені аналітичні характеристики біосенсорів – в Табл. 1.

Всі біосенсори мали невеликий час відгуку (від 1 хв. і менше) і схожу чутливість. Найменш чутливим виявився біосенсор для визначення пірувату, ймовірно через втрату активності ПОД при іммобілізації. Відтворюваність відгуків біосенсорів впродовж дня була високою, що дозволяло використовувати біосенсори багаторазово для точного визначення речовин.

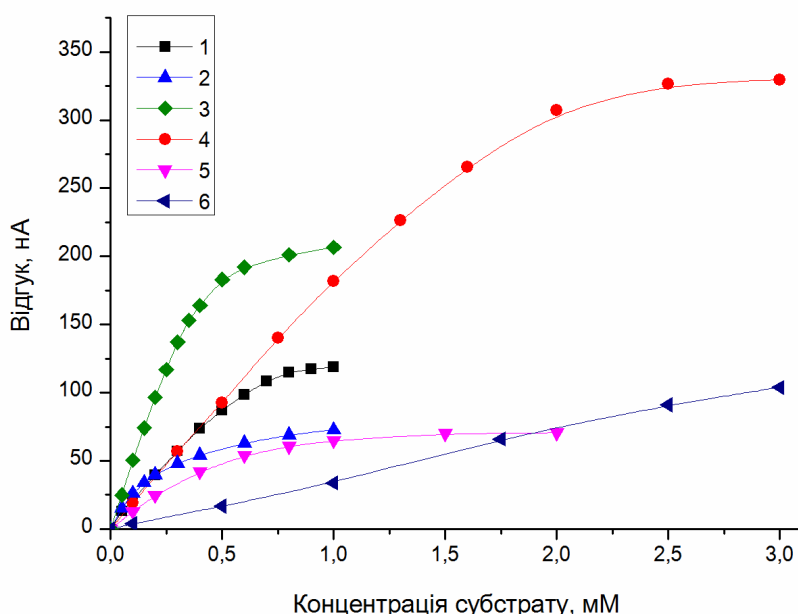


Рис. 4. Калібрувальні криві масиву біосенсорів для визначення: глутамату (1), холіну (2), лактату (3), глюкози (4), ацетилхоліну (5) та пірувату (6). Вимірювання проводились у 25 мМ НЕРЕС буфері, рН 7,4, за постійного потенціалу +0,6 В відносно Ag/AgCl електрода порівняння.

При дослідженні умов зберігання біосенсорного масиву найкращі результати спостерігались при зберіганні біосенсорів у сухому вигляді за температури $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$. Найбільш стабільними при зберіганні виявились біосенсори для визначення глюкози та глутамату, а найменш стабільними – біосенсори для визначення пірувату, лактату та ацетилхоліну. Така розбіжність між біосенсорами пояснюється різною стабільністю іммобілізованих ферментів, які входять до складу біоселективних елементів біосенсорів, оскільки амперометричні перетворювачі можуть зберігатися практично необмежено довго без втрати характеристик.

Слід відмітити, що всі біосенсори базуються на однакових перетворювачах і мають майже однакову процедуру виготовлення. Це спрощує їх масове виготовлення, а також потенційно дає можливість виготовити мультибіосенсор на основі єдиного перетворювача з шістьма чутливими ділянками. Винятком є біосенсор для визначення пірувату, оскільки нам не вдалося розробити ефективну процедуру іммобілізації піруватоксидази із використанням ГА, і довелось використати інкапсуляцію ферменту в фотополімері. Аналогічно, авторами іншої роботи не вдалося використати ГА для іммобілізації піруватоксидази [24].

Таблиця 1.

Аналітичні характеристики масиву біосенсорів.

	Характеристика біосенсора					
	Час відгуку, с	Чутливість до субстрату, нА/мМ	Лінійний діапазон визначення субстрату, мМ	Межа визначення субстрату, мкМ	Відтворюваність відгуків (RSD), %	Зберігання, міс.
Біосенсор для визначення глутамату	10 - 20	170 – 200	0,005 – 0,7	1	2,5	2,5
Біосенсор для визначення холіну	20 - 30	130 – 150	0,001 – 0,2	2	3	1,5
Біосенсор для визначення ацетилхоліну	60 - 150	100 – 120	0,01 – 0,3	3	5	1
Біосенсор для визначення глюкози	10-30	150 – 170	0,01 – 2	1	2	3

продовження таблиці 1

Біосенсор для визначення лактату	60 - 120	440 – 460	0,005 – 0,4	3	2	1
Біосенсор для визначення пірувату	30 - 60	35 – 40	0,01 – 2,5	5	4	1

ВИСНОВКИ

В даній роботі було вперше розроблено масив біосенсорів для одночасного визначення шістьох речовин: глутамату, глюкози, холіну, ацетилхоліну, лактату та пірувату. Досліджено аналітичні характеристики розроблених біосенсорів, такі як чутливість, час відгуку біосенсорів, лінійний діапазон та межа визначення субстрату. Розроблений масив біосенсорів характеризується високою селективністю та відтворюваністю відгуків (середньоквадратичне відхилення відгуків в середньому не перевищувало 5 %).

Було досліджено вплив параметрів робочого буферу на роботу масиву біосенсорів (рН, іонної сили та буферної ємності). Оптимальне рН для роботи біосенсора для визначення глутамату становило 7-9; глюкози – 7,5-9; холіну – 7,5-9,5; ацетилхоліну – 8-8,5; лактату – 7,3-8,5; пірувату – 7-8. Для подальшої роботи було обрано рН 7,4, що відповідає рН крові та інших біологічних рідин. Показано, що іонна сила та буферна ємність робочого буфера практично не впливає на відгуки біосенсорів, що дозволяє використовувати даний масив біосенсорів в розчинах, що характеризуються різною іонною силою та буферною ємністю. Масив біосенсорів можливо зберігати протягом місяця, а біосенсори для визначення глутамату та глюкози – 2,5-3 місяці. Таким чином, розроблений масив біосенсорів є перспективним для подальшої оптимізації та вимірювання даних речовин у реальних біологічних зразках. Перспективне використання даного масиву у проточній комірці, що поєднана з мікродіалізною системою, для вимірювань

концентрації речовин в тканинах в реальному часі. Також можливе додавання інших біосенсорів до складу масиву для розширення спектру речовин, які можливо визначати.

ПОДЯКА

Робота виконана за фінансової підтримки НАН України в рамках цільової програми наукових досліджень НАН України «Розумні» сенсорні прилади нового покоління на основі сучасних матеріалів та технологій».

СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

- [1] O. N. Schuvailo *et al.*, “Carbon fibre-based microbiosensors for in vivo measurements of acetylcholine and choline,” *Biosens. Bioelectron.*, vol. 21, no. 1, pp. 87–94, Jul. 2005.
- [2] T. Yao and G. Okano, “Simultaneous determination of L-glutamate, acetylcholine and dopamine in rat brain by a flow-injection biosensor system with microdialysis sampling,” *Anal. Sci.*, vol. 24, no. 11, pp. 1469–73, 2008.
- [3] T. Borisova *et al.*, “An amperometric glutamate biosensor for monitoring glutamate release from brain nerve terminals and in blood plasma,” *Anal. Chim. Acta*, Mar. 2018.
- [4] J. A. Dani, D. Ji, and F.-M. Zhou, “Synaptic Plasticity and Nicotine Addiction,” *Neuron*, vol. 31, no. 3, pp. 349–352, Aug. 2001.
- [5] R. J. Wurtman, M. Cansev, and I. H. Ulus, “Choline and Its Products Acetylcholine and Phosphatidylcholine,” in *Handbook of Neurochemistry and Molecular Neurobiology*, Boston, MA: Springer US, 2009, pp. 443–501.
- [6] D. Wise, T. Barkhimer, P. Brault, J. Kirch-

hoff, W. Messer, and R. Hudson, "Internal standard method for the measurement of choline and acetylcholine by capillary electrophoresis with electrochemical detection," *J. Chromatogr. B*, vol. 775, no. 1, pp. 49–56, Jul. 2002.

[7] S. Upadhyay, G. R. Rao, M. K. Sharma, B. K. Bhattacharya, V. K. Rao, and R. Vijayaraghavan, "Immobilization of acetylcholineesterase–choline oxidase on a gold–platinum bimetallic nanoparticles modified glassy carbon electrode for the sensitive detection of organophosphate pesticides, carbamates and nerve agents," *Biosens. Bioelectron.*, vol. 25, no. 4, pp. 832–838, Dec. 2009.

[8] P. Mergenthaler, U. Lindauer, G. A. Dienel, and A. Meisel, "Sugar for the brain: the role of glucose in physiological and pathological brain function," *Trends Neurosci.*, vol. 36, no. 10, pp. 587–597, Oct. 2013.

[9] M. Fisher, "Lehninger Principles of Biochemistry, 3rd edition; By David L. Nelson and Michael M. Cox," *Chem. Educ.*, vol. 6, no. 1, pp. 69–70, Feb. 2001.

[10] L. B. Gladden, "Lactate metabolism: a new paradigm for the third millennium," *J. Physiol.*, vol. 558, no. 1, pp. 5–30, Jul. 2004.

[11] L. Riske, R. K. Thomas, G. B. Baker, and S. M. Dursun, "Lactate in the brain: an update on its relevance to brain energy, neurons, glia and panic disorder," *Ther. Adv. Psychopharmacol.*, vol. 7, no. 2, pp. 85–89, Feb. 2017.

[12] M. G. Boutelle, L. K. Fellows, and C. Cook, "Enzyme packed bed system for the on-line measurement of glucose, glutamate, and lactate in brain microdialyzate," *Anal. Chem.*, vol. 64, no. 17, pp. 1790–1794, Sep. 1992.

[13] N. F. Shram, L. I. Netchiporouk, C. Martelet, N. Jaffrezic-Renault, C. Bonnet, and R. Cespuglio, "In Vivo Voltammetric Detection of Rat Brain Lactate with Carbon Fiber Microelectrodes Coated with Lactate Oxidase," *Anal. Chem.*, vol. 70, no. 13, pp. 2618–2622, Jul. 1998.

[14] F.-F. Zhang *et al.*, "Simultaneous assay of glucose, lactate, L-glutamate and hypoxanthine levels in a rat striatum using enzyme electrodes based on neutral red-doped silica nanoparticles," *Anal. Bioanal. Chem.*, vol. 380, no. 4, pp. 637–642, Oct. 2004.

[15] J. Woitzik, N. Abromeit, and F. Schaefer, "Measurement of Nitric Oxide Metabolites in Brain Microdialysates by a Sensitive Fluoro-

metric High-Performance Liquid Chromatography Assay," *Anal. Biochem.*, vol. 289, no. 1, pp. 10–17, Feb. 2001.

[16] J. Zhou, D. M. Heckert, H. Zuo, C. E. Lunte, and S. M. Lunte, "On-line coupling of in vivo microdialysis with capillary electrophoresis/electrochemistry," *Anal. Chim. Acta*, vol. 379, no. 3, pp. 307–317, Jan. 1999.

[17] M. A. Malone, H. Zuo, S. M. Lunte, and M. R. Smyth, "Determination of tryptophan and kynurenine in brain microdialysis samples by capillary electrophoresis with electrochemical detection," *J. Chromatogr. A*, vol. 700, no. 1–2, pp. 73–80, May 1995.

[18] C. A. Marquette, A. Degiuli, and L. J. Blum, "Electrochemiluminescent biosensors array for the concomitant detection of choline, glucose, glutamate, lactate, lysine and urate," *Biosens. Bioelectron.*, vol. 19, no. 5, pp. 433–9, Dec. 2003.

[19] I. S. Kucherenko, D. Y. Didukh, O. O. Soldatkin, and A. P. Soldatkin, "Amperometric biosensor system for simultaneous determination of adenosine-5'-triphosphate and glucose," *Anal. Chem.*, vol. 86, no. 11, 2014.

[20] O. Soldatkin *et al.*, "Monitoring of the velocity of high-affinity glutamate uptake by isolated brain nerve terminals using amperometric glutamate biosensor," *Talanta*, vol. 135, pp. 67–74, Apr. 2015.

[21] S. C. Kelly, P. J. O'Connell, C. K. O'Sullivan, and G. G. Guilbault, "Development of an interferent free amperometric biosensor for determination of l-lysine in food," *Anal. Chim. Acta*, vol. 412, no. 1–2, pp. 111–119, May 2000.

[22] S. J. Killoran and R. D. O'Neill, "Characterization of permselective coatings electrosynthesized on Pt–Ir from the three phenylenediamine isomers for biosensor applications," *Electrochim. Acta*, vol. 53, no. 24, pp. 7303–7312, Oct. 2008.

[23] N. Dizge, O. Gunaydin, F. Yilmaz, and A. Tanriseven, "Immobilization of invertase onto poly(3-methylthienyl methacrylate)/poly(3-thiopheneacetic acid) matrix," *Biochem. Eng. J.*, vol. 40, no. 1, pp. 64–71, May 2008.

[24] M. Situmorang, J. J. Gooding, D. B. Hibbert, and D. Barnett, "The Development of a Pyruvate Biosensor Using Electrodeposited Polypyridine," *Electroanalysis*, vol. 14, no. 1, pp. 17–21, Jan. 2002.

Стаття надійшла до редакції 03.05.2018 р.

UDC: 543.06 + 577.15 + 543.553

DOI <http://dx.doi.org/10.18524/1815-7459.2018.2.136887>

AN ARRAY OF ENZYME BIOSENSORS FOR THE DETERMINATION OF CONCENTRATIONS OF NEUROTRANSMITTERS AND METABOLITES

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

¹Institute of Molecular Biology and Genetics of NAS of Ukraine, 150 Zabolotnogo str., Kyiv, 03148, Ukraine

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

Summary

Aim: the purpose of this work was to test the possibility of creating an array of enzymatic biosensors for the simultaneous determination of glutamate, glucose, choline, acetylcholine, lactate and pyruvate in aqueous solutions.

Methods. The biosensor array consisted of 6 separate biosensors. For their creation, enzymes (oxidases), selective to glutamate, glucose, choline, acetylcholine, lactate and pyruvate, were immobilized on the surfaces of amperometric transducers. During the enzymatic reactions hydrogen peroxide was generated, that was detected by amperometric detection at a constant potential +0.6 V vs Ag/AgCl reference electrode.

Results. The influence of pH, ionic strength and buffer capacity of the solution on the response of biosensors was studied; the conditions of simultaneous operation of all bioselective elements were optimized. It was shown that ionic strength and buffer capacity of the working buffer have insignificant influence on the biosensor responses. High selectivity of biosensors and absence of influence of interfering substances on their work was found. The created array of biosensors had good reproducibility of responses (relative standard deviation was less than 5%). The array can be stored during 1 month, while the biosensors for glucose and glutamate determination – during 2.5-3 months.

Conclusions. The biosensor array for the simultaneous determination of glutamate, glucose, choline, acetylcholine, lactate and pyruvate was created and its characteristics were evaluated. The array is suitable for the rapid and easy determination of the substances in aqueous solutions. The use of identical transducers and similar conditions of immobilization of enzymes make the biosensor array promising for mass production.

Keywords: amperometric transducer, array of biosensors, glucose, glutamate, choline, acetylcholine, lactate, pyruvate

УДК: 543.06 + 577.15 + 543.553

DOI <http://dx.doi.org/10.18524/1815-7459.2018.2.136887>

МАСИВ ФЕРМЕНТНИХ БІОСЕНСОРІВ ДЛЯ ВИЗНАЧЕННЯ КОНЦЕНТРАЦІЙ НЕЙРОТРАНСМІТЕРІВ ТА МЕТАБОЛІТІВ

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

¹Інститут молекулярної біології та генетики НАН України,
вул. Заболотного, 150, 03148, м. Київ, Україна

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

Реферат

Мета: перевірка можливості створення масиву ферментних біосенсорів для одночасного визначення глутамату, глюкози, холіну, ацетилхоліну, лактату та пірувату у водних розчинах.

Методи дослідження. Біосенсорний масив складався з 6 окремих біосенсорів. Для їх створення, ферменти (оксидази), селективні до глутамату, глюкози, холіну, ацетилхоліну, лактату та пірувату, були іммобілізовані на поверхнях амперометричних платинових перетворювачів. В процесі ферментативних реакцій продукувався пероксид водню, який визначали амперометрично при постійному потенціалі +0,6 В відносно Ag/AgCl електрода порівняння.

Результати дослідження. Досліджено вплив рН, іонної сили та буферної ємності розчину на відгуки біосенсорів; оптимізовано умови одночасної роботи всіх біоселективних елементів. Показано, що іонна сила та буферна ємність робочого буфера практично не впливає на відгуки біосенсорів, що дозволяє використовувати даний масив біосенсорів в розчинах, що характеризуються різною іонною силою та буферною ємністю. Отримано дані про відсутність перехресного впливу субстратів всіх використаних ферментативних систем; показана висока селективність біосенсорів і відсутність впливу інтерферуючих речовин на їх роботу. Розроблений масив біосенсорів характеризувався високою селективністю та відтворюваністю відгуків (середньоквадратичне відхилення відгуків в середньому не перевищувало 5 %). Масив біосенсорів можливо зберігати протягом місяця, а біосенсори для визначення глутамату та глюкози – 2,5-3 місяці.

Висновки. Створено масив ферментних біосенсорів для одночасного визначення глутамату, глюкози, холіну, ацетилхоліну, лактату та пірувату і досліджено його аналітичні характеристики. Масив придатний для швидкого та простого визначення речовин у водних зразках. Використання однакових перетворювачів і схожих умов іммобілізації ферментів роблять біосенсорний масив перспективним для масового виготовлення.

Ключові слова: амперометричний перетворювач, масив біосенсорів, глюкоза, глутамат, холін, ацетилхолін, лактат, піруват